

## SISTEMA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GLÚCOSIDOS DE ESTEVIOL EN UN CULTIVO DE RAÍCES DE *STEVIA REBAUDIANA*

Data de aceite: 01/02/2022

### David Paniagua Vega

CONACyT-UANL. Facultad de Medicina.  
Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Monterrey, Nuevo León, México  
ORCID: 0000-0002-2207-580X

### Huerta-Heredia, Ariana Arlene

CONACyT-UNPA. Instituto de Biotecnología.  
Universidad del Papaloapan. Tuxtepec,  
Oaxaca, México  
ORCID: 0000-0003-4182-1529

### Itzel Vianney Alvarado-Orea

División de Estudios de Posgrado. Instituto de  
Biotecnología. Universidad del Papaloapan.  
Tuxtepec, Oaxaca, México  
ORCID: 0000-0002-3240-1170

### Norma Cecilia Cavazos-Rocha

Departamento de Química Analítica. Facultad  
de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo  
León. Monterrey, Nuevo León, México  
ORCID: 0000-0002-6626-3044

**RESUMEN:** Los glucósidos de esteviol (GEs) son edulcorantes naturales no calóricos con demanda comercial creciente. A nivel mundial se ha confirmado que su uso general es seguro. La principal fuente de obtención de GEs son las hojas de *Stevia rebaudiana*. Las raíces de las plantas son capaces de producir GEs, pero en el cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión (CRAIS) se discute sobre su

capacidad biosintética. Una estrategia adecuada de manejo y preparación de la muestra es fundamental para resolver controversias en cuanto a la producción de compuestos de interés. El objetivo del presente trabajo fue establecer una metodología de extracción, limpieza y análisis por infusión directa al módulo de masas en tándem con trampa de iones y ionización por electroespray (DFI-ESI-IT-MS<sup>n</sup>) que permitió confirmar la capacidad biosintética de GEs en una línea de CRAIS de *S. rebaudiana*. Se estableció un sistema de extracción hidrometanólica, seguido de una limpieza del extracto crudo por extracción sólido líquido (SPE) con acetonitrilo-agua y el análisis de los extractos limpios por espectrometría de masas permitió identificar los siguientes GEs: esteviósido, rebaudiósido A y esteviol/isoesteviol. Estos resultados confirmaron la capacidad de biosíntesis de GEs en CRAIS de *Stevia rebaudiana*.

**PALABRAS CLAVE:** Glucósidos de esteviol, SPE, DFI-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión.

### SYSTEM FOR THE IDENTIFICATION OF STEVIOL GLYCOSIDES IN A CULTURE OF *STEVIA REBAUDIANA* ROOTS

**ABSTRACT:** Steviol glycosides (GEs) are natural, non-caloric sweeteners with increasing commercial demand. Worldwide, it has been confirmed that its general use is safe. The main source for obtaining GEs is the leaves of *Stevia rebaudiana*. Plant roots are capable of producing GEs, but in the in vitro suspension cultivation of adventitious roots (CRAIS) their biosynthetic capacity is discussed. An adequate strategy for

managing and preparing the sample is essential to resolve controversies in the production of interest components. The objective of the present work was to establish a methodology for extraction, cleaning and analysis by direct infusion into the mass module in tandem with ion strain and ionization by electrospray (DFI-ESI-IT-MS<sup>n</sup>) that allowed confirming the biosynthetic capacity of GEs in A line of CRAIS from *S. rebaudiana*. A hydromethanolic extraction system was established, followed by cleaning of the raw extract by solid-liquid extraction (SPE) with acetonitrile-water and the analysis of the clean extracts by mass spectrometry allowed the identification of the following GEs: stevioside, rebaudioside A and steviol/isosteviol. These results confirmed the capacity of GEs biosynthesis in *Stevia rebaudiana* CRAIS

**KEYWORDS:** Steviol glucosides, SPE, DFI-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, in vitro suspension cultivation of adventitious roots.

## INTRODUCCIÓN

Los glucósidos de esteviol (GEs) son edulcorantes naturales no calóricos. A nivel mundial se ha confirmado que su uso general es seguro (JECFA, 2016) y se pronostica que en 2022 el mercado de GEs será de alrededor de USD 506 millones (ASKCI, 2017). Adicionalmente, se han reportado diferentes actividades biológicas de los GEs como glucoreguladora, hipotensora, anti-inflamatoria y anticancerígena (Momtazi-Borojeni et al. 2017). La principal fuente de obtención de GEs son las hojas de *Stevia rebaudiana*. Debido a la importancia de la producción de GEs a partir de *S. rebaudiana*, diferentes estudios han reportado el uso de cultivos in vitro en raíces como lo son: raíces transformadas es suspensión (Pandey et al. 2016) y raíces adventicias en suspensión (Reis et al. 2011; Lopes et al. 2016; Reis et al. 2017; Ghazal et al. 2018; Ahmad et al. 2018). Sin embargo, para el cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión (CRAIS) se discute sobre su capacidad biosintética.

El interés en la producción de GEs en CRAIS es debido a que facilitaría el control de calidad (al mantener un perfil de producción estable), ayudaría a la inocuidad del producto (al evitar las contaminaciones propias del cultivo agrícola o convencional) y podría ser escalado a cultivo en biorreactor. Por tanto, es importante evaluar una estrategia de extracción y análisis que aporte información sobre la producción GEs en CRAIS de raíces de *S. rebaudiana*.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue establecer una metodología de extracción, limpieza y análisis por cromatografía de capa fina e infusión directa al módulo de masas en tándem con trampa de iones y ionización por electrospray (DFI-ESI-IT-MS<sup>n</sup>) que permita confirmar la capacidad biosintética de GEs en un CRAIS de *S. rebaudiana*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Establecimiento del cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión

Para el establecimiento de las raíces en medio líquido se colocaron 1.2 g (peso fresco) de explantes de las raíces provenientes de plántulas in vitro de *S. rebaudiana* (Sánchez-Cordova et al. 2019) en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio Murashige & Skoog (MS) a la mitad de concentración (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 2% (p/v) de sacarosa y 0.5 mg/L de ácido indolbutírico (IBA), se ajustó el pH a 6.3 previo a la esterilización. Las raíces se mantuvieron en fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad) a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  a 110 rpm de agitación orbital.

### Extracción y limpieza de glucósidos de esteviol

La extracción de GEs a partir de CRAIS de *S. rebaudiana* se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Bondarev *et al.* (2001). La biomasa se liofilizó, se pulverizó y los GEs se extrajeron dos veces de forma sucesiva con metanol-agua (80:20 v/v), en una relación de 10 mL por cada gramo de biomasa (10:1) y se sonicó por 30 min. Posteriormente, se centrifugó por 15 min a 3500 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se llevó a sequedad. Para la limpieza del extracto de GEs se utilizaron cartuchos Chromabond® C<sub>18</sub> ec (500 mg), siguiendo la metodología de Wöelwer-Rieck *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Los cartuchos se limpiaron con 3 mL de metanol, se acondicionaron con 6 mL de agua y la muestra disuelta en acetonitrilo:agua (10:90) se incorporó al cartucho, se eluyó con 3 mL de agua, 3 mL de acetonitrilo:agua (10:90), se llevó a sequedad por flujo de aire durante 15 min. Los GEs se recuperaron eluyendo con 3 mL de acetonitrilo:agua 80:20. Esta fracción se llevó a sequedad hasta llegar a peso constante.

### Cromatografía de capa fina

Los extractos de raíces de *Stevia rebaudiana* fueron suspendidos en metanol:agua (80:20 v/v), se aplicaron en placa de sílica gel 60 F254. Se utilizaron como estándares el rebaudiósido A (1432- Sigma Aldrich) y esteviosido (50956-Sigma Aldrich). Con una fase móvil de acetato de etilo-etanol-acetona-agua (15:3:6:6) (Londhe y Nanaware, 2013). Las placas se asperjaron con ácido fosfomolibdico diluido, seguido de un calentamiento de 2 a 4 min. La identificación de los GEs en las muestras se llevó a cabo por comparación de los factores de retención con los estándares.

### Análisis de GEs por DFI-ESI-IT-MSn

Los datos espectrales de masas fueron obtenidos por la técnica de infusión directa de los extractos limpios a 10, 20 y 30 ppm en un espectrómetro de masas con trampa de

iones LCQ Fleet (Thermo, San Jose, CA, USA) y una interface por electrospray (Thermo, San Jose, CA, USA) (DFI-ESI-IT-MS<sup>n</sup>) en modo negativo. A una temperatura de capilar de 280 °C, voltaje de spray de 5.00 kV, voltaje del capilar de -35 V, lentes de enfoque a -100 V, a un flujo de 10 µL/min y una energía de colisión de entre 20 y 30 %. Las muestras se analizaron adicionalmente mediante experimentos MS/MS con energía de colisión de entre 20-30% y un tiempo de activación de 30 ms hasta que ceso la fragmentación. A continuación, los iones producto se sometieron a una mayor fragmentación en las mismas condiciones, hasta que no se observaron más fragmentos. Las sustancias se identificaron tentativamente utilizando las pérdidas características y la comparación con el patrón de fragmentación descrito en la literatura y la biblioteca de espectros de masas de MoNA (MassBank of North América, EE. UU.) y la de European MassBank (NORMAN MassBank) y finalmente, fueron identificados utilizando sus espectros de masas en comparación con estándares de interés.

## RESULTADOS

En este trabajo se establecieron condiciones de crecimiento para el cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión (CRAIS) de *S. rebaudiana* Figura 1A. Se observó que las raíces tomaron una coloración verde debido a las condiciones de crecimiento en fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad, además se observó que la producción de biomasa máxima alcanzada durante los 25 días de la cinética de crecimiento fue de 10 g<sub>p.s.</sub>/L.

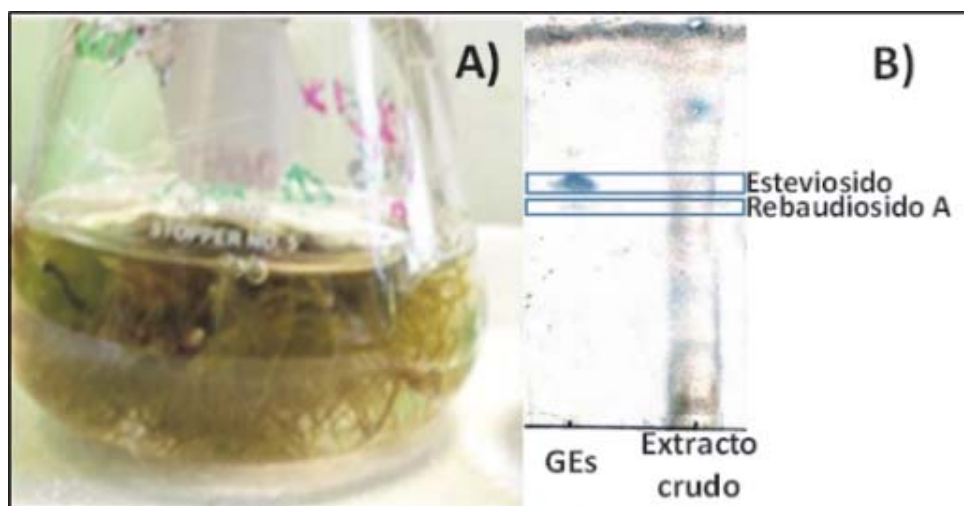


Figura 1. Cultivo in vitro y análisis por cromatografía de capa fina (TLC) donde; A) cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión (CRAIS) de *Stevia rebaudiana* a los 25 días de cultivo y B) identificación por TLC de glucósidos de esteviol (GEs) en el extracto crudo de CRAIS de *Stevia rebaudiana*.

En un primer análisis del extracto crudo de CRAIS de *Stevia rebaudiana* por espectrometría de masas no fue posible verificar la producción de GEs, debido a la baja

intensidad observada de los iones de interés. Como una estrategia complementaria que permitiera evaluar mayor cantidad de extracto crudo. Se procedió a realizar un análisis por cromatografía de capa fina (TLC) donde se comparó el factor de retención de los estándares esteviosido y rebaudiosido A con señales del extracto crudo. La estrategia, fue ir incrementando la masa del extracto crudo colocada en los carriles de las placas y fue posible ver señales que correspondían a los estándares de GEs al cargar la placa de TLC con 48 µg de extracto crudo (Figura 1B).

[M-H] <sup>-</sup>	Fragmentos mayores			Sustancia
	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>	MS <sup>4</sup>	
803	641; 624; 461; 317	479; 413; 521; 593	317	esteviosido <sup>a</sup>
965	803	ND	ND	rebaudiosido <sup>a</sup>
317	249; 273; 299; 231	180; 113; 205	ND	esteviol/isoesteviol <sup>b</sup>

Tabla 1. Análisis de iones precursores y sus fragmentos correspondientes obtenidos por DFI-ESI-IT-MS<sup>n</sup> de extractos de cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión de *Stevia rebaudiana* (modificado de Alvarado-Orea et al., 2020).

<sup>a</sup> Compuestos identificados conclusivamente por comparación con estándares.

<sup>b</sup> Compuestos identificados tentativamente con referencias: Gardana *et al.* 2010; Shafii *et al.* 2012 y bibliotecas.

ND no determinado.

Estos resultados evidenciaron la producción de GEs en CRAIS de *Stevia rebaudiana*, mostrando también que estos estaban presentes en baja cantidad. Para confirmar estos resultados por espectrometría de masas fue necesario implementar una estrategia para disminuir interferencias propias del extracto crudo, para lo cual, se realizó la limpieza del extracto crudo por medio de extracción en fase sólida (SPE) y finalmente, para alcanzar la intensidad de los fragmentos [M-H]<sup>-</sup> necesaria para la identificación en el análisis por DFI-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, fue necesario incrementar la concentración de la muestra de 10 ppm (concentración habitual en este experimento) a 30 ppm. Con este sistema, que consistió de la estrategia combinada de espectrometría de masas y limpieza del extracto crudo por SPE se logró identificar los GEs; esteviósido, el rebaudiósido A y esteviol/isosteviol (**Tabla 1**) a partir de un extracto hidroalcohólico de CRAIS de *Stevia rebaudiana*.

Estos resultados, aportan un sistema de análisis para CRAIS de *Stevia rebaudiana* con potencial aplicación en otros sistemas de cultivo con problemas similares en la identificación de GEs. Aunado a las ventajas del cultivo de raíces, como la posibilidad de llevar a escalamiento, también cabe mencionar que el cultivo de raíces es capaz de incrementar la producción de compuestos de interés en respuesta a diferentes condiciones de estrés, como se observó por Alvarado-Orea et al. (2020) con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En un panorama general se ha observado un interés creciente en los cultivos in vitro de *Stevia rebaudiana*, de acuerdo a Pastrana-Reyes et al. (2021) quienes revisaron el avance en el número de publicaciones al respecto hasta principios del 2021 encontró que de un total de 68 reportes de cultivos de plántulas, brotes, raíces, raíces pilosas y callos de *S. rebaudiana*, de forma general se encontró que el 48.5% de los casos reportó un aumento en la producción de Ges.

## CONCLUSIONES

El sistema implementado en este trabajo, que consistió en la extracción, limpieza y análisis por cromatografía de capa fina y espectrometría de masas permitió validar la capacidad de biosíntesis de GEs en el cultivo de raíces en suspensión de *S. rebaudiana*. Se recomienda evaluar diferentes condiciones de cultivo, adición de agentes que induzcan una mayor producción de GEs y su establecimiento en biorreactor; lo que permitirá establecer un sistema con una producción estable e inocuo para la obtención de GEs. Por otra parte, realizar la validación del método establecido y continuar con la etapa de cuantificación también se recomienda.

## AGRADECIMIENTOS

A los proyectos de investigadores 3212 y 1028 de Cátedras-CONACyT. Y a los proyectos de financiamiento INFRA2015-01-255514, CB-2016- 284813 e INFRA-2015-01-252013.

## REFERENCIAS

Ahmad N, Rab A, Ahmad N, Fazal H (2018) Differential pH-induced biosynthesis of steviol glycosides and biochemical parameters in submerge root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Sugar Tech 20: 100-104.

Alvarado-Orea, I V, Paniagua-Vega, D, Capataz-Tafur, J, Torres-López, A, Vera-Reyes, I, García-López, E, Huerta-Heredia, AA (2020). Photoperiod and elicitors increase steviol glycosides, phenolics, and flavonoid contents in root cultures of *Stevia rebaudiana*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 56(3): 298-306.

ASKCI Consulting Co. Ltd. (2017) Research and Markets. Market Research on Stevioside in China 2017-2022.

Bondarev N, Reshetnyak O, Nosov A (2001) Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Sci 161(1):155-163.

Ghazal B, Saif S, Farid K, Khan A, Rehman S, Reshma A, Fazal H, Ai M, Rahman L, Ahmad N (2018) Stimulation of secondary metabolites by copper and gold nanoparticles in submerge adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). IET nanobiotechnology 12(5): 569-573.

JECFA: The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2017) Compendium of Food Additive Specifications of the 84th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

Londhe SV and Nanaware SM (2013) HPTLC method for simultaneous analysis of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana*. *J AOAC Int* 96(1): 24-6.

Lopes SMS, Francisco MG, Higashi B, de Almeida RTR, Krausová G, Pilau EJ, Gonçalves JE, Gonçalves RAC, de Oliveira AJB (2016) Chemical characterization and prebiotic activity of fructo-oligosaccharides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) roots and in vitro adventitious root cultures. *Carbohydr polym* 152: 718-725.

Momtazi-Borojeni AA, Esmaeili SA, Abdollahi E, Sahebkar A (2017) A review on the pharmacology and toxicology of steviol glycosides extracted from *Stevia rebaudiana*. *Curr Pharm Des* 23: 1616-1622.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-49.

Pandey H, Pandey P, Pandey SS, Singh S, Banerjee S (2016) Meeting the challenge of stevioside production in the hairy roots of *Stevia rebaudiana* by probing the underlying process. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 126: 511-521.

Reis RV, Borges APPL, Chierrito TPC, de Souto ER, de Souza LM, Iacomini M, Gonçalves RAC (2011) Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. *Plant Cell Tissue and Organ Cult* 106(2): 329-335.

Reis RV, Chierrito TPC, Silva TFO, Albiero ALM, Souza LA, Gonçalves JE, Oliveira AJB, Gonçalves RAC (2017). Morpho- anatomical study of *Stevia rebaudiana* roots grown in vitro and in vivo. *Rev Bras Farmacogn* 27: 34-39.

Pastrana-Reyes A M, Robledo-Narváez P N, Huerta-Heredia A A, Paniagua-Vega D (2021) Producción de glucosidos de esteviol por cultivo in vitro de *Stevia rebaudiana*- una revisión. Congreso internacional CUCCAL 13. ISSN-2007-9613.

Sánchez-Cordova Á, Capataz-Tafur J, Barrera-Figueroa B, López-Torres A, Sanchez-Ocampo PM, García-López E, Huerta-Heredia AA (2019) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances steviol glycosides production and growth in *Stevia rebaudiana* plantlets. *Sugar Tech* 21(3): 398-406.

Wöelwer-Rieck U, Lankes C, Pawrzun A, Wust M (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *Eur Food Res Technol* 231(4): 581-588.