



Grado de aceptabilidad de *Stevia* (*Stevia rebaudiana* B.) en infusión en una bebida de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.)

Stevia's (*Stevia rebaudiana* B.) degree of acceptability on a chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) drink infusion

Víctor Vásquez-Villalobos.^a; Raul Blas^b; Luis Collantes^b; Marlon Echevarría^b; Carlos Gordillo^b; Neiver Guerrero^b; Roberto Rodríguez^b; Julia Vásquez^b

^a Departamento de Ciencias Agroindustriales, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, Perú.

^b Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, Perú.

Recibido 01 Noviembre 2012; Aceptado 7 de Diciembre 2012.

RESUMEN

Fue evaluado el efecto del tiempo de infusión y concentración de *Stevia* (*Stevia rebaudiana* B.) (1-4 minutos y 1-3 g/300mL respectivamente) sobre el grado de aceptabilidad en una bebida caliente de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.). Como diseño experimental se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta con un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) a través de 11 ensayos. Hojas de *Stevia*, fueron secadas en estufa a 40°C por 24 horas, posteriormente sometidas a molienda manual, envasadas en diversas proporciones en las bolsitas filtrantes y sometidas en infusión por diferentes tiempos en una bebida de manzanilla. La evaluación del grado de aceptabilidad, se realizó mediante un panel sensorial de 40 panelistas escogidas al azar. Se encontró que el grado de aceptabilidad, presento un modelo matemático de segundo orden, estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos mostraron que, para obtener una mayor aceptabilidad de *Stevia* en una bebida de manzanilla, los rangos óptimos en cuanto al de tiempo de infusión y concentración son de 120-160 segundos a 1.8-2.2 g/300 mL respectivamente.

Palabras clave: *Stevia*, infusión, manzanilla, bolsitas filtrantes, Diseño Compuesto Central Rotacional.

ABSTRACT

Stevia's (*Stevia rebaudiana* B.) effect of infusion time and concentration (1-4 minutes and 1-3 g/300 mL respectively) degree of acceptability in a hot drink of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) was evaluated. The Response Surface Methodology with a Rotational Central Composite Design (DCCR) through 11 trials was used as the experimental design. *Stevia* leaves were dried in an oven at 40 °C for 24 hours. Subsequently they were subjected to hand grinding, packaged in various proportions in small filter bags and subjected again to infusion at different times in a chamomile drink. The evaluation of the degree of acceptability was carried out through a sensory panel of 40 panelists chosen at random. It was found that the degree of acceptability presented a statistically significant second-order mathematical model ($p < 0.05$). The results showed that to obtain a *Stevia's* greater acceptability in a chamomile drink, the optimal ranges in terms of time of infusion and concentration are 120 -160 seconds and 1.8 - 2.2 g/300 mL respectively.

Keywords: *Stevia*, infusion, chamomile, small filter bags, Rotational Central Composite Design.

1. Introducción

Debido al incremento de consumo de biocombustibles, se ha comenzado a utilizar grandes volúmenes de caña de azúcar, así como

glucosa de otros alimentos. Esto ha motivado la búsqueda de sustitutos del azúcar y dentro de esto colateralmente, resolver los problemas de salud ocasionadas por el consumo de la misma (Villagran *et al.*, 2009).

^a Autor para correspondencia.

Email: vvasquez@unitru.edu.pe (V. Vásquez-Villalobos).

Dentro de las alternativas de edulcorantes naturales se encuentra la *Stevia*, considerada más dulce que la sacarosa y carente de calorías (López y Peña, 2004). *Stevia* es un género de aproximadamente 240 especie de hierbas y arbustos en la familia del girasol (*Asteraceae*), nativa de la parte tropical y subtropical de Sur América y América Central. La especie *Stevia rebaudiana* Bertoni, comúnmente conocido como hoja dulce, o simplemente *Stevia*, es cultivada intensamente por sus hojas dulces. Como un sustituto de azúcar, el sabor de la *Stevia* es bajo al principio y de duración más larga que la azúcar; algunos de sus extractos pueden tener un sabor amargo a concentraciones altas (Villagran *et al.*, 2009). El sabor dulce de la planta se debe a un glucósido llamado steviosido, el cual es glicósido diterpénico, compuesto de una aglycona de steviol y tres moléculas de glucosa. Además de steviosido, posee varios compuestos dulces, como el steviobiosido, rebaudiosido A, B, C, D, E, el dulcosido A; los cuales han sido aislados de la hoja de *Stevia*. Todos éstos glicósidos diterpénicos aislados, tienen las misma estructura vertebradora (steviol), pero se diferencian en las cadenas de hidrato de carbono en las posiciones C13 y C19. Los componentes principales de la hoja son, el steviosido (5-10% del peso seco total), el rebaudiosido A (2-4%), el rebaudiosido C (1-2 %) y el dulcosido (0.4-0.7 %) (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

De la *Stevia* se pueden obtener extractos hasta 300 veces más dulce que el azúcar y, ha captado la atención como una alternativa para disminuir su consumo. Las investigaciones médicas también han mostrado las ventajas posibles en el trato de la obesidad y la hipertensión. Como la *Stevia* tiene un efecto insignificante sobre la glucosa en la sangre, resulta atractivo como edulcorante natural para las personas que quieren mantener dietas controladas de carbohidratos. Sin embargo, controversias han limitado su disponibilidad en muchos países; como en los Estados Unidos, la cual fue prohibida en los años 1990, a menos que sea etiquetado como un suplemento (Villagran *et al.*, 2009).

Por otro lado la *Stevia* es una planta considerada por algunos como medicinal, con efectos benéficos sobre la diabetes tipo-2, por poseer glicósidos edulcorantes no aportantes de calorías. Los extractos de *Stevia rebaudiana* contienen un alto contenido de steviol glucósidos diterpenos. El steviosido y el rebaudiosido A, son los principales compuestos responsables de la edulcorancia y normalmente, están acompañados por pequeñas cantidades de otros steviol glucósidos. Se ha reportado que en Japón el 41% de endulzantes consumidos, provienen de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Landázuri y Tigrero, 2009). Kobylewski y Eckhert (2008) en una revisión de

la toxicología del rebaudiosido A, reportan que no produce efecto adverso hemodinámico significativo, en personas con presión arterial normalmente baja o normal, dosificada con 1000 mg/día durante cuatro semanas. Asimismo sostienen, que no afecta la homeostasis de la glucosa o la presión arterial en pacientes con diabetes mellitus tipo-2. El único hallazgo, fue un aumento en los niveles alanina transaminasa (ALT), la cual puede ser indicativo de daño hepático. Este hallazgo, consideran que no es motivo de gran preocupación, pues aseguran que no existe significancia clínica, debido a que los niveles medios se mantienen dentro de los valores normales. Pero se sugieren, que investigaciones adicionales podrían ser necesarias para determinar la causa del incremento y, los efectos a largo plazo del rebaudiosido A, en niveles elevados de ALT. También reportan que estudios de investigación de metabolismo en humanos y en ratas, han demostrado que el rebaudiosido A y el steviosido, tienen vías metabólicas similares con cada especie. Sin embargo el grupo funcional rebaudiosido A extraglucosa, causa diferencias en los parámetros farmacocinéticos. Debido a estas diferencias, los datos sobre la toxicidad para steviosidos no pueden ser asumidos con base adecuada, para evaluar la seguridad del rebaudiosido A. En este sentido han planteado estudios de toxicidad sobre el rebaudiosido A, para establecer conclusiones definitivas acerca de su seguridad.

Estudios de investigación publicados en Toxicología de Suplementación Química y Alimentaria, habían llegado a la conclusión a partir de estudios de metabolismo, que la rata era un modelo ideal para estudios de toxicidad humana de steviol glucósidos. Ambas especies hidrolizan los glucósidos a steviol por la microflora intestinal, pero después de la absorción la ruta metabólica varía. Por lo que si el metabolismo de steviol glucósidos en ratas y seres humanos no es idéntico, la rata no podría ser un modelo ideal para evaluar la toxicidad en humanos (Kobylewski y Eckhert, 2008).

Hutapea *et al.* (1997) han reportado steviol-16, 17-epóxido; un metabolito steviosido. Dada las estructuras de steviosido y rebaudiosido A; manifiestan que la presencia de un epóxido es un metabolito probable y en este sentido, existe la posibilidad de la formación de un metabolito epóxido a partir de un steviol glucósido. Por esta razón han planteado la necesidad de que estos aspectos sean investigados con cuidado, debido a que los epóxidos pueden reaccionar con el ADN y causar mutaciones.

Estudios de genotoxicidad publicados en suplementos de Toxicología Química y Alimentaria, así como otros estudios, han planteado ciertos problemas. Por ejemplo Suttajit

et al., (1993), reportaron resultados positivos en mutaciones reversas, en cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 con y sin extracto S9, en una dosis de 50 mg/placa de steviosido. Controversialmente ciertos estudios en los mismos grupos de publicación, citan resultados negativos de mutagenicidad (Klongpanichpak *et al.*, 1997) utilizando extracto de S9. Se incide en que los resultados mutagénicos de Suttajit, fueron más altos sin S9 y, en este sentido se planteaba que debido a la capacidad del steviosido y rebaudiosido A, de causar mutaciones reversas como las producidas en la TA98, sería necesario investigaciones adicionales, ya que tales mutaciones podrían sugerir la posibilidad de carcinogénesis.

Contrariamente a los hallazgos de Suttajit, Brusick (2008) y Williams y Burdock (2009), han sostenido que estos fueron inconsistentes con otros estudios y que se realizaron con una concentración 10 veces mayor, que la concentración máxima recomendada por la USFDA (*United States Food and Drug Administration*). Incluso sostiene que a una pureza del 99%, un resultado positivo podría fácilmente producirse, debido a la presencia de un contaminante mutagénico no identificado, o contaminantes presentes hasta 500 µg/placa.

Nunes *et al.* (2007) reportaron que el steviosido también causó rotura de ADN en sangre, bazo, hígado y células cerebrales en ratas. Por lo que recomendaban la necesidad de una investigación cuidadosa. Este estudio ha recibido una serie de cuestionamientos y ha sido el foco de varias evaluaciones críticas en publicaciones, por los aspectos técnicos y la interpretación de los datos del estudio (Geuns, 2007; Brusick, 2008; Urban *et al.*, 2013). Por ejemplo, no se observó el daño del ADN hasta la semana 5 del estudio, a pesar de haberse realizado un ensayo cometa, el cual fue diseñado para detectar daños genéticos de corta duración, que se resuelven rápidamente por procesos de reparación normal (Brusick, 2008). Asimismo en el estudio no se incluyó un control positivo, ni se realizó una evaluación de citotoxicidad (Geuns, 2007; Urban *et al.*, 2013).

Por otro lado los resultados presentados por Nunes *et al.* (2007) contradicen los ensayos cometa realizados utilizando protocolo estándar y dosis más altas, que reportaron que extractos de stevia contenían principalmente steviosidos; no pudiendo demostrar efecto genotóxico cuando fueron evaluados diferentes tejidos (Sasaki *et al.*, 2002; Sekihashi *et al.*, 2002).

También se ha reportado que steviol resultó positivo en una prueba mutagénica *umu*, causando aberraciones cromosómicas y mutaciones genéticas en células de mamíferos (Matsui *et al.*, 1996), así como mutagénesis de plásmidos (Matsui *et al.*, 1989). Asimismo Pezzuto *et al.* (1985), encontraron que steviol

originó toxicidad y mutagenicidad en ensayos con *S. typhimurium* cepa TM677, utilizando extracto de S9. Los estudios de Matsui se realizaron con S9. Estos resultados indicaron a los investigadores, que steviol tiene un mutágeno que tendría que ser identificado. En este sentido consideraban estos hallazgos muy importantes, porque el rebaudiosido A es hidrolizado en steviol antes de que se absorba por el tracto gastrointestinal. Mencionaban que anteriormente el rebaudiosido A, se consideraba "Generalmente Reconocido como Seguro" (GRAS – *Generally Recognized as Safe*), pero los intermediarios mutagénicos del steviol, necesitan ser identificado y adicionalmente estudiados. En general, debido a las advertencias planteadas por estos estudios, planteaban como crítico la realización de pruebas adicionales de genotoxicidad para aclarar los riesgos potenciales.

Williams y Burdock (2009) realizaron una batería completa de pruebas de genotoxicidad del rebaudiosido A (pureza 95.6%), siguiendo las normas recientemente aprobadas por la USFDA-2012. Los estudios de steviol glucósidos fueron realizados siguiendo los protocolos de las Directivas para Pruebas de Productos Químicos-2009 (OCDE – *Guidelines for the Testing of Chemicals*-2009). Los ensayos *in vitro* incluyeron el test de Ames (cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 y cepa de *Escherichia coli* WP2 uvrA, con y sin activación metabólica S9; OCDE#471), pruebas de aberraciones cromosómicas de mamíferos (células V79 de hámster chino, con y sin activación metabólica S9; OCDE#473) y el ensayo de linfoma de ratón (L5178Y ± células, con y sin activación metabólica S9; OCDE#476). Para cada uno de estos tres ensayos, la concentración del rebaudiosido A, llegó hasta 5 mg/placa, no produciendo efectos mutagénicos positivos.

Los resultados de Williams y Burdock con micronúcleos y ensayos de Síntesis de ADN no Programada-UDS (*Unscheduled DNA Synthesis*), proporcionan robustez a los ensayos de steviol glucósidos y steviol *in vivo*, así como soporte a los estudios que demuestran que el rebaudiosido A, no es mutagénico *in vitro* (Pezzuto *et al.*, 1985; Urban *et al.*, 2013). Es relevante que Williams y Burdock (2009) hayan encontrado que el rebaudiosido A, no permitió la realización de la prueba hepatocito UDS *in vivo*, un ensayo recomendado por Matsui *et al.* (1996) y Brahmachari *et al.* (2011).

Haciendo eco de la sugerencia de 15 años atrás realizada por Matsui *et al.* (1996), que nuevos estudios deberían llevarse a cabo para investigar el potencial genotóxico de steviol *in vivo*. Investigaciones de Brahmachari *et al.* (2011) y Tandel (2011), llevaron a cuestionar la seguridad

de los steviol glucósidos. Sin embargo Urban *et al.* 2013, sostienen que la información citada en ambos documentos proviene de estudios antiguos, que eran bien conocidos por el Comité de Expertos de la FAO/WHO en Aditivos Alimentarios (JECFA), Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA - *European Food Safety Agency*), Autoridad de Seguridad Alimentaria de New- Australia (ANZFS - *Australia-New Food Safety Authority*), y paneles de expertos que examinaron la seguridad de la *Stevia*. Teniendo en cuenta que preocupaciones de genotoxicidad relacionados con la ingesta de steviol glucósidos, tienden a perpetuarse en la literatura, realizaron: (1) revisión de los estudios de genotoxicidad que constituyen fuentes de incertidumbre, (2) revisión adicional de estudios publicados desde 2008, que pueden dilucidar un potencial de genotoxicidad en seres humanos, y (3) evaluación de la necesidad de realizar estudios adicionales de genotoxicidad *in vivo*.

Terai *et al.* (2002) sostienen TM677 posee alta especificidad, y en este sentido no es apropiada para la evaluación de la seguridad de salud humana. Asimismo Brusick (2008) ha sostenido que la dosis de steviol, produce citotoxicidad excesiva (aproximadamente 100% en el gen de ensayo de mutación y >50% de muerte celular en el ensayo de aberración cromosómica). Estos niveles de citotoxicidad prácticamente eliminan cualquier validez de los estudios, y argumentan que la citotoxicidad fue el responsable de los resultados positivos observados. Asimismo ha manifestado que los resultados de pruebas de Matsui y colaboradores, no han sido relacionados directamente con algún efecto genético adverso conocido, y por lo tanto no son útiles como predictores de riesgo.

Basado en un nivel máximo de ingesta estimada de steviol glucósido de 1.7 mg/kg de peso corporal/día (steviol equivalente), Kobylewski y Eckhert (2008) sostienen que steviol glucósido debe ser considerado un químico de nivel III, para que lo cual la USFDA recomienda estudios de carcinogenicidad en dos especies de roedores (generalmente de ratas y ratones). El valor de las pruebas químicas en las dos especies, lo recomendaban por el hecho de que bioensayos de productos químicos, con una variedad de estructuras que no mostraron carcinogenicidad en ratas, mostraron carcinogenicidad en ratones. Por esta razón recomendaban la realización de un estudio de carcinogenicidad de larga duración, con el rebaudiosido A con ratones, antes que esta sustancia (u otros steviol glucósidos) sean aceptados como un ingrediente GRAS, por la probabilidad de ser consumido por millones de personas. En este sentido manifestaban que la USFDA debería garantizar, que los estudios de toxicidad genética que producen resultados positivos o contradictorios sean repetidos.

Estudios que muestran aducción de ADN relacionados al potencial reactivo de metabolitos (iones carbono de C-13 ó epóxido) de steviol, manifiestan que podrían ser una fuerte adición de datos de genotoxicidad. En este sentido sugieren que la USFDA debería requerir estudios de carcinogenicidad y toxicología en ratas y ratones, antes de aceptar al rebaudiosido A como una sustancia GRAS, o aprobarla como un aditivo alimentario (Kobylewski y Eckhert, 2008).

En contraposición Urban *et al.* (2013), reportan que la seguridad de los steviol glucósidos ha sido ampliamente revisada y discutida, en la literatura publicada, así como por los organismos de seguridad nacionales e internacionales. La Junta del JECFA examinó la seguridad de los steviol glucósidos, concluyendo que el esteviósido y rebaudiosido A, no son genotóxicos (JECFA, 2005).

En el 2008, JECFA estableció una Ingesta Diaria Aceptable (IDA) para steviol glucósidos de 4 mg/kg de peso corporal/día basado en equivalentes de steviol; indicando que consideraban la evidencia presentada en steviol glucósidos, suficientes para asegurar la seguridad en ese nivel de exposición diaria para toda la vida de una persona (JECFA, 2008). Conclusiones similares que steviol glucósidos son seguros en los niveles propuestos de consumo, han sido anunciados por EFSA y ANZFS (Urban *et al.*, 2013).

En los Estados Unidos, aproximadamente 20 paneles de expertos han concluido que preparaciones purificadas de steviol glucósidos, cumplen con el estándar para ser clasificados como GRAS y sus conclusiones han sido notificadas a USFDA (USFDA, 2012).

Sin embargo no es excluyente la importancia de los estudios adicionales *in vivo*, para la evaluación de genotoxicidad de steviol glucósidos. Las principales opiniones expresadas por Brahmachari *et al.*, (2011) y Tandel (2011) son que, mientras la gran mayoría de ensayos de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* han dado resultados negativos, la presencia de respuestas positivas reproducible en el TM677 en ensayos futuros de mutación con *Salmonella* – así como ensayos cometa son considerados por varios expertos como poco fiable – podrían ser indicativo de relevancia de daño del ADN; por lo que sería necesario realizar pruebas adicionales, particularmente con métodos *in vivo*, para eliminar estas preocupaciones. Brahmachari *et al.* (2011) han indicado al hígado, como el más probable órgano para inducir la carcinogénesis por derivados mutágenos del steviol. Por lo tanto, el consumo de steviol glucósidos como el rebaudiosido A pueden ser absorbidos sistémicamente, transportado al hígado donde pueden formar derivados mutagénicos. Por lo que, estudios *in vivo* bien realizados de la

concentración de steviol glucósidos sobre la actividad en el hígado, deben identificar efectos genotóxicos relevantes.

Como se señaló anteriormente, Williams y Burdock (2009) realizaron un ensayo UDS con rebaudiosido A, siguiendo las pautas estándar - OECD#486 (OECD, 2009) con una dosis de 2000 mg/kg, los resultados no mostraron alguna evidencia de genotoxicidad. Sasaki *et al.*, (2002) y Sekihashi *et al.*, (2002), realizaron ensayos estándar cometa en ratones con steviosido, en el que el tejido hepático (entre otros) fueron examinados, para evidenciar daños en el ADN. Los resultados fueron negativos en el hígado, así como otros tejidos en ambos estudios. Sekihashi *et al.* (2002) también probaron directamente el steviol en ensayos cometa a 2000 mg/kg; otra vez, no mostrando evidencias de daño en el ADN del hígado. *Stevia* no solamente se consume en el Japón en donde es parte regular de la dieta diaria, desde la década de los sesenta que fue autorizada por el gobierno. Ha sido utilizada en el Paraguay por las tribus nativas desde mucho antes de la colonización española en el siglo XVI. A pesar que aun no se encuentra oficialmente aprobada para su venta por el gobierno, *Stevia* se utiliza comúnmente en el Paraguay. *Stevia rebaudiana* ha sido aprobada para ser vendida en el Brasil desde 1980, atribuyéndole una serie de aplicaciones, desde el tratamiento para la diabetes, hasta la dilatación de los vasos sanguíneos (Hale, 2001).

En este marco de discusión y basados en la preponderancia de estudios negativos, por parte de autoridades internacionales de seguridad de alimentaria y paneles de expertos, que han concluido que los steviol glucósidos en alimentos no son genotóxicos (JECFA, 2009; ANZFSA, 2008; EFSA, 2010; USFDA, 2012); la presente investigación tuvo por objetivo determinar la influencia del tiempo de infusión y concentración de *Stevia* en el grado de aceptabilidad, utilizada como edulcorante en una bebida caliente de referencia (agua de manzanilla).

2. Materiales y métodos

Se utilizó como materia prima hojas de *Stevia* adquirida en el Mercado Zonal Palermo de la ciudad de Trujillo – Región La Libertad – Perú, para la elaboración del polvo de infusión de *Stevia*, se siguió la secuencia que se observa en la Figura 1. Las hojas de *Stevia* fueron seleccionadas, clasificadas, en forma manual con la finalidad de eliminar sustancias indeseables. El trozado también se realizó por cortado con la finalidad de aumentar el área de exposición y obtener un producto deshidratado uniforme. El secado se llevó a cabo en la estufa a una temperatura de 40 °C por un tiempo de 24 horas. La molienda se realizó mediante la utilización de un mortero, con la finalidad de reducir el tamaño

en forma de polvo que permitió introducirlo a bolsitas filtrantes, las mismas que son utilizadas para infusiones (Figura 2). Una vez que el polvo de *Stevia* fue pesado, se colocó en las bolsitas, las cuales fueron selladas mediante doble sello.

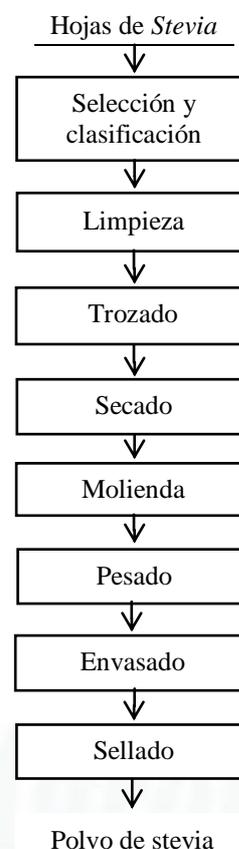


Figura 1. Proceso de elaboración del polvo de *Stevia*.



Figura 2. (a) Polvo de *Stevia*, (b) bolsitas filtrantes con polvo de *Stevia*.

Determinación del grado de aceptabilidad de *Stevia* como edulcorante

El grado de aceptabilidad de *Stevia* utilizado como edulcorante en la bebida caliente de manzanilla, se determinó mediante un panel sensorial de 40 panelistas escogidos al azar, los cuales proporcionaron una puntuación a las muestras, mediante el trazo de una línea vertical y escritura de su codificación, dentro de un recuadro, cuya medida fue de 10 cm, en proporción a su grado de aceptabilidad (método ranking). Según el diseño experimental se contó

con 11 muestras, divididos en dos bloques, de 5 muestras y 6 muestras. Según Jellinek (1964), con 5 muestras para principiantes es suficiente, y para casos con adiestramiento son suficientes 7. Según otros autores deberían ser de 3 a 8 (Christie, 1966). Se debe considerar el producto, intensidad de sabor, capacidad e interés de los jueces. Las muestras de bebida caliente de manzanilla fueron presentadas a los panelistas en vasos de plástico conteniendo 30 mL, cada una con su respectiva codificación. Se tuvo en cuenta la recomendación de Espinoza (2007) de considerar muestras líquidas de 20 a 30 mL.

Análisis estadístico

Se utilizó un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCRR) usando factoriales completos con un planeamiento factorial: $2^n + 2*n + pc$, donde 2 es el número de niveles a ser estudiado (-1; +1); n es el número variables independientes y pc es la cantidad de puntos centrales que se repiten. Un Diseño Compuesto se hace rotacional mediante la elección de α , mostradas en la Tabla 1. El valor de α es a la vez igual a $2^{n/4}$ (Rodríguez e Iemma, 2005).

Tabla 1. Valor de α según el número de variables.

n	2	3	4	5	6
α	± 1.41	± 1.68	± 2.00	± 2.37	± 2.82

En esta investigación se consideraron 2 variables independientes, por lo tanto $2^2 + 2*2 + 3$, totalizando 11 ensayos. Por doble interpolación y para las variables independientes tiempo de infusión y concentración, se calcularon los valores indicados en la Tabla 2, los que sirvieron para la construcción de la matriz de diseño de respuestas (Tabla 3), teniendo como respuesta el grado de aceptabilidad de la *Stevia* como edulcorante.

Tabla 2. Valores utilizados en el DCRR

Variables	Niveles				
	-1.41	-1	0	1	1.41
X ₁ : tiempo (s)	60	86.17	150	213.83	240
X ₂ : concentración (g/300mL)	1	1.29	2	2.71	3

Se elaboró un modelo codificado de segundo orden, de acuerdo a:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2$$

Donde:

Y: respuesta, en función de los coeficientes significativos (grado de aceptabilidad GA).

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{12}$: coeficientes de regresión.

Tabla 3. Matriz de diseño de respuestas.

Ensayos	Variables independientes			
	Codificadas		Reales	
	X ₁	X ₂	Tiempo de infusión (s)	Concentración de <i>Stevia</i> (g/300 mL)
1	-1	-1	86.17	1.291
2	1	-1	213.83	1.291
3	-1	1	86.17	2.709
4	1	1	213.83	2.709
5	-1.41	0	60.00	2.000
6	1.41	0	240.00	2.000
7	0	-1.41	150.00	1.000
8	0	1.41	150.00	3.000
9	0	0	150.00	2.000
10	0	0	150.00	2.000
11	0	0	150.00	2.000

Para validar el modelo se realizó un ANOVA, determinándose el coeficiente de determinación (R²), y el F-cal, el cual, si es mayor que el F-tab., indica que el modelo interpreta adecuadamente la respuesta. Finalmente se construyeron superficies de respuesta para definir las regiones de interés.

3. Resultados y discusión

Grado de aceptabilidad de la *Stevia*

Los resultados obtenidos experimentales para cada tratamiento, son mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores del grado de aceptabilidad de la *Stevia* como edulcorante.

Ensayos	Variables independientes		Variable dependiente
	Tiempo (s)	Concentración (g/300 mL)	Aceptabilidad
1	86.170	1.291	4.30
2	213.830	1.291	3.74
3	86.170	2.709	5.32
4	213.830	2.709	2.70
5	60.000	2.000	4.01
6	240.000	2.000	3.65
7	150.000	1.000	4.56
8	150.000	3.000	5.32
9	150.000	2.000	6.43
10	150.000	2.000	6.00
11	150.000	2.000	6.70

Se muestra la relación que ejerce tanto el tiempo de infusión (segundos) y concentración de *Stevia* (g/300mL), sobre el grado de aceptabilidad de la *Stevia*, como edulcorante en la bebida caliente de manzanilla. Conforme se observa el valor más bajo de aceptabilidad según los panelistas, se presenta en el ensayo 4 con un valor de 2.70, utilizando un tiempo de dilución de 213.83 segundos y una concentración 2.709 g/300mL. Mientras que, el que obtuvo mayor grado de aceptabilidad fue el ensayo 11, la cual pertenece a un tratamiento central. Como también se observa en los centrales (ensayos 9, 10 y 11), las respuestas mostraron muy poca variación, indicando una buena repetición del proceso.

Se observa que en los ensayos 1, 2, 3 y 4, conforme se mantiene constante la concentración de *Stevia* y se incrementa el tiempo de infusión, menor es el grado de aceptabilidad. Del mismo modo se observa que en los ensayos 5, 6, al mantener constante la concentración de *Stevia* e incrementando el tiempo de infusión, el grado de aceptabilidad tiende a disminuir.

Análisis estadístico usando el software Statistica 7.0

Para comprobar la significancia de las variables independientes, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de las mismas. El resultado de este análisis es mostrado en la Tabla 5, donde se puede notar que tanto el tiempo de infusión como la concentración de *Stevia* de grado 2 (cuadrático), influyen de manera significativa en el grado de aceptabilidad, puesto que los valores de p de ambos factores mostrados en la Tabla es muy pequeño ($p < 0.05$). Los valores de p se pueden utilizar como herramienta para verificar la significación de cada coeficiente, que a su vez puede indicar el patrón de la interacción entre los coeficientes (Liu *et al.*, 2003). Cuanto menor sea el valor de p, más significativo es el correspondiente coeficiente (Manimekalai y Swaminathan, 1999).

Tabla 5. Análisis de varianza de las variables independientes.

FACTOR	SS	df	MS	F	p
(1)Tiempo (L)	1.713	1	1.7133	5.5300	0.06543
Tiempo (Q)	10.50	1	10.507	33.914	0.00210
(2) Concen.(L)	0.136	1	0.1368	0.4417	0.53572
Concen.(Q)	3.691	1	3.6913	11.914	0.01820
1L by 2L	1.065	1	1.0650	3.4374	0.12290
Error	1.549	5	0.3098		
Total	16.01	10			

En el diagrama de Pareto mostrado en la Figura 3, se observa de manera gráfica la influencia de cada variable en la respuesta (grado de aceptabilidad), notándose la significancia del tiempo de infusión y concentración de *Stevia* de grado 2.

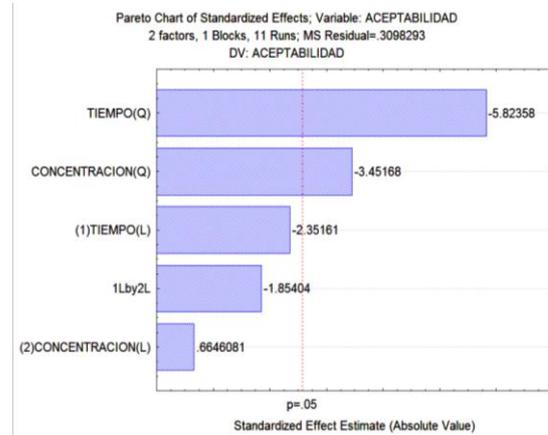


Figura 3. Diagrama de Pareto para las variables independientes.

Modelo matemático

Se encontraron los coeficientes de regresión significativos para la variable respuesta mostrada en la Tabla 6, con las cuales se elaboró un modelo matemático polinómico de segundo orden, para predecir el grado de aceptabilidad (GA) en función del tiempo de infusión (t) y concentración de *Stevia* (C); posteriormente, se realizó un análisis de varianza para verificar la significancia del modelo.

Tabla 6. Coeficientes de regresión para el grado de aceptabilidad de *Stevia*.

FACTOR	Coefficiente de Regresión	Error Estándar	P
Interaccion	-10.3407	3.038543	0.01918
(1) Tiempo (L)	0.1164	0.021462	0.00288
Tiempo (Q)	-0.0003	0.000058	0.00210
(2) Concen. (L)	8.3499	2.103672	0.01064
Concen. (Q)	-1.6139	0.467559	0.01820
1L BY 2L	-0.0114	0.006148	0.12290

(L) = lineal; (Q)= cuadrática

El modelo matemático para el grado de aceptabilidad se denota:

$$GA = -10.3407 + 0.1164 * t - 0.0003 * t^2 + 8.3499 * C - 1.6139 * C^2$$

$$(R^2 = 0.90327, R^2 \text{ Ajustada} = 0.80653)$$

Donde:

GA: grado de aceptabilidad de la *Stevia* como edulcorante.

t: tiempo de infusión de la *Stevia* (segundos).

C: concentración de *Stevia* (g/300mL).

Análisis de varianza del grado de aceptabilidad

A continuación en la Tabla 7, se presenta el análisis de varianza para la variable dependiente (aceptabilidad). Como se observa, el valor de Fcal es mucho mayor al Ftab, lo que indica que el modelo matemático obtenido es altamente significativo, es decir estos describen resultados adecuadamente a través de la Metodología Superficie de Respuesta. Esto, también, se puede confirmar a través de los coeficientes de determinación ($R^2 = 0.90327$, R^2 Ajust. = 0.80653).

Tabla 7. Análisis de varianza para el grado de aceptabilidad.

F.R	S.C	G.L	C.M	F cal.	F tab.
Regresión	157651.69	4	39412.9	33.94	2.71
Error	32516.993	28	1161.3		
Total	190168.684	32			

($R^2 = 0.90327$, R^2 Ajust.= 0.80653)

FR: fuente de regresión
 S.C: suma de cuadrados
 G.L: grados de libertad
 C.M: cuadrados medios

La significancia del modelo y los coeficientes de determinación (R^2) cercanos a 1 ($R^2 = 0.90327$, R^2 Ajust.= 0.80653), indican la concordancia entre los valores observados y predichos, dicha concordancia se observa en la Tabla 8, y gráficamente en la Figura 4.

Tabla 8. Valores observados y predichos del grado de aceptabilidad.

Nº	Tiempo de infusión (s)	Concen-tración de Stevia (g/300 mL)	Grado de Acepta. (observado)	Grado de Acepta. (predicho)
1	86.170	1.291	4.30	4.0132
2	213.830	1.291	3.74	4.1182
3	86.170	2.709	5.32	5.3071
4	213.830	2.709	2.70	3.3482
5	60.000	2.000	4.01	4.3087
6	240.000	2.000	3.65	3.0017
7	150.000	1.000	4.56	4.5795
8	150.000	3.000	5.32	4.9489
9	150.000	2.000	6.43	6.3780
10	150.000	2.000	6.00	6.3780
11	150.000	2.000	6.70	6.3780

El valor R^2 , de la ecuación polinómica de segundo orden obtenido fue de 0.90327, lo que indica que la variabilidad de los valores obtenidos de aceptabilidad, aproximadamente el 90 % podría ser explicado por el modelo ajustado y solo el 10 % no puede ser explicado por el mismo.

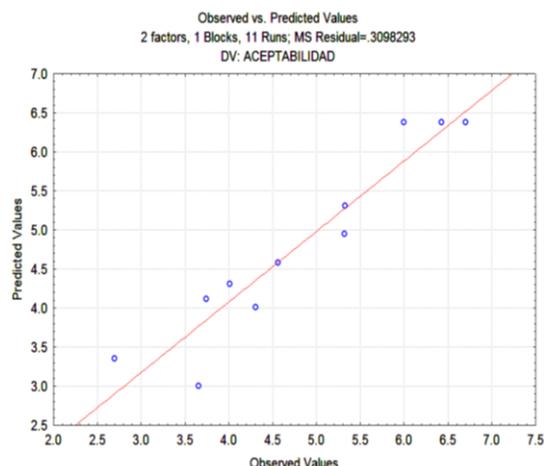


Figura 4. Valores predichos y valores observados para la aceptabilidad.

Los altos valores de coeficiente de correlación R y el coeficiente de determinación R^2 , muestran una estrecha concordancia entre los resultados experimentales obtenidos y los valores predichos por el modelo polinómico (Ferreira-Dias *et al.*, 2003; Abdel *et al.*, 2005). Cuando son cercanos los valores de R (coeficiente de correlación múltiple) a 1; mejor será la correlación entre los valores experimentales y predichos (Wang y Lu, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2000).

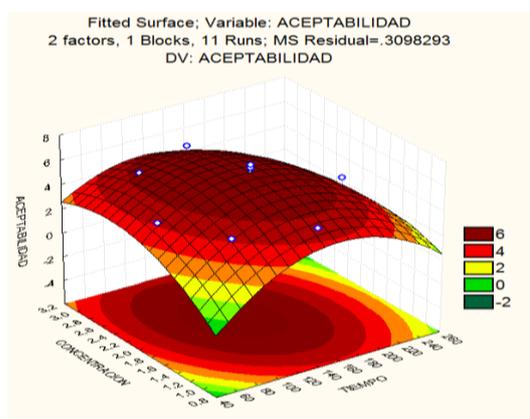
Superficie de respuesta

Tal y como en el análisis de varianza, los métodos son significativos, por tanto valida la construcción de sus respectivas superficies de respuesta y las regiones de interés.

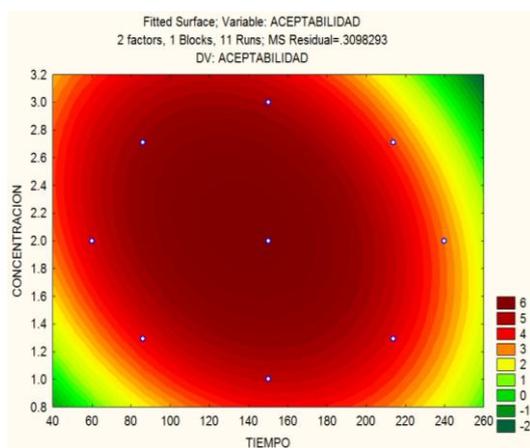
La superficie de respuesta generada por el modelo matemático de segundo orden es mostrada en la Figura 5, en la que puede notarse la influencia del tiempo de infusión y concentración de Stevia en los niveles de aceptabilidad. A través de estos gráficos de tres dimensiones y sus respectivas graficas de contorno, es fácil de entender las interacciones entre dos variables y de localizar los niveles óptimos.

En la Figura 5, se observa el comportamiento que toma el grado de aceptabilidad, dependiendo del tiempo de infusión (segundos) y de la concentración de Stevia (g/300mL).

Se nota que al mantener constante el tiempo de infusión, y al aumentar la concentración, el grado de aceptabilidad tiende a aumentar hasta el valor medio del rango establecido, una vez pasada este valor tiende a tener un efecto inversamente proporcional. Asimismo, al mantener constante una concentración, y al aumentar el tiempo de infusión, el grado de aceptabilidad tiende a aumentar hasta el valor medio del rango establecido, una vez pasada este valor tiende a tener un efecto inversamente proporcional.



(a)



(b)

Figura 5. Superficies de respuesta (a) y curvas de contorno (b), del grado de aceptabilidad, en función del tiempo de infusión y concentración de *Stevia*.

Sensaciones de agrado o desagrado para soluciones puras de los gustos básicos están en relación con la concentración. Sawyer (1971), describió que al incrementar la concentración aumenta la sensación de agrado, pero esto es válido dentro de un rango, ya que a concentraciones mayores la sensación se torna desagradable.

Es por eso que para obtener valores óptimos de aceptabilidad, los rangos óptimos de tiempo de infusión y concentración, se encuentra alrededor de los valores medios, siendo para el tiempo de infusión entre 120-160 segundos y 1.8-2.2 g/300mL para concentración de *Stevia*. Considerando un valor IDA de 4 mg/kg de peso corporal/día de steviol glucósidos (expresado como equivalente de steviol); para una persona de 60 kg, se estima en 240 mg. Si en los tiempos de infusión indicados, se obtiene la máxima extracción con un 10% de steviosidos y rebaudiosido en el polvo de la hoja deshidratada, se tendría una ingesta de 180 a 220 mg, lo que constituye un valor adecuado por día, si se ingiere una taza de 300 mL.

Reportes de EFSA (2010) mencionan que una dosis de 1000 mg de steviol glucósidos/persona por día (97% rebaudiosido A) (corresponden a aproximadamente 330 mg equivalente de steviol/día), no afectan la homeostasis de la glucosa y la presión arterial en individuos con tolerancia a la glucosa normal, o con diabetes mellitus tipo-2. Igualmente repitiendo su uso durante 16 semanas de 1000 mg de rebaudiosido A/persona/día, no altera la homeostasis de la glucosa en individuos con diabetes mellitus tipo-2. Los parámetros de la presión arterial no son afectados significativamente por ingesta de 1000 mg de rebaudiosido A/persona/día, durante 4 semanas en individuos presión arterial sistólica normal y baja. Esta dosis diaria corresponde a 16.6 mg de rebaudiosido A/kg de peso corporal, para una persona 60 kg de peso y a aproximadamente 5.5 mg steviol equivalente/kg de peso corporal/día.

Rodríguez y Sáenz (2005), reportan que un extracto puro de *Stevia* con agua, se encontró una concentración de compuestos polares lo cuales son taninos o compuestos polifenólicos. Además, dentro de los compuestos polares, están steviol, el steviósido y el rebaudiósido-A, así como rebaudiósido-C (dulcósido B), rebaudiósido-D, rebaudiósido-E y dulcósido A, que son los que generan el poder edulcorante en la planta de *Stevia*.

Se han realizado estudios experimentales para evaluar el efecto del extracto de stevia y del steviosido en humanos. Una comida estándar suplementada con 1 g de steviosido administrada a 12 sujetos diabéticos de tipo-2, es capaz de reducir los niveles de glucosa postprandial en sangre sobre un 18% (Gregersen *et al.*, 2004). Se observó un leve incremento en la circulación de insulina y un descenso en los niveles de glucagones. El índice insulinogénico indicó que tras el tratamiento con steviosido se incrementó un 40% la secreción de insulina. No se observó pérdida de glucosa urinaria por el consumo de steviosido, esto implica que el steviosido puede tener un efecto directo en la disposición de la insulina periférica, inducido por la insulina responsable del descenso en los niveles en sangre de glucosa postprandial. Esto puede incluir un aumento en el almacenamiento de glucógeno en el hígado.

En contraste con lo anterior, Barriocanal *et al.* (2008), ha expuesto que el consumo prolongado de steviosido (> 92% pureza) de 250 mg, 3 veces/día durante 3 meses, cantidad similar a la usada como dulcificante, no tiene efectos farmacológicos en individuos diabéticos tanto de tipo 1 como de tipo 2, así como en sujetos normotensos o hipotensos. No se encontró menos glucosa en sangre o presión sanguínea. Se desconoce la explicación a esta carencia de efecto del steviosido, pero se debe señalar que el

steviosido parece tener la habilidad de bajar los niveles de glucosa en plasma y la presión sanguínea, sólo cuando estos parámetros son anormalmente elevados. Estos resultados son consecuentes con aquellos obtenidos previamente a corto plazo sobre los efectos en individuos sanos (Geuns *et al.*, 2007).

De manera similar, el consumo a largo plazo de rebaudiosido A, durante 16 semanas por parte de sujetos con diabetes mellitus tipo-2, no ha tenido efecto en la homeostasis de la glucosa, ni en la presión sanguínea (Maki *et al.*, 2008).

Basado en estudio en células, animales y humanos, steviosido y sus compuestos relacionados (steviol y rebaudiosido A) afectan a la glucosa plasmática, mediante la modulación de la secreción de insulina y la sensibilidad, lo que mejora la eliminación de glucosa en el plasma. También inhiben la absorción de glucosa intestinal y la generación de glucosa por el hígado, alterando la actividad de varias enzimas claves envueltas en la síntesis de la glucosa; reduciendo así el aporte de glucosa plasmática. Existen una serie de efectos anti-hiperglicémicos del steviosido y sus componentes. Es interesante resaltar que los efectos del steviosido, dependen enormemente de los niveles de glucosa plasmática, siendo observados sólo cuando estos son elevados. Así, parece ser totalmente seguro para individuos sanos. De todas formas, el mecanismo de este efecto no se conoce.

Estudios en humanos han mostrado el efecto del steviosido en el sistema cardiovascular. Steviosido causa bradicardia e hipotensión (Humboldt y Boech, 1977). Similarmente, un leve efecto hipotensivo ha sido observado en sujetos humanos que recibieron té de *S. rebaudiana* (extracto de *Stevia*) diariamente, durante 30 días (Boeckh y Humboldt, 1981). En estos estudios, también se sugirió que el steviosido tiene un efecto inotrópico de reducción de la duración de la sístole. Esto reduce la presión arterial sanguínea media. Así, tanto el steviosido como el extracto de stevia parecen tener un efecto anti-hipertensivo.

Los resultados de los ensayos clínicos a largo plazo en humanos con leve y moderado nivel de hipertensión, demostraron que un consumo continuado de steviosido (750 mg/día) por un año, reduce ambas, la presión sanguínea sistólica y diastólica, mientras que no se han observado efectos secundarios significantes o alteración en lípidos (Chan *et al.*, 2000). Subsiguientes estudios hasta 2 años con un incremento de la dosis de steviosido (1500mg/día), permitieron observar una reducción significativa de ambas presiones sanguíneas, sin cambios significativos en el índice de masa corporal, ni en los valores bioquímicos de la sangre, ni en el índice de masa ventricular (Hsieh *et al.*, 2003). Además, se ha podido comprobar que la calidad de vida es

significativamente mejor con steviosido, en comparación con el placebo. Estos resultados refuerzan el papel hipotensivo del steviosido en humanos. Los investigadores concluyeron que el consumo de steviosido a largo plazo es bien tolerado, y debe ser considerado como alternativa o suplemento en terapias con pacientes hipertensivos.

Se han demostrado actividades inmunomoduladoras en vivo de esteviósido (Sehar *et al.*, 2008). El esteviósido (6.25, 12.5 y 25 mg / kg de peso corporal) en ratones alimentados promueven las funciones fagocíticas, como se indica, por un aumento del índice de fagocitosis de la prueba de carbono de compensación y aumento de la respuesta inmune humoral; medida debido a un aumento del número de anticuerpos a la prueba del antígeno. En experimentos *in vitro* también se demostraron los efectos estimulantes de los esteviósidos, en la actividad fagocítica y la proliferación de células B y T, estimuladas por lipolisacáridos y concanavalin A, respectivamente. Estos resultados apoyan aún más la suposición de que el consumo oral de esteviósido, puede ser útil en la promoción de la inmunidad contra la infección por microorganismos.

Según reporte de la Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión (Rodríguez y Sáenz, 2005), el amargor en la *Stevia* se asemeja al dulzor debido a su dependencia de la estereoquímica de las moléculas que desencadenan el estímulo; las dos sensaciones son puestas en marcha por características similares de las moléculas, haciendo que algunas moléculas produzcan ambas sensaciones amarga y dulce, incluso simultáneamente. Por ello se ha apreciado que las muestras con mayor concentración de *Stevia* son menos aceptadas, probablemente a la sensación de sabor generado.

La utilización de la bebida caliente de manzanilla como medio de referencia, puede solapar una apreciación correcta del edulcorante, considerando que la infusión de manzanilla es una bebida de consumo común en la población. Pardo de Santayana y Morales (2006) mencionan que la manzanilla tiene efectos antiinflamatorios, antiespasmódicos, coleréticos y colagogo, así como se sedantes y relajantes. Situación que no se produciría durante la apreciación del panel debido al tiempo reducido que implica el ensayo. Se observó en el análisis sensorial realizado, que los panelistas tuvieron diferente apreciación para cada una de las muestras; según Jellinek (1985), el aparato sensorial humano muestra grados de variación de sensibilidad de persona a persona, de acuerdo a que el mundo individual de sensaciones, es muy diferente; dependiendo del nivel de desarrollo y que la sensibilidad puede ser influenciada fácilmente por circunstancias externas o del medio. Uno de los mayores

problemas asociados al análisis sensorial de los alimentos, es conseguir que la respuesta humana sea precisa y reproducible.

La *Stevia* se puede utilizar en todo, como endulzante, en galletas, horneados, refrescos y en la preparación de cualquier alimento. Pamies (2008) menciona que una taza de azúcar equivale a 1.5 o 2 cucharadas de la hierba fresca o un cuarto de cucharadita de polvo en extracto.

4. Conclusiones

A través de la Metodología de Superficie de Respuesta, se encontró que las variables independientes, tiempo de infusión y concentración de *Stevia*, presentan un modelo matemático estadísticamente significativo ($p < 0.05$), con el cual es posible modelar su grado de aceptabilidad en una bebida caliente de manzanilla. Al aumentar el tiempo de infusión, el grado de aceptabilidad tiende a aumentar hasta el valor medio del rango establecido, una vez pasada este valor tiende a tener un efecto inversamente proporcional. Al aumentar la concentración, el grado de aceptabilidad tiende a aumentar hasta el valor medio del rango establecido, una vez pasada este valor tiende a tener un efecto inversamente proporcional. Según la Metodología de Superficie de Respuesta con un Diseño Compuesto Central Rotacional, los rangos óptimos para una buena aceptabilidad *Stevia* en una bebida de manzanilla, se encuentran entre los valores de tiempo de infusión 120 a 160 segundos, con una concentración de *Stevia* de 1.8 a 2.2 g/300mL.

Referencias bibliográficas

- Abdel, Y.R.; Saeed, H.M.; Gohar, Y.M.; Baz, M.A. 2005. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Proc. Biochem.* 40:1707-14.
- Australia–New Zealand Food Safety Authority (ANZFS). 2008. Steviol glycosides as intense sweeteners. Final assessment report. Application A540. 6.
- Barriocanal, L.A.; Palacios, M.; Benitez, G.; Benitez, S.; Jimenez, J.T.; Jimenez, N. 2008. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regul Toxicol Pharmacol* 51(1), 37–41.
- Boeckh, E.M.A.; Humboldt, G. 1981. Efeitos cardiocirculatorios do extrato aquoso total em individuos normais e do esteviosideo em ratos. *Cienc Cult* 32, 208–210.
- Brahmachari, G.; Mandal, L.C.; Roy, R.; Mondal, S.; Brahmachari, A.K. 2011. Stevioside and related compounds – molecules of pharmaceutical promise: a critical overview. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 344, 5-19.
- Brusick, D.J. 2008. A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food Chem. Toxicol.* 46, 83-91.
- Chan, P.; Tomlinson, B.; Chen, Y.J.; Liu, J.C.; Hsieh, M.H.; Cheng, J T. 2000. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 50(3), 215–220
- Chatsudthipong, V.; Muanprasat, C. 2009. El esteviosido y sus compuestos relacionados: Los beneficios terapéuticos más allá de la dulzura. *Pharmacology & Therapeutics* 121: 41–54.
- Christie, E. 1966. *Practical Aspects of Tasting Tests*, Food Technology, New Zealand. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/wittinge01/capitulo03/02.html.
- Espinoza, J. 2007. Evaluación sensorial de los alimentos. Editorial Universitaria. Edición Dr. C. Torricella Morales. La Habana, Cuba.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2010. Scientific opinion of the panel on food additives and nutrient sources (ANS) on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA J.*; 8(4): 1537.
- Ferreira-Dias, S.; Correia, A.C.; Da Fonseca, M.M.R. 2003. Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides. *Jour. Mol. Catal. B: Enzymtic.* 21:71-80.
- Geuns, J.M.C. 2007. Comments to the paper by Nunes *et al.* (2007), Analysis of genotoxic potential of stevioside by comet assay. *Food and Chemical Toxicology* 45. 662-666. *Food Chem. Toxicol.* 45(12): 2601-2602.
- Geuns, J.M.C.; Buyse, J.; Vankeirsbilck, A.; Temme, E.H.M. 2007. Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Exp Biol Med* 232(1), 164–173.
- Gregersen, S.; Jeppesen, P.B.; Holst, J.J.; Hermansen, K. 2004. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism* 53(1), 73–76.
- Hale, A.D. 2001. *Stevia rebaudiana*: propiedades, mercados y factibilidad de producción de un cultivo de venta al contado en Bolivia. Chemonics International INC. Disponible en: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNACU375.pdf.
- Hsieh, M.H.; Chan, P.; Sue, Y.M.; Liu, J C.; Liang, T.H.; Huang, T.Y. 2003. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clin Ther* 25(11), 2797–2808.
- Humboldt, G.; Boech, E.M. 1977. Efeito do edulcorante natural (stevioside) e sintético (sacarina) sobre o ritmo cardiaco em ratos. *Arq Bras Cardiol* 30, 257–277.
- Hutapea A.M.; Toskulkao, C.; Buddhasukh, D.; Wilairat, P.; Glinsukon, T. 1997. Digestion of stevioside, a natural sweetener, by various digestive enzymes. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 23, 177-186.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2005. Steviol glycosides. In: 63rd Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, WHO Technical Report Series 928, pp. 34-39 and 138.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2008. Compendium of Food Additive Specifications. Monograph 5. Steviol glycosides.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2009. Steviol glycosides (addendum). In: 69th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, WHO Food Additive Series 60, pp. 183-219.

- Jellinek, G. 1964. Introduction to and critical review of modern methods of sensory analysis (odour, taste and flavor evaluation) with special emphasis on descriptive analysis. *J. of Nutr. and Dietetics*. 1: 219-289.
- Jellinek, G. 1985. *Sensory Evaluation of Food. Theory and Practice*. England: Ellis Horwood. Chichester England.
- Klongpanichpak, S.; Temcharoen, P.; Toskulkao, C.; Apibal, S.; Glinsukon, T. 1997. Lack of mutagenicity of stevioside and steviol in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100. *J. Med. Assoc. Thai*. 1: 121-128.
- Kobylewski, S.; Eckhart, C. 2008. Toxicology of Rebaudioside A: A Review. University of California, Los Angeles. 1-26. Disponible en: http://www.cspinet.org/new/pdf/stevia-report_final-8-14-08.pdf.
- Landázuri, P.; Tigrero, J. 2009. *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Escuela Politécnica del Ejército. Bol. Téc. Edición Especial. ESPE. Sangolquí, Ecuador.
- Liu, J.Z.; Keng, L.P.; Zhang, Q.L.; Xu, H.; Ji, L.N. 2003. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology. *World J Microbiol and Biotechnol*. 19:317-323.
- López, L.; Peña, L. 2004. Plan estratégico para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de edulcorante a base de Stevia. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ingeniería Industrial. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ingenieria/tesis17.pdf>.
- Maki, K.C.; Curry, L.L.; Reeves, M.S.; Toth, P.D.; McKenney, J.M.; Farmer, M.V. 2008. Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food Chem Toxicol* 46(7 Suppl 1), S47-53.
- Manimekalai, R.; Swaminathan, T. 1999. Optimization of lignin peroxidase production from *Phanerochaete chrysosporium* using response surface methodology. *Bioproc Eng*. 21:465-468.
- Matsui, M.; Matsui, K.; Nohmi, T.; Mizusawa, H.; Ishidate, J.M. 1989. Detection of deletion mutations in pSV2-gpt plasmids induced by metabolically activated steviol. Selected abstracts of the 17th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan. *Mutat. Res*. 216, 353-385.
- Matsui, M.; Matsui, K.; Kawasaki, Y.; Oda, Y.; Nogushi, T.; Kitagawa, Y.; Sawada, M.; Hayashi, M.; Nohmi, T.; Yoshihira, K.; Ishidate, Jr.; Sofuni, T. 1996. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis* 11: 573-579.
- Nunes, A.P.M.; Ferreira-Machado, S.C.; Nunes, R.M.; Dantas, F.J.S.; De Mattos, J.C.P.; Caldeira-de-Araújo, A. 2007. Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. *Food Chem. Toxicol*. 45, 662-666.
- OECD, 2009. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 4: health effects. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Available from: <http://titania.sourceoecd.org/v1=785010/cl=26/nw=1/rpsv/cw/vhosts/oecdjournals/1607310x/v1n4/contp1-1.htm>
- Pamies, J. 2008. Documento Manual de cultivo y usos de la Stevia. Disponible en: <http://joseppamies.wordpress.com/manual-de-cultivo-y-uso-de-la-stevia/>
- Pezzuto, J.M.; Compadre, C.M.; Swanson, S.M.; Nanayakkara, N.P.D.; Kinghorn, A.D. 1985. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2478-2482.
- Rodríguez, M.; Iemma, A. 2005. *Planeamiento de experimentos y optimización de procesos*. Edit. Casa do Pao. Brasil.
- Rodríguez, J.E.; Sáenz, M.A. 2005. Obtención de un edulcorante natural proveniente de *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Universidad EARTH. Pp. 6. Disponible en: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/dpg/200533.pdf>
- Pardo de Santayana, M.; Morales, R. 2006. Manzanillas ibéricas: historia y usos tradicionales. *Revista de Fitoterapia*. 6: 143-153. Disponible en: http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF6-2_manzanillas.pdf
- Sasaki, Y.F.; Kawaguchi, S.; Kamaya, A.; Ohshita, M.; Kabasawa, K.; Iwama, K.; Taniguchi, K.; Tsuda, S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res*. 519, 103-119.
- Sawyer, M. 1971. The Role of Sensory Evaluation in the Food Industry. Interaction of Sensory Panel and Instrumental Measurements. *J. of Food Technol*. 25:247.
- Sehar, I.; Kaul, A.; Bani, S.; Pal, H.C.; Saxena, A.K. 2008. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chem Biol Interact* 173(2), 115-121.
- Sekihashi, K.; Saitoh, H.; Sasaki, Y.F. 2002. Genotoxicity studies of stevia extract and steviol by the comet assay. *J. Toxicol. Sci*. 27, 1-8.
- Suttajit, M.; Vinitketkaumnuen, U.; Meevatee, U.; Buddhasukh, D. 1993. Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from stevia rebaudiana bertoni. *Environ. Health Perspect. Suppl*. 101, 53-56.
- Tandel, K. R. 2011. Sugar substitutes: health controversy over perceived benefits. *J. Pharmacol. Pharmacother*. 2, 236-243.
- Terai, T.; Ren, H.; Mori, G.; Yamaguchi, Y.; Hayashi, T. 2002. Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in *Salmonella typhimurium* TM677. *Chem. Pharm. Bull*. 50, 1007-1010.
- Urban, J. D.; Carakostas, M. C.; Brusick, D. J. 2013. Steviol glycoside safety: Is the genotoxicity database sufficient? *Food and Chemical Toxicology* 51. 386-390
- United States Food and Drug Administration (USFDA), 2012. GRAS Notice Inventory, GRN: 252, 253, 275, 278, 283, 287, 303, 304, 328, 323, 329, 349, 354, 365, 367, 369, 380, 388, 395, 418. Disponible en: www.accessdata.fda.gov/scripts/cfn/cfnNavigation.cfm?pt=grasListing
- Vasconcelos, A.F.D.; Barbosa, A.M.; Dekker, R.F.H.; Scarminio, I.S.; Rezende, M.I. 2000. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Proc Biochem*. 35:1131-1138.
- Villagran, A.; Huayamave, C.; Lara, J.; Maluk, O. 2009. *Stevia: Producción y Procesamiento de un Endulzante Alternativo*. Escuela superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/5208/1/8555.pdf>
- Wang, Y.X.; Lu, Z.X. 2005. Optimization of processing parameters for the mycelial growth and extracellular polysaccharide production by *Boletus* spp. *ACCC* 50328. *Proc Biochem*. 40:1043-1051.
- Williams, L.D.; Burdock, G.A. 2009. Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. *Food Chem. Toxicol*. 47, 1831-18.