COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE RESIDUOS POST SELECCIÓN Y HOJAS SECAS PARA EXTRACCIÓN DE STEVIÓSIDOS DE *Stevia rebaudiana* BERTONI.

IN VITRO DIGESTIBILITY COEFFICIENT AND CHEMICAL COMPOSITION OF POST SELECTION RESIDUES AND DRY LEAVES FOR STEVIOSIDE EXTRACTION FROM *Stevia rebaudiana* BERTONI.

Criscioni P¹; Valiente OL¹; Gauna L¹; Castellani G¹

¹ Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Bromatología, Nutrición y Alimentación Animal

RESUMEN. El objetivo de este experimento fue valorar el coeficientes de digestibilidad in vitro y la composición química de residuos post selección y hojas secas para extracción de steviósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Ka'á He'é). Para la digestibilidad in vitro fueron utilizadas dos ovejas mestizas canuladas en el rumen, que tuvieron un periodo de adaptación a la dieta de 12 días previo a la extracción de líquido ruminal, las muestras para composición química fueron recogidas de una industria extractora de steviósidos. Los análisis bromatológicos y digestibilidad in vitro se realizaron siguiendo los métodos de la AOAC (2000) y Tilley y Terry (1963) respectivamente. Los resultados obtenidos en cuanto a la composición química en base parcialmente seca para Materia Seca a 105°C (MS) de Residuos 89,99 y 91,71%; para hojas y en base seca para Proteína Bruta (PB): 15,49 y 15,47%; FND 29,96 y 24,63%; Extracto Etéreo (EE) 10,15 y 6,39%, Energía Bruta (EB) 4,3 y 4,1 Mcal/kg para residuos post selección y hojas, respectivamente. En cuanto a los coeficientes de digestibilidad in vitro de la Materia Seca (%DMSIV) y de la Materia Orgánica (%DMOIV) fueron de 51,22 y 53,34% y 52 y 54,57% para residuos post selección y hojas respectivamente.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana* Bertoni, digestibilidad in vitro, composición química, rumiantes.

ABSTRACT. The objective of this experiment was to valuate digestibility coefficient in vitro and chemical composition of post selection residues and leaves of the (*Stevia rebaudiana* bertoni) Ka'á He'é. For the in invitro digestibility were used two fistulated, crossbred sheep previously adapted (12 d.) to the diet prior to the extraction of ruminal liquid. The samples for chemical composition were extracted of an industry. Chemical composition and in vitro digestibility were made following methods of AOAC (2000) y Tilley y Terry. (1963). The results obtained in relation to the bromatological composition in dry base were the following Dry Matter (MS) for Residues 89.99%; Sheets 91.71%; Crude Protein (PB): 15.49%; 15.47%; NDF 29.96% and 24.63%; Respectively, Gross Grease (G.B) 10.15% and 6.39%, Gross Energy (E.B.) 18 and 17 Mj / kg. As regards the in vitro digestibility coefficients of Dry matter (% DMSIV) and in vitro digestibility of Organic Matter (% DMOIV) was 51.22 and 53.34% for post selection residues and 52 and 54.57% for leaves respectively.

Keywords: *Stevia rebaudiana* Bertoni, in vitro digestibility, chemical composition, ruminants.

doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2017.07.01.07-11

Dirección para correspondencia: Dra. Patricia Criscioni - Departamento de Bromatología, Nutrición y Alimentación Animal. - Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Asunción - Casilla de Correo N° 1061 - Ruta Mcal. Estigarribia Km 10,5- Campus Universitario - San Lorenzo- Paraguay

E-Mail: pcriscioni@vet.una.py

Recibido: 26 de abril de 2017/ **Aceptado:** 05 de mayo de 2017

INTRODUCCIÓN

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es un arbusto perenne nativo de Paraguay. Produce edulcorantes bajos en calorías y de alta capacidad de endulzar en su tejido foliar. Este edulcorante fue utilizado durante siglos por los indígenas guaraníes para contrarrestar el sabor amargo de varias infusiones medicinales y bebidas vegetales. El botánico suizo Moisés Santiago Bertoni fue el primero en describir la planta en 1887 destacando su sabor dulce, y fue quien propuso su clasificación botánica en 1899. La segunda parte del nombre se le atribuye al químico paraguayo Ovidio Rebaudi, que en 1900 logró aislar los principios activos responsables del dulzor (1). Los componentes más importantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni incluyen los glicósidos de esteviol, que gracias a su alto potencial edulcorante se puede agregar a los alimentos y bebidas; el esteviósido tiene un ligero sabor amargo, pero proporciona 250 a 300 veces más dulzor que el azúcar (2).

Las hojas frescas de *Stevia* tienen un alto contenido de agua que va de 80 a 85% (3). La mayor concentración de esteviósido se encuentra justamente en las hojas, lo que sugiere que estas sirven como el principal tejido para la síntesis y acumulación primaria de glucósidos de esteviol (4).

Muchos países demostraron interés en el cultivo y comercialización de la *Stevia*. El creciente uso de steviósidos como edulcorante incentivó la expansión del cultivo a nivel mundial y particularmente en Paraguay, que ocupa el segundo lugar como productor detrás de China. El volumen de *Stevia* en miles de toneladas, producido por Paraguay en el año 2012 fue de 448, y de China 27.343 en el mismo año. (5) Los principales mercados de steviósidos son varios países de Sudamérica, Japón, Estados Unidos y la Unión Europea.

Si bien las divisas ingresadas por las exportaciones de *Stevia* no son aún importantes frente a otros productos paraguayos tradicionales como la soja, las proyecciones para los próximos años son alentadoras (6). Al ser el volumen de producción importante, esto también genera una cantidad importante de residuos post selección y hojas secas, y la bibliografía sobre su uso alternativo o utilización en alimentación de rumiantes es escasa, por lo que surge interesante, en primer lugar su valoración química y en segundo lugar la valoración nutricional antes de

recomendar su uso en la alimentación animal, que son los motivos que impulsaron a realizar este estudio, cuyo objetivo general fue valorar la digestibilidad in vitro y la composición química de los residuos post selección y las hojas secas utilizadas para extracción de steviósidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Alimentación

El experimento se llevó a cabo en el Departamento de Bromatología, Nutrición y Alimentación Animal, fueron utilizados dos animales de la especie ovina, machos enteros, mestizos, canulados en rumen, con 2 años de edad y peso vivo promedio de $44,5 \pm 1,06$ kg de los que se extrajeron líquido ruminal para el estudio de la digestibilidad in vitro (7).

Los animales consumieron una ración constituida por 800 gr de heno de alfalfa y 200 g de *Stevia rebaudiana* Bertoni, ofrecidas una vez al día por la mañana a las 08:00 horas y agua a voluntad. Las muestras sometidas al estudio fueron: Hojas de primera calidad, secas que corresponden a las seleccionadas para extracción de steviósidos y los residuos de post selección o limpieza, que es lo que queda después de la selección de hojas de primera calidad y correspondieron a hojas no aptas para extracción u hojas de segunda que cayeron durante la desecación, y que no fueron aptas para extracción, estas muestras, podrían incluir tallos u hojas de plantas extrañas en pequeñas proporciones.

Procedimiento experimental

El experimento se inició con un periodo de adaptación a la dieta de los animales de 12 días, durante el cual los animales proveedores de líquido ruminal consumieron una parte de la dieta experimental (800 g de heno de alfalfa y 200 g de *Stevia*), y posterior a eso se estudio la digestibilidad in vitro, según método Tilley y Terry, 1963 que consistió de un periodo de incubación de 48 horas en líquido ruminal (extraído tras el acostumbramiento a la dieta con 12 horas de ayuno) en un medio Buffer correspondiente a la primera fase y una segunda de digestión en HCL-pepsina también por 48 horas. Las cantidades de MS y MO que desaparecen tras las incubaciones se consideran "digeridas", y para valorarlas fueron incubadas 6 repeticiones por cada tipo de muestra.

Análisis Químicos

Las muestras estudiadas, previo a sus análisis químicos fueron secadas en estufa a aire forzado a 55°C por 48 hs y luego molidas en un molino martillo con un tamiz de 1 mm de diámetro. El análisis químico se realizó mediante métodos de la AOAC (2000) para MS, EE, y PB (8), para FND y FAD se midió en el ANKOM Fiber Analyzer con la técnica propuesta por Martens, 2002 (9). La energía bruta se determinó mediante bomba calorimétrica adiabática (Plain Jacket Calorimeter 1341) y el contenido de CNF fue calculado por diferencia en base a análisis químicos individuales (10).

Cálculos

El porcentaje de digestibilidad de la Materia Seca (%DMSIV) y la Materia Orgánica y (% DMOIV) fueron calculados de la siguiente manera:

% DMSIV: [Materia Seca Inicial- (Materia Seca Residual de la Muestra- Materia Seca residual del blanco) x 100] / Materia Seca Inicial.

% DMOIV: [Materia Orgánica Inicial- (Materia Orgánica Residual de la Muestra- Materia Orgánica residual del blanco) x 100] / Materia Orgánica Inicial. El contenido de CNF se calculó con la siguiente ecuación: 100-NDF-ceniza-PB-EE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Composición química

En la Tabla 1 se presenta la composición química del residuo post selección y hojas secas, siendo la MS en 1.88 % menor en el primero. En un estudio realizado por Gonzalez et al. (11) encontraron valores de MS que variaron entre 92,5 a 98,8 % en hojas de tres variedades de Stevia, valores que fueron un tanto superiores al del presente estudio.

Tabla 1. Composición Bromatológica de los residuos de limpieza y hojas secas.

Composición (% MS ¹)	Residuos	Hojas
Materia Seca (PS) ²	89,99	91,71
Proteína Bruta	15,49	15,47
Fibra Neutro Detergente	29,96	24,63
Fibra Acido Detergente	23,68	21,15
Extracto Etereo	10,15	6,39
Energía (MJ/kg MS)	17,47	16,87
Carbohidratos No Fibroso	36,52	45,52

Materia Seca, 2 PS: Parcialmente Seca

En lo que se refiere a la PB los valores fueron casi idénticos, con un promedio de 15,48 %, bastante similar a los 16% en hojas reportados por Atteh, 2011. (12). Sin embargo, en otro experimento se reportó un valor promedio de 10,73 %, utilizando hojas secadas al sol (13).

Respecto a la FND y FAD, se registraron valores bastantes bajos en ambos tipos de muestras, lo que son indicativos de la baja proporción de pared celular en ambos casos.

En relación a los valores encontrados para EE, se puede apreciar que, en los residuos, es cerca del doble que en hojas, 10,15 vs 6,39 %, siendo este último valor similar a los 6,13 % hallados en un estudio sobre composición química y propiedades de las hojas de Stevia (13). Sin embargo, otros autores encontraron valores de EE más bajos que variaron desde 1,2 a 1,8 % en hojas de tres variedades de Stevia (11), de 1,9 % en otro caso (14); y un rango de 2,5 a 2,7 % en otros tres estudios (12, 15, 16). Esta diferencia en el porcentaje de EE podría deberse a las diferentes variedades de Stevia utilizadas en los experimentos. También la energía bruta fue mayor en Residuos post selección que en Hojas (4,3 vs 4,1 Mcal/kg MS). En fin, la diferencia en la composición química reportada por otros Autores, además de las diferencias de variedades podrían deberse al método de secado aplicado (17).

b. Digestibilidad in Vitro.

En la Tabla 2 se puede observar el % DMSIV y % DMOIV tanto para los residuos de limpieza como para las hojas secas, notándose que los valores son muy similares especialmente para el primero, siendo los porcentajes de digestibilidad ligeramente menores en residuos de limpieza, lo que era de esperarse debido a la mayor proporción de EE y FND presente en el mismo y la mayor concentración de CNF presente en las hojas (9 % más que en los residuos).

Tabla 2. Porcentaje de digestibilidad In Vitro de la Materia Seca y Materia Orgánica en residuos de post selección y hojas secas.

	Residuos	Hojas
%DMSIV ¹	51,22	52
%DMOIV ²	53,44	54,57

1: Digestibilidad in vitro de la Materia Seca

2: Digestibilidad in vitro de la Materia Orgánica.

FEDNA (2016), utiliza el valor relativo del forraje (VRF), que supone un índice de la calidad forrajera que refleja tanto el potencial de ingestión como el potencial de digestibilidad, este índice permite calificar el forraje en Excelente (>151), de Primera (125-151), de Segunda (103-124), de Tercera (87-102), de Cuarta (75-86) y de Quinta categoría (>75) (21). En el caso de los residuos de limpieza y las hojas secas de primera se puede observar en la Tabla 3 que su VRF es Excelente para ambos, y el potencial de digestibilidad es también alto. Si bien la información sobre composición química y la digestibilidad de la Stevia y las diferentes partes de la planta es escasa (18), los valores de digestibilidad son relativamente bajos si se tiene en cuenta su composición química, situación que pudiera deberse a la posible actividad antimicrobiana de los steviósidos y rebaudiósidos mencionada en un estudio (19). En coincidencia, otros autores manifiestan también la actividad antimicrobiana de la Stevia ante varios microorganismos como: *B. subtilis*; *S. aureus*; *P. aeruginosa*; *A. niger*. Si bien esta posible actividad antimicrobiana no actuaría sobre todas las bacterias del rumen, el que llegue a actuar sobre algunas cepas, hace suponer, que en general, habría un menor ataque microbiano y una menor digestibilidad.

Tabla 3. Valor Relativo de Forraje.

Items	Residuos de Limpieza	Hojas de primera secas
IMS ¹	4,01	4,87
DMS ²	70,45	72,42
VRF ³	218,75	273,53

1: Potencial de Ingestión de Materia Seca.

2: Potencial de digestibilidad de Materia Seca.

3: Valor Relativo de Forraje.

CONCLUSIÓN

En base a los resultados se puede concluir que la composición química de los residuos post selección y las hojas secas son bastantes similares, siendo en el primero un poco más elevado en pared celular y más bajo en carbohidratos No fibroso, pero insuficiente para afectar a los coeficientes de digestibilidad.

Los valores de digestibilidad son relativamente menores a los esperados según su composición química y el valor relativo del forraje. Se recomienda continuar con estudios de la digestibilidad, pero ya realizadas de manera in vivo

para avanzar en el potencial uso como alimentos para rumiantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Melis, M. (1999). Effects of chronic administration of Stevia rebaudiana on fertility in rats. *J Ethnopharmacol.* 1999; 67 (2): 157-61.
- Kolb N, Herrera JL, Freyre DJ, Uliana RF. Analysis of sweet diterpene glycosides from Stevia rebaudiana: improved HPLC method. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 4538-4541.
- Sharma N, Kaushal N, Chawla A, Mohan M, Sethi A, Sharma Y. Stevia rebaudiana-A review. *AgrobiosNewslett.* 2006; 5:46-8.
- Melis MS, Rocha ST, Augusto A. Steviol effect, a glycoside of Stevia rebaudiana, on glucose clearances in rats. *Braz J Biol.* 2009; 69: 371-4.
- Stanley C, Paredes M, Fretes F, Lesme R. 2014. Paraguay Orgánico. Prospección de mercados para la oferta de productos agrícolas con atributos de diferenciación. Paraguay Orgánico. 2014; 1: 30-35
- Poletti, Alberto. 2016. La Steviarebaudiana/Ka'ahe'e : de la prohibición al auge en el comercio exterior. Departamento de Investigación de la Universidad Columbia.
- Tilley A., and Terry R. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassland Soc.* 1963; 18:104-111.
- Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 17a ed. AOAC, Arlington: AOAC; 2000.
- Mertens DR. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J.AOAC Int.* 2002; 8: 1217- 1240.
- National Reserch Counsil. Nutrient requeriments of dairy cattle. 7a ed. Washington: Natl. Acad. Press; 2001.
- González C, Tapia MS, Pérez E, Dornier M, Morel G. 2014. Characterization of cultivars of Stevia rebaudiana Bertoni produced in different countries. *Bioagro.* 2014; 26 (2): 79-88.
- Atteh J, Onagbesan O, Tona K, Buyse J, Decuyper E, Geuns J. Potential use of Stevia rebaudiana in animal feeds. *Arch. Zootec.* 2011; 60: 133-136.
- Marcinek k, Krejpcio Z. Stevia Rebaudiana Bertoni – Chemical composition and functional properties. *Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2015; 14(2): 145-152.

14. Goyal S, Samsher R. Stevia a bio-sweetener: a review. *Inter. J. Food Scienc. and Nutr.*; 2010; 61: 1–10.
15. Kaushik R, Narayanan P, Vamshi V, Geetha M, Usha A. Nutrient composition of cultivated stevia leave and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaves extracts. *J. Food. Sci. Technol.* 2010; 47 (1):27-33.
16. Yadav AK, Singh, S, Dhyani D, Ahuja PS. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci.* 2011; 91: 1–27.
17. Gasmalla MAA, Yang R, Amadou I, Hua X. Nutritional composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf: effect of drying method. *Trop. J. Pharm. Res.* 2014; 13(1), 61–65.
18. Penner, R., T. Shanks, K. Timcke, J. Krigbaum and J. Uno. *Stevia from Paraguay: market perspectives, development and potential, use international regulations.* Asunción: Paraguay Vende; 2004.
19. Manish T, Subhash R. Preliminary studies on *Stevia Rebaudiana* leaves: proximal composition, minera analysis and Phytochemical Screening. *Int. J. Med. Sci.* 2006; 6:321-326.
20. Kujur RS, Singh V, Ram M, Yadava HN, Singh KK, Kumari S, Roy BK. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res.* 2010; 2 :258-63
21. Casalmiglia S, Ferret A, Bach A. *Tablas FEDNA de valor nutritivo de forrajes y subproductos* [Internet] Madrid: FEDNA; 2016. [20 de mayo de 2017]. Disponible en: www.fundacionfedna.org/forrajes/introducción-forrajes.