
SÍNTESIS DE ESTEVIOSIDOS EN ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* BERT).

Stevioside Synthesis in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert).

ALFREDO JARMA OROZCO¹, M.Sc.; MIGUEL ESPITIA CAMACHO¹,
Ph. D.; GERHARD FISCHER², Ph. D.

¹ Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería,
Colombia. ajarma@sinu.unicordoba.edu.co

² Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia,
Sede Bogotá. Bogotá D.C., Colombia.

Presentado 2 mayo de 2008, aceptado 26 de junio de 2009, correcciones 1 de diciembre de 2009.

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bert. es una planta selvática subtropical nativa de Paraguay, que posee un potente edulcorante de hasta 300 veces más dulce que la sacarosa y no tiene calorías. Las moléculas responsables de esta característica son glucósidos de diterpeno, presentes en hojas y sintetizados, al menos en los estados iniciales, usando la misma ruta de síntesis del ácido giberélico, en la que el ácido shiquímico, da origen a muchos compuestos aromáticos. El acetato es el precursor de los terpenos o isoprenoides por la ruta del acetato-mevalonato, donde se encuentran los esteviosidos, aunque en esta nota se discute una ruta alternativa. La presente actualización pretende aportar algunas herramientas para el entendimiento de las principales rutas de síntesis de los glucósidos de esteviol.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana*, edulcorante, metabolismo secundario, terpenoides.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bert. is a subtropical wild plant of Paraguay, that possesses a potent sweetener up to 300 times higher than sucrose and has no calories. The molecules responsible for these characteristics are diterpen glycosides, found in leaves and synthesized at least, at initial states, which use the same pathway of the gibberellic acid in which the shiquimic acid gives origin to many aromatic compounds. The acetate is the precursor of the terpens or isoprenoids through the acetate-mevalonate pathway, where steviosides are found. Although in this update, an alternative route is discussed. This updating pretends to contribute tools for the understanding of the main pathways of steviol glycosides synthesis.

Key words: *Stevia rebaudiana*, edulcorate, secondary metabolism, terpenoids.

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bert. es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia de las Astareceas; crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y Paraguay. Cobra un alto valor entre los vegetales nativos de estos países, debido a que contiene glucósidos bajos en calorías, llamados comúnmente esteviósidos, cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino puede ser 300 veces mayor que el del azúcar de caña (Jarma, 2008). En Colombia, se ha reportado su adaptación y potencialidad como nuevo cultivo agroindustrial (Jarma *et al.*, 2005; Jarma *et al.*, 2006).

Los edulcorantes, en su mayoría concentrados en las hojas, son glucósidos de diterpeno sintetizados, en la ruta del ácido giberélico a partir del mevalonato (Hsieh y Goodman, 2005; Guevara *et al.*, 2005; Kasahara *et al.*, 2002). Varios autores han indicado que la diferencia radica que en estevia, el kaureno, precursor de dichas hormonas, se convierte a esteviol en el retículo endoplásmico (Geuns, 2003; Totté *et al.*, 2000; Totté *et al.*, 2003; Brandle *et al.*, 2002).

El glucósido es un polvo cristalino blanco; los científicos lo llaman una “molécula noble”, debido a que el producto es 100% natural, no tiene calorías, las hojas pueden utilizarse en su estado natural y solo son necesarias cantidades pequeñas del producto, gracias a su gran poder edulcorante. Recientemente se ha reportado su actividad antiácida, cardiotónica, anticaries (Brandle, 1998), propiedades antirotavirus (Takahashi *et al.*, 2001), efectos antihiperlipidémicos e insulinoatrópicos que ayudan al tratamiento de Diabetes mellitus tipo 2 (Reziwanggu *et al.*, 2004; Gregersen *et al.*, 2004) y como estimulante en la secreción de insulina actuando sobre las células β del páncreas (Jeppesen *et al.*, 2000; Jeppesen *et al.*, 2002).

SÍNTESIS DE ESTEVIÓSIDOS

Terpenos. Todos los terpenos naturales proceden de unidades de acetato activo (Acetil CoA), que se condensan y transforman para originar ácido mevalónico (AMV), unidad de cinco átomos de carbono, específica de la biosíntesis de terpenos (Chappell, 1995; Gershenzon y Croteau, 1993). En la primera etapa de esta ruta sintética, por acción de una tiolasa y la hidroximetilglutaril CoA sintetasa, se condensan tres unidades de acetil CoA y forman 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA), compuesto que experimenta una reducción dependiente de NADPH.H⁺, transformándose en AMV por la acción de la HMG-CoA reductasa ubicada en la membrana del retículo endoplasmático (RE). El AMV es activado, formándose isopentenil pirofosfato (IPP). En las reacciones de alargamiento de la cadena terpenica, IPP y dimetilalil pirofosfato (DMAPP) se condensan de cabeza a cola; El DMAPP aporta el resto isoprenoide α , o inicial, formándose geranil pirofosfato GPP (C₁₀). La adición sucesiva cabeza a cola de otras unidades IPP conduce a la síntesis de farnesil pirofosfato FPP (C₁₅), geranilgeranil pirofosfato GGPP (C₂₀), que dará origen al diterpeno tetracíclico *ent*-kaureno en una reacción catalizada por la enzima *kaureno sintetasa* (KS).

Otra ruta alternativa en la síntesis del *ent*-kaureno que excluye el AMV, fue propuesta por Totté *et al.*, 2000, usando glucosa marcada radiactivamente (1-¹³C-glucosa); según los autores, en esta ruta alternativa llamada vía metil-eritritol-fosfato (MEP), el primer compuesto intermediario, 1 deoxi-d-xilulosa-5-fosfato (DXP), es formado a partir de

los productos del catabolismo de la glucosa, piruvato y d-gliceraldehído-3-fosfato, por una tiamina sintasa difosfato-dependiente. Una reducto-isomerasa cataliza la reestructuración de la cadena de DXP, así como la subsecuente reducción del aldehído resultante (NADPH-dependiente), a la forma 2-C-metil-d-eritritol 4-fosfato (MEP), el cual podría representar el primer intermediario comprometido en esta ruta metabólica. Los pasos siguientes involucran la conversión del MEP en ME 2,4-ciclodifosfato vía 4-difosfocitidil ME y 4-difosfocitidil ME 2-fosfato, los cuales por pasos aún desconocidos que involucran la reducción y eliminación de moléculas de agua, darían origen a IPP y DMAPP, a partir de los cuales se siguen normalmente los pasos que se proponen para la ruta del AMV.

Compartimentación de la síntesis de terpenos. De manera general se puede indicar que los pasos metabólicos que conducen a la formación del ácido mevalónico están catalizados por enzimas microsomales, mientras que la posterior transformación del AMV en IPP, está catalizada por enzimas solubles del citoplasma. Los mayores procesos del metabolismo terpenoide se registran a nivel subcelular. Los sesquiterpenos (C15), triterpenos (C30) y politerpenos son sintetizados en los compartimentos del RE y el citosol (Reigosa *et al.*, 2003), mientras que el isopreno, monoterpenos (C10), diterpenos (C20), tetraterpenos (C40) y ciertas quinonas se originan en los plastidios (Eisenreich *et al.*, 1998; Langenheim, 1994; Lichtenthaler, 1999). Buchanan *et al.*, 2000, indican que las evidencias actuales demuestran que la ruta biosintética para la formación del IPP, difiere marcadamente en los compartimentos celulares, siendo la ruta del acetato-mevalonato activa en el citosol y el RE, en tanto que la ruta gliceraldehído fosfato-piruvato opera en plastidios. Los autores concluyen sin embargo, que la regulación de estas dos rutas puede ser difícil de estudiar dado que los plastidios pueden suministrar el IPP al citosol y viceversa.

Conversión del *ent*-kaureno a glicósidos de esteviol. Brandle, 1998, quien ha clonado y secuenciado el gen de estevia que codifica para la enzima *copalil pirofosfato sintasa*, responsable de la conversión de GGPP a CPP, afirma que la hidroxilación del ácido *ent*-kaurenónico en la posición C13 es el punto de divergencia para la síntesis del esteviol y las giberelinas. Esta hidroxilación, que requiere de NADPH y oxígeno molecular proveniente del estroma, es catalizada por la enzima ácido *ent*-kaurenoico 13-hidroxilasa. Kim *et al.*, 1996, indican que la formación de esteviol (espina dorsal de los glicósidos de diterpeno) a partir del ácido *ent*-kaurenónico (*ent*-KA), se da en el retículo endoplásmico.

Seguidamente, en el aparato de golgi, cadenas laterales que contienen glucosa y/o ramnosa, se agregan al grupo alcohol del C13 y al grupo carboxilo del C19 del esteviol por acción de 2 glucosil transferasas (GTasa I y IIB), que catalizan la transferencia de la glucosa a los principales glicósidos de esteviol, a partir de la ADP glucosa (Shibata *et al.*, 1995), y presentan un óptimo de actividad a un pH de 6,5. La subunidad Mr 24.600 de la GTasa I, cataliza la transferencia de la glucosa a esteviol y esteviolmonósido (compuestos intermediarios), pero no a otros esteviolglicósidos. La subunidad Mr 30.700 de la GTasa IIB, muestra una alta especificidad en la transferencia de las unidades de glucosa al esteviol para formar los principales edulcorantes; esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido C, y dulcósido A, los cuales van finalmente a las vacuolas.

BIBLIOGRAFÍA

- BRANDLE J, RICHMAN A, SWANSON A, CHAPMAN B. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: A Resource for Gene Discovery in Diterpene Synthesis. *Plant Mol Biol.* 2002;50:613-622.
- BRANDLE J. *Stevia rebaudiana*: Its Agricultural, Biological, and Chemical Properties. *Can J Plant Sci.* 1998;78(4):527-536.
- BUCHANAN B, GRUISSEM W, JONES R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* American Society of Plants Physiologists; 2000.
- CHAPPELL J. *Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants.* *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1995;46:521-547.
- EISENREICH W, SCHWARTZ M, CATAYRADE A, ARIGOIN D, ZENK M, BACHER A. The Deoxylulose Phosphate Pathway of Terpenoid Biosynthesis in Plants and Microorganisms. *Chem Biol.* 1998;5:R221-R233.
- GERSHENZON J, CROTEAU R. Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. En: T. S. Moore., ed. *Lipid metabolism in plants.* CRC Press, Boca Ratón, Florida, Estados Unidos de América; 1993. p. 340-388.
- GEUNS J, AUGUSTIJNS P, MOLS R, BUYSE J, DRIESSEN B. Metabolism of Stevioside in Pigs and Intestinal Absorption Characteristics of Stevioside, Rebaudioside A and Steviol. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:1599-1607.
- GREGERSEN S, JEPPESEN P, HOLST J, HERMANSEN K. Antihyperglycemic Effects of Stevioside in Type 2 Diabetic Subjects. *Metabolism.* 2004;53(1):73-76.
- GUEVARA-GARCÍA A, SAN ROMÁN C, ARROYO A, CORTES M, DE LA LUZ GUTIÉRREZ-NAVA M, LEÓN P. Characterization of the Arabidopsis clb6 Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway. *Plant Cell.* 2005;17(2):628-643.
- HSIEH M, GOODMAN H. The Arabidopsis IspH Homolog Is Involved in the Plastid Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Plant Physiol.* 2005;138(2):641-653.
- JARMA A. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev Colomb Cienc Hortic.* 2008;2(1):109-120.
- JARMA A, RENGIFO T, ARAMENDIZ H. Aspectos Fisiológicos de Estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe Colombiano: I. Efecto de la Radiación Incidente Sobre el Área Foliar y la Distribución de Biomasa. *Agron Colomb.* 2005;23(2):207-216.
- JARMA A, RENGIFO T, ARAMENDIZ H. Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento. *Agron Colomb.* 2006;24(1):38-47.
- JEPPESEN P, GREGERSEN S, POULSEN R, HERMANSEN K. Stevioside Acts Directly on Pancreatic β Cells to Secrete Insulin: Actions Independent of Cyclic Adenosine Monophosphate and Adenosine Triphosphate-Sensitive K^+ -Channel Activity. *Metabolism.* 2000;49(2):208-214.
- JEPPESEN P, GREGERSEN S, ALSTRUP K, HERMANSEN K. Stevioside Induces Antihyperglycaemic, Insulinotropic and Glucagonostatic Effects *in vivo*: Studies in the Diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine.* 2002;9-14.

KASAHARA H, HANADA A, KUZUYAMA T, TAKAGI M, KAMIYA Y, YAMAGUCHI S. Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins in Arabidopsis. J Biol Chem. 2002;277(47):45188-45194.

KIM K, SAWA Y, SHIBATA H. Hydroxylation of ent-Kaurenoic Acid to Steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni-Purification and Partial Characterization of the Enzyme. Archiv Biochem Biophys. 1996;332(2):223-230.

LANGENHEIM J. Higher plants terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. J Chem Ecol. 1994;20:1223-1280.

LICHTENTHALER H. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1999;50:47-65.

REIGOSA M, PEDROL N, SÁNCHEZ A. La Ecofisiología Vegetal. Una Ciencia de Síntesis. Thompson (España); 2003.

REZIWANGGU A, JEPPESEN P, ROLFSEN S, XIAO J, HERMANSEN K. Rebaudioside A Potently Stimulates Insulin Secretion From Isolated Mouse Islets: Studies on the Dose-, Glucose-, and Calcium-Dependency. Metabolism. 2004;53(10):1378-1381.

SHIBATA H, SAWA Y, OKA T, SONOKE S, KIM K, YOSHIOKA M. Steviol and Steviol-Glycoside: Glucosyltransferase Activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni- Purification and Partial Characterization. Archiv Biochem Biophys. 1995;321(2):390-396.

TAKAHASHI K, MATSUDA M, OHASHI K, TANIGUCHI K, NAKAGOMI O, *et al.* Analysis of Anti-rotavirus Activity of Extract from *Stevia rebaudian*. Antiviral Res. 2001;49:15-24.

TOTTÉ N, CHARON L, ROHMER M, COMPERNOLLE F, BABOEUF I, GEUNS J. Biosynthesis of the Diterpenoid Steviol, an Entkaurene Derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, Via the Methylerythritol Phosphate Pathway. Tetrahedron Lett. 2000;41:6407-6410.

TOTTÉ N, VAN DEN ENDE W, VAN DAMME E, COMPERNOLLE F, BABOEUF I, GEUNS J. Cloning and Heterologous Expression of Early Genes in Gibberellin and Steviol Biosynthesis Via the Methylerythritol Phosphate Pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Can J Bot. 2003;81(5):517-522.

