



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

PROYECTO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

**“FORMULACIÓN DE UN EDULCORANTE A PARTIR DE EXTRACTO DE
HOJAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni”**

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

AURORA ANAHÍ OCAMPO ZARAGOZA

ASESOR:

ING. MARGARITA MARCELIN MADRIGAL

REVISORES:

DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

ING. JAQUELINE LEYRA HERNANDEZ

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS

INDICE

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo General	4
3.2 Objetivos Específicos	4
4. CARACTERIZACIÓN DEL AREA	5
5. PROBLEMAS A RESOLVER	5
6. ALCANCE Y LIMITACIONES	5
6.1 Alcances	5
6.2 Limitaciones	5
7. FUNDAMENTO TEÓRICO	6
7.1 Cultivo de Stevia rebaudiana Bertoni	6
7.2 Stevia como endulzante natural	7
7.3 Métodos de extracción sólido-liquido	8
7.3.1 Extracción con agua	8
7.3.2 Extracción con solventes orgánicos	9
7.3.3 Extracción asistida por Ultrasonido	9
7.3.4 Extracción por fluidos supercríticos	9
7.4 Métodos de purificación	9
7.4.1 Filtración por membranas	11
7.4.1.1 Microfiltración	11
7.4.1.2 Ultrafiltración	11
7.4.1.3 Nanofiltración	12
7.4.1.4 Osmosis inversa	12
7.4.2 Resinas de intercambio iónico	12

7.4.3 Precipitación selectiva	13
7.4.4 Absorción cromatográfica	13
7.5 Métodos de secado	13
7.5.1 Secado por aspersion	14
7.5.2 Liofilización	15
7.5.3 Cristalización	16
8. METODOLOGÍA	17
8.1 Materia prima	17
8.2 Elaboración de los extractos de <i>S. rebaudiana</i>	17
8.3 Purificación de los extractos de <i>S. rebaudiana</i>	17
8.3.1 Filtración con membranas de celulosa	17
8.5 Cuantificación de sólidos solubles de los extractos de <i>S. rebaudiana</i>	17
8.6 Determinación del color de los extractos de <i>S. rebaudiana</i>	18
8.7 Diseño experimental	18
8.8 Secado	19
8.8.1 Cristalización por evaporación	19
9. RESULTADOS Y DISCUSIONES	20
9.1 Análisis preliminares	20
9.2 Resultados del diseño experimental	22
9.3 Lecturas en espectro de IR	26
9.4 Secado por evaporación	28
10. CONCLUSIONES	29
11. BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 7.1	Distribución de las áreas potenciales del cultivo de Stevia en la República Mexicana	7
Figura 7.2	Estructura química del esteviósido	8
Figura 7.3	Procesos de separación según la presión y tamaño de molécula	10
Figura 7.4	Secador de aspersion tipo I	14
Figura 7.5	Secador de aspersion tipo II	15
Figura 9.1	Diagrama de Pareto Estandarizado para el contenido de sólidos solubles	23
Figura 9.2	Superficie de Respuesta del contenido de sólidos solubles en el extracto	23
Figura 9.3	Gráfica de Efectos Principales en la Luminosidad del extracto	25
Figura 9.4	Superficie de Respuesta del efecto combinado del pH y la Temperatura de la solución extractora	26
Figura 9.5	Lectura del espectro de IR de hoja pulverizada de S. rebaudiana	27
Figura 9.6	Lectura del espectro de IR del extracto de S. rebaudiana	27
Figura 9.7	Infrarrojo estándar de esteviósidos	28
Figura 9.8	Cristales de S. rebaudiana	28

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 8.1 Tratamientos realizados para la extracción de glucósidos de <i>Stevia rebaudiana</i>	18
Cuadro 9.1 Contenido de solutos y valores de L, a y b del extracto de hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> a pH 7	20
Cuadro 9.2 Contenido de solutos y valores de L, a y b del extracto de hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> a pH 5	21
Cuadro 9.3 Contenido de solutos y valores de L, a y b del extracto de hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> a pH 9	21
Cuadro 9.4 Análisis de Varianza del contenido de sólidos solubles del extracto de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	22
Cuadro 9.5 Análisis de Varianza de la Luminosidad del extracto de <i>Stevia rebaudiana</i>	24
Cuadro 9.6 Optimización de la luminosidad del extracto	25

1. Introducción

Los edulcorantes, han sido de suma importancia dada la relación con la industria alimentaria para sus diversas aplicaciones, sobre todo en la preparación de distintos alimentos para consumo humano.

La demanda del consumo de edulcorantes artificiales no calóricos, han sido principalmente para controlar enfermedades como la diabetes y la obesidad, la desventaja de éstos edulcorantes como el aspartame, sacarina, sucralosa por mencionar algunos, son los daños que a largo plazo puede ocasionar a la salud.

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es una hierba dulce originaria de Sudamérica, de la cual se puede obtener un edulcorante natural no calórico, las hojas de ésta planta contienen glicósidos diterpenos llamados, steviósidos, rebaudiósidos A-F, esteviolbiónido y dulcósido A, siendo éstos los responsables del típico sabor dulce (Geuns, 2003). Los steviósidos son los glucósidos predominantes en la hoja de *Stevia rebaudiana* contiene aproximadamente del 3 al 8% del peso de la hoja seca, los rebaudiósidos es el segundo glucósido más abundante en la hoja contiene el 1 al 2% (p/p) de la hoja seca, los restantes son de menor concentración (Gardana et al., 2003). El poder edulcorante de los esteviósidos y rebaudiósidos son superiores al de la sacarosa, puede llegar a ser de 200 y 300 veces más dulce (Huang and Guo, 1996; Geuns, 2003).

Existen diversos métodos de extracción, purificación y cristalización de los principios edulcorantes de la hoja de *Stevia rebaudiana*, entre los más comunes es la extracción con agua a altas temperaturas, otro método menos convencional es la extracción asistida por ultrasonido, para los procesos de purificación y cristalización existen diversos métodos por ejemplo: basado en solventes orgánicos, filtración por membranas, intercambio iónico, fluidos supercríticos, absorción cromatográfica entre otros, la cristalización puede ser por liofilización, secado por aspersion (encapsulamiento) y evaporación.

En este trabajo se estudiarán los diferentes métodos de extracción, purificación y cristalización de los glucósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni mencionados anteriormente, y se elegirán los procesos más adecuados para la obtención de un producto totalmente orgánico.

2. Justificación

La sacarosa o azúcar común, es el edulcorante más utilizado para endulzar alimentos, sin embargo éste azúcar está relacionado con diversos padecimientos tales como obesidad, diabetes, caries entre otros.

La importancia de cuidar la salud humana es indispensable para cada individuo, por esta razón se buscan alternativas de consumo para ciertos productos que pueden ocasionar alteraciones a la salud, la sacarosa es uno de éstos productos, y las alternativas existentes en el mercado son los endulzantes sintéticos no calóricos, los cuales también pueden afectar la salud a largo plazo, otra alternativa hoy en día, son los endulzantes naturales, de los cuales son de mayor interés los no calóricos, para disminuir padecimientos mencionados anteriormente.

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta de la cual se puede extraer endulzantes naturales que tienen la particularidad de no ser metabolizados por el organismo humano, lo cual es de interés para personas que padecen principalmente de diabetes y obesidad, siendo éstas las enfermedades de mayor consideración en la población.

Se han descrito diversos métodos para la obtención de dichos endulzantes, de los cuales se pretende estudiar y seleccionar el más conveniente para formular un producto totalmente orgánico, con altos rendimientos y bajos costos. Cabe mencionar que la obtención de éste edulcorante es mediante un proceso menos complejo en comparación con la síntesis de los edulcorantes artificiales.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Encontrar un método económico y eficiente para extraer y purificar de manera orgánica los glucósidos de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni para la obtención de un edulcorante natural no calórico.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar las variables de proceso optimas para la extracción de los glucósidos de la hoja de *Stevia rebaudiana* Bertoni.
- Determinar cuál de las dos técnicas de purificación, la de tratamiento con membranas filtrantes o de acidificación es más eficiente, para el extracto de *S. rebaudiana*
- Evaluar rendimientos de secado por aspersion y cristalización por evaporación del extracto de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

4. Caracterización del área

El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de investigación del área de posgrado ubicado en el edificio “D” del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Éste laboratorio cuenta con los equipos necesarios para el desarrollo del proyecto tal como: parrillas eléctricas, balanzas analíticas y granatarias, autoclaves, secador de aspersión, refrigeración, equipo ultrasónico, etc.

5. Problemas a Resolver

La principal problemática es la clarificación del extracto de *S. rebaudiana* sin utilización de alcoholes, para que sea un producto totalmente orgánico, aunque la clarificación no afecte directamente a las características organolépticas, es importante para tener una aceptación visual por el consumidor.

La purificación del extracto puede o no realizarse idealmente por el método y material propuesto a utilizar en éste trabajo, aunado a esto se detallará y se tratará de resolver durante el desarrollo del proyecto.

6. Alcances y Limitaciones

6.1 Alcances

Se desarrollaron diferentes técnicas de extracción de los glucósidos de *S. rebaudiana* y así como las condiciones de optimización de la extracción, logrando cristalizarse los dulcósido del extracto.

6.2 Limitaciones

El laboratorio no cuenta con materiales específicos para clarificación y purificación de los extractos de *S. rebaudiana*.

El secador por aspersión no estuvo disponible durante el tiempo en que se desarrolló el proyecto.

Otro factor importante fue el tiempo limitado para el desarrollo del proyecto.

7. Fundamento teórico

7.1 Cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni

La planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta arbustiva mide alrededor de 40 a 80 cm de altura, se puede cultivar en suelos variados, tanto de baja fertilidad, de tipo arenoso y hasta suelos orgánicos de alta humedad.

Es una especie originaria de la zona subtropical, semihúmeda con precipitaciones entre 1400-1600 mm al año uniformemente distribuidas, la temperatura promedio es de 24°C, se reporta que el cultivo prospera bien entre los 24 y 28°C, con un porcentaje de humedad relativa inferior al 85%, ya que este factor es punto clave en las enfermedades (Casaccia y Álvarez, 2006).

El suelo ideal es areno-arcilloso, francos y franco-arenosos, con regular proporción de humus. Se adapta bien a suelos con buen drenaje, no en lugares con exceso de humedad. Prospera bien en suelos de pH ácido, pero crece bien entre 6.5 a 7.5, siempre que sean no salinos. Para México se están considerando como óptimos los suelos Luvisoles, Nitosoles, Fluvisoles y los Regosoles; subóptimos los Leptosoles (anteriormente Rendzinas) y Cambisoles con buen drenaje; no aptos los Gleysoles, los Vertisoles, Solonchaks y Litosoles.

La condición de baja luminosidad en el trópico, hace que la planta de stevia presente ciclos más cortos en la floración que en su centro de origen, este ciclo oscila entre los 45 a 60 días, dependiendo de las condiciones de precipitación, temperatura y luminosidad en donde se encuentre.

Las zonas de alto potencial en México se distribuyen principalmente en los estados del Pacífico como son Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; no obstante existen algunas áreas importantes en la región del Golfo de México en los estados de Tamaulipas, Veracruz y en menor medida en Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Figura 7.1) (Inifap, 2011).

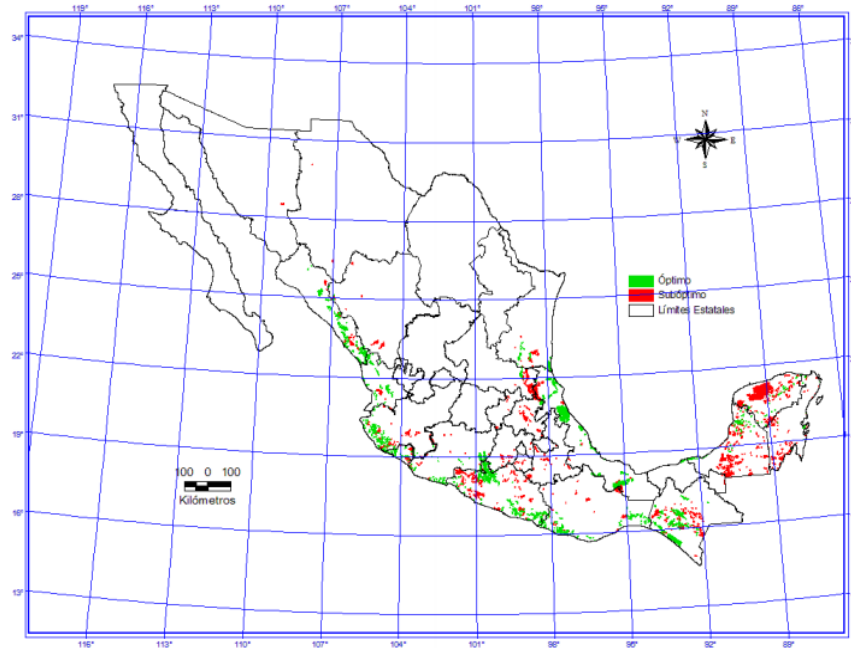


Figura 7.1 Distribución de las áreas potenciales para el cultivo de stevia en la República Mexicana.

La cosecha debe hacerse cuando se presente un máximo del 5% de botones florales, pues esto afecta la calidad del producto final, cuando las plantas son jóvenes, los períodos de floración son más cortos y esto influye en el número de cortes que se deben de realizar. Se hace un corte parejo de todas las plantas, procurando que queden 2 o 3 pares de hojas. El lapso de tiempo entre cada cosecha oscila entre 50 y 60 días.

7.2 Stevia como endulzante natural

El consumo de *S. rebaudiana*, como endulzante natural, ya es empleado en muchos países, como es el caso de Japón, donde ocupa el 40% del mercado de edulcorantes, así como Japón hay otros países (Brasil, Paraguay, China, Canadá, etc.) donde el consumo es menor, pero con el paso del tiempo va incrementando.

En la actualidad la FAO y OMS (2008) han acreditado su certificación como alimento inocuo, lo que indica que ya es considerado como alimento seguro en todo el mundo.

En seguida se muestra la estructura química del esteviósido, uno de los glucósidos responsables del dulzor de la hoja de *S. rebaudiana*.

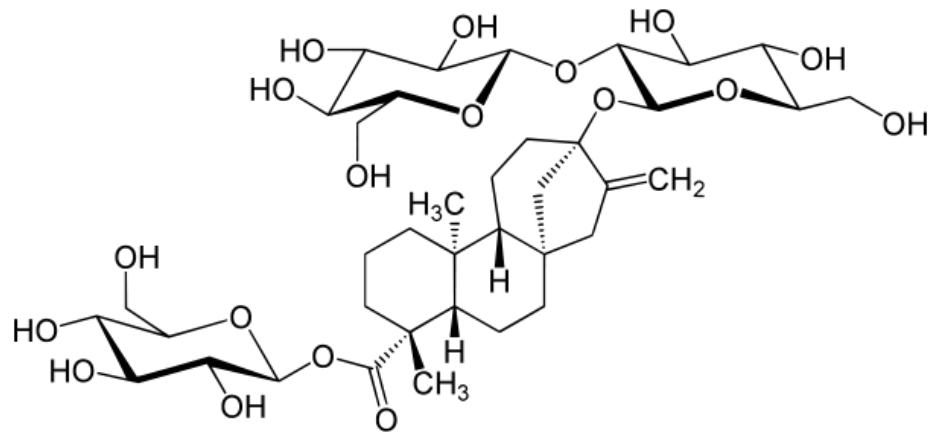


Figura 7.2 Estructura química del esteviósido.

7.3 Métodos de extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es una operación donde se separa un componente soluble de la materia sólida con la ayuda de un disolvente, si se desea extraer un componente valioso, se le llama lixiviación, cuando se extrae un componente no deseado del sólido se le dice lavado, así dependiendo el caso.

7.3.1 Extracción con agua

La lixiviación de steviósidos y rebaudiósidos, se pueden realizar con agua a diferentes temperaturas, pueden ser bajas o altas, existen diversos reportes donde se ha experimentado desde temperaturas de -2°C hasta los 100°C . La temperatura es un factor importante para el proceso de extracción con agua. Esta extracción permite que el producto sea totalmente natural y pueda ser comercializado.

7.3.2 Extracción con solventes orgánicos

Los solventes orgánicos usualmente empleados para la extracción de los glucósidos de *S. rebaudiana* son alcoholes, como el metanol, el cual después es removido, a pesar de que este alcohol facilita la separación de los glucósidos de stevia, el producto final puede contener residuos tóxicos, los cuales no son seguros para la salud.

7.3.3 Extracción asistida por Ultrasonido

Es un método poco convencional que involucra dos fenómenos físicos: difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto (Vinatoru, 2001). Ésta extracción utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Gao & Liu, 2005).

7.3.4 Extracción por fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión sobre su punto crítico termodinámico. Tiene una habilidad única para difundirse a través de los sólidos como un gas y de disolver materiales como un líquido, generando solvente de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial. Se utilizan, principalmente, dióxido de carbono y agua. Se puede realizar una extracción selectiva de diferentes compuestos utilizando distintas presiones del fluido supercrítico (Vinatoru, 2001).

7.4 Métodos de purificación

7.4.1 Filtración por membranas

La filtración por medio de membranas es una alternativa competitiva en los procesos de separación, dentro de estos procesos se destacan cuatro categorías

de acuerdo con los tamaños de las moléculas o partículas que se separan y por consiguiente el tamaño de poro:

- Microfiltración
- Ultrafiltración
- Nanofiltración
- Osmosis inversa

Estos procesos tienen como fuerza impulsora una diferencia de presión, como se muestra en la siguiente figura 7.2.

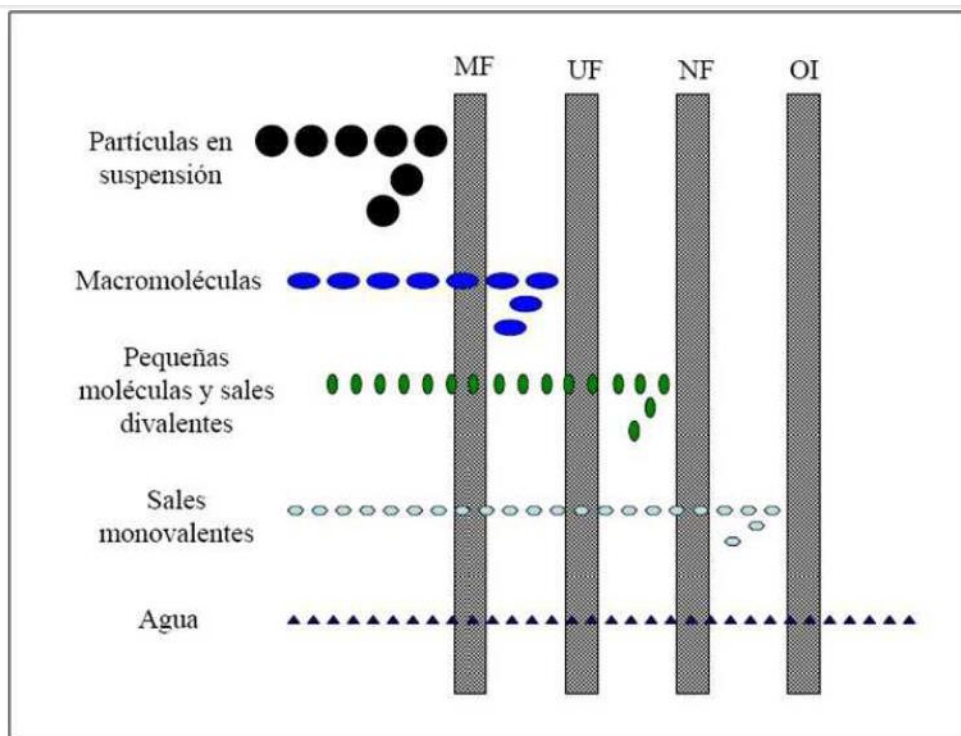


Figura 7.3 Procesos de separación según la presión y tamaño de molécula

(Ibáñez, 2007)

7.4.1.1 Microfiltración

Se utiliza para separar partículas con un tamaño de por comprendido entre 0.05 y 10 μm . las presiones de trabajo utilizadas oscilan entre los 0.5 y 3 bares. Las partículas se retienen en función de su tamaño y forma de esta manera el proceso de membrana que se parece más a la filtración convencional.

Se suelen usar para retener sólidos en suspensión y por tanto se emplea como etapa de limpieza, de concentración o como pre-tratamiento para la nanofiltración o la osmosis inversa. Otras aplicaciones incluyen la esterilización en frío de bebidas y productos farmacéuticos, clarificación de vinos o cervezas, tratamientos de aguas, etc.

7.4.1.2 Ultrafiltración

Se emplea para retener moléculas de tamaño relativamente grande, comprendidas en el rango de 2 a 100 nm (proteínas, polímeros, etc.), mientras las moléculas pequeñas tal como, sales, disolventes de bajo peso molecular, etc., pasan libremente.

El tamaño de poro de las membranas empleadas en esta técnica oscilan entre 0.001 y 0.1 μm y las presiones empleadas están entre 1 y 10 bares.

Su principal aplicación es como etapa de concentración o purificación en la industria láctica para la obtención de concentrados proteicos, también se usa en la industria de potabilización de aguas, así como tratamientos de aguas residuales. Una aplicación de especial interés de la ultrafiltración es el fraccionamiento de macromoléculas (Ibáñez, 2007).

7.4.1.3 Nanofiltración

Se utiliza para retener moléculas de bajo peso molecular (200-100 Da) e iones multivalentes como el calcio. El tamaño de poro en este caso está comprendido entre 0.005 y 0.0005 μm oscilan presiones aplicadas entre 3 y 20 bares. En esta técnica el proceso de separación está marcado por la difusión de los elementos y flujos a través de los poros.

La nanofiltración encuentra su aplicación en la eliminación de pequeñas moléculas como proteínas, enzimas, antibióticos, tintes, en la reducción de la dureza de aguas, etc. (Ibáñez, 2007).

7.4.1.4 Osmosis inversa

Con esta técnica se pueden retener moléculas de muy bajo peso molecular tales como las sales, su mecanismo fundamental es la difusión de la sustancia de mayor concentración a una de menor concentración.

El tamaño de poro en este caso es menor a 0.0005 μm , oscilan presiones aplicadas entre 10 y 50 bares. Al ser el tamaño de poro tan reducido, solo moléculas orgánicas de muy pequeño tamaño y solutos sin carga pueden pasar a través de la membrana junto con el agua. La osmosis inversa se aplica principalmente en la desalinización de agua de mar, la producción de agua ultra pura, la concentración de azúcares, leche, etc. (Ibáñez, 2007).

7.4.2 Resinas de intercambio iónico

El intercambio iónico es una operación de separación basada en la transferencia de materia fluido-sólido, la eficacia del proceso depende del equilibrio sólido-fluido y de la velocidad de transferencia de materia. Los sólidos regularmente son de tipo polimérico, los más habituales son los basados en resinas sintéticas.

Una resina de intercambio iónico puede considerarse como una estructura de cadenas hidrocarbonadas a las que se encuentran unidos de forma rígida grupos iónicos libres. Estas cadenas se encuentran unidas transversalmente formando una matriz tridimensional que proporciona rigidez a la resina y donde el grado de reticulación o entrecruzamiento determina la estructura porosa interna de la misma. Como los iones deben difundirse en el interior de la resina para que ocurra el intercambio, la selección del grado de reticulación puede limitar la movilidad de los iones participantes (Perry *et al.*, 2001).

7.4.3 Precipitación selectiva

Es un procedimiento para la eliminación de partículas o interferencias existentes en una solución, por medio de precipitación selectiva de uno o más iones presentes. Cuando estos iones tienden a formar compuestos pocos solubles, se debe regular la concentración del reactivo precipitante para aislar un número limitado de iones. En otros casos, se hace necesario agregar un reactivo complejo que reaccione selectivamente con alguno de los iones e impida su interacción con el precipitante (Pickering, 1980).

7.4.4 Adsorción cromatográfica

7.5 Métodos de secado

En general, el secado de sólidos consiste en separar pequeñas cantidades de agua u otro líquido de un material sólido con el fin de reducir el contenido de líquido residual hasta un valor aceptablemente bajo. El secado es por lo común la etapa final de una serie de operaciones (McCabe *et al.*, 1994).

El contenido de líquido de una sustancia seca varía de un producto a otro. En ocasiones el producto no contiene líquido, por lo cual es totalmente seco; pero lo más frecuente es que el producto contenga algo de líquido, puede variar desde 0.5% hasta cantidades poco mayor del 8% (McCabe *et al.*, 1994).

El secado es un término relativo que significa que hay una reducción del contenido de agua, los sólidos que se secan presentan diferentes formas debido al

tratamiento de secado que se aplique, estas formas pueden ser: escamas, gránulos, cristales, polvos, hojas o láminas continuas, que poseen propiedades muy diferentes (McCabe *et al.*, 1994).

7.5.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión es un método ampliamente usado en la industria de los alimentos para el secado de sólidos disueltos, debido a que es un método económico que produce partículas de buena calidad (McCabe *et al.*, 1994).

En los procesos de secado por aspersión, el material de alimentación que es líquido o tiene alguna fluidez es atomizado dentro de una cámara, en la cual se introduce aire caliente u otro gas. El líquido es rápidamente evaporado, dejando partículas sólidas que deben ser separadas del aire. El movimiento del aire y del material ocurre aproximadamente a favor de la corriente (Nonhebel y Moss, 2002).

Las figuras 7.3 y 7.4 muestran dos tipos de instalaciones de secado por aspersión.

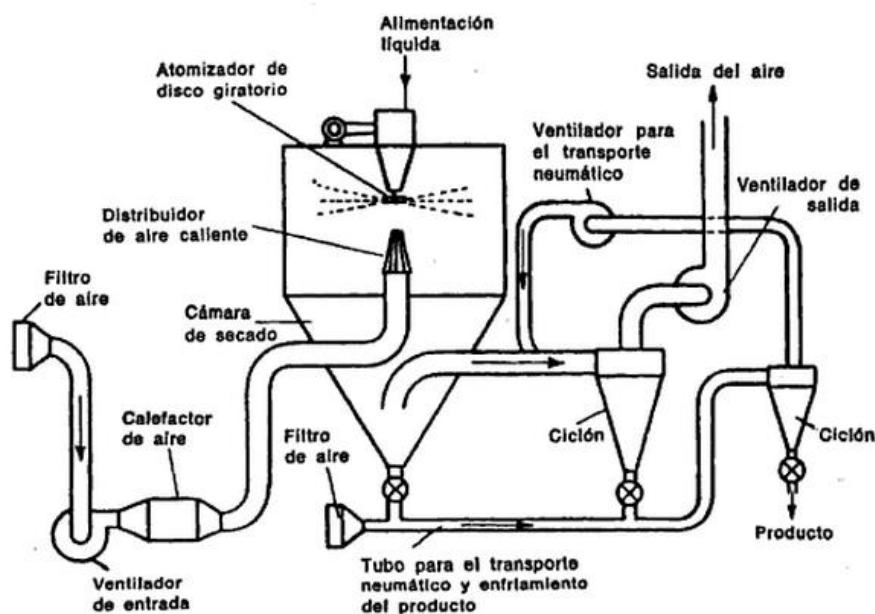


Figura 7.4 secador de aspersión tipo I

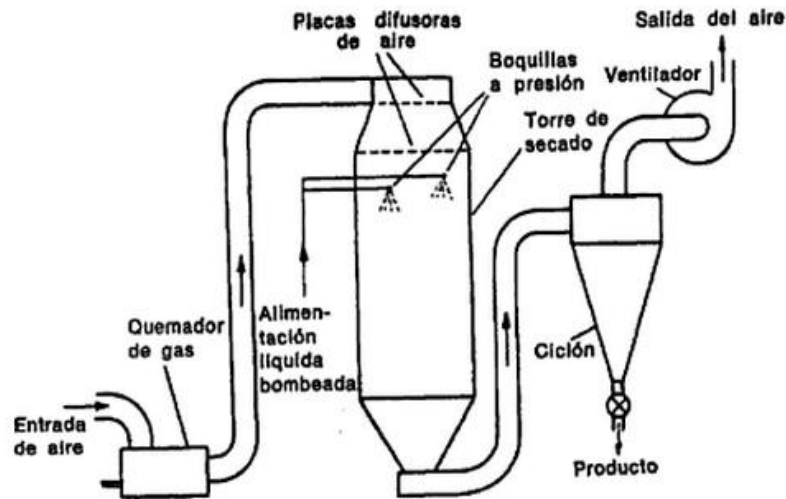


Figura 7.5 secador de aspersión tipo II

El secado por aspersión ofrece la ventaja de un secado extremadamente rápido para los productos sensibles al calor, un tamaño y densidad de la partícula de producto que son controlables dentro de ciertos límites y costos relativamente bajos de operación, en especial en el caso de secadores de capacidad grande (Nonhebel y Moss, 2002).

7.5.2 Liofilización

Es un proceso para secado de alimentos y otros productos sensibles al calor a temperaturas por debajo de 0°C . El material que va a ser secado se congela rápidamente y se coloca en capas delgadas sobre platos perforados en cámaras especiales de vacío, o se congela en lugares por refrigeración circulante dentro de platos perforados. El vacío completo es aplicado y un fluido pasa a través de los platos para suplir el calor de sublimación. A medida que procede el secado, el frente de hielo se retira de la superficie, dejando atrás una zona de sólido poroso casi seco (McCabe *et al.*, 1994). En la mayoría de los periodos de secado, la temperatura es prácticamente constante a valores por debajo de 0°C .

7.5.3 Cristalización

Es la formación de partículas sólidas a partir de una base homogénea. La cristalización de soluciones es importante en la industria debido a la gran variedad de materiales que se comercializan en forma cristalina. Su amplia utilidad se debe a dos razones: un cristal formado a partir de una solución impura es esencialmente puro, y la cristalización proporciona un método práctico para la obtención de sustancias químicas puras en una condición adecuada para su envasado y almacenamiento (McCabe *et al.*, 1994).

Los cristalizadores comerciales pueden operar de distintas formas. El primer requerimiento de un cristalizador es generar una solución sobresaturada, ya que la cristalización no puede ocurrir sin sobresaturación. Existen tres métodos para producir sobresaturación, dependiendo esencialmente de la naturaleza de la curva de solubilidad del soluto.

- Sobresaturación por enfriamiento
- Sobresaturación por evaporación
- Sobresaturación por la combinación de evaporación y enfriamiento

Los cristalizadores comerciales pueden diferir en distintos aspectos. Una diferencia importante reside en la manera en que los cristales se ponen en contacto con el líquido sobresaturado (McCabe *et al.*, 1994).

8.1 Materia prima

Las hojas deshidratadas de *Stevia rebaudiana* Bertoni se sometieron a un proceso de molienda y tamizado, en el cual se utilizó un molino manual para obtener un tamaño de partícula no muy fino y posteriormente se tamizó con malla 16.

8.2 Elaboración de los extractos de *S. rebaudiana*

Para la extracción de los principales glucósidos de la hoja de *S. rebaudiana*, se empleó como disolvente agua purificada, a la cual se le modificó el pH a 5, 7 y 9, utilizando hidróxido de sodio para pH básico y ácido cítrico para pH ácido.

La extracción se llevó a cabo en una relación de 1:10 (p/v) a diferentes temperaturas y tiempos.

Se utilizaron temperaturas de 90 y 100°C con distintos tiempos, los cuales se manejaron de 15 y 20 minutos de extracción, terminando la extracción la muestra se sometió a un proceso de enfriamiento para luego proseguir con su filtrado.

8.3 Purificación de los extractos de *S. rebaudiana*

8.3.1 Filtración con membranas de celulosa

Los extractos fueron purificados a temperatura ambiente con filtros de celulosa con tamaño de poro de 3 y 0.2 micras, con ayuda de un matraz kitazato y una bomba de vacío con una presión de -40 y -45 cmHg respectivamente.

8.5 Cuantificación de sólidos solubles de los extractos de *S. rebaudiana*

La cuantificación de sólidos solubles (°Brix) presentes en el extracto de *S. rebaudiana* se hicieron con un refractómetro digital a temperatura ambiente.

8.6 Determinación del color de los extractos de *S. rebaudiana*

En una caja petri se vació parte de la muestra para medir la luminosidad, y el color de cada muestra realizado con ayuda del colorímetro.

8.7 Diseño experimental

Para la extracción de los glucósidos de *S. rebaudiana* se utilizó un diseño factorial con 2 niveles (2^3). El software utilizado fue Statgraphics, obteniendo 24 experimentos, los cuales se muestran en el siguiente cuadro 8.1.

Cuadro 8.1 Tratamientos realizados para la extracción de glicósidos de *S. rebaudiana*.

pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
5	90	15
7	90	15
5	100	15
7	100	15
5	90	20
7	90	20
5	100	20
7	100	20

8.8 Secado

8.8.1 Cristalización por evaporación

Los extractos de *Stevia rebaudiana* se sometieron a temperatura de ebullición para evaporar la mayor parte del agua, ya obtenido el concentrado se colocó en un cristizador. El cristizador se metió a la cámara de vacío a temperatura de 130°C con un vacío de -45 cm Hg y se retiró a los 90 minutos.

8.9. Espectro de Infrarrojo

Se leyeron 3 muestras en el espectro de IR, una muestra fue del extracto de *S. rebaudiana*, otra muestra fue de hoja seca de *Stevia* pulverizada, para la muestra líquida se agregó con una pipeta 1 ml del extracto en el sensor de detección y se tomó lectura, de igual manera se realizó para la hoja pulverizada tomando una muestra aproximadamente de 0.5 g. y la última muestra fue de los cristales del extracto de *s. rebaudiana*, que se leyeron de igual manera.

9. Resultados y Discusiones

9.1 Análisis preliminares

Se hicieron experimentos preliminares tomando en cuenta la bibliografía consultada. Se propuso, hacer una cinética con 8 muestras determinadas, las cuales se muestran en los siguientes cuadros (9.1, 9.2 y 9.3) con sus respectivos resultados.

Cuadro 9.1 Contenido de solutos y valores de L, a y b del extracto de hojas de Stevia rebaudiana a pH 7.

Tiempo de extracción (min)	Sólidos solubles (°Brix)	L	A	b
1	0.1	46.72	-0.0026	16.22
2	0.1	44.03	-0.0663	33.78
3	0.3	35.01	-0.0464	27.23
4	0.5	44.05	-0.0208	16.25
5	0.6	37.85	-0.0684	31.39
10	1.1	34.13	0.0213	42.44
15	2.5	43.72	-0.0519	35
20	2.5	44.39	-0.0699	34.93

Cuadro 9.2 Contenido de solutos y valores de L, a y b del extracto de hojas de Stevia rebaudiana a pH 5

Tiempo de extracción (min)	Sólidos solubles (°Brix)	L	a	b
1	0.2	42.47	-1.81	-7.76
2	0.7	43.37	-5.27	-6.72
3	0.8	43.04	-8.79	-1.16
4	1	43.62	-5.79	-3.81
5	1.1	42.41	-5.19	-2.62
10	1.1	43.29	-3.07	-6.89
15	2.1	44.44	-4.14	-6.03
20	2.6	43.5	-6.41	-1.55

Cuadro 9.3 Contenido de solutos y valores de L, a y b del extracto de hojas de Stevia rebaudiana a pH 9.

Tiempo de extracción (min)	Sólidos solubles (°Brix)	L	a	b
1	0.2	38.68	-6.98	0.51
2	0.3	37.12	-9.65	1.62
3	0.4	31.21	-14.74	13.17
4	0.7	36.18	-12.18	9.41
5	0.7	34.73	-12.36	6.59
10	0.7	26.19	-16.18	17.04
15	2.1	34.55	-14.91	22.33
20	2.1	33.2	-19.35	28.24

En los cuadros 9.1, 9.2 y 9.3, se observa que a pH 5 y 7 se obtuvieron mayor cantidad de glucósidos y las muestras presentaron mayores valores de luminosidad, por lo que se descartó usar para las extracciones valores de pH 9. De acuerdo a estos resultados se diseñó experimentalmente el proceso de extracción de los glucósidos de *S. rebaudiana* teniendo como factores, el pH (5 y 7), tiempo de extracción (15 y 20 min) y temperatura (90 y 100°C).

9.2 Resultados del Diseño Experimental

En el cuadro 9.4 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) con nivel de confiabilidad del 95%, el cual indica que la temperatura es la única variable que tuvo un efecto significativo sobre el contenido de sólidos solubles (°Brix) que se obtuvieron en el proceso de extracción de los glucósidos de la hoja de *Stevia rebaudiana bertonii*.

Cuadro 9.4. Análisis de Varianza del contenido de sólidos solubles del extracto de *Stevia rebaudiana bertonii*.

VARIABLES	Valor de P
pH	0.9102
Temperatura	0.0000
Tiempo	0.0728
pH y Temperatura	0.3175
pH y Tiempo	0.2492
Temperatura y Tiempo	0.2887

El valor de P indica la significancia estadística de cada variable de proceso comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. Para que una variable tenga un efecto significativo en el proceso, su valor P debe ser menor a 0.05. Como se muestra en el cuadro 8.4 podemos observar que la

temperatura tuvo un efecto estadístico significativo ($p < 0.05$) sobre el contenido de sólidos solubles.

En la figura 9.1 se muestra el diagrama de Pareto, donde se representa en forma ordenada las variables que tienen prioridad en el proceso de extracción de steviósidos y rebaudiósidos. De igual manera que en el análisis de varianza se observa que la temperatura es la única variable con efecto significativo en el proceso de extracción. Es posible observar en el diagrama que este efecto, se deba incrementar la temperatura de la solución extractora para incrementar el rendimiento de extracción. Sin embargo, la temperatura máxima posible para trabajar el proceso es de 99°C a la presión atmosférica presente.

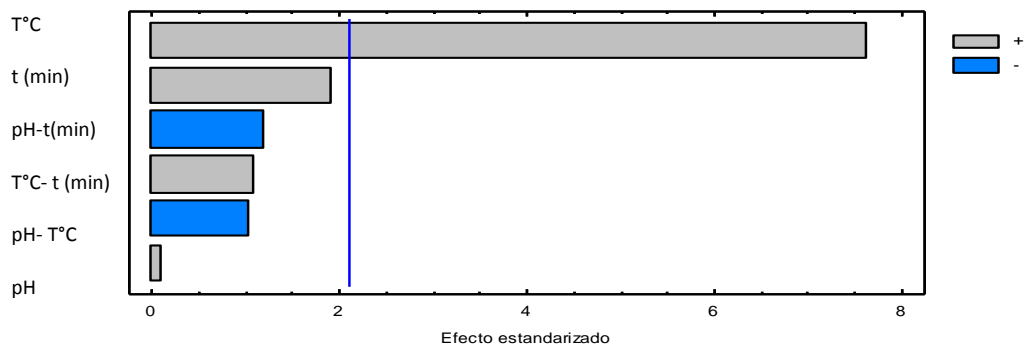


Figura 9.1. Diagrama de Pareto Estandarizada para el contenido de sólidos solubles.

Con la ayuda del software Statgraphics se obtuvieron gráficos de superficie de respuesta, y se obtuvo la figura 9.2. donde se indica la combinación de los rangos de las variables evaluadas para maximizar el contenido de sólidos solubles.

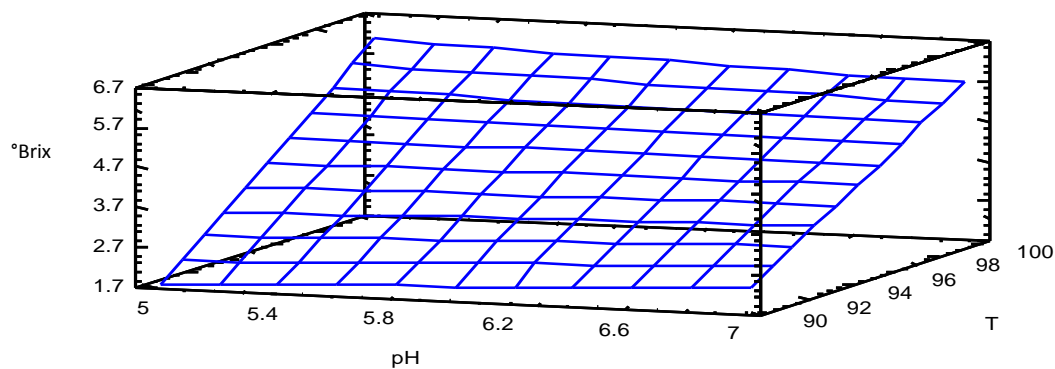


Figura 9.2. Superficie de respuesta del contenido de sólidos solubles en el extracto.

En la figura 9.2 se observa que el mayor % de sólidos solubles se puede extraer utilizando una temperatura de 100°C, mientras que el pH no influye estadísticamente.

El análisis anterior fue enfocado a la cantidad de sólidos solubles que se extrae de las hojas de *S. rebaudiana* para incrementar el rendimiento del proceso de extracción de los glucósidos. Sin embargo, otro factor importante de análisis, es la luminosidad de cada muestra.

En el análisis de varianza (ANOVA) (cuadro 9.5) se observa que las variables de proceso de extracción que tuvieron un efecto significativo sobre la Luminosidad (L) del extracto fueron: la temperatura y la interacción temperatura y tiempo.

Cuadro 9.5. Análisis de Varianza de la Luminosidad del extracto de *S. rebaudiana*.

Variable	Valor-P
pH	0.7372
Temperatura	0.0011
tiempo	0.3321
pH y Temperatura	0.6035
pH y tiempo	0.3213
Temperatura y tiempo	0.0257

En la figura 9.3 se muestra gráficamente el efecto que tienen las variables sobre la Luminosidad. En esta figura se observa que a menor temperatura de extracción mayor es la luminosidad del extracto, también se observa que el tiempo de extracción prolongado aumenta ligeramente en la luminosidad del extracto. La temperatura es la variable que tiene mayor efecto sobre la luminosidad del extracto.

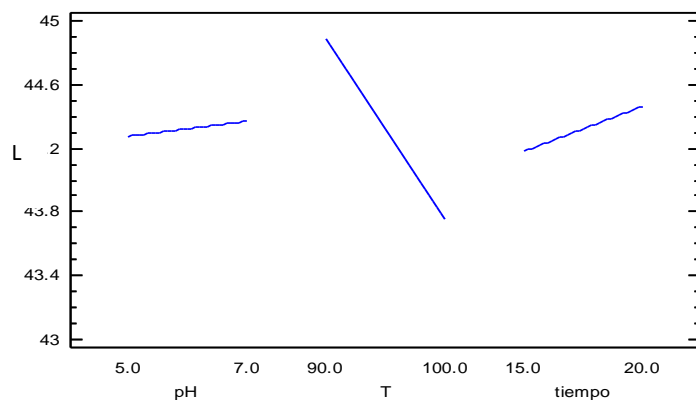


Figura 9.3. Gráfica de Efectos Principales en la luminosidad del extracto.

Se aplicó el método de superficie de respuesta para optimizar el resultado de la luminosidad del extracto, el cual nos arrojó como resultado el siguiente cuadro (Cuadro 9.6). Las condiciones mostradas predicen una luminosidad máxima de 45.5.

Cuadro 9.6. Optimización de la Luminosidad del extracto.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
pH	5.0	7.0	7.0
T	90.0	100.0	90.0
Tiempo	15.0	20.0	20.0

Después de analizar las variables de interés ($^{\circ}$ Brix, L) por separado, se aplicó la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software Statgraphics con los resultados de la optimización del contenido de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) y de la luminosidad del extracto al mismo tiempo, para poder optimizar el proceso de extracción de glucósidos y así obtener resultados deseables en cuanto a la luminosidad y $^{\circ}$ Brix del extracto.

En este caso el objetivo de la optimización fue maximizar el contenido de sólidos solubles y la luminosidad del extracto. La figura 9.4. muestra que el valor óptimo de la deseabilidad se puede obtener a pH neutro e incrementando la temperatura.

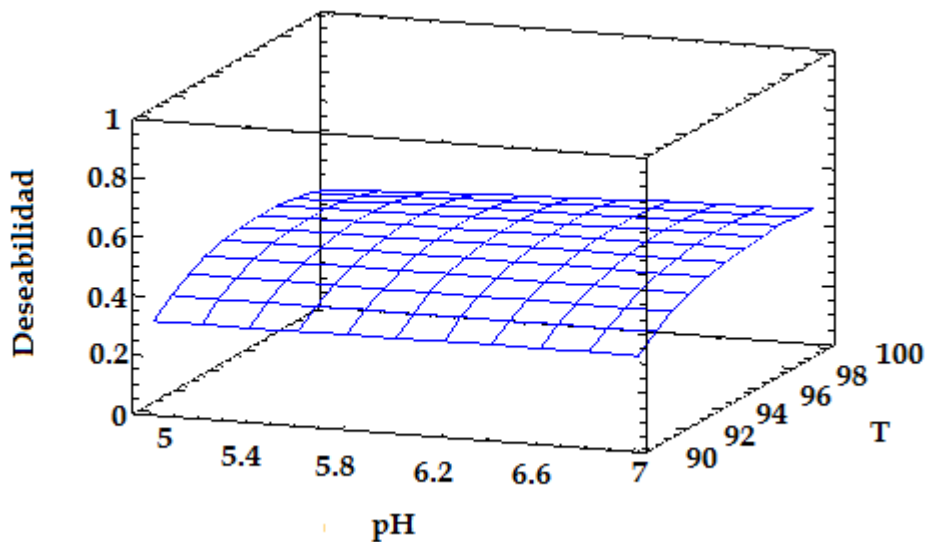


Figura 9.4. Superficie de respuesta del efecto combinado del pH y de la Temperatura de la solución extractora.

9.3 Lecturas en espectro de IR

En la figura 9.5 se muestra la lectura del espectro de Infrarrojo de la muestra de hoja seca pulverizada de *S. rebaudiana*, los picos que se marcan en el gráfico coinciden con el patrón de esteviósidos que se detallan en la figura 9.7.

Los picos pronunciados de la muestra y del patrón se encuentran a un número de onda aproximado de 1010 cm^{-1} .

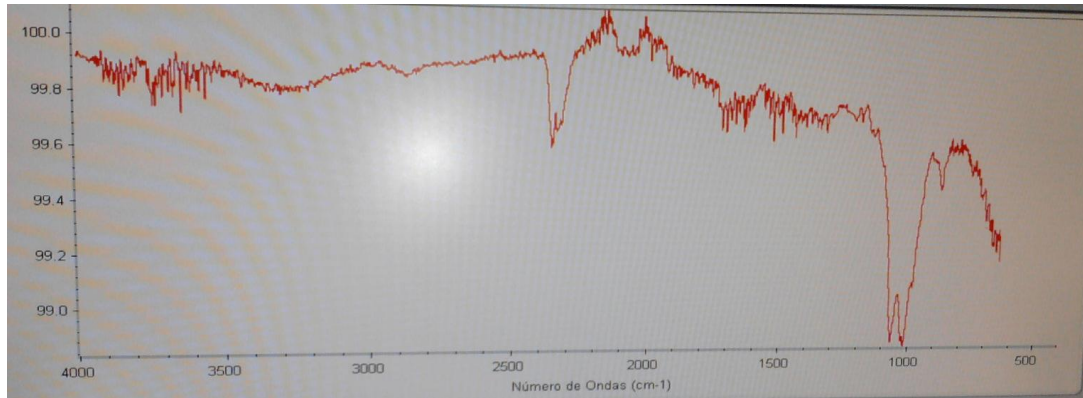


Figura 9.5 Lectura del espectro de IR de hoja pulverizada de *S. rebaudiana*

En la siguiente figura 9.6 es la lectura de la muestra del extracto de *S. rebaudiana*, ahí se observa que no existe comparación alguna con el patrón de esteviósidos (figura 9.7), esto puede ser debido a que la muestra es acuosa y el espectro detecta mayoritariamente agua y otros componentes.

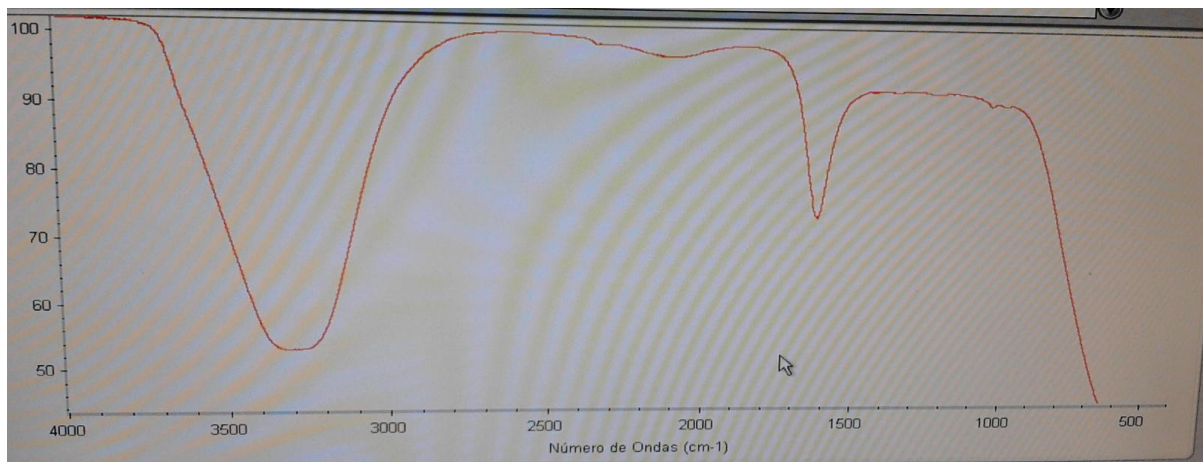


Figura 9.6 Lectura del espectro de IR del extracto de *S. rebaudiana*

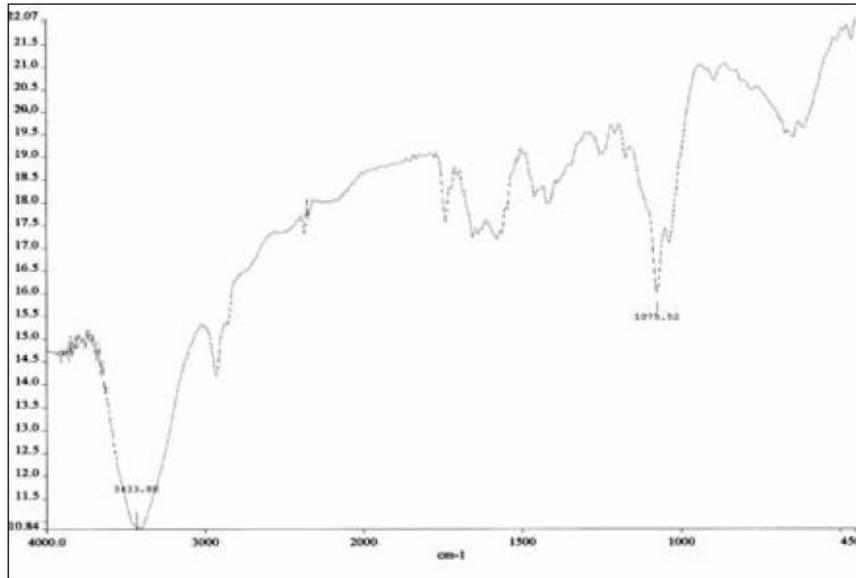


Figura 9.7 Infrarrojo estándar de esteviósidos

9.4 Secado por evaporación

La siguiente imagen (figura 9.8) muestra los cristales que se obtuvieron después del proceso de evaporación, se llegó a una cristalización de los glucósidos de *S. rebaudiana*, los cristales mostrados son de color oscuro, por falta de una mejor purificación y clarificado de los extractos.



Figura 9.8. Cristales de *S. rebaudiana*

10. Conclusiones

La temperatura y el tiempo de extracción son los factores que tuvieron mayor efecto en la extracción en el contenido de sólidos solubles y la luminosidad del extracto de *Stevia rebaudiana*.

A temperaturas altas y tiempos prolongados en la extracción, mayor es la concentración de los steviósidos y rebaudiósidos, sin embargo también se extraen otros componentes indeseables en el extracto y esto afecta a la clarificación y purificación del extracto.

Se encontró que hay una relación proporcional entre el color y la concentración de los glucósidos, entre más oscuro el extracto mayor concentración de steviósidos y rebaudiósidos.

No se logró la purificación del extracto satisfactoriamente con el sistema de membranas de celulosa, por lo que se sugiere utilizar otro sistema de membranas como, el de intercambio iónico que permita una mejor purificación del extracto.

No se logró comparar rendimientos del edulcorante por el método de secado por evaporación y de aspersion, debido a que el secador por aspersion no estuvo en funcionamiento durante el desarrollo del proyecto. Obteniéndose los cristales únicamente por el método de evaporación.

La cristalización por evaporación es un método sencillo y de bajos costos, el inconveniente del método, es el tiempo que tarda para obtener los cristales.

11. Bibliografía

Vinatoru, M. 2001. "An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs". *Ultrasonics Sonochemistry*. N.º 8: 303-313.

GAO, M. & Llu, C. 2005. "Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa Maxim*". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 1461-1463.

McCabe, W.L.; Smith, J.C. y Harriot, P. (1994). "Operaciones unitarias de Ingeniería Química". McGraw-Hill. Madrid.

Perry, R.H. y Green, D.W. (Volumen III, 2001). "Manual del ingeniero químico". McGraw-Hill. Madrid.

G. Nonhebel, A.A.H Moss. (2002) "El secado de sólidos en la Industria Química". Reverté S.A. Pág. 295-299

IBAÑEZ, R. 2007. Estudio de la ultrafiltración de proteínas modelo con membranas cerámicas. España, pp. 12- 29

FAO/ OMS 2008. Summary and Conclusions of the 69th meeting of the Joint FAO/WHO Expert committee on Food Additives, 17-26 June 2008, Rome, Italy.