



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ingeniería Química
Secretaría de Investigación y Estudio de Posgrado



TESIS

“EVALUACIÓN Y MEJORAS DE UNA PLANTA DE PRODUCCIÓN DE UN EDULCORATE”

Para obtener el grado de maestro en Ingeniería Química

Presenta:

Ing. Lizbeth Martínez Bucio

Dirigido por:

Dr. Efraín Rubio Rosas, Asesor

Dr. Jenaro L. Varela Caselis, Coasesor

SINODALES

Dra. Gabriela Pérez Osorio

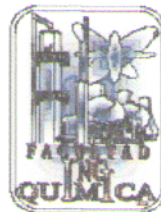
Firma

Dra. Ma. del Consuelo Mendoza Herrera

Firma

Heroica Puebla de Zaragoza

2014



MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ACTA DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS

Nombre del Estudiante: LIZBETH MARTINEZ BUCIO

Matrícula: 212470799

Nombre del Asesor: Dr. Efraín Rubio Rosas

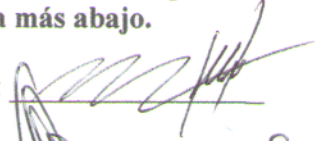
Nombre del Coasesor: Dr. Jenaro Varela Caselis

Título de la Tesis:

“Evaluación y mejoras de una planta de producción de un edulcorante”

Por medio de la presente, los integrantes de la Comisión Revisora expresamos que hemos leído y revisado el manuscrito de esta tesis de maestría, por lo que **estamos de acuerdo en que se proceda con su impresión definitiva y que el estudiante presente su defensa y examen de grado en horario y lugar que se indica más abajo.**

Presidente: Dra. María del Consuelo Mendoza Herrera

Firma: 

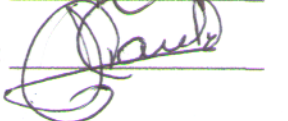
Secretario: Dra. Gabriela Pérez Osorio

Firma: 

Vocal (1) Dr. Efraín Rubio Rosas

Firma: 

Vocal (2): Dr. Jenaro Varela Caselis

Firma: 

FECHA DE EXAMEN: 05 de Diciembre del 2014

HORA: 17:00 hs

DÍA DE LA SEMANA: Viernes

LUGAR: Auditorio del CUV y TT

RESUMEN

Los edulcorantes naturales constituyen, en la actualidad, una excelente alternativa para mitigar en parte el deseo del consumo del azúcar ya que no contribuyen al aumento calórico. Dentro de estos edulcorantes destaca el edulcorante *Stevia* ya que tiene una capacidad edulcorante de 200 a 300 veces más que el azúcar pero sin los efectos tan contraproducentes que éste genera en el organismo humano.

Este trabajo presenta el estudio de mejoramiento del proceso de extracción vía infusión del edulcorante de la planta de *Stevia* de una planta de producción ubicada en el Estado de Puebla, ya que el proceso actual de obtención de dicho edulcorante, *Stevia*, en esta planta de producción presenta algunas dificultades, tales como la selección del equipo, funcionamiento de éste, condiciones del inmueble y servicios requeridos que no fueron tomados en cuenta al momento de llevar a cabo la instalación de la planta, por lo que se pretende aminorar los problemas y obtener un mejor rendimiento al hacer más eficiente la extracción de edulcorante en cuestión.

El trabajo se dividió en tres apartados, en el primero se hizo una evaluación de las instalaciones de la planta de producción así como del proceso en sí con el que se contaba. Dicha evaluación puso en evidencia la carencia en la que se encuentra la planta de producción así como la improductividad que presenta, ocasionados ambos, por el hecho de que los equipos seleccionados no son los más adecuados, tal es el caso del secador, sólo por citar un ejemplo, que actualmente es un secador de charola mientras que lo adecuado es un secador por aspersión.

En un segundo apartado se llevaron a cabo pruebas de infusión a diferentes proporciones agua-hoja seca de *Stevia*, diferente tamaño de materia prima, varias temperaturas de extracción y diferentes velocidades de agitación así como la caracterización de las hojas de la planta de *Stevia* por la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). De igual manera, se efectuaron pruebas con hojas provenientes de cuatro regiones diferentes con la finalidad de comparar el comportamiento de cada una de ellas en la extracción y así estandarizar el proceso de obtención del edulcorante. Como punto adicional, se hicieron

pruebas de filtración a las infusiones obtenidas para retirar algunas partículas sólidas presentes, además de un proceso de floculación para aclarar dicho líquido. Finalmente, para conocer la pureza del producto obtenido se analizó utilizando cromatografía de líquidos (HPLC).

Los resultados obtenidos de la segunda sección, además de encontrar los mejores parámetros de temperatura, agitación y relación sólido/líquido para efectuar la extracción del edulcorante, demuestran la eficacia de los procesos de floculación y filtración en la disminución de impurezas del extracto y por lo tanto un incremento del contenido porcentual tanto del Rebaudiósido A como del Esteviósido.

Para la última sección se introdujo la implementación de las mejoras sugeridas a la planta de producción.

Palabras clave: edulcorante, *Stevia*, rebaudiósido A, esteviósido, extracción.

SUMMARY

The natural sweeteners are, at present, an excellent alternative to mitigate some desire sugar consumption and do not contribute to increasing calorie. Among these sweetener stands out the *Stevia* sweetener because it has a sweetening capacity 200 to 300 times that of sucrose but counterproductive as it occurs in the human body sugar.

This paper presents the study of improving the extraction process via infusion sweetener *Stevia* plant in a production plant located in the State of Puebla, as the current process for obtaining said sweetener, *Stevia*, in this production plant presents some difficulties, such as equipment selection, operation thereof, conditions of the property and services required that were not taken into account when carrying out the installation of the plant, which is to minimize the problems and get a best performance by making more efficient extraction of sweetener in question.

The work was divided into three sections, the first was an evaluation of the plant facilities and production process itself with which he had. This assessment revealed deficiency in the production plant and unproductive having, caused both by the fact that the selected computers are not the most appropriate, as in the case of the dryer, for example, which is now a tray dryer while it is appropriate to a spray dryer.

The second section tests were conducted at different infusion water-dry leaf *Stevia*, different size of raw material, several different extraction temperatures and stirring speeds and the characterization of the leaves of the *Stevia* plant of proportions using the technique of scanning electron microscopy (SEM). Similarly, tests were performed with leaves from four different regions in order to compare the performance of each one in the extraction and standardize the process of obtaining the sweetener. As a further point, filtration test in the obtained infusions where made, in order to remove some solid particles, in addition to a flocculation process to clarify the liquid. Finally, to determine the purity of the infusion was analyzed using liquid chromatography (HPLC).

The best results of the second section, in addition to finding the parameters of temperature, agitation and solid/liquid in order to get extraction of the sweetener

relationship, shows the efficacy of flocculation and filtration processes in the reduction of impurities of the extract and an increase in both the percentage content of Rebaudioside A and Stevioside.

For the last section the implementation of the suggested improvements to the production plant was introduced.

Key words: sweetener, *Stevia*, rebaudioside A, stevioside, extraction.

DEDICATORIAS

Este trabajo va dedicado con todo mi amor a mi mamá, Sra. Esperanza Bucio Nolasco, por la confianza puesta en mi al emprender esta nueva aventura, su paciencia, amor, dedicación y sobre todo la educación que me inculcó cuya causa es la razón de este nuevo logro en mi vida como de todos los logrados anteriormente.

A mi padre, Sr. Baldomero Martínez Martínez, por su apoyo, amor y educación que son parte de la formación de mi temple y carácter.

A mi hermano, Doane Adair Martínez Bucio, que muchas veces le ha tocado lidiar con los momentos difíciles a causa de mi ausencia en casa y que ha sacado la casta y con la frente muy en alto. Gracias ito por ser como eres y sacarnos, a los tres, la sonrisa cuando menos lo esperamos.

A mi tío, Marco Antonio Bucio Nolasco, por su apoyo incondicional, amor y formar parte muy importante en mi vida.

Y finalmente a mis dos angelitos, Sr. Rogelio Bucio Ramirez y Ana Luisa Nolasco Montoya por todo su amor y tiempo que compartimos mientras Dios lo permitió a lo largo de mi vida.

Esto es para todos ustedes quienes confían en mí, en mis capacidades y estás ahí cuando los necesito sin importar nada más, aquí puedes ver reflejada uno más de sus logros por sin duda este trabajo y proyecto también es suyo.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer a Dios por darme la oportunidad de llevar a buen término una más de mis metas propuestas, darme la salud, fortaleza e inteligencia para vencer todas las vicisitudes que se presentaron durante el tiempo de duración de este proyecto.

También expreso mi más sincero agradecimiento a mi familia; padre, madre y hermano por su apoyo incondicional durante todo este proceso. De manera muy especial a mi madre por enseñarme a no darme por vencida hasta haber alcanzado las metas propuestas.

A mis tíos, Marco Antonio Bucio y Guillermina Martínez por darme su tiempo, apoyo, confianza y cariño, abrirme las puertas de su casa nuevamente en este proyecto y estar cuando más se necesita.

A mis segundos padres aunque muchas de las veces fungieron como los primeros, Rogelio Bucio Ramirez y Ana Luisa Nolasco Montoya que aunque ya no están con nosotros fueron y siguen siendo una piedra fundamental de mi formación tanto académica como personal siendo dos de las personas que más quiero y extraño.

Agradezco también a las personas laboraron, Nancy Ruiz González, y que laboran en el CUV y TT; Ing. Mayté Juárez Meneses, Ing. José Alejo Zárate Reyes, Mtra. Carla de la Cerna Hernández, Mtro. Eric Reyes Cervantes y al Dr. Gerardo Cortés que ayudaron a llevar a buen término la elaboración de este trabajo porque más que ser unos buenos compañeros de trabajo llegaron a ser también unos buenos amigos.

Por último, aunque no por ello menos importante, a los Dr. Efraín Rubio Rosas y al dr. Jenaro L. Varela Caselis por la confianza puesta en mi persona para la elaboración de este proyecto, el tiempo invertido y sus amables atenciones.

NOMENCLATURA

ATR	Attenuated Total Reflectance (Reflectancia Total Atenuada)
CFE	Comisión Federal de Electricidad
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	High Performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
M1PF	Muestra de extracto recién extraída
M2PF	Muestra de extracto con maceración
M3PF	Muestra de extracto filtrada con papel filtro (8-12 μ m)
M4PF	Muestra de extracto filtrada a 0.20 μ m
M5PF	Muestra de extracto recién floculada
M6PF	Muestra de extracto 18 horas después de floculada
M7PF	Muestra de extracto floculada y filtrada con papel filtro (8-12 μ m)
M8PF	Muestra de extracto floculada y filtrada a 0.20 μ m
MPM	Materia Prima proveniente de la Mixteca
MPP	Materia Prima proveniente de Puebla
MPT	Materia Prima proveniente de Tecolutla
MPV	Materia Prima proveniente de Veracruz
mUA	Unidades de altura de pico reportado por el HPLC (mili Unidades de Amplitud)
mUA*min	Unidades de área de pico reportado por el HPLC (mili Unidades de Amplitud por minuto)
w/v	Relación peso/volumen
w/w	Relación peso/peso

CONTENIDO

RESUMEN	i
SUMMARY	iii
DEDICATORIAS.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
NOMENCLATURA	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
I. ANTECEDENTES	4
I.1 Tipos de edulcorantes	4
I.2 Calóricos	5
I.3 No calóricos: Naturales y artificiales	6
I.4 Stevia	12
I.4.1 Generalidades	12
I.4.2 Ventajas y usos	14
I.5 Tipos de proceso de obtención de los endulzantes de <i>Stevia</i>	17
I.6 Descripción del proceso seguido actualmente por la planta de producción	20
I.7 Selección de la metodología a seguir	23
CAPÍTULO II	25
II. METODOLOGÍA.....	26
II.1 Proceso de extracción del edulcorante a base de <i>Stevia</i> a nivel laboratorio	27
II.1.1 Adquisición de la materia prima	27
II.1.2 Caracterización de la hoja de <i>Stevia</i> mediante SEM y SEM-EDS.....	28
II.1.3 Selección y preparación de la materia prima	29
II.1.4 Condiciones de extracción	30
II.1.5 Filtración (Proceso de eliminación de algunos sólidos)	32

II.1.6	Floculación.....	33
II.1.7	Secado	34
II.1.8	Pulverización	34
II.1.9	Preparación de la solución de la muestra a analizar.....	35
II.1.10	Análisis mediante HPLC.....	36
II.1.11	Análisis de la muestra certificada mediante HPLC.....	38
II.1.12	Análisis mediante FT-IR	38
II.2	Análisis sensorial	38
CAPÍTULO III		39
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
III.1	Evaluación del estado actual de la planta de producción.....	40
III.2	Resultados de la experimentación a nivel laboratorio.....	42
III.2.1	Caracterización de la hoja mediante SEM y SEM-EDS	42
III.2.2	Análisis de caracterización de la hoja y resultados encontrados en el estudio de FT-IR realizado.....	47
III.2.3	Análisis de muestra certificada mediante HPLC.....	53
III.2.4	Análisis de la relación sólido/líquido en la extracción de esteviósido y rebaudiósido A de las hojas de Stevia.....	55
III.2.5	Análisis de la variedad de especie de las plantas de Stevia	61
III.2.6	Análisis de la influencia del tamaño de partícula.....	64
III.2.7	Análisis de temperatura	68
III.2.8	Análisis del tiempo de extracción	73
III.2.9	Análisis de la velocidad de agitación.....	78
III.2.10	Prueba optimizada de extracción.....	82
III.2.11	Efectividad de la floculación.....	85
III.2.12	Seguimiento de la corrida completa de obtención del edulcorante (prueba optimizada con semi purificación)	90
III.2.13	Proceso de la empresa vs corrida completa optimizada.....	99
III.2.14	Recuperación mediante prensado de parte del líquido perdido por hidratación de las hojas en el proceso de extracción	102
CONCLUSIONES		105
Bibliografía		107
ANEXOS		

Figura 1 Foto de la planta de <i>Stevia Rebaudiana Bertoni</i>	12
Figura 2 Molécula de <i>Steviósido</i>	13
Figura 3 Diagrama de flujo general del proceso de producción del edulcorante de <i>Stevia</i>	19
Figura 4 Esquema del proceso para la extracción de los edulcorantes presentes en las hojas de <i>Stevia</i>	21
Figura 5 Esquema del proceso de obtención y análisis del edulcorante a base de <i>Stevia</i>	26
Figura 6 Diagrama completo de la metodología seguida en el proceso de obtención del edulcorante de <i>Stevia</i> a nivel laboratorio	27
Figura 7 Materia prima.....	28
Figura 8 Equipo empleado en la caracterización: a) Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6610LV b) Evaporador marca Denton Vacuum modelo DESK V	29
Figura 9 Preparación de la materia prima: a) Hoja entera, b) Molino para obtener el polvo de hojas de <i>Stevia</i> y c) Polvo de hoja de <i>Stevia</i>	30
Figura 10 Esquema de la extracción del edulcorante de <i>Stevia</i>	31
Figura 11 Equipo de filtración a vacío	32
Figura 12 Horno de secado marca Felisa	34
Figura 13 Cristales de <i>Stevia</i> adheridos al fondo del vaso	35
Figura 14 Polvo de los cristales de <i>Stevia</i>	35
Figura 15 Equipo de filtración de muestra a analizar por HPLC.....	35
Figura 16 Cromatógrafo marca Dionex	36
Figura 17 FT-IR marca BRUKER modelo VERTEX 70	38
Figura 18 Bosquejo de distribución de las instalaciones.....	40
Figura 19 Micrografías obtenidas por SEM de cada variedad de hoja de <i>Stevia</i> a x100	43
Figura 20 Espectro EDS de cada variedad de <i>Stevia</i>	45
Figura 21 Composición química elemental de la hoja de <i>Stevia</i>	46
Figura 22 Infrarrojo del estándar del esteviósido	48
Figura 23 Infrarrojo del estándar del rebaudiósido A	48
Figura 24 FT-IR de las muestras analizadas.....	50
Figura 25 Cromatograma de esteviósido y rebaudiósido A de muestra certificada Rebaudiósido A 40%.....	54
Figura 26 Gráfica de la diferencia de alturas en la relaciones sólido/líquido (w/w)....	56
Figura 27 Cromatografía HPLC relación sólido/líquido extracción vía infusión de hojas de <i>Stevia</i>	57
Figura 28 Gráfica de concentración (%) de esteviósido y rebaudiósido A de la muestra certificada vs relaciones sólido/líquido (w/w).	58

Figura 29 Gráfica masa obtenida vs relación sólido/líquido (w/w).	59
Figura 30 Cromatogramas de esteviósido y rebaudiósido A de cada variedad de especie de hojas de <i>Stevia</i>	61
Figura 31 Gráfica área de pico vs variedad de hoja de <i>Stevia</i>	62
Figura 32 Gráfica de porcentaje de concentración vs muestra en estudio	63
Figura 33 Cromatogramas de esteviósido y rebaudiósido A a diferente tamaño de materia prima	65
Figura 34 Gráfica de altura de pico vs tamaño de muestra	66
Figura 35 Gráfica de área de pico vs tamaño de muestra.....	66
Figura 36 Porcentaje de concentración vs tipo de muestra.	67
Figura 37 Cromatogramas de esteviósido y rebaudiósido A de cada temperatura de extracción	69
Figura 38 Área de pico vs temperatura.....	70
Figura 39 Porcentaje de concentración vs muestra.....	70
Figura 40 Masa de los polvos obtenidos vs temperatura de extracción	72
Figura 41 Cromatogramas de esteviósido y rebaudiósido A de cada tiempo de extracción vía infusión de hojas de <i>Stevia</i>	74
Figura 42 Áreas de pico de los glucósidos respecto al tiempo de extracción.....	75
Figura 43 Concentración de glucósidos respecto al tiempo de extracción y en la muestra certificada	76
Figura 44 Masa de los polvos obtenidos en su respectivo tiempo de extracción	77
Figura 45 Parrilla eléctrica marca Thermo Scientific modelo Cimarec	78
Figura 46 Cromatogramas de esteviósido y rebaudiósido A de cada nivel de agitación en que se llevó a cabo la extracción.....	79
Figura 47 Área de pico de cada nivel de agitación.....	80
Figura 48 Concentración obtenida de cada nivel de agitación	81
Figura 49 Cantidad de masa obtenida de polvo en cada nivel de agitación.....	81
Figura 50 Cromatograma de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra final	83
Figura 51 Área de pico de los glucósidos en la prueba final de extracción.....	84
Figura 52 Concentración de los glucósidos en la prueba final de extracción	84
Figura 53 Concentración de esteviósido y rebaudiósido A en las mejores corridas de cada parámetro vs prueba final	85
Figura 54 Masa obtenida de esteviósido y rebaudiósido A en las mejores corridas de cada parámetro vs prueba final	85
Figura 55 Extracto de <i>Stevia</i> antes y después de la floculación.....	86
Figura 56 Cromatogramas de efectividad de la floculación en dos distintos tiempos	87
Figura 57 Comparación entre las áreas de los glucósidos de interés de una muestra con y sin floculación	87
Figura 58 Porcentaje de concentración de los glucósidos en la muestra debido a la floculación	88
Figura 59 Diagrama de flujo del proceso completo de obtención a nivel laboratorio del edulcorante a base de <i>Stevia</i>	91

Figura 60 Cromatogramas del proceso completo hecho en el laboratorio para la obtención del edulcorante de <i>Stevia</i>	93
Figura 61 Área aproximada de esteviósido y rebaudiósido A en cada etapa del proceso de obtención del edulcorante a base de <i>Stevia</i>	95
Figura 62 Porcentaje de concentración de los glucósidos en cada etapa del proceso de obtención del edulcorante a base de <i>Stevia</i> vs la muestra certificada	97
Figura 63 Masa obtenida de glucósido en cada etapa tomando como base 1 gramo de hoja seca de <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>	98
Figura 64 Extracción de la Empresa vs Prueba optimizada	100
Figura 65 Filtración de la Empresa vs prueba optimizada	100
Figura 66 Floculación de la Empresa vs la prueba optimizada	101
Figura 67 Esquema de la recuperación de extracto mediante prensado	102

Tabla 1	Edulcorantes no dietéticos y su aporte calórico.....	5
Tabla 2	Edulcorantes artificiales, sus desventajas y consecuencias al consumirlos	7
Tabla 3	Edulcorantes naturales no calóricos. Descripción, usos y estructura	9
Tabla 4	Composición química elemental de la hoja de <i>Stevia</i>	46
Tabla 5	Principales picos de los espectros de FT-IR de los estándares de esteviósido y rebaudiósido A.....	49
Tabla 6	Resultado del cromatograma de la muestra certificada Rebaudiósido 40% mediante HPLC.....	54
Tabla 7	Alturas aproximadas del análisis de relación sólido/líquido del extracto de <i>Stevia</i> obtenido por infusión	56
Tabla 8	Concentración en porcentaje de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras relación sólido/líquido (w/w) estudiadas	58
Tabla 9	Cantidad de producto obtenido de acuerdo a la relación (w/w) sólido/líquido	59
Tabla 10	Resultados de los cromatogramas de cada variedad de hoja <i>Stevia</i> analizada mediante HPLC	62
Tabla 11	Concentración en porcentaje de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras de variedad de hoja <i>Stevia</i> estudiadas.....	63
Tabla 12	Resultados de los cromatogramas HPLC de hoja entera y polvo de 1000 μ m de <i>Stevia</i>	66
Tabla 13	Concentración de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras de hoja entera y polvo de <i>Stevia</i> estudiadas.....	67
Tabla 14	Resultados de los cromatogramas de temperatura de extracción vía infusión de hoja de <i>Stevia</i>	70
Tabla 15	Concentración de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras de temperatura de extracción.....	70
Tabla 16	Cantidad de producto obtenido de acuerdo a la temperatura de extracción.....	72
Tabla 17	Resultados de los cromatogramas de cada tiempo de extracción vía infusión de hojas de <i>Stevia</i>	75
Tabla 18	Concentración de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras de tiempo de extracción.....	76
Tabla 19	Cantidad de producto obtenido de acuerdo al tiempo de extracción	77
Tabla 20	Resultados de los cromatogramas de cada nivel de agitación en que se llevó a cabo la extracción.....	80
Tabla 21	Concentración de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras de cada nivel de agitación	81
Tabla 22	Cantidad de producto obtenido de acuerdo a la agitación en que se llevó a cabo la extracción	81

Tabla 23 Resultados y concentración de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra final	84
Tabla 24 Recopilación datos de concentración y masa de la prueba optimizada	85
Tabla 25 Área de esteviósido y rebaudiósido A antes y después de la floculación	87
Tabla 26 Concentración de glucósidos debido a la floculación.....	88
Tabla 27 Área aproximada de los picos correspondientes a los glucósidos en cada etapa del proceso de obtención del edulcorante a base de <i>Stevia</i>	95
Tabla 28 Porcentaje de concentración de cada etapa del proceso de obtención del edulcorante a base de <i>Stevia</i> vs muestra certificada	97
Tabla 29 Masa obtenida de glucósido en cada etapa tomando como base 1 gramo de hoja seca de <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>	98

INTRODUCCIÓN

La *Stevia rebaudiana Bertonii* es una planta originaria del norte Argentino, Paraguay y Brasil que en sus hojas contiene una serie de sustancias denominadas glucósidos, que se caracterizan por presentar un sabor que comparado con el del azúcar es entre 200 y 300 veces mayor (Aguilar, 2004; Chatsudthipong & Muanprasat, 2009; López Torres & Peña Guevara, 2004). Además de ser endulzantes, estos compuestos, presentan una serie de efectos beneficiosos para el organismo, debido a que pueden ser consumidos por personas diabéticas y obesas, no son cancerígenos, mutagénicos ni tienen efectos tóxicos. Los glucósidos presentes en la hoja, responsables del sabor dulce son Esteviósido, Rebaudiósidos A, B, C, D, E y Dulcósidos A y B, siendo los más abundantes Esteviósido y Rebaudiósido A (Kovylyeva et al., 2007; Lemus-Mondaca, Vega-Gálvez, Zura-Bravo, & Ah-Hen, 2012). Además, poseen los mejores atributos sensoriales como endulzantes.

En la actualidad la producción de edulcorantes a base de *Stevia rebaudiana Bertonii* ha ido en aumento, el mayor productor es China, y Paraguay es el segundo productor mundial de edulcorantes a base de *Stevia*. En México, son escasos los artículos científicos que abordan el uso de las hojas de la planta *Stevia* para producción de edulcorantes naturales y la producción nacional de estos productos es muy reciente, pues casi todo el producto que se consume en México es importado. (Celis, 2012)

Por otra parte, la tendencia de la sociedad apunta a consumir cada vez más productos naturales, particularmente en el mercado de los edulcorantes, en especial los producidos a partir de *Stevia*, han venido desplazando a los edulcorantes artificiales a los cuales se les atribuyen efectos secundarios nocivos para la salud. Se pronosticó que el mercado mundial de *Stevia* podría alcanzar los mil millones de dólares hacia el año 2014 y la Organización Mundial de la Salud espera que la *Stevia* represente el 20% de los 80 mil millones de dólares del mercado mundial de los edulcorantes, es por ello que se dice que este producto representa una gran área de oportunidad. (Celis, 2012)

La producción de edulcorantes naturales a partir de las hojas de *Stevia* en México, está muy limitada, debido al poco conocimiento sobre las propiedades de planta, así como a la falta de optimización en el proceso de extracción y purificación de los glucósidos del

steviol, lo que pone en evidencia las necesidades tecnológicas de este sector agroindustrial en México.

El objetivo del presente trabajo fue llevar a cabo la evaluación y mejoramiento a nivel laboratorio del proceso de extracción de una planta de producción de edulcorantes a base de *Stevia* ubicada en el Estado de Puebla.

El proyecto consta de tres fases: en la primera se realiza una evaluación de las condiciones en que se encuentra realmente la empresa, la segunda en reproducir y mejorar el proceso de extracción que se tiene (todo ello a nivel laboratorio) para finalmente, en la tercera etapa, efectuar las recomendaciones pertinentes para el mejoramiento de la planta de producción.

Las tres etapas quedan asentadas dentro del documento en una introducción y tres capítulos distribuidos de la siguiente manera:

En el primer se habla de los antecedentes, es decir, el conocimiento tanto del producto a obtener como el origen de procedencia del mismo y su razón de ser, lo que actualmente se está siguiendo en la Empresa en estudio y las diferentes técnicas de obtención del producto. Este último punto a causa de que dicho proceso no se encontraba debidamente caracterizado por lo que, a pesar de que en un inicio se planteó el mejoramiento de todas las etapas de proceso de producción, fue necesario reducir dichos alcances a solo la etapa de extracción.

El segundo capítulo habla de la metodología, de cuáles son las técnicas a seguir y como se llevarán a cabo los experimentos y los métodos de cada equipo.

Finalmente, el tercer apartado, son los resultados de los experimentos realizados así como el reporte de las condiciones de operación de la planta y el estado en que se encontró la misma antes de implementar los resultados de laboratorio, las condiciones en que se deja la planta después de los resultados y las sugerencias al proceso para mejorarlo.



Capítulo I

I. ANTECEDENTES

I.1 Tipos de edulcorantes

Los productos dulces han sido consumidos por el hombre desde el inicio de su historia con la finalidad de dar un sabor más agradable a los diversos alimentos a consumir. Es por ello que recurre a la implementación de los edulcorantes.

La palabra edulcorante viene de la palabra latina “dulcor”, que significa dulzor. Por lo tanto, un edulcorante es cualquier sustancia, natural o artificial, que es capaz de dotar de sabor dulce a un alimento, una bebida o un medicamento que de otra forma tiene sabor amargo o desagradable. (Aguilar, 2004; López Torres & Peña Guevara, 2004)

Algunas de las funciones generales de los edulcorantes en la industria alimentaria son (Valdés Martínez & Ruiz Ortiz, 2009):

- ✿ Aportación de dulzor al producto.
- ✿ Neutralización de sabores astringentes (en jugo de uva) y picante (chocolate).
- ✿ Efecto preservativo (por su higroscopicidad), por lo que se reduce el crecimiento microbiano.
- ✿ Para realzar el sabor de algunos alimentos como en las carnes curadas.
- ✿ Como fuente de carbono para levaduras y otros microorganismos, en procesos de fermentación como en panificación, bebidas alcohólicas, vinagre, etc.
- ✿ Contribuyente en el desarrollo del color y sabor debido a reacciones de caramelización y oscurecimiento de Maillard (cajetas, productos de panificación, etc).
- ✿ Proveedor de cuerpo, palatabilidad y textura (jarabes, dulces, helados, etc).
- ✿ Mejoramiento de las propiedades funcionales como el control del punto de congelación de productos congelados, cristalización en helados y dulces, al hacer una mezcla de edulcorantes.
- ✿ Enmascaramiento de sabor picante al elaborar mezcla de edulcorantes naturales y artificiales en pequeñas cantidades.

Los edulcorantes se pueden clasificar de diferente manera (López Torres & Peña Guevara, 2004; Valdés Martínez & Ruiz Ortiz, 2009):

- 🌿 Por su origen: naturales o artificiales.
- 🌿 Por su estructura: hidratos de carbono, alcoholes polihídricos, glucósidos, proteínas y otros.
- 🌿 Por su valor nutritivo: nutritivos y no nutritivos.
- 🌿 Por su valor calórico: calóricos o no dietéticos y no calóricos o dietéticos.

Siendo las más recurrentes tanto la primer como la última clasificación antes mencionadas.

I.2 Calóricos

Tabla 1 Edulcorantes no dietéticos y su aporte calórico

Edulcorante	Aporte calórico
Azúcar refinada	4.00 Kcal/g
Dextrosa	3.40 Kcal/g
Edulcorante de maíz	3.38 Kcal/g
Fructosa	3.86 Kcal/g
Glucosa	3.86 Kcal/g
Lactosa	80% de la sacarosa
Maltosa	3.80 Kcal/g
Miel	3.40 Kcal/g
Sacarosa	3.94 Kcal/g
Sorbitol	2.40 Kcal/g
Xilitol	2.40 Kcal/g

Los edulcorantes calóricos son aquellos que, como su nombre lo dice, aportan calorías al organismo. En términos generales, aportan 4 Kcal/g o 16 Kcal/cdta (Coca cola / Argentina, n.d.; Cortés S, n.d.). Son considerados una fuente natural de energía rápida y se pueden encontrar solos o añadidos a diferentes alimentos (Montes Rios, 2009).

Han sido empleados desde tiempos muy remotos como complemento de platillos, sin embargo, su consumo en exceso aunado a un estilo de vida poco saludable, se relaciona con sobrepeso u obesidad y diabetes tipo 2 por lo que su ingesta debe ser moderada.

Entre los edulcorantes calóricos más comunes se encuentran los enlistados en la Tabla 1, la cual muestra también sus respectivos aportes calóricos. (Marcial Berdugo, 2008; “Miel,” n.d., “Sacarosa,” n.d., “Sorbitol,” n.d.; mujer de elite, n.d.; Polioles, 2014; Vergés Serra, n.d.; Vitalimentos, 2011; Walstra, Walstra, & Wouters, 2005)

I.3 No calóricos: Naturales y artificiales

Los edulcorantes no calóricos también conocidos como edulcorantes de alta potencia, no son metabolizados por el organismo, tienen alto poder edulcorante y no contribuyen con calorías a la dieta.

Éstos, a su vez, pueden clasificarse con base en su origen en naturales y artificiales.

Los edulcorantes artificiales son compuestos elaborados por el ser humano, cuyo beneficio radica en que son mucho más dulces que el azúcar común pero con menos aporte energético, por lo que al agregarlos a una gran variedad de productos o alimentos se disminuye de forma importante su contenido de calorías, sin perder el sabor dulce. Dentro de los edulcorantes artificiales más comunes están el acesulfame K, el aspartame, el ciclamato, la sacarina y la sucralosa.

Lamentablemente, a este tipo de edulcorantes se le atribuyen una gran cantidad de efectos nocivos para la salud a largo plazo dentro de los que destacan los mencionados en la Tabla 2 (Aguilar, 2004; Biddulph, n.d.; Osorio Barrera, 2007; “Proceso para purificar sacarina,” n.d.; Valdés Martínez & Ruiz Ortiz, 2009).

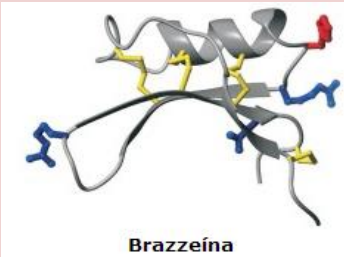
Tabla 2 Edulcorantes artificiales, sus desventajas y consecuencias al consumirlos

Edulcorante	Desventajas y consecuencia a largo plazo
Acesulfame K	*Deja un sabor amargo al final. *No es metabolizado por el cuerpo y es excretado, sin sufrir cambios, por los riñones. *Ciertos estudios realizados en ratas hembra y macho, mostraron que podía ser causante de tumores en el pulmón o en las glándulas mamarias y elevar el nivel de colesterol en ratas diabéticas. La FDA señaló que este análisis mostraba que dichos tumores eran típicos y podrían encontrarse en forma rutinaria, por lo cual la evidencia de que sea un carcinogénico no es concluyente.
Aspartame	*No se recomienda su empleo en productos que requieran un largo calentamiento o cocción ya que pierde su dulzor además de que tiende a descomponerse. *Una de las precauciones que se deben de considerar es que contiene Fenilalanina y no es apto para los fenilcetonúricos. *Al parecer causa daños irreversibles en las células cerebrales encargadas de la función endocrina, causando obesidad patológica y diabetes; así como daños en la fertilidad humana.
Ciclamatos	*Tiene un cierto regusto desagradable, por lo que se mezcla con sacarina. *Estudios demuestran que la ingesta producía alta presión sanguínea, atrofia testicular, mutagenicidad, tumores en vejiga, deformaciones en feto, así como daños en cromosomas, en animales de laboratorio. Motivo por el cual ha sido prohibido en algunos países.
Sacarina	*Aunque presenta un sabor dulce inicial muy intenso, dejan un regaliz metálico final muy persistente. *En su mayor parte se elimina como tal por la orina; no es genotóxica. *Debe limitarse su consumo así como usarse sólo muy pura ya que de lo contrario se estarían ingiriendo junto con ella entre 50 y 100 ppm de

	impurezas dentro de las cuales destacan el amonio, algunos metales pesados y o-tolueno sulfonamida dependiendo del método de obtención empleado (Método de Maumee y método de Remsen/Fahlberg respectivamente). *Hay estudios que indican que puede ser potencialmente nociva para el feto durante el embarazo ya que puede traspasar la placenta y puede afectar al producto y causar irritabilidad y alteraciones musculares. *Hay quienes afirman que produce erupciones en la piel, diarrea o dolores de cabeza, pero también sostienen que estas consecuencias se presentan porque el compuesto pertenece al grupo de la sulfonamida. *Estudios recientes han concluido que el uso de este compuesto puede incrementar el peso corporal ya que mediante estudios en roedores se estableció una correlación inversa entre el endulzante y consumo de calorías, en el cerebro de los roedores, que tuvo como consecuencia un fenómeno de sobrealimentación tan generoso, que los hizo subir de peso.
Sucralosa	*Proviene del azúcar; sin embargo, tiene un proceso de elaboración en donde intervienen intermediarios químicos, por tal motivo no se puede considerar natural. *No es metabolizado por el organismo por lo que se excreta sin alteración. *La sucralosa podría actuar como disparador de las migrañas aunque no se ha podido comprobar del todo. *Es necesario realizar un estudio antes de consumirlo ya que personas sensibles o alérgicas al edulcorante presentan dolores musculares, hinchazón, diarrea, mareos, adormecimiento y dolor estomacal. Otros posibles efectos secundarios son problemas de vejiga, calambres intestinales y agitación similar al pánico.

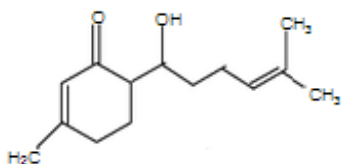
Por su parte, los edulcorantes naturales son aquellos que son extraídos de la naturaleza y cuyo consumo no genera desventajas o problemas al ser humano. Algunos de estos edulcorantes son enlistados en la Tabla 3 donde además se muestra su descripción, usos más generales y su estructura molecular. (Giannuzzi & Molina Ortiz, 1995; López Torres & Peña Guevara, 2004; “Monelina. Composición proteica, propiedades, dulzura, como un edulcorante,” n.d., “Taumatina,” n.d.).

Tabla 3 Edulcorantes naturales no calóricos. Descripción, usos y estructura

Edulcorante	Descripción	Usos
Brazeína 	Proteína dulce extraída de una enredadera originaria del África occidental (<i>Pentadiplandra brazzeana Baillon</i>). Consta de 54 aminoácidos que forman una hélice alfa y tres cadenas de beta-láminas antiparalelas (cadenas de aminoácidos en las que los grupos NH de una cadena forman enlaces de hidrógeno con los grupos C=O de una cadena opuesta). Es aproximadamente 1000 veces más dulce que el azúcar. Su sabor es similar al de la sacarosa pero con regusto dulce persistente. Es estable en un amplio rango de pH (2.5 a 8) y a temperaturas de 98°C por 2 h. Desventaja: no se puede extraer en cantidades comerciales de su fuente natural pero se puede producir de	Utilizado como edulcorante natural en comidas y bebidas.

variedades de maíz genéticamente modificados.

Hernandulcina



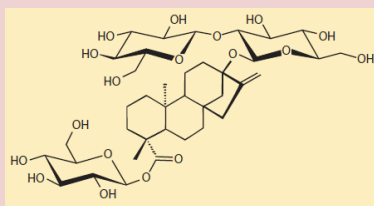
Endulzante natural usado por los aztecas.

Principalmente empleada en

infusiones.

Desventaja: Junto con la extracción de la hernandulcina se encuentra el alcanfor, lo cual hace que esta planta sea abortiva.

Esteviósido



Glucósido diterpeno cristalino y dulce cuya molécula compleja contiene 38 carbonos, 60 hidrógenos y 18 oxígenos.

Edulcorante de mesa, dulces, en bebidas, pastelería, confituras, mermeladas, yogures, chicles, entre otros.

Su sabor dulce es considerado excelente ya que es entre 250 y 300 veces más dulce que la sacarosa.

Monelina



Proteína extraída de la savia de los frutos del *Dioscoreophyllum comminsii* (baya de Nigeria)

Es útil en la obtención de nuevas

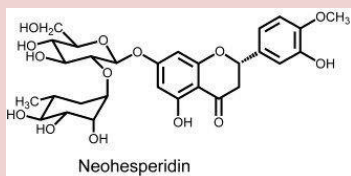
De estructura polipeptídica constituida por una sola cadena de aproximadamente 94 aminoácidos y conformada por dos aminoácidos, la primera con 44 y la segunda con 50.

variedades de tomate y lechuga con mejor sabor.

Es de los edulcorantes naturales más dulces (3000 veces superior a la sacarosa).

Desventaja: A temperaturas elevadas (>70°C y a pH extremo sufre una descomposición y pierde su poder edulcorante. Esta molécula pierde también su actividad en frío

Neohesperidina

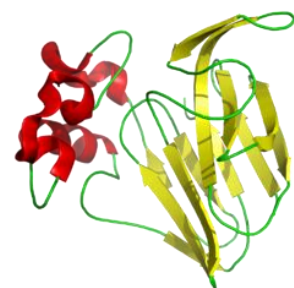


Se produce por hidrogenación de neohesperidina, un flavonoide que se encuentra de modo natural en las naranjas amargas.

Desventaja: Su potencia está afectada por el pH o la aplicación en que se use.

Empleado en goma de mascar, caramelos, postres, bebidas carbonatadas y no carbonatadas y como edulcorante de mesa.

Taumatina



Se obtiene a partir del fruto del Katemfe de África Occidental *Thaumatococcus daniellii*, conocida como la “fruta del milagro”.

Figura en el “libro Guinness de los Récords” como la sustancia más dulce conocida, unas 2500 veces más que el azúcar. Tiene un cierto regusto a regaliz y mezclada con glutamato, puede utilizarse como potenciador del sabor.

Desventaja: Obtención altamente costosa (ingeniería genética)

Uso en alimentos muy limitado

Implementado en bebidas a base de café, gomas de mascar, aperitivos, productos bajos en grasa, yogures, postres, productos farmacéuticos, bebidas alcohólicas.

I.4 Stevia

I.4.1 Generalidades



Figura 1 Foto de la planta de *Stevia Rebaudiana Bertoni*

La *Stevia* es un edulcorante de alta intensidad proveniente de la planta *Stevia rebaudiana Bertoni* considerado como natural de acuerdo a su origen. (Ronald & Deis, 2012)

La *Stevia rebaudiana Bertoni* es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia de las Asteraceas, que crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y Paraguay, cuyo tallo es erecto de raíz pivotante que logra alcanzar una altura de 70 cm aproximadamente. Sus hojas son simple opuestas, en su estado juvenil, y alternas como manifestación de floración. (Hearn y Subedi, 2008)

Su reproducción es de manera asexual por fecundación cruzada (alógama) que se hace vegetativamente con el fin de conservar las características genéticas por medio de esquejes obtenidos de plantas adultas seleccionadas y fito-sanitariamente sanas.

La reproducción por semilla no es recomendada por la gran variabilidad fenotípica, lo cual se traduce en una menor calidad de hoja. (Villagran Jaramillo, Huayamave Bravo, Lara García, & Maluk Salem, n.d.)

Es una planta de raíz perenne pero de sistema aéreo transitorio por lo cual puede considerarse un cultivo perenne, siempre y cuando se hagan las prácticas adecuadas para mantener un sistema radicular y lograr de esta forma un rebrote luego de cada cosecha.

La *Stevia* es una especie vegetal de foto-periodo corto y su producción depende de la cantidad de luz día que reciba.

Se le conoce mundialmente como yerba dulce o “ka-á-he-é” en su denominación vernácula cuyas hojas han sido utilizadas durante siglos por los indios guaraníes para endulzar sus comidas y bebidas sin efectos nocivos para su salud (Alonso, 2010). Aunque los conquistadores españoles tuvieron conocimiento de la *Stevia* durante el siglo XVI, no fue sino hasta 1887 que el científico norteamericano Anthony Bertoni la reportó.

Las hojas de la planta *Stevia rebaudiana Bertoni* tiene diferentes tipos de componentes que son los que proporcionan el dulzor. Están los esteviósidos, los glucósidos, los rebaudiósidos (A, B, C y D) y el dulzor puede variar dependiendo de la concentración con que se encuentren estos componentes dentro de la hoja de la planta. Entre menos componentes tengan, éste será de mayor pureza, los rebaudiósidos A son los considerados más puros. (Rodríguez Montoya, 2007)

Las hojas secas de la *Stevia* contienen un 42% aproximadamente de sustancias hidrosolubles dentro de las cuales se tiene una concentración de esteviósido y rebaudiósido en las hojas secas del 6% al 10%, habiéndose registrado ocasionalmente valores extremos del 14%. (Alonso, 2010; Rodríguez Montoya, 2007)

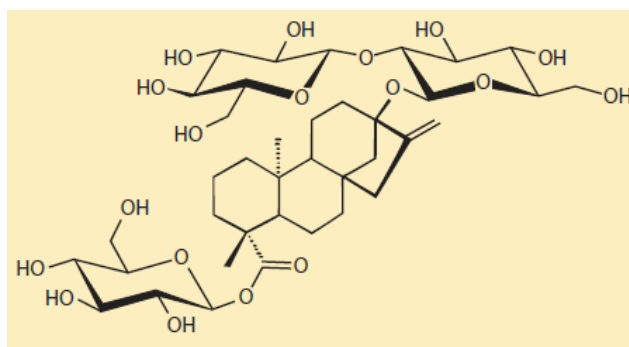


Figura 2 Molécula de *Steviósido*

Diversos análisis de laboratorio han demostrado que la *Stevia* es extremadamente rica en: hierro, manganeso, cobalto, fósforo, calcio, potasio, zinc, proteínas, fibras y vitaminas A y C. No contiene cafeína. Tiene un peso molecular de 804 g/mol. Su fórmula es $C_{38}H_{60}O_{18}$. Sus cristales en estado de pureza se funden a 238°C. Mantiene su sabor estable a altas y bajas temperaturas. No fermenta. Es soluble en agua, alcohol etílico y metílico. Su informe nutricional reporta que no tiene aporte calórico, su contenido en grasas saturadas es nulo al igual que el contenido de azúcares, colesterol y el número total de carbohidratos. (Rodríguez Montoya, 2007)

Actualmente la planta *Stevia rebaudiana Bertonii* se cultiva en varios países como Japón, China, Corea, Malasia, Rusia, Israel, América del Sur y México. (Rodríguez Montoya, 2007)

Cobra un alto valor entre los vegetales nativos de los países antes mencionados, debido a que contiene glucósidos de diterpeno bajos en calorías, llamados comúnmente esteviósidos, cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino puede ser desde 50 hasta 300 veces mayor que el del azúcar de caña. (Jarma O, Combatt C., & Cleves L., 2010; Ronald & Deis, 2012)

1.4.2 Ventajas y usos

La *Stevia* no tiene calorías y es no cariogénico, es decir, no produce caries. Es muy estable a condiciones de temperaturas altas y un rango de pH entre 3 y 9 a temperaturas no mayores a 100°C. Es altamente higroscópica. Tiene un ligero resabio además de presentar efectos beneficiosos en la absorción de la grasa y la presión arterial ya que funge como vasodilatador, diurético y cardiotónico con lo cual se regula la presión y los latidos del corazón. No se reportan efectos secundarios de ninguna clase, como efectos mutagénicos u otros efectos que dañen la salud. Una taza de azúcar equivale de 1 ½ a 2 cucharadas de la hierba fresca (de 3 a 4 g) o ¼ de cucharadita (de 250 a 500 mg) del polvo de extracto. (Baño Montero, 2010; Chatsudthipong & Muanprasat, 2009; Cuadras, 2012; INNATIA, 2013; Loria Kohen, 2012; Osorio Barrera, 2007; Purkayastha, 2010; Ronald & Deis, 2012; Villagran Jaramillo et al., n.d.)

El consumo del edulcorante *Stevia* proporciona diversos beneficios, dentro de los cuales se encuentran los nutrientes que este edulcorante proporciona y que se enlistan a continuación (López Torres & Peña Guevara, 2004; Terán Elizalde, 2010):

- ✿ Más del 50% de carbohidratos de fácil asimilación.
- ✿ Más del 10% de fibras, polipéptidos (proteínas vegetales).
- ✿ Más del 1% lípidos, potasio.
- ✿ Entre el 0.3 y 1% de calcio, magnesio y fósforo.
- ✿ Menos del 0.1% cromo, cobalto, hierro, manganeso, selenio, silicio, zinc.
- ✿ Indicios de ácido ascórbico, aluminio, beta caroteno C, estaño, riboflavina, vitamina B1.
- ✿ Varios aceites esenciales.

Además, provee beneficios para la salud como lo son el de reducir la obesidad así como la ansiedad por lo que es recomendado para las personas que presentan diabetes. Es considerado un cardiotónico ya que regula la presión y los latidos del corazón, así mismo, funciona como antireumático y antioxidante. Presenta efectos digestivos ya que ayuda a eliminación de toxinas al ser diurético y antiácido. A su vez, previene caries y enfermedades de las encías al detener el crecimiento de las plaquetas debido a que es compatible con el flúor. De igual manera, presenta un efecto dérmico de revitalización de células epiteliales que se refleja en la rápida cicatrización de las heridas al mismo tiempo que manifiesta una actividad antimicrobiana al eliminar *E-coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, bacilos y el hongo *Cándida albicans* (productor frecuente de vaginitis en la mujer) con el extracto de *Stevia* y al mismo tiempo no afectar a las bacterias útiles, lo que indica una acción selectiva (Sato investigador japonés 2000) (Terán Elizalde, 2010) (Villagran Jaramillo et al., n.d.)(Rodríguez Montoya, 2007)(Alonso, 2010)(Ronald & Deis, 2012).

Otras aplicaciones tradicionales, sobre todo en América Latina, incluyen la nutrición del hígado, páncreas y el bazo ya que, al no ingerir una gran cantidad de azúcares y reducir el nivel de grasas ayuda al buen funcionamiento de éstos facilitando la desintoxicación de los mismos y por ende del organismo. Asimismo, contrarresta la fatiga y ayuda a aliviar las “hambres falsas” promoviendo la sensación de bienestar.

Se llega a aplicar de manera externa como tratamiento de la piel en manchas y granos.

Por otra parte, las propiedades a destacar de este edulcorante son (López Torres & Peña Guevara, 2004; Terán Elizalde, 2010):

- ✿ Su poder endulzante de hasta 300 veces más dulce que la sacarosa derivado de los glucósidos responsables del sabor dulce de la planta (el esteviósido y el rebaudiósido A).
- ✿ El contenido de más de 100 elementos y aceites volátiles identificados que contiene la *Stevia* sin refinar.

En la actualidad, el edulcorante *Stevia*, se utiliza de varias formas, como una infusión, en forma líquida o en forma de cristales solubles, cada una de ellas con diferentes propiedades y aplicaciones. Dentro de los principales usos se encuentran la implementación de éste como:

- ✿ Edulcorante de mesa, en la elaboración de bebidas, dulces, mermeladas, chicles, en pastelería, confituras, yogures, etc.
- ✿ Algunos estudios indican su actividad antibiótica, en especial ataca a las bacterias alojadas en las mucosas bucales y los hongos.

En 1970, Japón aprobó el uso de la *Stevia* en alimentos y bebidas en sustitución de los edulcorantes químico-artificiales (supone el 41% de los endulzantes consumidos) y en Extremo Oriente (comprendido por Asia Oriental, Sudeste Asiático y el Extremo Oriente Ruso) es muy utilizada como edulcorante, tanto en refrescos como en chicles y hasta para saltar las salsas (Rodríguez Montoya, 2007).

En Estados Unidos de Norte América la Food and Drug Administration (U.S. FDA) aprobó en septiembre de 1995 el uso de *Stevia* como endulzante, aunque con restricciones: sólo podría venderse en tiendas naturistas. Con esta medida se garantiza que no interfiera con los intereses de las industrias productoras de los otros edulcorantes no naturales. En el año 2002 el mercado de la *Stevia* en EEUU experimentó un incremento de más del 400% y continúa actualmente con esta tendencia (Rodríguez Montoya, 2007).

I.5 Tipos de proceso de obtención de los endulzantes de *Stevia*

En la literatura es posible encontrar diversos procesos industriales para la extracción y purificación de los endulzantes de la hoja de *Stevia rebaudiana Bertoni* sin embargo, todos ellos se reducen a tres clasificaciones (Delgado Encinas, 2007; López Torres & Peña Guevara, 2004):

- ✿ Extracción por medio de solventes orgánicos
- ✿ Extracción en condiciones supercríticas
- ✿ Extracción mediante un medio acuoso

En el caso de la extracción por medio de solventes orgánicos, se puede realizar una extracción mediante alcoholes de 4-8 átomos de carbono como el metanol. Cualquiera que sea el solvente usado en la operación, se realiza de forma similar, lo que varía son las condiciones en que la extracción se lleve a cabo ya que tanto la temperatura como el tiempo de extracción depende del solvente empleado.

El solvente orgánico más implementado para este proceso es el metanol, cuyo uso se supone incrementa la eficacia del proceso de extracción y la separación de los esteviósidos y aunque posteriormente es removido del producto final, es una de las razones por las que la FDA (Food and Drug Administration) no califica a los extractos de *Stevia* como un producto natural y seguro.

Los métodos aplicables a la extracción del edulcorante *Stevia* mediante el empleo de solventes orgánicos son los siguientes:

- ✿ Maceración
- ✿ Lixiviación
- ✿ Extracción por Soxhlet

Siendo los métodos mayormente empleados los mencionados a continuación:

- ✿ Método de Payzant John Donald (1999)
- ✿ Álvarez y Couto (1984) y Goto (1997)
- ✿ Dobberstein (1982)

Por su parte, la extracción del edulcorante a condiciones supercríticas está siendo empleado a nivel industrial, debido a que se incrementa el poder del solvente al lograr una penetración a nivel microporo en la hoja seca, lo que representa una mayor capacidad de extracción en comparación de los otros dos métodos.

El ejemplo claro de este método es el descrito por Kienle (1992) que se efectúa mediante CO₂ presurizado y el cual se lleva a cabo en dos etapas, la primera es la extracción de parte de los compuestos responsables del sabor amargo y la segunda la extracción de los glucósidos (Delgado Encinas, 2007) .

El extracto obtenido contiene tanto los principios activos como pigmentos de la hoja, polisacáridos solubles y otras impurezas (Macia & Monesterolo, n.d.).

A su vez, para la extracción mediante solventes acuosos la operación puede llevarse a cabo de dos formas distintas, mediante una infusión o bien una destilación por arrastre de vapor.

En la primera, infusión, solo consiste en agregar agua caliente a las hojas de *Stevia* contenidas en un recipiente dejándolo reposar por un lapso de tiempo determinado para de esa manera extraer los glucósidos contenidos en las hojas. Por su parte, la segunda, arrastre de vapor, se efectúa en una columna de destilación en tres etapas lo que consiste en el calentamiento de la mezcla de las hojas con el solvente, en la parte baja de la columna, para dar lugar a un vapor rico en la esencia de las hojas, mientras que por la parte superior de dicha columna desciende agua fría para condensar parte del vapor y hacer que éste sea en cada etapa de la columna cada vez más rico en la esencia de interés. Los ejemplos más claros de estas metodologías son (Delgado Encinas, 2007; López Torres & Peña Guevara, 2004; Macia & Monesterolo, n.d.):

🌿 Método descrito por Kutowy (1999)

🌿 Método descrito por Cernadas y Pryluka (1985)

Finalmente, sea cual sea la metodología a seguir, el proceso de obtención del edulcorante *Stevia* podría resumirse en el siguiente diagrama de flujo:

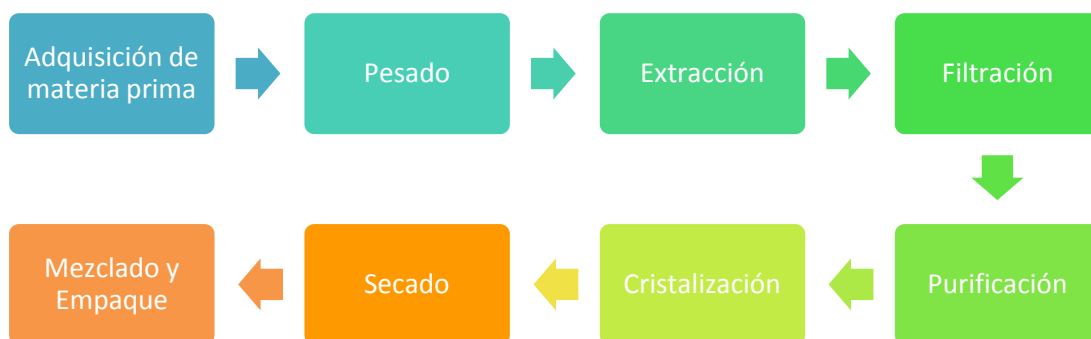


Figura 3 Diagrama de flujo general del proceso de producción del edulcorante de *Stevia*

Los pasos siguientes a la extracción, tal y como se logra observar en la Figura 3 son:

- 🌿 **Filtración.** La finalidad de este paso es retener las partículas en suspensión para lo cual se recurre al uso de dos o más filtros o membranas.
- 🌿 **Purificación.** Paso importante para el producto final a comercializar. Se puede llevar a cabo por tres mecanismos diferentes; combinación de membranas filtrantes, absorción con zeolitas modificadas o bien por resinas de intercambio iónico. La primer opción se realiza mediante el paso del fluido por membranas filtrantes de distinto tamaño que van de las 20 a 1 micra, para luego ser sometida a una ultrafiltración y nano filtración. Por su parte, tanto el uso de zeolitas como el de resinas se efectúa por intercambio iónico, la diferencia entre ellas es que en el uso de zeolitas se lleva a cabo el intercambio de iones sodio por iones de calcio, bario o magnesio usando cloruro como anión pero que al usar bario resulta un sabor salado en el producto final, mientras que para el uso de resinas el líquido de extracción primero es sometido al paso por una resina que retiene los edulcorantes extraídos, para después ser recuperados por elusión de una columna con una mezcla hidroalcohólica y a continuación pasarla por una segunda resina pero ahora de intercambio catiónico y posteriormente una tercera que es de intercambio aniónico para finalmente pasarlo por una columna de carbón activado (Álvarez, 1984)(Macia & Monesterolo, n.d.)

- ✿ Cristalización. Su finalidad es obtener el edulcorante en polvo lográndose por la evaporación la formación de los cristales.
- ✿ Secado. Paso que se efectúa para la obtención del polvo ya que se retira por corriente de aire caliente, 80°C aproximadamente, la humedad contenida en los cristales para si es requerido, para posteriormente molerlos y así lograr el polvo fino.
- ✿ Mezclado y empaque. Esto se efectúa con la finalidad de venta del producto por lo que algunas compañías mezclan el endulzante obtenido con lactosa, maltodextrina o dextrosa para luego ser empacadas conforme a las presentaciones establecidas.

Como consideración importante hay que tomar en cuenta el tratamiento previo que se le da a la hoja, la cual debió ser secada en el lugar de origen antes de las veinticuatro horas de la recolección de las mismas.

1.6 Descripción del proceso seguido actualmente por la planta de producción

La finalidad de esta tesis es llevar a cabo la reproducción, a nivel laboratorio, de la metodología de extracción seguida actualmente en la planta de producción del edulcorante de *Stevia* para con ello hacer una evaluación del proceso implementado y de esa manera establecer algunas mejoras considerables a dicho proceso de producción.

El proceso actualmente seguido en la planta de producción para la extracción de los edulcorantes presentes en las hojas de *Stevia* es el descrito a continuación y esquematizado en la Figura 4.

Se inicia con la llegada de las hojas de *Stevia* a la planta de extracción que preferencialmente deberán contener como máximo de un 7 a 8% de humedad.

La cantidad mínima a procesar deberá ser de 300 Kg/día distribuida en bolsas de 20 Kg de preferencia para no entorpecer la maniobra de carga en el difusor.

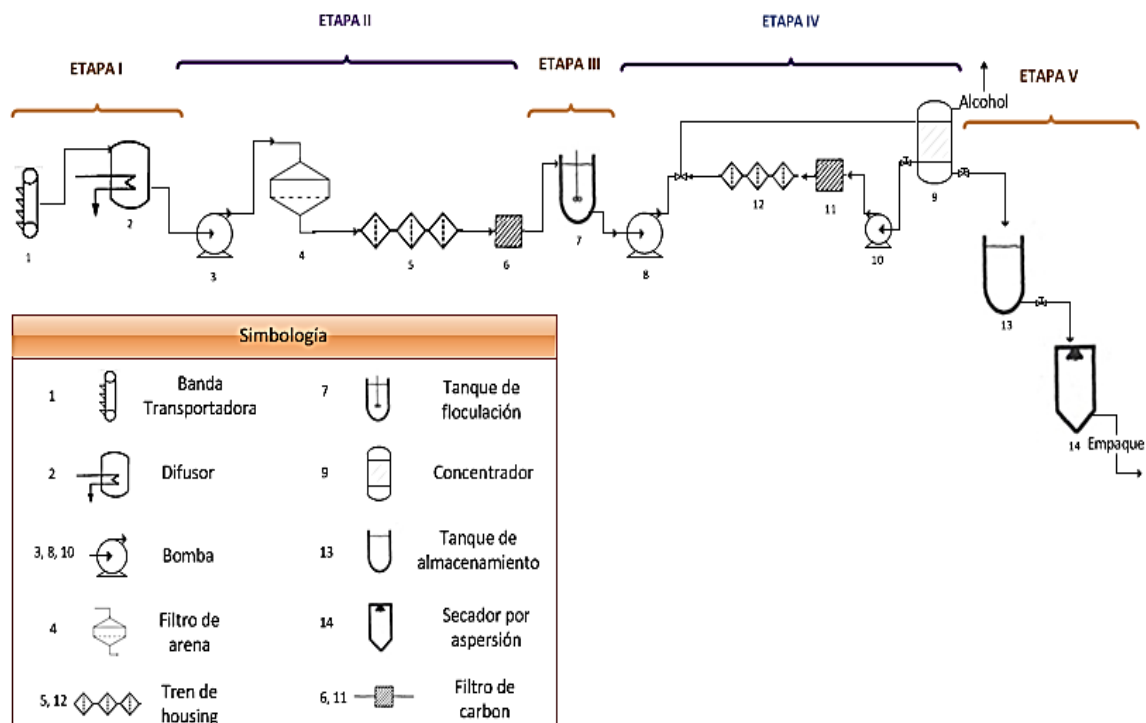


Figura 4 Esquema del proceso para la extracción de los edulcorantes presentes en las hojas de *Stevia*

Etapa I: Para la extracción se dispone de un difusor de 3000 litros de capacidad (2) que deberá llenarse con agua tratada hasta la mitad, dicho difusor está equipado con un dispositivo de calentamiento (serpentín) por el cual circula vapor (de escape) de 7 Kg/cm², el cual empezará a circular desde el momento que empiece a caer el agua al difusor.

La alimentación de las hojas de *Stevia* se lleva a cabo mediante un transportador (1), por la parte superior del difusor hasta completar la carga (lleno al 90%) y terminar de llenar el difusor con agua tratada.

Una vez llenado el difusor, se cierra con su tapa (tornillería) e inicia la recirculación del agua caliente (40-45°C) en dicho difusor. Previamente se adicionan 500 L de etanol al 96% antes del llenado, manteniendo la temperatura descrita. Esta operación durará 4 horas.

Posteriormente, se abre la tapa del difusor para iniciar el vaciado del mismo y se realiza el cambio de válvulas para empezar con el filtrado de los sólidos.

Etapa II. El primer filtro será el de arena (4) para separar los gruesos, posteriormente pasará al tren de housing (5) para filtrar con cartuchos desechables primero 20 micras, 10 micras, 5 micras y 1 micra. Por último, el líquido se hace pasar por un filtro de carbón activado (6) (acero inoxidable). Los flujos en estos filtros deben ser de 20 L/min mediante una bomba (3) que opere en un rango de presión de 45-50 psi.

Se continúa el proceso con la apertura de la válvula para bombear el producto al tanque de floculación (7).

Etapa III. Una vez en el tanque, se determina el volumen correspondiente al líquido y se pone en funcionamiento el agitador del tanque. Se agrega 1 g de hidróxido de calcio por litro de líquido contenido en el tanque manteniendo la agitación. Posteriormente, se agrega 1 g/L de sulfato de aluminio (agitando). Esta operación durará 15 minutos.

Concluido el tiempo, se apaga el agitador y así se da inicio con el proceso de clarificación/floculación el cual tiene una duración de 8 horas.

Etapa IV. El sobrenadante (líquido claro) se bombea al alambique/concentrador (9) y una vez cerrado, le es adicionado alcohol etílico hasta que alcance una concentración de 20%. Ocurrido lo anterior, se calienta la mezcla hasta alcanzar una temperatura de 45°C momento en el cual, se da comienzo a una recirculación sobre sí mismo durante 20 minutos con el fin de capturar la clorofila que aun esté en el sistema.

Concluido lo anterior, se somete nuevamente a recirculación pasando esta por un filtro de carbón activado (10) con el fin de detener la clorofila separada de los líquidos.

El líquido resultante se hace pasar por el proceso de filtración final para retener la clorofila separada en este proceso, lo cual se logra filtrando con el segundo tren de filtros (11) que tienen cartuchos desechables de 20 micras, 10 micras, 5 micras y 1 micra. Los flujos en estos filtros deben ser de 20 L/min mediante una bomba (10) operada en un rango de presión de 45-50 psi.

Como el líquido final contiene etanol, se efectúa el cambio de válvulas para iniciar la destilación del etanol y recuperar el alcohol del sistema.

Finalmente, se hace el último cambio de válvulas y se pone a funcionar el extractor de turbina para comenzar la concentración de los azúcares. La finalidad de esta operación es reducir el volumen original de líquido contenido en el alambique a aproximadamente la mitad.

Etapas V. Ya obtenido el concentrado es llevado al tanque de almacenamiento (13) para posteriormente ser llevado a un Spray Dryer (14) para su secado final y empaclado.

I.7 Selección de la metodología a seguir

Para la selección de la metodología a seguir en la obtención de los edulcorantes contenidos en las hojas de la planta *Stevia rebaudiana Bertoni* se han considerado como relevante tomar en cuenta cuatro cosas:

-  Información de las diferentes metodologías
-  Economía en la producción
-  Calidad del producto final
-  Producción masiva del producto de interés

Al hacer un análisis de las metodologías señaladas en el apartado I.5, se llega a la conclusión de que la implementación de una metodología de medio acuoso será la mejor opción según las normativas de la FDA (Food and Drug Administration), en lo respectivo a la clasificación del endulzante como natural. Así mismo, es a consideración uno de los más económicos en lo que a extracción y a filtración se refiere, ya que presenta un alto rendimiento en la obtención del edulcorante además de que el mayor consumo de energía requerida en el proceso es el absorbido por las bombas empleadas para hacer que los líquidos pasen por los filtros, a diferencia de las demás metodologías que requieren del consumo elevado de energía, tal y como lo sería el continuo calentamiento y enfriamiento de los líquidos obtenidos a lo largo del proceso (metodología de Payzant), o el gasto

económico que genera la integración en el proceso de un disolvente orgánico (metodología de Payzant, Álvarez, Dobberstein y una sección de la presentada por Cemadas) que suelen ser de un coste elevado y que al final tiene que recuperarse lo que implica un gasto energético.

En lo referente a la calidad del producto final, al implementar una metodología cuyo disolvente es acuoso, se elimina la presencia de los tóxicos generados por el uso de disolventes orgánicos como el metanol, que es el frecuentemente usado en las otras técnicas y aunque la que implementa condiciones supercríticas no genera este problema se vuelve a presentar el problema energético.

Por último, es importante señalar que al evaluar las diferentes metodologías, varias de ellas, generalmente las que incluyen el uso de algún disolvente orgánico, presentan la característica de llevarse a cabo de forma “batch”, es decir por lotes, que puede tomar un tiempo de hasta 48 horas, lo que para nivel planta de producción representa grandes pérdidas. Caso contrario ocurre tanto con los métodos que implementa condiciones supercríticas (que ya anteriormente se descartó) como con la metodología de disolvente acuoso, que se puede llevar a cabo de forma continua lo que se puede traducir en un uso y abastecimiento constante durante la cadena productiva y que más tarde puede llevarse a la automatización.

Ahora que ya se ha seleccionado el proceso a implementar se procede a efectuar la etapa experimental que se describe en el siguiente apartado.



Capítulo II

II. METODOLOGÍA

A grandes rasgos la metodología seguida para la extracción y análisis del edulcorante a base de *Stevia* es la mostrada en la Figura 5, la cual inicia con la adquisición de la materia prima, provista por la empresa en cuestión, pasando por la selección de la materia prima, extracción del edulcorante y una semi-purificación (floculación y filtración) hasta llegar al análisis de la pureza del producto final realizada mediante cromatografía de líquidos (HPLC).

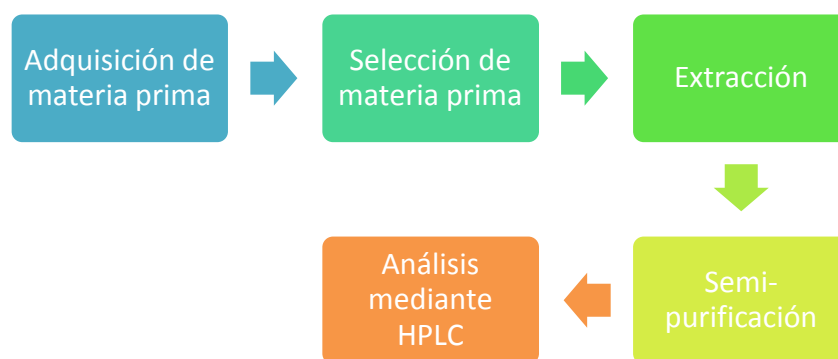


Figura 5 Esquema del proceso de obtención y análisis del edulcorante a base de *Stevia*

De manera más detallada, el esquema anterior se presenta en la Figura 6 en donde se pueden observar los pasos comprendidos entre cada una de las etapas del proceso de obtención y análisis del edulcorante a base de *Stevia*, destacándose el hecho de que entre la etapa de semi-purificación y la correspondiente al análisis mediante HPLC existen siete pasos siendo tres de ellos (tanto la floculación como dos pasos de filtración) los correspondiente al proceso de semi-purificación.

Por su parte, la metodología a seguir para el análisis de cada uno de los parámetros (temperatura, agitación, relación sólido/líquido y tiempo de extracción) por separado consistió básicamente en la metodología mostrada en la Figura 6, solo que se omitieron tanto el paso de la caracterización de la hoja, como el de la floculación y su siguiente filtración.

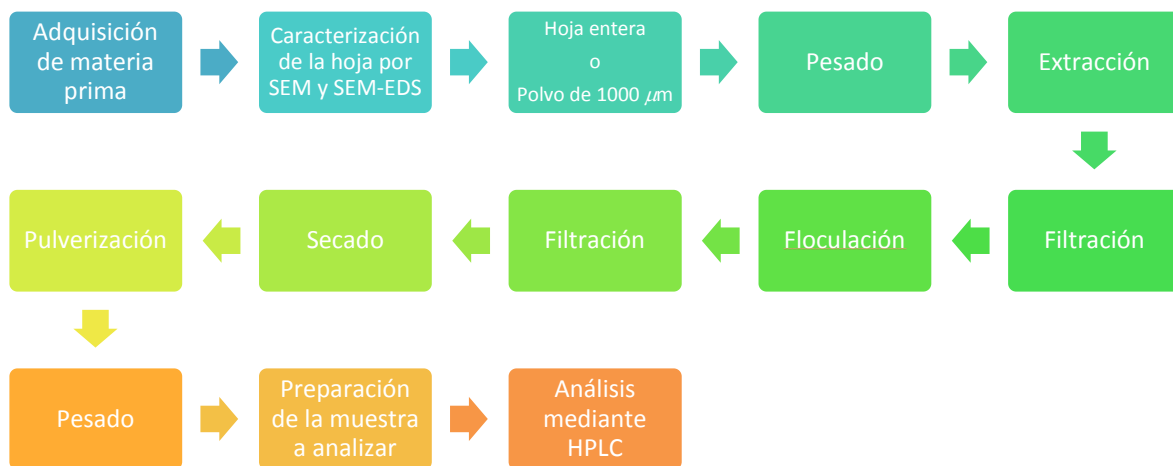


Figura 6 Diagrama completo de la metodología seguida en el proceso de obtención del edulcorante de *Stevia* a nivel laboratorio

Cada uno de los pasos mostrados en los diagramas de flujo será explicado en este apartado en los siguientes subtítulos.

II.1 Proceso de extracción del edulcorante a base de *Stevia* a nivel laboratorio

II.1.1 Adquisición de la materia prima

La materia prima, hoja seca, fue provista por la empresa en cuestión directamente al laboratorio.

Fueron entregadas cuatro variedades de hoja de *Stevia rebaudiana Bertoni*, denominadas: MPM, MPP, MPT y MPV, las tres primeras provenientes de diferentes zonas del estado de Puebla, la zona de la Mixteca, Puebla y Tecolutla respectivamente, y una más originaria del estado de Veracruz. Todas ellas venían empacadas en bolsa (ver Figura 7) sin previa especificación de las condiciones de cultivo, tiempo de la recolección, condiciones de secado ni porcentaje de humedad presente en ellas.



Figura 7 Materia prima

Las bolsas contenían además de las hojas enteras, hojas semi-trituradas, algunos troncos de la misma planta además de que en una de las muestras presentó un poco de tierra, al parecer de la zona de sembrado, lo que deja en claro deficiencias en la cosecha y/o recolección de la materia prima.

Dicho lo anterior, para el proceso de extracción fue necesario hacer una previa selección de las hojas para retirar en la medida de lo posible tanto la tierra como los troncos y de esa manera poder clasificar cada variedad de hoja en dos tantos, uno de hoja entera y el otro con la semi-triturada que posteriormente fue molida y tamizada dando así origen al polvo de $1000\mu\text{m}$.

II.1.2 Caracterización de la hoja de Stevia mediante SEM y SEM-EDS

Se utilizaron las cuatro variedades de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni antes mencionadas: MPM, MPP, MPT y MPV.

La caracterización de la hoja de *Stevia* se efectuó bajo la implementación de un microscopio electrónico de barrido (Figura 8a) marca JEOL modelo JSM-6610LV acoplado con una sonda de espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X de la marca OXFORD INSTRUMENTS modelo INCAX-act (SEM y SEM-EDS). El primero, SEM (empleado para el conocimiento de la morfología de la hoja) se efectuó a condiciones de alto vacío con una aceleración de voltaje de 5kV y una separación de la superficie de la muestra de 10

milímetros. Por su parte, el segundo (SEM-EDS), utilizado para conocer la composición química elemental de cada una de ellas se llevó a cabo con una apertura de cañón de electrones a 60 de spot size, a condición de alto vacío, un minuto de exposición a la irradiación y una separación respecto de la muestra de 10 milímetros.

Para el procedimiento anterior, se tomó aleatoriamente una hoja completa de cada variedad, dado que son muestras orgánicas, fue necesario efectuarles un recubrimiento de oro mediante un evaporador marca Denton Vacuum modelo DESK V (Figura 8b) para poder ser analizadas. Posteriormente, se cortó cada hoja por la mitad horizontalmente y se colocaron, cada una, en un porta muestra de aluminio adhiriéndolas mediante un trozo de cinta carbón doble cara para finalmente, introducir una a una al equipo y hacer sus respectivos análisis.



Figura 8 Equipo empleado en la caracterización: a) Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6610LV b) Evaporador marca Denton Vacuum modelo DESK V

II.1.3 Selección y preparación de la materia prima

El primer paso fue hacer una previa selección de las hojas para retirar, en la medida de lo posible, tanto la tierra como los troncos y de esa manera poder clasificar cada variedad de hoja en dos tantos, uno de hoja entera y el otro con la semi-triturada.

Una vez separadas las hojas se procede a la selección del tamaño de materia prima a implementar, hoja entera o tamaño de partícula de $1000\mu\text{m}$. En el caso de que el tamaño a implementar fuera la hoja fuera entera, lo único que se empleó fue la separación de éstas de los tallos que traían pero, para el caso de tamaño de partícula de $1000\mu\text{m}$ fue

necesario además, hacer una molienda de las hojas mediante el uso de un molino para carne, como el ilustrado en la Figura 9b, y una vez obtenido el polvo (Figura 9c) tamizar a un tamaño de partícula de $1000\mu\text{m}$.

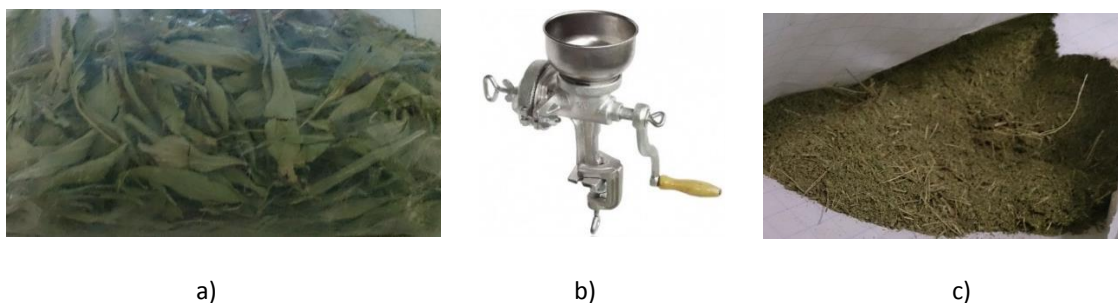


Figura 9 Preparación de la materia prima: a) Hoja entera, b) Molino para obtener el polvo de hojas de *Stevia* y c) Polvo de hoja de *Stevia*

II.1.4 Condiciones de extracción

Se tomaron 2 gramos, de polvo o de hoja entera de *Stevia*, colocándoles en un vaso de precipitado, después se le adicionó agua destilada y se llevó a cabo el proceso de infusión, a una temperatura de 45°C durante un tiempo designado, empleando como parte del control de temperatura un baño maría. El esquema es mostrado en la Figura 10.

El procedimiento descrito se realizó a cada una de las variedades de hoja de *Stevia rebaudiana Bertoni* tanto a la hoja entera como a un tamaño de partícula de $1000\mu\text{m}$, para así tener un análisis de la influencia del tamaño de partícula a emplear en la eficiencia de extracción.

De igual manera, se llevaron a cabo diferentes pruebas del proceso de extracción por infusión estableciendo diferentes proporciones de líquido adicionado a la muestra para, de esa forma, hallar la mejor condición de relación sólido/líquido con base en la cantidad de glucósidos extraídos y minimización de solvente requerido. Las relaciones sólido/líquido empleadas fueron: 1/9, 1/18, 1/27 y 1/36, todas ellas en base al peso.



Figura 10 Esquema de la extracción del edulcorante de *Stevia*

Una vez encontrada la mejor relación sólido/líquido, se procedió a hacer un análisis usando como variable la temperatura en un rango de 35 a 55°C con un intervalo de 5°C entre ellas manteniendo una agitación constante.

Así mismo, se planteó el manejo de 1, 1.5, 2, 4, 6 y 8 horas como tiempo de extracción manteniendo la temperatura de 45°C constante para encontrar el mejor tiempo de extracción.

Finalmente, como última variable a analizar, se realizó variaciones en la agitación en el proceso de extracción para observar la afectación que ésta produce en la concentración de los glucósidos de interés en el extracto.

Cabe resaltar, que tomando en cuenta el procedimiento y equipos que conforman el proceso en la planta industrial en estudio, se llevó a cabo la planeación y desarrollo de cada uno de los experimentos antes mencionados efectuados por triplicado para garantizar la reproducibilidad.

II.1.5 Filtración (Proceso de eliminación de algunos sólidos)

La metodología a seguir en el proceso de eliminación de sólidos, del líquido proveniente de la infusión resultante de la extracción de los edulcorantes de las hojas de *Stevia*, consistió en hacer pasar, primero, a cada muestra por una malla que funcionó como tamiz y, posteriormente, por dos filtros con tamaño de poro diferente.

El primer paso consistió en, una vez realizada la infusión, filtrar el líquido resultante de la extracción contenido en el vaso para separarlo de las hojas. Lo anterior se llevó a cabo haciendo pasar el líquido por una malla cuyo tamaño de poro fue de $1000\mu\text{m}$.

En seguida, la infusión resultante se filtró, a vacío, mediante dos filtros de papel con tamaño de poro de $8-12\mu\text{m}$ el primero (para eliminación por completo de las partes de hojas que pudieron ser arrastradas por el propio líquido) y $0.20\mu\text{m}$ el segundo (eliminación del polvo generado por la agitación en la extracción, principalmente) obteniéndose una solución libre de sólidos mayores al último tamaño de poro mencionado.



Figura 11 Equipo de filtración a vacío

En el procedimiento anterior fue empleado un aparato para filtración con membrana de 47-50 mm el cual cuenta con base de vidrio y malla de acero inoxidable, un embudo de 300 mL, tapón de silicón #8 y pinza de aluminio además de un matraz kitasato, tal y como se muestra en la Figura 11:

En el aparato ilustrado fueron colocados, sobre la malla de acero inoxidable, el papel filtro a emplear y una vez asegurada la correcta colocación del embudo sobre su base,

mediante la pinza, se vertió el líquido en el embudo de 300 mL y se accionó el vacío, generado mediante una bomba, dando inicio así la filtración.

Toda la metodología descrita se llevó a cabo, de igual manera, después de realizada la floculación (paso descrito en el siguiente subtema) para la remoción de los sedimentos y partículas suspendidas con un tamaño mayor a los $0.20\mu\text{m}$ ocasionados por la misma floculación.

II.1.6 Floculación

A la infusión obtenida, ya filtrada, se le hizo un tratamiento de floculación con cal comercial y sulfato de aluminio ambos en igual cantidad, 1 gramo de cada componente por cada litro de muestra (equivalente a aproximadamente un 0.1% w/v), obteniéndose un líquido con menor coloración que la inicial, que posteriormente fue pasada nuevamente por la serie de filtros de papel para la remoción de los sedimentos ocasionados por la floculación.

La metodología detallada seguida para la realización de la floculación fue:

- 1.- Determinación de la cantidad de líquido contenido.
- 2.- Pesaje, tanto de la cal comercial como del sulfato de aluminio, según lo descrito en el primer párrafo de esta sección.
- 3.- Someter a agitación el líquido contenido.
- 4.- Adición de la cantidad correspondiente de cal comercial manteniendo la agitación.
- 5.- Un minuto después, agregar la cantidad respectiva del sulfato de aluminio continuando con la agitación.
- 6.- Continuación de la agitación.

La agitación concluyó una vez transcurridos los 15 minutos de duración de esta operación.

Concluido el tiempo, se apaga el agitador y así se da inicio con el proceso de filtración.

II.1.7 Secado

La finalidad del secado fue, básicamente, ser un paso previo de la preparación de las muestras para el análisis mediante cromatografía de líquidos.

Cabe destacar que las muestras consisten, cada una, en la toma 10 mL del líquido correspondiente a cada etapa a analizar para su posterior vaciado en un vaso de precipitado de 250 mL e introducción al horno donde permanecerá hasta concluido el secado.

El secado de las muestras se llevó a cabo a una temperatura constante de 80°C mediante un horno marca Felisa modelo FE-291AD (Figura 12) durante 5 horas.



Figura 12 Horno de secado marca Felisa

Una vez transcurrido el tiempo de secado se sacan los vasos del horno dejándolos enfriar a temperatura ambiente.

II.1.8 Pulverización

La pulverización consistió en raspar y triturar hasta formar una especie de polvo (Figura 14) la laminilla de cristales obtenida del secado. Dicha laminilla corresponde a la adhesión de los cristales (Figura 13), correspondientes al edulcorante extraído, tanto al fondo como a la parte baja de las paredes de los vasos de precipitado que contenían las muestras a secar.



Figura 13 Cristales de *Stevia* adheridos al fondo del vaso



Figura 14 Polvo de los cristales de *Stevia*

II.1.9 Preparación de la solución de la muestra a analizar

Para el análisis por medio de HPLC de las muestras fue necesario hacer la preparación de la solución que contiene a la muestra en estudio y con la que se llenaron los viales de 2 mL a introducir en el cromatógrafo.

Como primer paso fue necesario la elaboración de una solución agua/acetonitrilo, ambos líquidos de grado HPLC, en una relación 7/3 correspondientemente.

Una vez hecha la solución se pesaron 10 miligramos del polvo a analizar, con un margen de tolerancia de ± 0.0002 mg, los cuales se vertieron posteriormente en un matraz aforado de 10 mL, se agregó un poco de la solución acetonitrilo/agua antes descrita y ya disuelto el polvo se llevó a aforar con la misma solución.



Figura 15 Equipo de filtración de muestra a analizar por HPLC

Posteriormente, se procedió al llenado de los viales con capacidad de 2 mL cada uno. Para el llenado, fue necesario filtrar la solución con la muestra mediante un filtro para jeringa con membrana de nylon marca Titan 2, el cual cuenta con una carcasa de polipropileno y un tamaño de poro $0.45\mu\text{m}$, Figura 13, esto para evitar que se tape la aguja inyectora del

cromatógrafo de líquidos. Una vez filtrada la solución y llenos los viales se llevan al cromatógrafo para su análisis, en caso de analizarse al siguiente día, se cubren totalmente los viales con papel aluminio para evitar la descomposición por la luz y se almacenan en refrigeración para su conservación hasta el momento de su análisis.

II.1.10 Análisis mediante HPLC

El análisis por HPLC se hizo empleando un cromatógrafo marca Dionex modelo Ultimate 3000 (Figura 16) y una columna Capcell pak C₁₈ MG II operada a 40°C, siguiendo la metodología propuesta por la FAO JECFA (2010) que es el método usado para la determinación de los porcentajes individuales de los glucósidos del esteviol.



Figura 16 Cromatógrafo marca Dionex

La metodología de la FAO JECFA se llevó a cabo usando las siguientes condiciones:

Reactivos. Acetonitrilo, más del 95% de transmitancia a 210 nm.

Estándar. Se empleó una muestra certificada cuyo contenido de Rebaudiósido A es del 42.20% y el contenido total de glicósidos del esteviol del 95.20%.

Solución estándar. Se pesó con precisión 50 mg de estándar de esteviósido y rebaudiósido A en cada uno de los dos matraces aforados de 50 mL. Posteriormente se disolvió y aforó con la mezcla agua/acetonitrilo (7:3)

Solución de la muestra. Con precisión se pesó de 50-100 mg de muestra y colocó dentro de un matraz aforado. Se disolvió y aforó con la mezcla agua/acetonitrilo (7:3).

El procedimiento consistió en inyectar 5 μ L de la solución de la muestra bajo las siguientes condiciones: Empleando una columna Capcell pak C₁₈ MG II, una fase móvil 32:68 mezcla de acetonitrilo y 10 mmol/L de buffer de fosfato de sodio (pH 2.6) a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min bajo un detector UV a 210 nm y una temperatura de operación de la columna de 40°C.

El registro del cromatograma se llevó por aproximadamente 15 minutos, debido al tiempo de retención de los glucósidos a analizar.

Para la identificación de los picos y cálculos se requirió hacer lo siguiente:

Se identificaron los picos de la solución con la muestra comparando el tiempo de retención con los picos de la mezcla de los glucósidos de esteviol de la solución estándar. Después se midieron las áreas de los picos para el esteviósido y rebaudiósido A a partir de sus soluciones estándar.

Posteriormente, se calculó el porcentaje del esteviósido en la muestra a partir de la fórmula:

$$\%X = \left[\frac{W_S}{W} \right] \left[\frac{f_X A_X}{A_S} \right] 100$$

Y para el cálculo del porcentaje de rebaudiósido A en la muestra se hizo a partir de la fórmula:

$$\%Rebaudiósido A = \left[\frac{W_R}{W} \right] \left[\frac{A_X}{A_R} \right] 100$$

Donde:

X es el esteviósido

W_S es la cantidad calculada (mg) sobre la sustancia seca de esteviósido en la solución estándar.

W_R es la cantidad calculada (mg) sobre la sustancia seca de rebaudiósido A en la solución estándar.

W es la cantidad calculada (mg) sobre la sustancia seca de la muestra en la solución estándar.

A_S es el área de pico del esteviósido de la solución estándar.

A_R es el área de pico del rebaudiósido A de la solución estándar.

A_X es el área de pico de X de la solución estándar, y

f_X es la relación entre el peso de la fórmula de X para el peso de la fórmula de esteviósido.

II.1.11 Análisis de la muestra certificada mediante HPLC

Se efectuó el análisis de la muestra certificada con el objetivo de tener un comparativo ya que se carece del estándar. Dicho análisis se efectuó mediante cromatografía de líquidos (HPLC) bajo la metodología FAO JECFA 2010, descrita en el apartado anterior.

II.1.12 Análisis mediante FT-IR

Los análisis se llevaron a cabo mediante un FT-IR marca BRUKER modelo VERTEX 70 (Figura 17) en donde la lectura del espectro en el aparato se hizo en el modo de reflectancia total atenuada (ATR).



Figura 17 FT-IR marca BRUKER modelo VERTEX 70

II.2 Análisis sensorial

Se realizaron pruebas sensoriales a los productos obtenidos de las diferentes corridas mencionadas en el apartado II.1, las cuales involucran los sentidos de gusto, olfato y vista.



Capítulo III

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Evaluación del estado actual de la planta de producción

Las instalaciones son amplias y se encuentran distribuidas en tres zonas: oficinas, proceso y almacén, tal y como se ilustra en la Figura 18.

Las zonas de interés para este trabajo son tanto la del proceso como la del almacén esto debido a que, en la zona del proceso es donde se efectúan todos los pasos necesarios para la obtención del edulcorante a base de *Stevia* y en el almacén es donde se conservan, preservan y almacenan las hojas de *Stevia* correspondientes a la materia prima del proceso en estudio, de ahí su importancia.

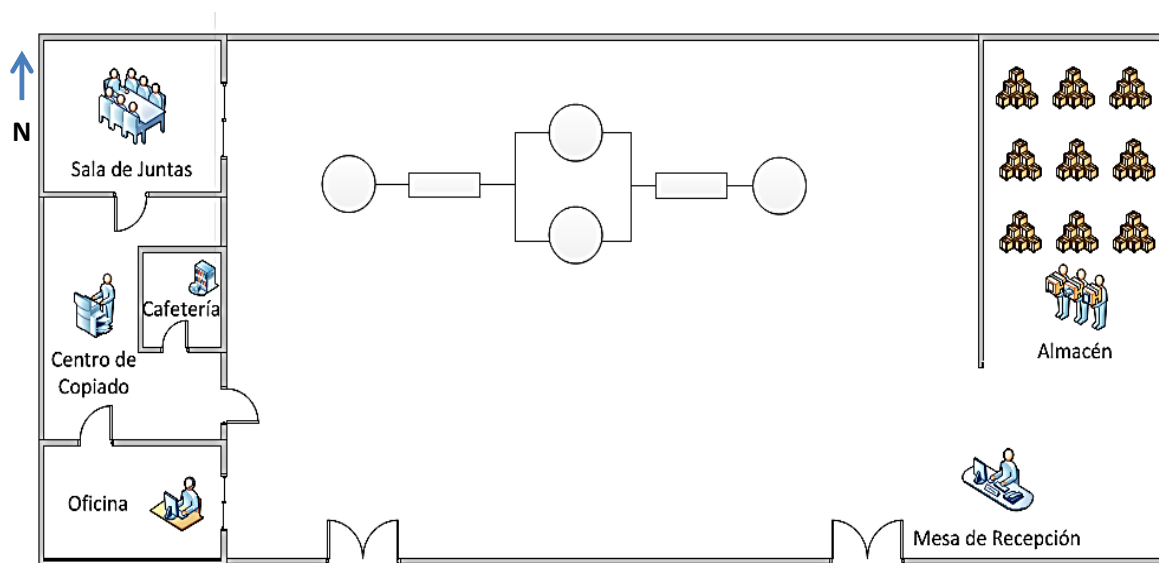


Figura 18 Bosquejo de distribución de las instalaciones

La primera zona a evaluar es el almacén, el cual tomando como punto de referencia la puerta principal de acceso (lugar de localización de la mesa de recepción), se pudo ver que su ubicación es en el lado este de las instalaciones, lugar donde se observó el resguardo tanto de las hojas secas empleadas en el proceso, material de repuesto de los filtros así como costales cuyo contenido son las sustancias necesarias para la floculación, todas ellas al aire libre y juntas sin tener ningún tipo de control ni aislamiento unas de otras por lo que pudiera existir una contaminación de las hojas a emplear en el proceso con dichas

sustancias, dando cabida así a la primer recomendación: la división de la zona al menos en dos mediante la creación de unos cuartos como tal de almacenamiento en donde quede aislada totalmente la materia prima de las demás sustancias y de esa manera no exista ningún tipo de contaminación en ellas.

Por su parte, en la zona del proceso se ubicó el tanque de extracción o difusor (primer etapa del proceso de obtención del edulcorante) seguido en línea desde ahí hacia el lado oeste del inmueble de las demás etapas del proceso, ver Figura 18. Todos sin ningún tipo de señalización y de acuerdo a la línea de proceso mencionada en el apartado I.6 del presente trabajo.

Debido a que precisamente para la construcción de esta planta de producción solo se tomó en cuenta lo descrito en el apartado I.6 se puede decir que dicho proceso sólo se encuentra en base a procedimiento; es decir, solo se tomó en cuenta la descripción de los equipos deduciéndose así, el hecho de que el proceso en estudio no está caracterizado, por lo tanto, no es de claro conocimiento que sea el proceso más adecuado para el tipo de producto que se pretende obtener, de ahí que se haya realizado un análisis de los diferentes mecanismos de extracción del edulcorante.

De igual manera, al no contar con la respectiva caracterización de las diferentes etapas, el secado del producto obtenido se realizó en vez de en un secador por aspersion, mediante un secador de charolas operado a 120°C por un tiempo de 2 horas resultando un producto quemado, además de difícil de desprender de las charolas, lo que se traduce en una mala calidad.

Finalmente, es necesario dar a conocer el hecho de que al momento del reconocimiento y evaluación de las instalaciones, éstas no contaban en forma con los siguientes servicios auxiliares:

- 🔥 Luz propia. Se obtenía mediante el arrendamiento de una pequeña generadora portátil de energía eléctrica por periodos necesarios.
- 🔥 Agua potable. Suministrada por pipas ya que aunque se cuenta con un pozo en la propiedad, dicha agua no se encuentra caracterizada.

Lo anterior da pie a las siguientes recomendaciones:

- ✿ Contar a la brevedad posible con una fuente directa de energía (provista por la CFE).
- ✿ Realizar un análisis al agua del pozo con que se cuenta para su caracterización y de esa manera ver la viabilidad de ser empleada en el proceso de producción. En caso de no poder emplearse dicha agua, realizar tanto los trámites correspondientes como medidas necesarias para contar con una toma de agua potable dentro de las instalaciones.
- ✿ Así mismo contar con una planta tratadora de agua dentro de las instalaciones para asegurar que el agua empleada pueda ser ingerible.

III.2 Resultados de la experimentación a nivel laboratorio

III.2.1 Caracterización de la hoja mediante SEM y SEM-EDS

Se realizó la caracterización de la hoja mediante SEM a las tres diferentes variedades de hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni* provenientes del estado de Puebla (MPM, MPP y MPT) así como a la proveniente del estado de Veracruz (MPV) resultando las micrografías mostradas en la Figura 19. En dichas micrografías se puede observar la rugosidad propia de cada hoja así como las fibras que las conforman, las cuales son más perceptibles en la muestra MPM. Por su parte, la presencia de los poros, denominados estomas, tanto abiertos como cerrados son más notorios y abundantes en la muestra MPP lo que denota las condiciones adversas en que se desarrolló la planta ya que ellos son la vía que ésta tiene para comunicarse con el medio ambiente, es decir, es la forma en que captan o liberan la mayor parte del oxígeno y/o dióxido de carbono y al tener una mayor presencia de ellos quiere decir que requiere de mayor captación o liberación de los gases antes mencionados.

De igual manera, se le realizó a cada una de ellas, un SEM-EDS con el objetivo de ver las diferencias en composición dando como resultado los espectros mostrados en la Figura

20, en donde se puede observar que las cuatro variedades de hoja presentan una composición base de carbono, oxígeno y potasio, ya en mucho menor cantidad magnesio, silicio, cloro y calcio. Así mismo, se visualiza la presencia de manganeso en la hoja proveniente del estado de Veracruz, elemento que no se presenta en las demás variedades, así como aluminio en la hoja proveniente de Tecolutla que caracteriza a esta variedad y pueda deberse debido al tipo de suelo con que cuenta la zona de cultivo.

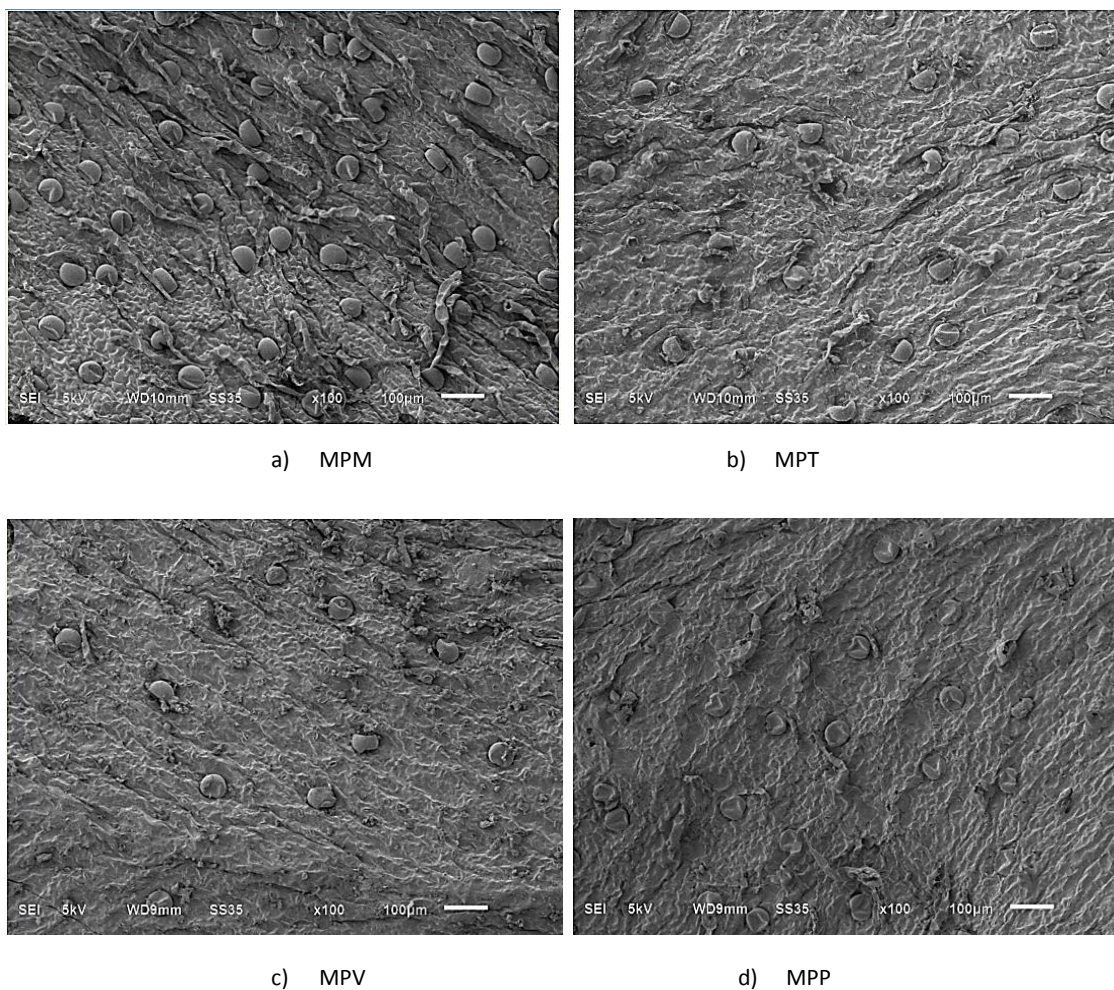
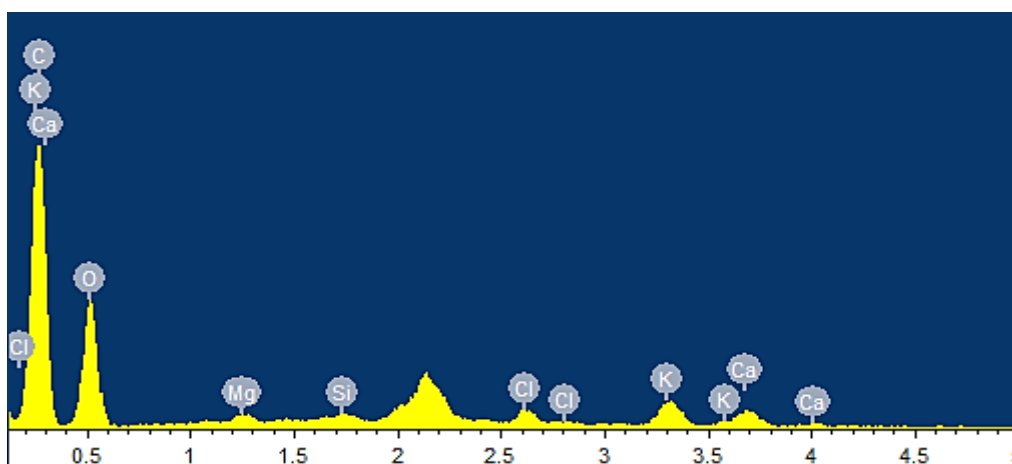


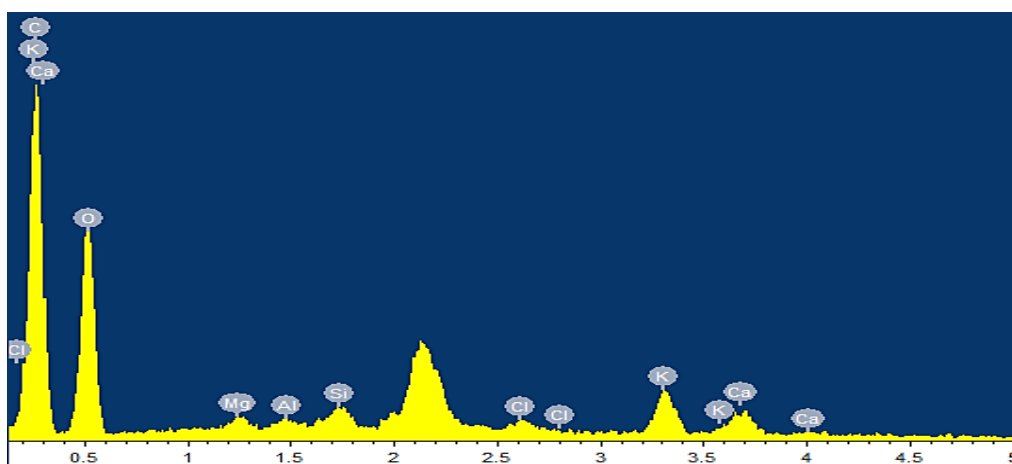
Figura 19 Micrografías obtenidas por SEM de cada variedad de hoja de *Stevia* a x100

Los datos cuantitativos en porcentajes aproximados de los distintos elementos químicos identificados son presentados en la Tabla 4 donde se destaca además de la presencia de

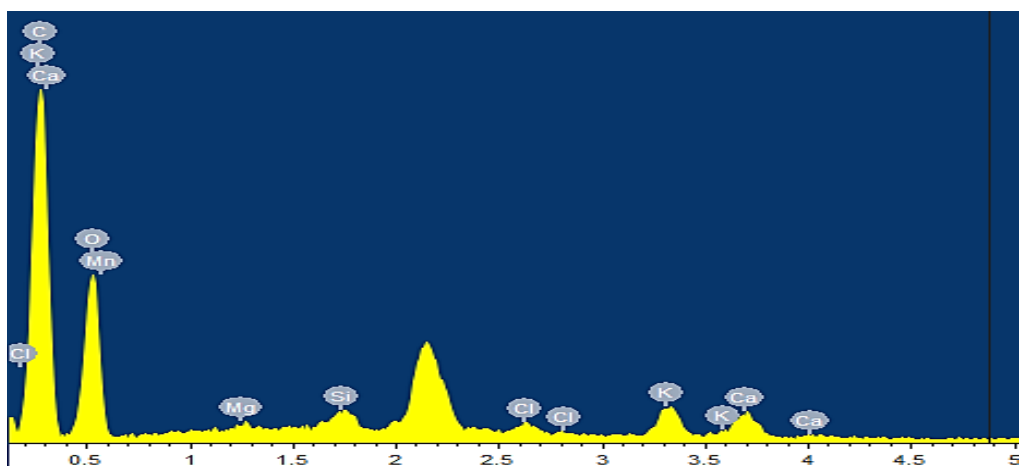
manganeso y aluminio antes mencionadas, así como la composición base de carbono y oxígeno esperado en un compuesto orgánico, un rango que va del 1 al 2% aproximadamente de potasio así como un margen que va del 0.26 al 0.48% de magnesio concordando los porcentajes de ambos elementos con lo establecido en literatura (López Torres & Peña Guevara, 2004). Comportamiento distinto presenta el calcio al variar su composición entre el 1.05 y 1.29% cuando lo establecido en literatura es menor al 1% pero mayor al 0.3%. De igual forma, para los elementos químicos, silicio y manganeso presentes en las hojas, el rango establecido en la literatura es menor al 0.1% lo cual evidentemente no es concordante con lo obtenido en el análisis EDS. Mención especial requieren tanto el cloro como el aluminio cuya presencia, como parte de la composición de la hoja, no se referencia en la literatura.



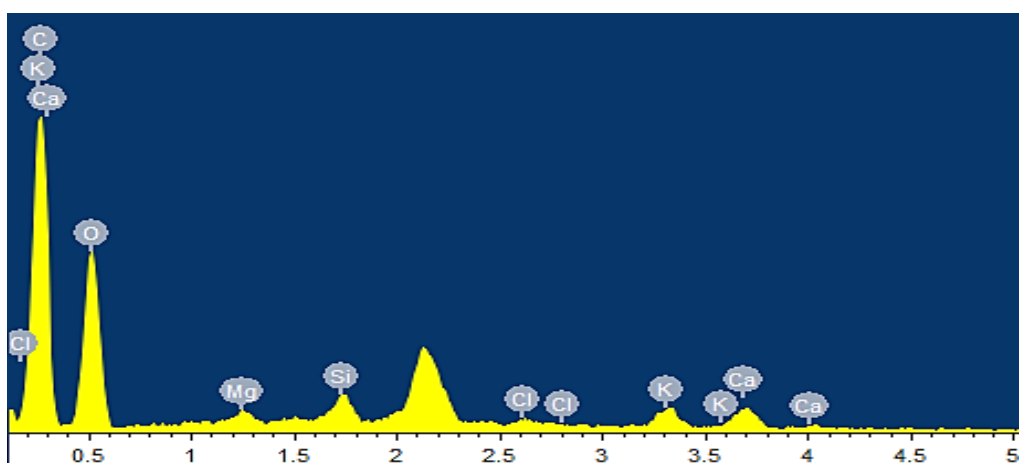
a) MPM



b) MPT



c) MPV



d) MPP

Figura 20 Espectro EDS de cada variedad de *Stevia*

De todos los componentes antes mencionados fueron tanto el potasio como el calcio los dos elementos base más destacados dejando fuera la base orgánica (un promedio del 44.1% para el oxígeno como un 51.52% promedio para el carbono), tal y como puede verse en la Figura 21 en donde se representan mediante barras los porcentajes de cada elemento presente en las muestras para una mejor percepción de los demás componentes.

Tabla 4 Composición química elemental de la hoja de *Stevia*

Elemento	Hoja			
	MPM	MPV	MPT	MPP
C	53.75	52.29	49.40	50.65
O	42.06	43.17	45.74	45.42
Mg	0.45	0.26	0.45	0.48
Si	0.27	0.56	0.60	0.96
Cl	0.81	0.49	0.36	0.23
K	1.58	1.54	2.08	1.05
Ca	1.08	1.29	1.17	1.21
Mn	—	0.40	—	—
Al	—	—	0.20	—
Total	100	100	100	100

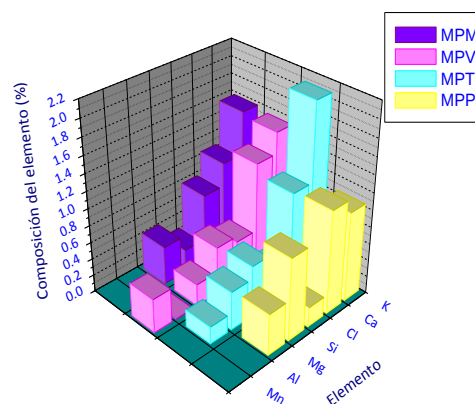


Figura 21 Composición química elemental de la hoja de *Stevia*

Una mención especial requiere tanto la muestra de Puebla, ya que predomina la presencia de calcio sobre el potasio (contrario a lo visto en las otras muestras) además de un exceso de silicio que justifica en cierta medida la gran cantidad de estomas que presenta, como la muestra de Tecolutla, que manifiesta tanto potasio que los demás elementos parecieran casi imperceptibles.

Los demás elementos componentes de las muestras presentaron fluctuaciones muy marcadas, tal y como se puede apreciar en la figura a excepción del magnesio cuya presencia en tres de las cuatro variedades, menos en la MPV, tiene un porcentaje muy similar.

Dado que la muestra MPP presenta las características especiales antes mencionadas y que es la materia prima de cual se tiene una mayor cantidad en almacenamiento, es la que se elegida para la realización de los experimentos necesarios para la determinación de los parámetros óptimos de extracción (relación sólido/líquido, tiempo, temperatura, nivel de agitación y tamaño de partícula).

III.2.2 Análisis de caracterización de la hoja y resultados encontrados en el estudio de FT-IR realizado

Con la finalidad de ver la posibilidad de efectuar una cualificación y/o cuantificación rápida de la presencia de los glucósidos de interés, esteviónido y rebaudiónido A en las muestras, es que se realizó la implementación de esta técnica, por ello se analizaron cuatro muestras: la muestra certificada, el polvo de dos de las variedades de hoja estudiadas y una última del polvo resultante como producto final.

Aunado a lo anterior se analizó una muestra de clorofila para así tratar de identificar su presencia en las muestras mediante su pico correspondiente y con ello dar un seguimiento de ésta pudiendo observar así, si ocurría una pérdida y/o eliminación de ella en el producto final.

Debido a que no se contó con los estándares de los glucósidos en estudio, se emplearon los espectros de infrarrojo presentados dentro del trabajo de Giraldo E. et al, Figura 22 y 23 para el esteviónido y rebaudiónido A respectivamente, en donde se logran apreciar picos en tres de las cuatro regiones del espectro de FT-IR siendo los picos más destacables los enunciados en la Tabla 5. Tanto de la tabla como de los espectros mostrados, se puede observar la gran similitud existente entre ambos glucósidos; sin embargo, el espectro del rebaudiónido A presenta los picos más profundos.

Como la región de la huella digital es la que determina la esencia de cada compuesto, es en esta zona (región comprendida entre los 600 y 1500 cm^{-1}) donde debe haber la principal atención por lo que se puede definir que la diferencia entre el esteviónido y el rebaudiónido A (ver Figuras 22 y 23) es primordialmente la pronunciación del pico presente a 1076 cm^{-1} siendo más intenso en el rebaudiónido A que en el esteviónido. Misma tendencia pero menos perceptible se presenta en el pico detectado a 656 cm^{-1} .

Ahora bien, una vez conocidos los espectros de los estándares de ambos glucósidos en estudio, se procedió a realizar el análisis mediante FT-IR de la materia prima, la muestra

certificada (Anexo A) y muestra obtenida a nivel laboratorio para su posterior comparativa.

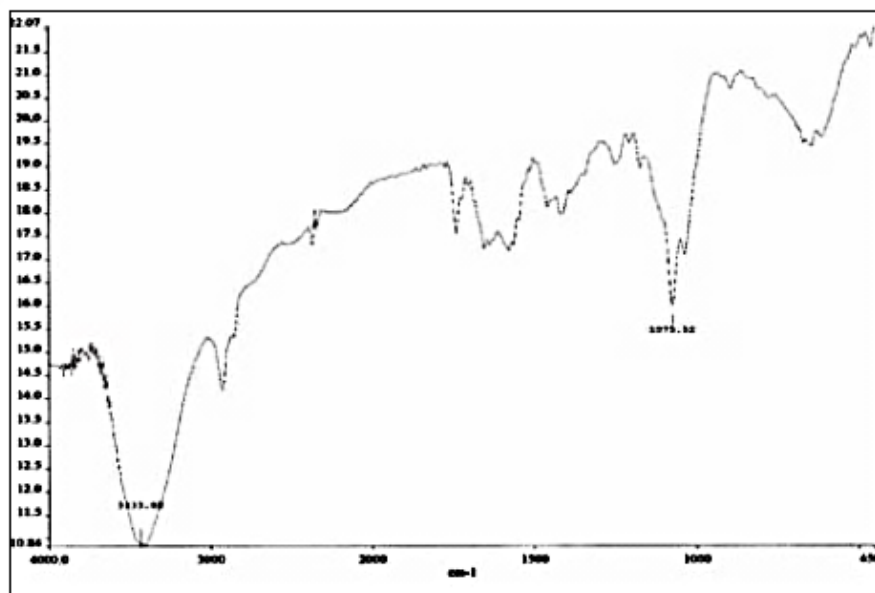


Figura 22 Infrarrojo del estándar del esteviósido (Giraldo E. et *al.*, 2005)

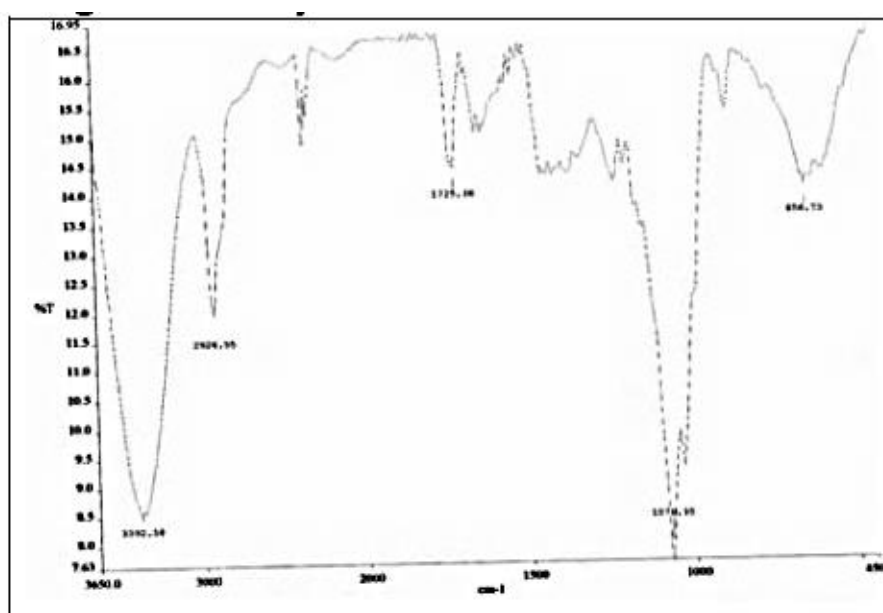


Figura 23 Infrarrojo del estándar del rebaudiósido A (Giraldo E. et *al.*, 2005)

Tabla 5 Principales picos de los espectros de FT-IR de los estándares de esteviósido y rebaudiósido A

Esteviósido			Rebaudiósido A		
Región del espectro	Banda aproximada (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Región del espectro	Banda aproximada (cm ⁻¹)	Grupo funcional
Tensión X-H	3433	O-H	Tensión X-H	3392.5	O-H
	2930	C-H		2924	C-H
Doble enlace	1729	C=O	Doble enlace	1729	C=O
	1645	C=C		1680	C=O
	1575	C=C		1600	C=C
	1437	C-H		1420	O-H
Huella digital	1416	O-H	Huella digital	1380	C-H
	1229	C-O		1350	O-H
	1187	C-C		1220	C-O
	1062	C-O-C		1076	C-O-C
	653	=C-H		656	=C-H

Los espectros obtenidos del análisis realizado en el equipo son los mostrados en la Figura 24 en donde la materia prima (polvo de hoja seca) se analizó para dos de las variedades de hoja estudiadas las cuales se presentan de color verde (B) y magenta (C) en la imagen. Por su parte, el espectro para la muestra certificada es el registro de color naranja (D) mientras que la línea de color cian (A) es el correspondiente al polvo obtenido de la extracción hecha a nivel laboratorio.

Al efectuar la comparativa entre los espectros antes mencionados se apreció la gran similitud existente entre ellos al presentar tres picos en la región de tensión X-H (donde X representa O o C) siendo el primero en detectarse el pico comprendido en el intervalo que va aproximadamente de los 3000 a los 3660 cm⁻¹, el segundo a los 2913cm⁻¹ y el tercero a los 2850 cm⁻¹.

El primer pico corresponde al enlace O-H y como puede verse no existe una diferencia notoria entre los cuatros espectros determinados. A su vez, en el segundo pico detectado (2913cm⁻¹) correspondiente al enlace C-H no presenta diferencias entre las dos muestras

del polvo de la hoja seca pero si se diferenciá con respecto a los otros dos ya que en el caso de la muestra certificada la señal no manifiesta un pico como tal pero si su existencia, mientras que, la intensidad detectada por el producto obtenido a nivel laboratorio no presenta ni el pico bien definido ni el grado de intensidad que las demás muestras. Por su parte el tercer y último pico detectado en la región de tensión X-H (2850 cm^{-1}), es muy visible nuevamente para los espectros del polvo de las hojas secas cosa que no sucede con los otros dos ya que, mientras que en el de la muestra certificada apenas logra detectarse su presencia, en el del polvo del producto pareciera no existir ya que se presenta demasiado atenuado.

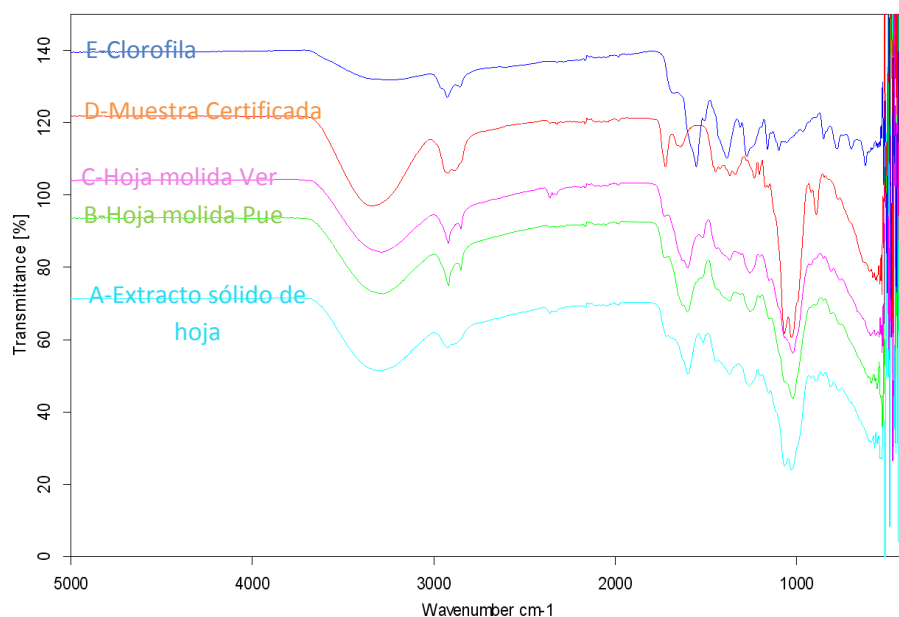


Figura 24 FT-IR de las muestras analizadas

La segunda región de los espectros que se analizó fue la referida al doble enlace en donde se apreciaron tres picos, uno representante del enlace $\text{C}=\text{O}$ presente aproximadamente a los 1701 cm^{-1} en las cuatro muestras el cual, en las muestras del polvo de hoja seca apenas se logra apreciar pero en la lectura de la muestra certificada o estándar se presenta en forma muy clara. Los dos picos restantes son concernientes a enlaces $\text{C}=\text{C}$, el primero de ellos es referido únicamente al espectro de la muestra certificada apreciable a

los 1673 cm^{-1} aproximadamente, mientras que el segundo pico, ubicado a los 1592 cm^{-1} aproximadamente, es perceptible en las muestras del polvo de hoja seca y en el polvo del extracto del edulcorante y que en el caso de los espectros del polvo de hoja son prácticamente iguales a diferencia del otro polvo presentando este último un pico menos pronunciado.

La tercer y última región a analizar es la perteneciente a la huella digital, en donde para su análisis es necesario separar el espectro de la muestra certificada de los demás, ya que en él se logran apreciar múltiples picos siendo tres los más notorios, los cuales están presentes aproximadamente a los 1055 cm^{-1} , 1019 cm^{-1} y 884 cm^{-1} , siendo el primero relativo al enlace C-O-C, el segundo y tercero al enlace C-C. Por su parte, los demás espectros muestran prácticamente la misma línea desde aproximadamente los 1100 a 1500 cm^{-1} en donde se perciben a simple vista dos picos, uno a los 1375 y el segundo a los 1250 cm^{-1} (ambos datos son aproximados), la diferencia radica en los picos presentes a los 1055 y 1019 cm^{-1} aproximadamente, en donde a pesar de que las cuatro muestras presentan el pico de los 1019 cm^{-1} , el espectro del producto obtenido muestra picos más similares a los presentes en el espectro de la muestra certificada que a los de los polvos de las hojas secas.

Al efectuar la comparativa entre los espectros de las muestras analizadas con los correspondientes a los estándares de los dos glucósidos en estudio, se notó el gran parecido existente ya que todas las muestras analizadas coinciden con los puntos determinados en las regiones tanto de tensión X-H como en la de doble enlace, es en la región de la huella digital donde se aprecian las diferencias ya que, mientras los estándares reportados por el estudio de Gildardo E. et *al.* muestran el pico crítico (pico con mayor intensidad) a los 1076 cm^{-1} y el siguiente no lo toman en cuenta sino que se centran hasta el detectado a los 656 cm^{-1} según su reporte, en las muestras analizadas en el laboratorio se aprecia de manera clara una mayor intensidad del pico para los estándares omitido, que del propio pico determinado como crítico, esto debido a que, como se pudo observar, viene desde la materia prima la cual exhibe de manera muy clara su presencia.

Ahora bien, si se centra la atención únicamente en el espectro de la muestra certificada (D) y el del polvo del producto obtenido (A), claramente se logran apreciar las diferencias tanto en la señal emitida por el equipo, al mostrar menor número de picos en el polvo del producto obtenido que en el de la muestra certificada, como en la intensidad con que se presentan los picos principales (ubicados a los 1055 y 1019 cm^{-1} aproximadamente), siendo esto último un posible parámetro tanto para la detección como para una cuantificación aproximada de la presencia de los glucósidos, aunque sin una clara definición de a cuál de ellos pertenece en particular ya que al menos estos dos glucósidos analizados se llegan a enmascarar.

En lo referente a la cuantificación de los glucósidos presentes, para este caso de estudio en particular, es útil debido a que en el producto final que se obtuvo existe una mucha mayor presencia de rebaudiósido A que del esteviósido (ver apartados anteriores) que aunado al hecho de que la intensidad del pico correspondiente a los glucósidos es mucho mayor en el rebaudiósido A que en el esteviósido (como puede apreciarse en las Figuras 22 y 23) se puede fácilmente atribuir la intensidad del pico de interés al rebaudiósido A, por lo que, al cotejar la intensidad que presenta el polvo del producto obtenido con la mostrada por la muestra certificada, se aprecia que dicha intensidad es de aproximadamente la mitad de la reflejada por la muestra certificada, lo cual referido con los resultados reportados del apartado anterior presenta la misma proporcionalidad por lo que de hacerse, en un futuro una curva de calibración que enmarque porcentajes de concentración que vayan desde cero hasta el 100%, podría emplearse este análisis como un método rápido de detección de la concentración de rebaudiósido A en muestras derivadas de esta variedad de planta de *Stevia rebaudiana Bertoni*.

Por último, como es de observarse en la Figura 24 existe un espectro más (presentado en azul (E)), el cual se derivó del análisis de una gota de extracto de clorofila proveniente de una marca comercial realizado con la finalidad de ver, mediante la comparativa (entre la intensidad de pico presente en las muestras en estudio y la reportada por la del extracto) la probabilidad de determinación de una eliminación parcial o total de clorofila en el producto final obtenido. Como es de apreciarse, el espectro correspondiente al extracto

de clorofila presenta en la región de tensión X-H dos picos, uno a los 2913 y el otro a los 2850 cm^{-1} correspondiente a enlaces C-H, en la región de doble enlace solamente uno a los 1538 cm^{-1} aproximadamente que se debe a un enlace C=C, mientras que en la región correspondiente a la huella digital presenta al menos 8 picos fácilmente apreciables a simple vista.

Al efectuarse la comparativa entre los dos espectros, extracto de clorofila y producto final obtenido, se contempló que los picos de la región de tensión X-H se presentan de manera muy tenue en el polvo del producto final cuando en un inicio, en el polvo de las hojas secas, se apreciaba a simple vista la misma intensidad; sin embargo, el pico existente en la región del doble enlace (1538 cm^{-1} aproximadamente) de la muestra de clorofila se presenta casi bajo la misma intensidad sólo que un poco desfasado en la muestra del producto final. Por su parte, los picos del extracto de clorofila presentes en la zona de la huella digital no pudieron ser identificados de manera clara en la muestra del producto final pero con ello no quiere decir que no estén presentes en él. Es por todo lo anterior que se llegó a la conclusión de que, a pesar de que los dos primeros picos detectados presentan una ligera disminución de intensidad y los correspondientes a la región de la huella digital no son a simple vista perceptibles, no se puede definir mediante este análisis si existe o no una disminución del contenido de clorofila en la muestra final, para ello se requerirá de otro tipo de análisis más exhaustivo.

III.2.3 Análisis de muestra certificada mediante HPLC

Con motivo de cuantificar de manera aproximada en nuestros resultados la cantidad de esteviósido y rebaudiósido A, componentes de interés, se recurrió al análisis de una muestra certificada (ver certificado en el anexo A) para mediante una comparativa entre la muestra certificada y las obtenidas en este trabajo, lograr conocer la concentración aproximada con la que se obtuvo el producto final.

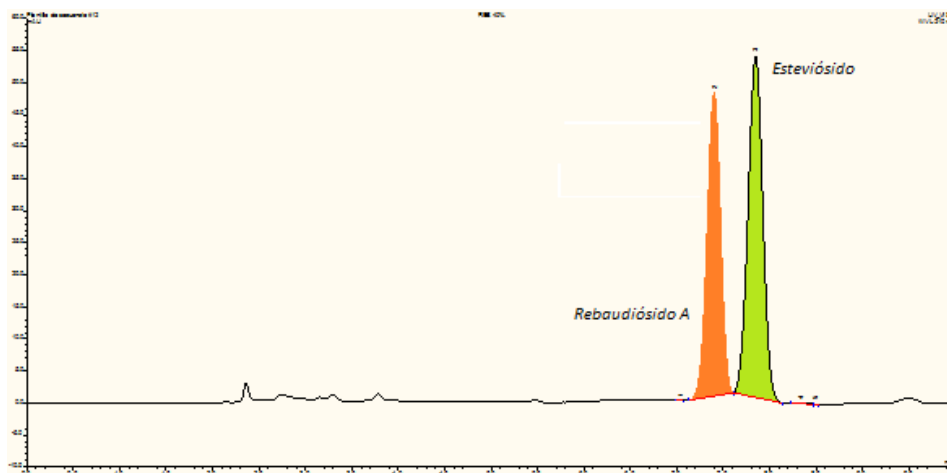


Figura 25 Cromatograma de estevisido y rebaudiósido A de muestra certificada Rebaudiósido A 40%

Como no se especifica la concentración del estevisido de la muestra certificada en el documento que lo avala, se recurrió al análisis de los datos numéricos arrojados por el software Chromeleon del HPLC recopilados en la Tabla 6 correspondientes al cromatograma de la Figura 25. Dicha tabla muestra el tiempo de retención, la altura de los picos y el área pertenecientes tanto al rebaudiósido A como al estevisido de la muestra certificada y cuyos datos, altura y área del rebaudiósido A, corresponden a la concentración del 42.2% mostrada en el certificado, por lo que recurriendo a la literatura, en donde establecen el rango dentro del cual está la composición de cada glucósido dentro de la hoja (5-10% para el estevisido y 2-4% para el rebaudiósido A), así como a los datos de la tabla antes mencionada, se estableció la relación existente de 1.25 veces del estevisido con respecto al rebaudiósido A, por lo que la concentración del estevisido en la muestra certificada es de aproximadamente un 52.75%.

Tabla 6 Resultado del cromatograma de la muestra certificada Rebaudiósido 40% mediante HPLC

Dato	Tiempo de retención (min)	Altura de pico (mUA)	Área de pico (mUA*min)
Compuesto			
Estevisido	7.90	49.5	9.55
Rebaudiósido A	7.46	39.5	7.74

Lo anterior puede ser explicado considerando que la composición promedio de glucósidos dentro de una hoja es del 9% y que la muestra certificada en este estudio es un 95.2% pura, según demuestra el certificado, tenemos que la concentración de 42.2% del rebaudiósido A corresponde a un 3.99%, es decir aproximadamente un 4% del contenido de los glucósidos presentes en una hoja de *Stevia*, por lo que dada la relación existente tanto entre las alturas, 49.5/39.5 mili unidades de amplitud (mUA) de intensidad, como la de las áreas, 9.55/7.74 mUA*min, se llega a que el 4% correspondiente a la composición del rebaudiósido A multiplicado por la relación existente entre ellos (1.25) da una composición existente de esteviósido dentro de la hoja es del 5%, lo que se traduce en el resultado mencionado en el párrafo anterior.

III.2.4 Análisis de la relación sólido/líquido en la extracción de esteviósido y rebaudiósido A de las hojas de Stevia

Después de la revisión bibliográfica (Chhaya, Sharma, Mondal, Majumdar, & De, 2012; Monesterolo & Macia, 2002) y un primer experimento se decidió que, para la determinación de la mejor relación sólido/líquido (w/w), siendo el sólido las hojas secas de *Stevia* y el líquido agua, en la extracción del rebaudiósido A y del esteviósido se hicieran los experimentos en las proporciones mostradas en la Tabla 7, todas ellas a presión atmosférica, manteniendo temperatura y agitación constante durante dos horas. En dicha tabla, se reportan las alturas aproximadas, en mili unidades de amplitud (mUA), de los picos obtenidos del análisis mediante cromatografía de líquidos (HPLC) y cuyos datos son presentados para mejor percepción en el gráfico de la Figura 26.

Los cromatogramas que originan los datos antes mencionados son mostrados en la Figura 27, cada uno de ellos para una relación sólido/líquido estudiada.

Es necesario aclarar que, en caso de desearse ver con mayor detalle tanto los cromatogramas presentados en este apartado como los exhibidos en futuros apartados de este texto, pueden ser consultados en el Anexo B.

Tabla 7 Alturas aproximadas del análisis de relación sólido/líquido del extracto de *Stevia* obtenido por infusión

Dato	Relación sólido/líquido			
	1/9	1/18	1/27	1/36
Impureza	No se	40.0	46.5	48.8
Esteviósido	pudo	0.5	4.0	0.5
Rebaudiósido A	deter- minar	19.55	21.13	16.31

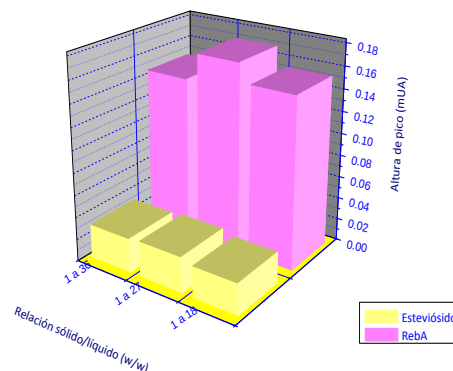


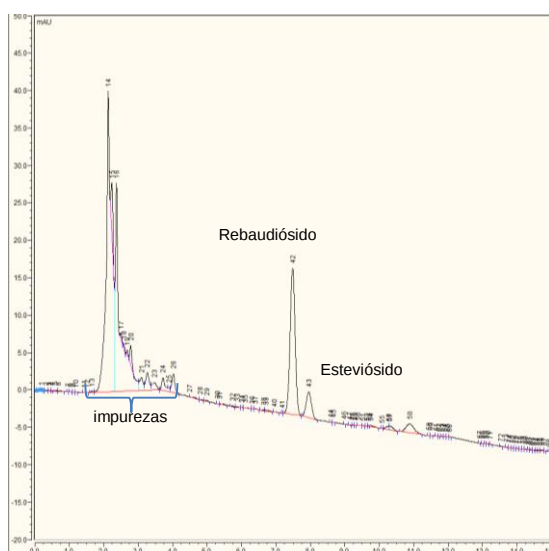
Figura 26 Gráfica de la diferencia de alturas en la relaciones sólido/líquido (w/w).

Retomando los resultados, es claro que la mejor relación sólido/líquido para la extracción de los glucósidos de interés es la 1/27 al alcanzar la máxima altura de pico.

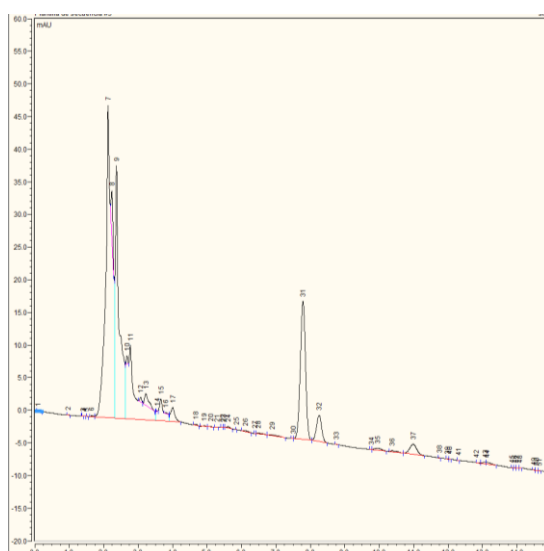
Cabe señalar, que la relación 1/9 no se analizó debido a que se evaporó por completo el agua antes de concluir los experimentos, motivo por el cual no fue reportado.

Por su parte, tanto en la Tabla 7 como en la Figura 27 se observó que las impurezas, componentes detectados antes de los picos de interés, aumentan proporcionalmente con respecto a la cantidad de agua empleada en la extracción, mientras que los dos componentes a extraer, esteviósido y rebaudiósido A, presentaron un máximo en la relación 1/27 y luego disminuyeron notablemente, esto último pudo ser debido a que empezaron a extraerse mayores cantidades de otras sustancias no deseadas, nombradas impurezas.

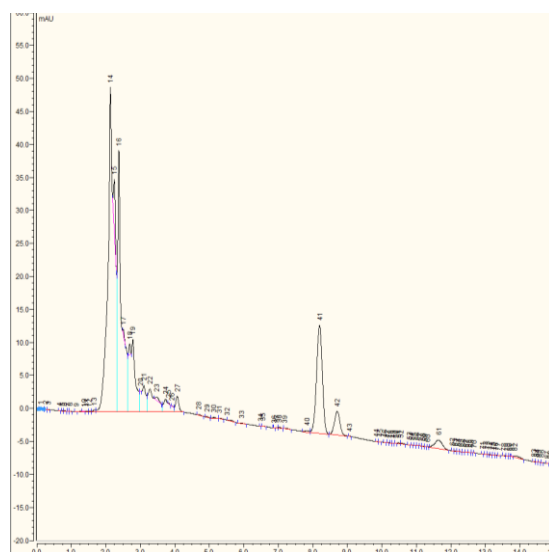
Así mismo, es posible percatarse del hecho de que, el rebaudiósido A predomina con respecto al esteviósido, lo cual es muy bueno ya que el componente principal otorgante del sabor dulce es precisamente el rebaudiósido A, por lo que todas nuestras muestras presentaron un sabor bastante intenso y agradable ya que el regaliz generado por la presencia del esteviósido se vio opacado casi en su totalidad.



a) Relación 1/18



b) Relación 1/27



c) Relación 1/36

Figura 27 Cromatografía HPLC relación sólido/líquido extracción vía infusión de hojas de *Stevia*

NOTA: Los cromatogramas presentan el tiempo en el eje x que va desde el minuto cero hasta el 15, mientras que el eje y, que representa la unidades de absorbancia (altura de los picos en mUA), va de -20 a 50 para el caso de la relación 1/18 y de -20 a 60 para los otros dos casos.

Es importante destacar lo anterior ya que, aunque en la literatura se contempla como componente principal de esta planta al esteviósido, en nuestro caso en particular, el componente predominante como ya se mencionó, es el rebaudiósido A en relación al

esteviósido lo cual es una característica particular de la especie de *Stevia rebaudiana* Bertoni en estudio, sin que las condiciones de suelo, agua y demás agentes externos dependientes de la zona de origen de sembrado lo modificasen como pudo observarse en los anteriores cromatogramas y tabla (Figura 27, Tabla 7).

Tabla 8 Concentración en porcentaje de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras relación sólido/líquido (w/w) estudiadas

Dato	Concentración dentro de la muestra			Muestra certificada
	Relación sólido/líquido			
	1/18	1/27	1/36	
Esteviósido	0.53	4.26	0.53	52.75
Rebaudiósido A	20.88	22.57	17.42	42.20

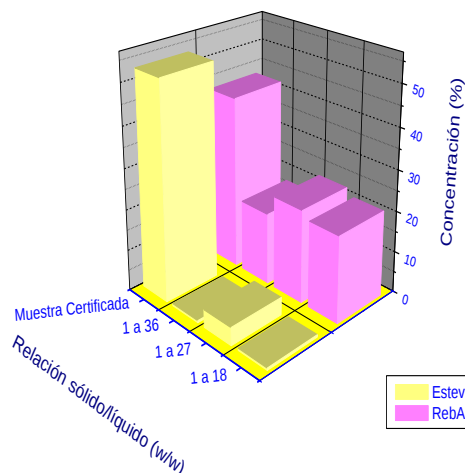


Figura 28 Gráfica de concentración (%) de esteviósido y rebaudiósido A de la muestra certificada vs relaciones sólido/líquido (w/w).

El análisis de los datos numéricos presentados en la Tabla 7 e ilustrados mediante la Figura 26, además de identificar la mejor opción de relación sólido/líquido para llevar a cabo la extracción (1/27 (w/w)), sirvió para efectuar la comparativa de las alturas de pico resultantes de las cromatografías de cada una de las diferentes relaciones sólido/líquido estudiadas con la correspondiente altura de pico de la muestra certificada, que a su vez representa una concentración, obteniéndose para las muestras analizadas que las cifras en términos de concentración fueron las presentadas en la Tabla 8 que a su vez son ilustradas en la Figura 28 para mejor percepción, confirmando nuevamente que la mejor opción de relación (w/w) sólido/líquido es la 1/27 al presentar un porcentaje de contenido del 22.57% para el rebaudiósido A y del 4.26% para el esteviósido.

Tabla 9 Cantidad de producto obtenido de acuerdo a la relación (w/w) sólido/líquido

Dato	Masa (g)	
	Relación 1/18	Relación 1/27
Polvo total obtenido	0.1267	0.3379
Esteviósido	0.0007	0.0144
Rebaudiósido A	0.0265	0.0763

NOTA: Las cantidades son referidas a un gramo de polvo de Stevia y a la concentración correspondiente

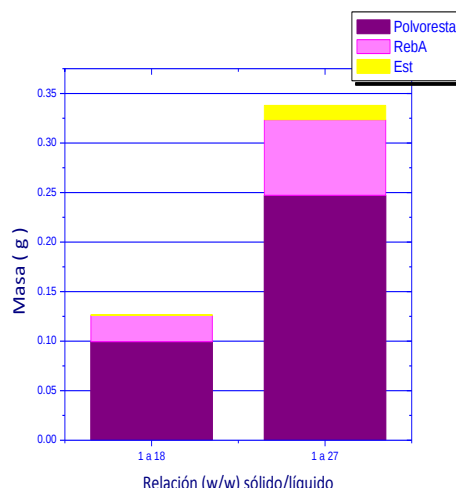


Figura 29 Gráfica masa obtenida vs relación sólido/líquido (w/w).

Una vez descartada la relación sólido/líquido 1/36 (w/w), ya que el extracto resultante presentó notables deficiencias en lo concerniente a la concentración del esteviósido y rebaudiósido A además de representar un uso excesivo de agua (ver tablas anteriores, 7 y 8), se efectuó la evaluación para las relaciones de 1/18 y 1/27, correspondiente a las masas resultantes de cada una, tanto para el polvo total generado como para cada componente de interés en particular, para determinar cuál de ellas resultó más efectiva, los datos numéricos resultantes conforman la Tabla 9. Dichos datos son ilustrados mediante el gráfico de la Figura 29 para una mejor visualización de la diferencia existente entre el polvo total obtenido (altura máxima de las columnas) y la cantidad de polvo correspondiente a cada uno de los glucósidos de interés dentro del total de polvo (color magenta y amarillo para el rebaudiósido A y esteviósido respectivamente), logrando observar con contundencia la superioridad, tanto en la cantidad de polvo total obtenido como en la proporción correspondiente a cada glucósido, de la relación sólido/líquido 1/27 sobre las demás relaciones estudiadas.

Aunque en la tabla anterior las cantidades parecen muy pobres, cabe enfatizar que cada análisis se hizo a mini escala (referidas a un gramo de hoja seca de *Stevia*) además recordando que:

- ✿ Según lo reportado en literatura la cantidad de glucósidos contenidos en una hoja va desde un 7 a un 15% aproximadamente (Boileau, Fry, & Murray, 2012; Giraldo E., Marín P., & Habeych N., 2005),
- ✿ El porcentaje en peso de hoja seca para el esteviósido varía del 5 al 10% y del 2 al 4% para el rebaudiósido A. (López Torres & Peña Guevara, 2004; Monesterolo & Macia, 2002)
- ✿ La suma de esteviósido y rebaudiósido A para la muestra certificada analizada fue del 9% y que,
- ✿ Un método propuesto de extracción hecho con solvente ha reportado un rendimiento de alrededor de 5% de glucósidos sobre la base del peso en hojas secas. (Soto & Del Val, 2002).

Tenemos que la suma de estos dos glucósidos en los polvos obtenidos en el laboratorio alcanzaron un contenido de glucósidos en la hoja de un 2% para la relación 1/18 a un 2.5% para la relación 1/27, lo que resulta bastante bajo a comparación con el rango mencionado anteriormente, pero, se puede encontrar una justificación en el hecho de que el componente prioritario según la literatura es el esteviósido, caso contrario a lo que presentaron las hojas en estudio y de donde se puede derivar un 4% faltante.

Por otro lado, si las mismas cantidades de polvo obtenidas de cada componente lo comparamos con lo reportado para la base seca, se evidencia más aún el faltante de esteviósido al reportar un máximo de tan solo un 1.4% (relación 1/27) en vez del 5% mínimo que debería tener mientras que, la cantidad de polvo correspondiente al rebaudiósido A va de un 2.65 a un 7.6% para las relaciones 1/18 y 1/27 respectivamente cuando lo reportado en literatura es de un 2 a 4% (López Torres & Peña Guevara, 2004; Monesterolo & Macia, 2002).

Por lo anterior se concluye que, para la situación a nivel industrial, es decir, los resultados expresados en kilogramos o toneladas no resultan tan poco atractivos.

III.2.5 Análisis de la variedad de especie de las plantas de Stevia

Se realizó el análisis HPLC de la extracción tanto del esteviósido como del rebaudiósido A de tres de las cuatro variedades de *Stevia*, de las analizadas previamente por SEM, para corroborar el hecho de que, no importando las diferencias proporcionales en la composición química elemental de cada variedad, el extracto resultante puede ser muy similar confirmando así, la efectividad del procedimiento de extracción de los glucósidos de la planta de *Stevia* y la semejanza en la extracción de ellos.

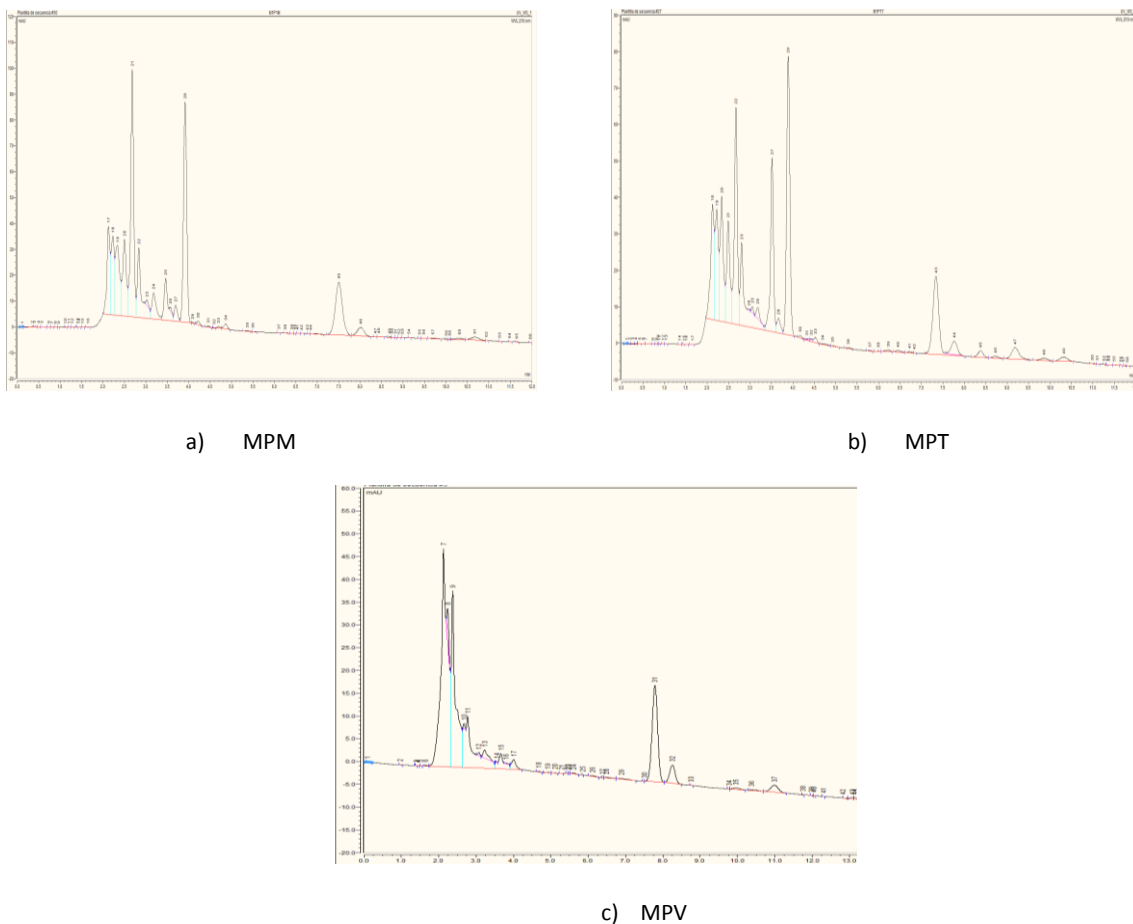


Figura 30 Cromatogramas de esteviósido y rebaudiósido A de cada variedad de especie de hojas de *Stevia*

NOTA: Los cromatogramas presentan la escala de tiempo de cero hasta el minuto 12, mientras que el eje de las unidades de absorbancia en mUA va de -20 a 120 para el caso de la muestra MPM, de -10 a 90 para la MPT y de -20 a 60 para MPV.

La extracción de los glucósidos, para obtener las muestras a estudiar, se realizó mediante infusión manteniendo la temperatura (45°C), tiempo de reacción (2 horas), agitación y relación sólido/líquido (1/27) constantes.

Una vez obtenidas las muestras se secaron, se recurrió a la implementación de la metodología de la cromatografía de líquidos (HPLC) para la preparación de los viales a introducir en el cromatógrafo y se analizaron.

Los cromatogramas obtenidos del análisis HPLC de cada variedad de hoja de *Stevia* analizada son presentados en la Figura 30, por medio de ellos se pudo observar que a pesar de que las escalas de cada cromatograma son diferentes, las tres muestras presentan picos muy similares tanto para el esteviósido como para el rebaudiósido A, la diferencia más notable entre cada cromatograma son los picos que para nosotros representaron las impurezas, en este ámbito, el de las impurezas, se advirtió que mientras que para la muestra MPM tienen gran relevancia solo dos sustancias desconocidas a remover, en la muestra MPT son tres las impurezas importantes las causantes del problema mientras que en la muestra MPV, aunque no se lograron observar una gran cantidad de picos representantes de impurezas, debido a la intensidad con que se presentaron éstas, si representaron una gran influencia en el resultado.

Tabla 10 Resultados de los cromatogramas de cada variedad de hoja *Stevia* analizada mediante HPLC

Dato	Área de pico (mUA*min)		
	MPM	MPT	MPV
Esteviósido	0.62	0.62	0.69
Rebaudiósido A	3.92	3.33	3.67

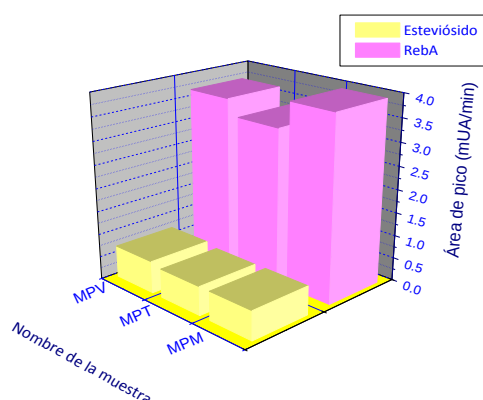


Figura 31 Gráfica área de pico vs variedad de hoja de *Stevia*

Los resultados numéricos de cada cromatograma arrojados por el software del HPLC, tanto para el esteviósido como para el rebaudiósido A, fueron recopilados en la Tabla 10 que a su vez originaron el gráfico presentando en la Figura 31. Dichos resultados confirmaron la similitud existente entre las áreas de los picos de cada componente de interés revelando una diferencia inexistente en el caso de las áreas presentadas para el esteviósido entre la MPM y la MPT pero de 0.07 mUA*min (10.69% de diferencia) con respecto a la MPV, mientras que para el rebaudiósido A, cada muestra presenta una discrepancia con respecto a las otras dos siendo la mayor la presentada por la muestra MPM con respecto a las otras dos con una diferencia de 0.59 mUA*min con respecto a la MPT que es la mayor.

Una vez conocidas las áreas existentes de cada pico, se aplican las fórmulas presentadas en el apartado II.1.10 tomando como base la concentración de la muestra certificada de rebaudiósido 40%, para ver la concentración de los dos componentes de interés con la que cuenta cada muestra obtenida, resultando la Tabla 11.

Tabla 11 Concentración en porcentaje de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras de variedad de hoja *Stevia* estudiadas

Dato	Concentración dentro de la muestra			Muestra certificada
	Variedad de hoja de Stevia			
	MPM	MPT	MPV	
Esteviósido	3.42	3.42	3.81	52.75
Rebaudiósido A	21.37	18.16	20.00	42.20

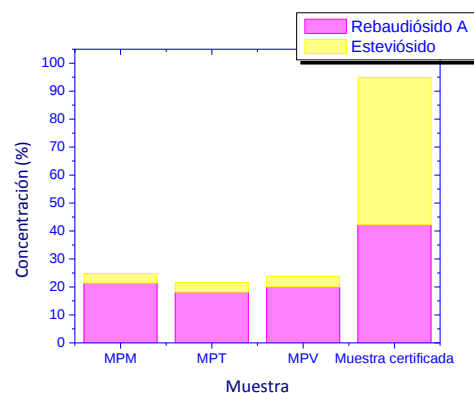


Figura 32 Gráfica de porcentaje de concentración vs muestra en estudio

Una manera más clara de ver los resultados obtenidos es mediante el gráfico mostrado en la Figura 32 (generado a partir de los datos de la tabla antes mencionada), de donde se puede observar que el contenido de glucósidos (esteviósido y rebaudiósido A) de la muestra proveniente de Tecolutla apenas alcanza la mitad del porcentaje de rebaudiósido A contenido en la muestra certificada, mientras que las otras dos muestras logran esa

misma cantidad con su contenido tan sólo de rebaudiósido A, por lo que se pudo concluir que las muestras obtenidas apenas alcanzarían el 20% de pureza para el rebaudiósido A, a excepción claro, de la muestra proveniente de Tecolutla (MPT) cuya pureza sería de tan solo el 18.16% y que alcanza el 21.58% de contenido de glucósidos tomando en cuenta también la cantidad de esteviósido con que cuenta la muestra.

Así mismo, se concluyó que el método extractivo es efectivo para cualquier variedad de hoja que se tenga sin necesidad de realizarle ningún ajuste a éste al momento de cambiar la procedencia de la materia prima, ya que en las tres muestras estudiadas presenta resultados superiores al 18% de pureza para el rebaudiósido A y aunque pudiera sonar un rendimiento muy bajo, cabe destacar que la extracción es 100% natural ya que sólo se está implementando agua como solvente además de que, comparados con los resultados hasta hoy reportados donde han sido empleando alcohol u otro solvente (Soto & Del Val, 2002), que según los autores, aumenta en gran medida la extracción de los glucósidos no presenta tan bajo rendimiento.

Por otro lado, es bueno recordar que la cantidad de glucósidos contenidos en la hoja depende además de las condiciones climatológicas y de suelo con las que cuenta el plantío, también de las condiciones en que se llevó a cabo el secado de las hojas, las cuales no fueron especificadas al momento de la adquisición de las hojas secas de *Stevia* y pudieran en determinado momento ser causa de las diferencias de pureza entre las muestras. Aunado lo anterior al hecho de que las hojas en estudio provienen de una planta con un bajo contenido de esteviósido propio de la especie de *Stevia rebaudiana Bertoni* plantada.

III.2.6 Análisis de la influencia del tamaño de partícula

El análisis de tamaño de partícula se llevó a cabo con la finalidad de establecer la influencia que ésta ejerce sobre la efectividad en la extracción de los glucósidos contenidos en las hojas de *Stevia* (muestra MPP).

Como ya se mencionó, la extracción se efectuó para dos tamaños, una a $1000\mu\text{m}$, la cual se consiguió mediante trituración de las hojas y tamizado del polvo resultante (ver apartado II.1.3), y una segunda con la hoja entera manteniendo, en ambos casos, la temperatura ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$), agitación, relación sólido/líquido (1/27) y tiempo de extracción (2 horas) constantes.

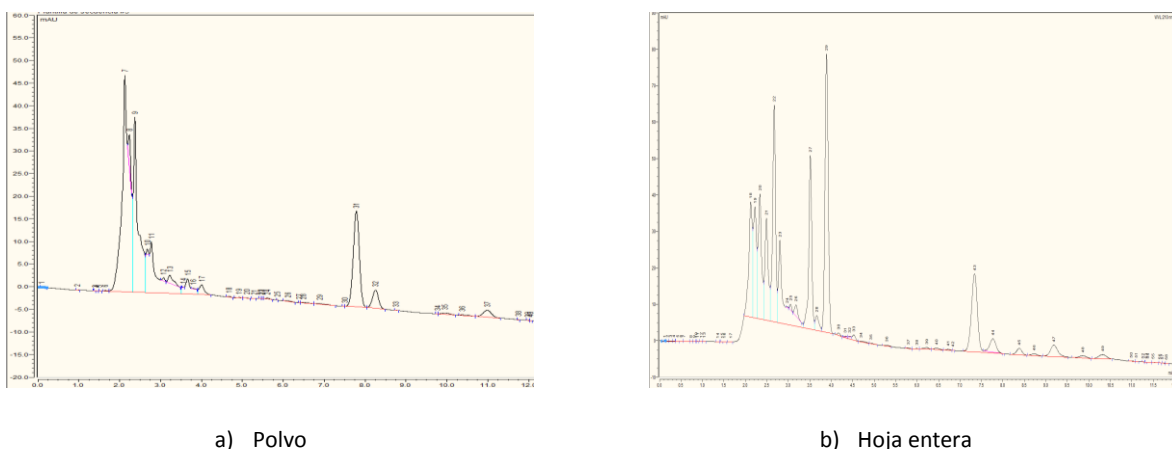


Figura 33 Cromatogramas de esteviósido y rebaudiósido A a diferente tamaño de materia prima

NOTA: Los cromatogramas presentan la escala de tiempo de cero hasta el minuto 12, mientras que el eje de las unidades de absorbancia en mUA va de -20 a 60 para el caso de la muestra en polvo y de -10 a 90 para la muestra de hoja entera.

El análisis efectuado por cromatografía de líquidos arrojó como resultado una gran similitud, para ambos casos, en cuanto a la altura de pico tanto para el esteviósido como para el rebaudiósido A (ver Figura 33), así mismo se notó una diferencia en lo que a la extracción de sustancias de no interés se refiere y que para nuestras finalidades fueron denominadas impurezas.

Para tener mayor claridad sobre de los resultados que se obtuvieron, se reportan los datos aproximados de las alturas y las áreas de pico que presentaron al momento del análisis por cromatografía de líquidos compilados en la Tabla 12 e ilustrados por las Figuras 34 y 35 (alturas y áreas respectivamente). Es necesario señalar que en el caso de las impurezas solo se reporta el pico más alto encontrado en todo el rango correspondiente a estas.

En la tabla antes mencionada, se observó que la diferencia existente entre ambos tamaños de materia prima, en lo referente a las áreas de pico es de tan solo 0.07

mUA*min, equivalente a un porcentaje de diferencia del 10.69% entre los valores encontrados para el esteviósido, mientras que para el rebaudiósido A la diferencia existente fue de 0.34 mUA*min, lo que se traduce en un 9.71% de porcentaje de diferencia entre ellas.

Tabla 12 Resultados de los cromatogramas HPLC de hoja entera y polvo de 1000 μ m de *Stevia*

Tamaño de partícula	Polvo (1000 μ m)		Hoja entera	
Dato	Altura de pico (mUA)	Área de pico (mUA*min)	Altura de pico (mUA)	Área de pico (mUA*min)
Esteviósido	47	----	76.5	----
Rebaudiósido A	4	0.69	5	0,62

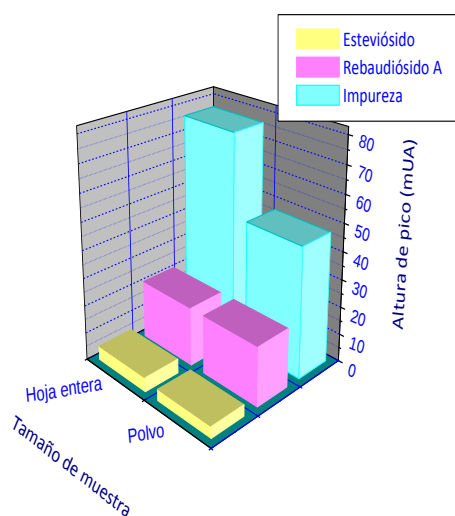


Figura 34 Gráfica de altura de pico vs tamaño de muestra

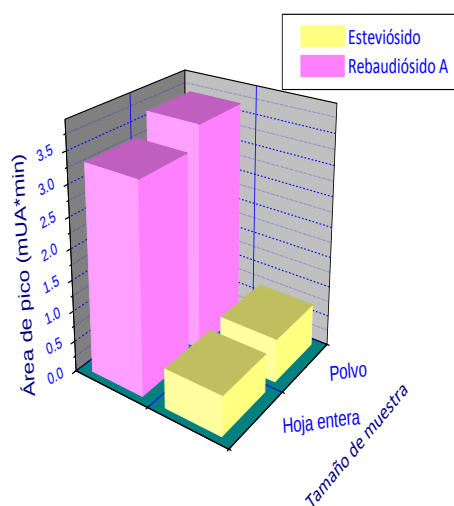


Figura 35 Gráfica de área de pico vs tamaño de muestra

Por su parte, al ver Figura 34 se advierte que la altura correspondiente al rebaudiósido A, en el caso del polvo, representa aproximadamente la mitad de la altura reportada por el pico más alto de las impurezas mientras que el pico del esteviósido semeja aproximadamente el 10% de ellas. A su vez, las alturas presentadas por el rebaudiósido A

y el esteviósido, en el caso de la hoja entera, equivalen aproximadamente a un 27.5% y 6.5 % respectivamente, de la altura presentada por el pico más alto de las impurezas extraídas en su corrida. Con lo anterior se pudo deducir que la hoja sin moler presenta menor cantidad de impurezas al momento de la extracción, lo cual es de esperarse ya que al tamizar el polvo se quedan en el tamiz una gran cantidad de materia fibrosa que agrega a la infusión otro tipo de sustancias. Ahora bien, al momento de analizar las áreas, que en realidad son los valores de interés, se presenta para el esteviósido (ver Figura 35) el caso contrario a las alturas, ya que la muestra que presenta una mejor área es la que tiene como base el polvo a pesar de que el pico con mayor altura lo presenta la muestra de hoja entera. Sin embargo, aunque el rebaudiósido A presentó alturas de pico iguales, las áreas difieren aunque muy poco siendo la mayoritaria la presentada por la muestra base polvo.

Tabla 13 Concentración de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras de hoja entera y polvo de *Stevia* estudiadas

Dato	Concentración dentro de la muestra		
	Tamaño de muestra <i>Stevia</i>		Muestra certificada
	Polvo (1000 μm)	Hoja entera	
Esteviósido	3.81	3.42	52.75
Rebaudiósido A	20.00	18.16	42.20

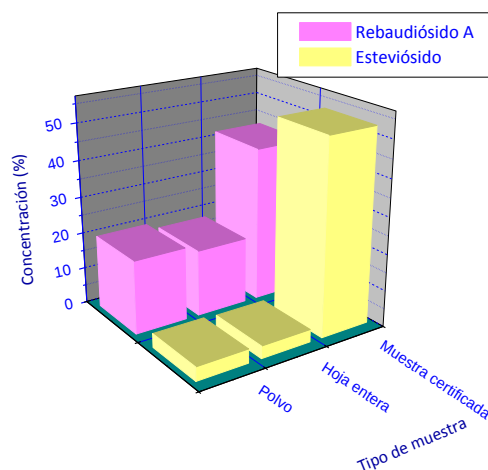


Figura 36 Porcentaje de concentración vs tipo de muestra.

Por todo lo anterior se pudo deducir que, al emplear un tamaño de partícula de 1000 μm de hoja de *Stevia* se obtuvo una mejor extracción que al efectuarla con la hoja entera pero, para concretar aún más dicha idea fue necesario efectuar un análisis respectivo a la concentración de ambos componentes de interés, es decir, con los resultados de las áreas

de cada pico de la tabla anterior, tanto para el esteviósido como para el rebaudiósido A, se buscó, al igual que con los apartados anteriores, la obtención de la concentración con la que cuentan los polvos finales derivados de estos experimentos y cuyos valores fueron reportados en la Tabla 13 mostrada a continuación.

Al comparar los resultados de la tabla anterior se encontró que, para el esteviósido hubo una diferencia porcentual del 10.79% entre la concentración del extracto proveniente del polvo y el derivado de la hoja entera, lo cual es bastante significativo en términos numéricos; sin embargo, hay que tomar en cuenta que éste glucósido es el que aporta el regaliz al producto final lo cual implica que una pequeña concentración de éste no suele ser tan desfavorable. Por su parte, para el rebaudiósido A esa diferencia numérica en la concentración representa un 9.64%, lo cual resulta revelador, ya que implica un cambio drástico en las propiedades sensoriales del producto final y dado que, éste último es el glucósido prioritario en las muestras en estudio, implica una considerable diferencia entre ambos polvos resultantes. Ahora bien, ambos tamaños de materia prima para la extracción refieren una concentración del 18 al 20%, es decir, aproximadamente de un 22 a 24% por debajo de la lograda por la muestra certificada analizada tal y como se puede ver de manera más clara en la Figura 36, mientras que para el esteviósido, el área refiere a tan sólo un rango aproximadamente entre 6.48% y 7.22% del contenido de dicho compuesto en dicha muestra certificada.

Finalmente, para el análisis de las impurezas, cabe destacar que únicamente se reportó la altura del pico más alto, que en este caso si presentó una diferencia considerable entre los experimentos pero que para los fines buscados no representaron un gran obstáculo ya que en pasos posteriores se buscó su reducción.

III.2.7 Análisis de temperatura

Con la finalidad de tener un ahorro energético en la producción de calor necesario para llevar a cabo la extracción de los glucósidos vía infusión, se recurrió a la evaluación de ésta a diferentes temperaturas en un rango de 35 a 55°C, teniendo como punto de partida lo

recomendado por la literatura (Arakawa *et al.*, 2012; Monesterolo & Macia, 2002), para así encontrar la mejor temperatura a la que se puede llevar a cabo dicha extracción a manera de obtener la mayor cantidad de producto posible que cuente con una considerable calidad.

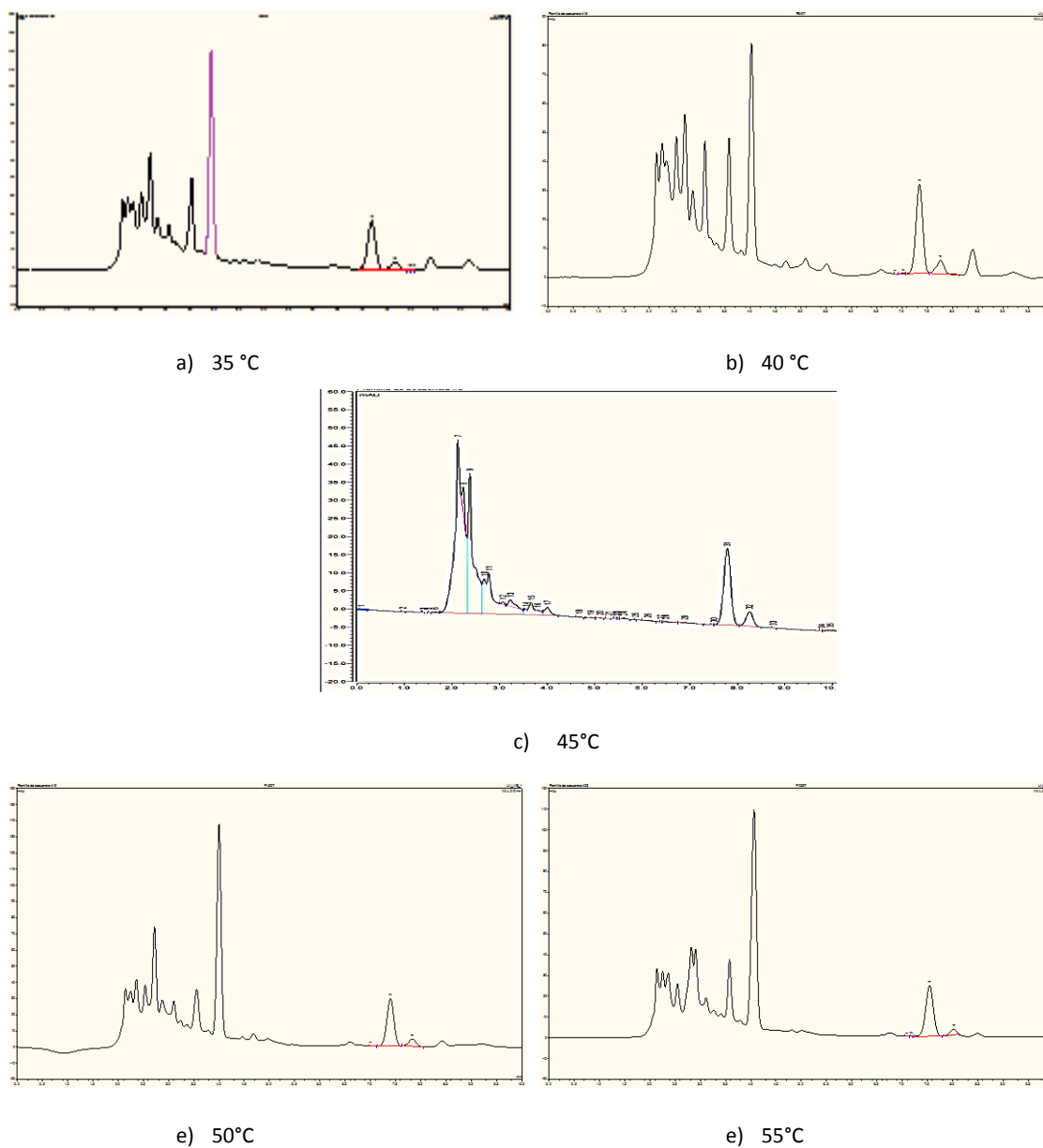


Figura 37 Cromatogramas de esteviosido y rebaudiosido A de cada temperatura de extracción

NOTA: Los cromatogramas presentan la escala de tiempo de cero hasta el minuto 10, mientras que el eje de las unidades de absorbancia en mUA va: a) de -20 a 140, b) de -10 a 90, c) de -20 a 60, d) de -20 a 160 y e) de -20 a 120

Tabla 14 Resultados de los cromatogramas de temperatura de extracción vía infusión de hoja de *Stevia*

Temperatura	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
Dato	Área de pico (mUA*min)				
Estevisósido	0.82	0.85	0.69	0.75	0.60
Rebaudiósido A	4.82	4.83	3.67	4.77	4.31

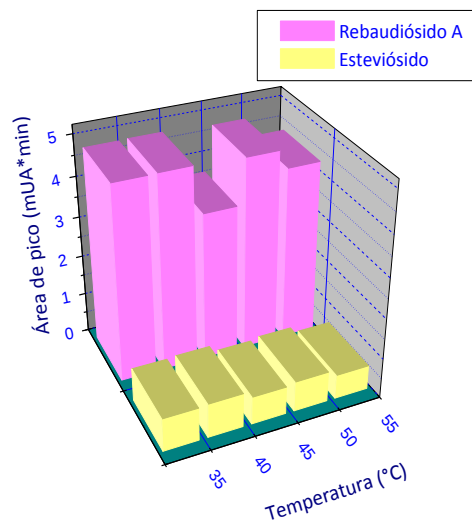


Figura 38 Área de pico vs temperatura

Tabla 15 Concentración de estevisósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras de temperatura de extracción

Dato	Concentración dentro de la muestra					Muestra certificada
	Temperatura (°C)					
	35	40	45	50	55	
Estevisósido	4.52	4.69	3.81	4.14	3.31	52.75
Rebaudiósido A	26.27	26.33	20.00	26.00	23.49	42.20

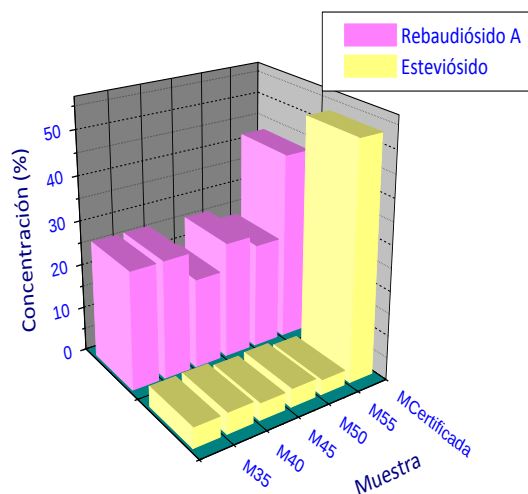


Figura 39 Porcentaje de concentración vs muestra

Los cromatogramas resultantes de dicho análisis por HPLC se encuentran reportados en la Figura 37, de ellos se dedujo que comparando cada pico con su respectivo, todas las temperaturas presentan picos muy similares tanto para el esteviósido como para el rebaudiósido A, la diferencia nuevamente se observan en los componentes representantes de las impurezas que presentó cada uno, ya que a simple vista pareciese que son los mismos componentes solo que en menor o mayor cantidad, siendo la impureza predominante, en todos ellos, la retenida en aproximadamente el minuto 4.0 y que para fines ilustrativos se delineó en el cromatograma a) de morado.

Para ver las pequeñas diferencias entre cada pico de esteviósido y rebasudiósido A, se extrajeron del software Chromeleon del cromatógrafo HPLC los valores numéricos de las áreas correspondientes a cada uno de ellos, que posteriormente fueron recopilados en la Tabla 14, mostrada a continuación.

Como pudo percibirse tanto en la Tabla 14 como en la Figura 38, la tendencia de extracción de ambos componentes es irregular debido a que primero fue de menos a más, al presentar una mayor área de pico a los 40°C con respecto a los 35°C, para después tener un descenso súbito del área a los 45°C, incrementar en los 50°C y nuevamente presentar una menor área a los 55°C, aún y con esos fuertes cambios ocasionados por la variación de la temperatura quedó claro el hecho de que las dos más bajas temperaturas expuestas en la tabla fueron las que arrojaron mejores resultados. Ahora bien, fue necesario saber con qué calidad se obtuvieron por lo que se expresaron los resultados en términos de concentración, tomando como base tanto las áreas como las concentraciones con las que cuenta la muestra certificada analizada en el apartado III.2.3 de este documento, resultando la Tabla 15 ilustrada mediante la Figura 39 y de las cuales se contemplan dos cosas principalmente: la primera, las dos temperaturas que presentan mejor contenido de los dos glucósidos estudiados son la de 35 y 40°C, y segunda, aunque la temperatura de 40°C presenta una mejor concentración que la de 35°C, resulta mejor opción, hasta el momento, la de 35°C ya que existe un porcentaje de diferencia entre sus concentraciones de tan solo un 0.23% pero la opción de 40°C implica un mayor gasto

energético al tener que mantener 5°C más la temperatura por todo el tiempo que dure la extracción.

Tabla 16 Cantidad de producto obtenido de acuerdo a la temperatura de extracción

Dato	Masa (g)				
	35°C	40°C	45°C	50°C	55°C
Polvo total obtenido	0.4390	0.3935	0.3379	0.4167	0.4140
Esteviósido	0.0198	0.0184	0.0144	0.0172	0.0137
Rebaudiósido A	0.1153	0.1036	0.0763	0.1083	0.0972

NOTA: Las cantidades son referidas a un gramo de hojas de Stevia y a la concentración correspondiente

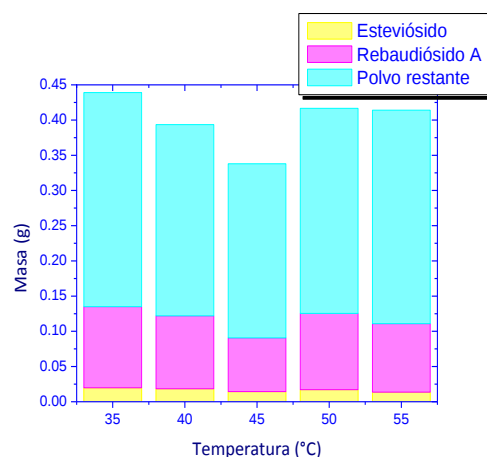


Figura 40 Masa de los polvos obtenidos vs temperatura de extracción

De igual manera, al observar la Figura 39 queda más clara la diferencia de concentraciones existente entre la muestra certificada y las obtenidas al presentar, en el caso del esteviósido, una proporción aproximada que va del 6.27% (punto más bajo, obtenido a los 55°C) al 8.89% correspondiente al punto más alto obtenido (40°C) y en el caso del rebaudiósido A ese intervalo va aproximadamente del 47.39 al 62.39%.

Por otra parte, al efectuar el análisis de materia obtenida en cada temperatura estudiada se obtuvieron los resultados de la Tabla 16, datos correspondientes a los mostrados en la Figura 40 donde se observa que a 45°C se obtuvo menos polvo total de la extracción por lo que quedó totalmente descartada esa temperatura, de igual manera quedaron descartadas las temperaturas de 50 y 55°C ya que, aunque se obtiene mayor cantidad de polvo total de extracto que a los 40°C, recordemos que ambos productos tiene una menor concentración de los dos glucósidos en estudio por lo que no resulta viable, además de que, para su obtención se requirió un mayor gasto energético al tratar de mantener

constante los 50 o 55°C, según sea el caso, que sostener los 40°C de la otra opción durante todo el tiempo de extracción. A su vez, queda confirmado que la mejor opción de temperatura es 35°C, como ya se había establecido anteriormente, debido a que por una parte se obtuvo más producto final (ver Figura 40) y de buena calidad que incluso a los 40°C, y por otra, fue al mismo tiempo la opción que menos energía calorífica requirió para extraer los glucósidos de interés.

III.2.8 Análisis del tiempo de extracción

El análisis de tiempo de extracción se llevó a cabo tomando en consideración lo reportado en bibliografía (Arakawa et al., 2012; Chhaya et al., 2012; Monesterolo & Macia, 2002) y estableciendo presión atmosférica, agitación, relación sólido/líquido (1/27) y temperatura (45°C) constantes a 1, 1.5, 2, 4, 6 y 8 horas, obteniéndose los cromatogramas HPLC mostrados en la Figura 41 en donde se observó que, a medida que se fue incrementando el tiempo de extracción existió un mayor arrastre de componentes considerados como impurezas, mientras que los picos representativos tanto del rebaudiósido A como del esteviósido permanecen casi constantes a excepción de la prueba realizada a una hora, que contrario a lo que esperado presenta una mayor extracción para ambos componentes de interés.

Lo dicho anteriormente fue corroborado por los datos numéricos proporcionados por el software Chromeleon del cromatógrafo de líquidos para las áreas de los respectivos picos, los cuales son presentados en la Tabla 17 e ilustrados por gráfico de barras de la Figura 42.

De la Figura 41 se tuvo que para el caso del esteviósido, sin considerar el tiempo de una hora, a medida que incrementa el tiempo de extracción se logró una mayor área, es decir una mejor extracción, sin embargo, para el caso del rebaudiósido A, el área de pico no presentó ninguna tendencia ya que a lo largo de todo el rango de tiempo de estudio mostró una oscilación en los valores, de los cuales los tres que exhiben las mayores áreas son el tiempo de 1, 1.5 y 6 horas, el segundo con un área aproximada de 5.00 y el tercero con 5.22 mUA*min, sin embargo, existe una considerable diferencia de gasto energético

entre una y otra opción por lo cual se tendría que analizar a fondo la concentración resultante de cada uno y la cantidad final, en gramos, de producto obtenido.

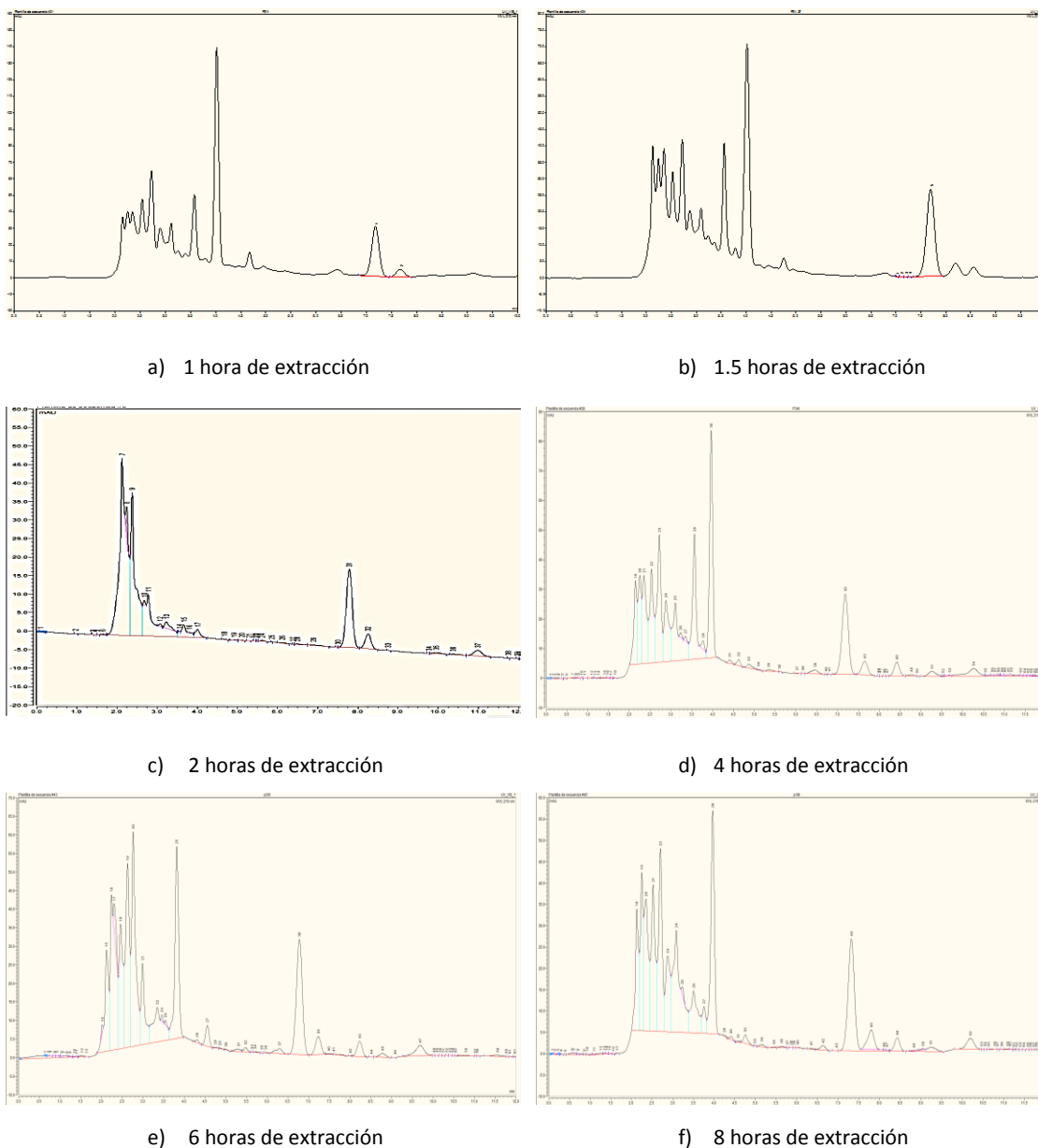


Figura 41 Cromatogramas de esteviósido y rebaudiósido A de cada tiempo de extracción vía infusión de hojas de *Stevia*

NOTA: Los cromatogramas presentan la escala de tiempo de cero hasta el minuto 10 para el inciso a) y b) mientras que para los demás va hasta el minuto 12. Por su parte, el eje de las unidades de absorbancia, en mUA, es: a) de -20 a 160, b) de -10 a 80, c) de -20 a 60, d) de -10 a 90, e) de -10 a 70 y e) de -10 a 60

Tabla 17 Resultados de los cromatogramas de cada tiempo de extracción vía infusión de hojas de *Stevia*

Tiempo	1 hora	1.5 horas	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Dato	Área de pico (mUA*min)					
Esteviósido	0.80	0.67	0.69	0.73	0.76	0.86
Rebaudiósido A	5.24	5.00	3.67	4.80	5.22	4.64

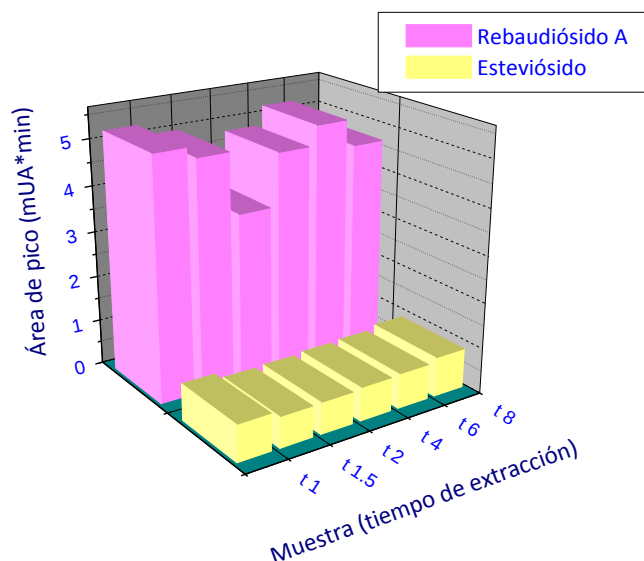


Figura 42 Áreas de pico de los glucósidos respecto al tiempo de extracción

Mención aparte merece el tiempo de una hora, ya que presenta, contrario a todo lo esperado, una muy buena extracción al contar con los valores más altos de área para ambos componentes de interés, un área de 0.80 para el esteviósido así como una de 5.24 mUA*min para el rebaudiósido A.

Ahora bien, al convertir las áreas de cada pico en concentración (ver Tabla 18) resultó, como era de esperarse, la conservación de la tendencia de la tabla anterior (ver Figura 43), por lo que siguió como la mejor opción la extracción efectuada por el periodo de una hora bajo las condiciones que se mencionaron; sin embargo, como una segunda opción a elegir destacó la extracción de 6 horas ya que presentó una diferencia porcentual de concentración de rebaudiósido A de tan solo 0.35% con respecto a la de una hora, la

diferencia principal radica en las cinco horas más que se requirieron para obtener una concentración similar. Por otro lado, si se requiere que el producto final tenga como base una concentración de rebaudiósido A del 20%, cualquiera de las opciones aquí presentadas es buena; sin embargo, nuevamente resulta mejor la extracción por un periodo de una hora ya que facilita un sistema de extracción en forma continua, descartando así a todos los demás tiempos propuestos analizados.

Tabla 18 Concentración de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras de tiempo de extracción

Dato	Concentración dentro de la muestra						Muestra certificada
	Tiempo de extracción						
	1 hora	1.5 horas	2 horas	4horas	6 horas	8 horas	
Esteviósido	4.41	3.70	3.81	4.03	4.19	4.75	52.75
Rebaudiósido A	28.56	27.26	20.00	26.17	28.46	25.29	42.20

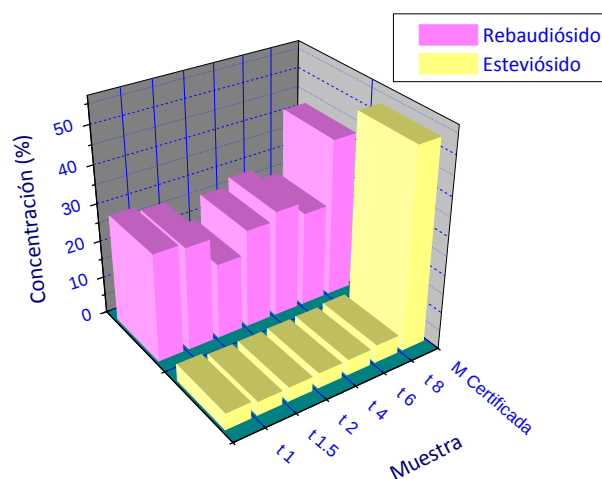


Figura 43 Concentración de glucósidos respecto al tiempo de extracción y en la muestra certificada

Finalmente, para dar el visto bueno definitivo se hizo una evaluación anteponiendo la masa total obtenida de cada corrida a la concentración que cada componente de interés presentó, conformando tanto la Tabla 19 como la Figura 43 donde se presentan los

resultados de cuatro de las seis corridas, a manera ilustrativa del comportamiento, descartando así las corridas de 4 y 8 horas ya que, la primera presenta una concentración intermedia que no es muy útil para el objetivo planteado y, la segunda, demasiado tiempo de extracción además de ser la que presentó menor concentración. De igual manera, una vez conocidos los gramos obtenidos de cada corrida, se vio que las dos corridas que presentaron un mayor producto son las dos que se efectuaron con menor tiempo de extracción, dejando a un lado la extracción de 6 horas que hasta ahora se perfilaba como una segunda opción. Por lo tanto, se concreta de manera definitiva lo que hasta ahora tan solo se apuntaba como la mejor opción.

Tabla 19 Cantidad de producto obtenido de acuerdo al tiempo de extracción

Dato	Masa (g)			
	1 hora	1.5 horas	2 horas	6 horas
Polvo total obtenido	0.4137	0.4279	0.3379	0.3811
Esteviósido	0.0182	0.0158	0.0144	0.0159
Rebaudiósido A	0.1181	0.1166	0.0758	0.1084

NOTA: Las cantidades son referidas a un gramo de hojas de Stevia y a la concentración correspondiente

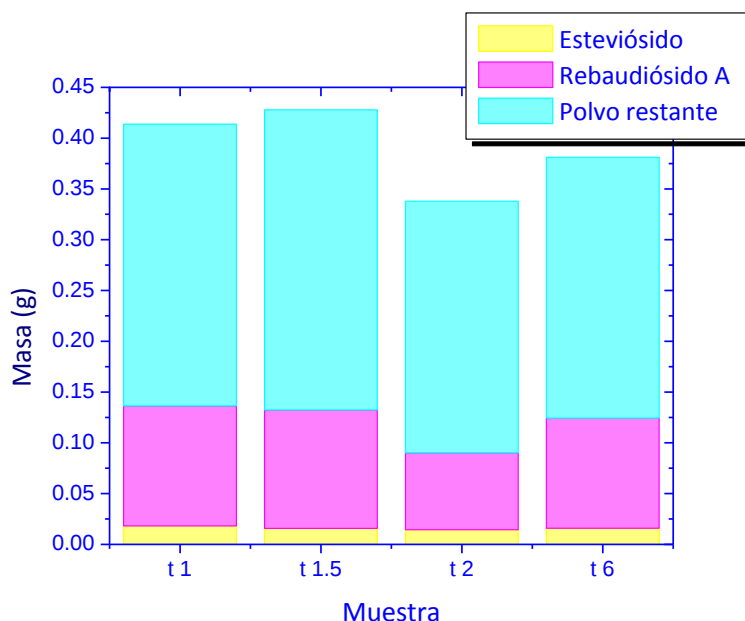


Figura 44 Masa de los polvos obtenidos en su respectivo tiempo de extracción

Concluyendo, tanto de los cromatogramas como de los datos de las diferentes tablas y figuras correspondientes de esta sección, se concretó que el mejor tiempo de extracción es el de 1 hora, ya que presentó una mayor extracción pero sin el arrastre de tantas impurezas, proporcionó un ahorro de tiempo durante la extracción que se tradujo también en ahorro de energía ya que no se requirió tanto calentamiento en ello y además, facilita la implementación de un sistema de extracción en forma continua.

III.2.9 Análisis de la velocidad de agitación

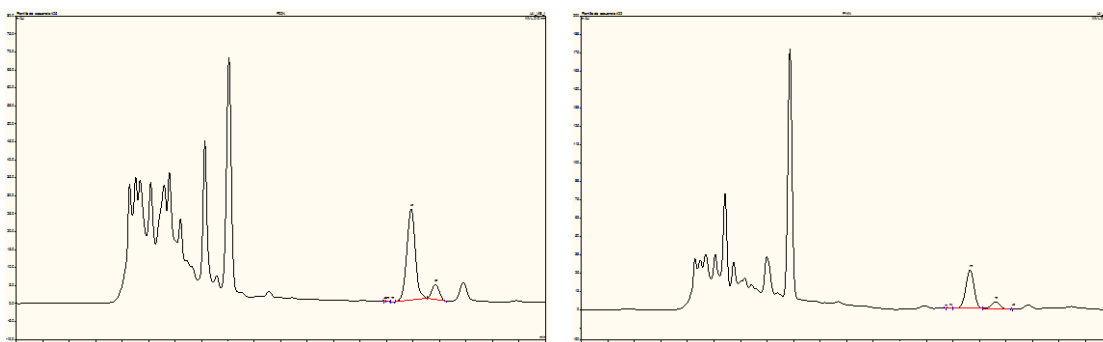
El análisis de la agitación se llevó a cabo en un rango de 60 a 1200 rpm, que es la capacidad con la que cuenta la parrilla empleada y que van, desde el nivel uno de agitación hasta el máximo nombrado como nivel 12 (ver Figura 45).



Figura 45 Parrilla eléctrica marca Thermo Scientific modelo Cimarec

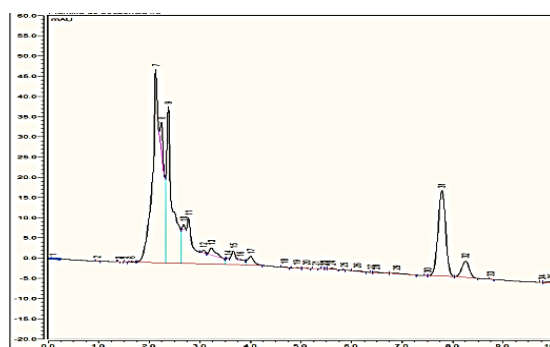
Los polvos resultantes de cada prueba se prepararon según la metodología a seguir para la cromatografía de líquidos (apartado III.1.9) y posteriormente fueron sometidos cada uno a su respectivo análisis bajo el método descrito en el apartado III.1.10.

Una vez analizados los polvos dieron como resultado los cromatogramas englobados en la Figura 46 y cuyos valores numéricos, para las áreas tanto del pico del esteviósido como del rebaudiósido A, fueron reportados en la Tabla 20 y graficados en la Figura 47, mediante ambos, figura y tabla, se pudo visualizar el hecho de que las áreas del pico de esteviósido oscila desde 0.66, a nivel 2 de agitación, hasta 0.82 a nivel 4 pasando por los puntos intermedios de 0.69, a nivel 6, y 0.79 en los dos restantes. Por su parte, el rebaudiósido A manifiesta su área más baja en el nivel 6 mientras que la más alta se establece en la máxima agitación evaluada

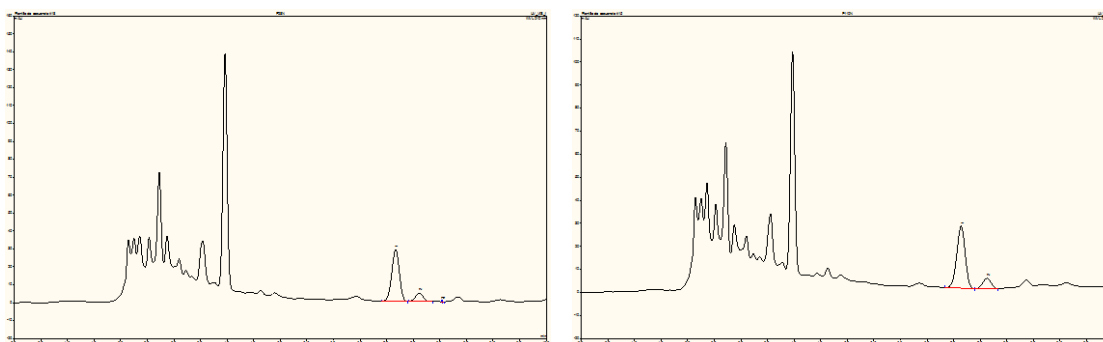


a) 2N

b) 4N



c) 6N



d) 8N

e) 10N

Figura 46 Cromatogramas de esteviósido y rebaudiósido A de cada nivel de agitación en que se llevó a cabo la extracción

NOTA: Los cromatogramas presentan la escala de tiempo de cero hasta el minuto 10. Por su parte, el eje de las unidades de absorbancia, en mUA, es: a) de -10 a 80, b) de -20 a 200, c) de -20 a 60, d) de -20 a 160 y el inciso e) de -20 a 120

Tabla 20 Resultados de los cromatogramas de cada nivel de agitación en que se llevó a cabo la extracción

Agitación	2 N	4 N	6 N	8 N
Dato	Área de pico (mUA*min)			
Esteviósido	0.66	0.82	0.69	0.79
Rebaudiósido A	4.37	4.69	3.67	4.81

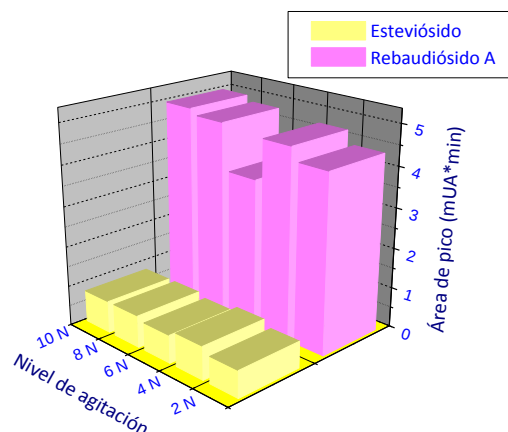


Figura 47 Área de pico de cada nivel de agitación

Ahora, con los datos de la anterior tabla y nuevamente los de la muestra certificada analizada, se llegó a los datos de concentración de cada glucósido de interés englobados en la Tabla 21 que a su vez originó la Figura 48, ambos denotaron el hecho de que la tendencia, al menos para el rebaudiósido A, corresponde a una proporción inversa de la agitación con respecto a la concentración a excepción del punto medio en el que se tuvo una disminución muy drástica, mientras que para el esteviósido no se mantiene una tendencia ya que varía de manera oscilante de un nivel de agitación a otro teniendo una mejor concentración. Por su parte al comparar los resultados obtenidos de los diferentes niveles de agitación estudiados con el reportado por la muestra certificada, se denota mediante la Figura 48 que para el esteviósido el máximo obtenido es aproximadamente un 8.56% del contenido del mismo componente de la muestra certificada y en el caso del rebaudiósido A logra alcanzar desde un 47.39 hasta un 63.93% la concentración de la muestra certificada.

Hasta ahora los mejores resultados se obtuvieron bajo la condición de agitación alcanzada a nivel 10, pero aún falta la evaluación de la cantidad de polvo resultante de dichas extracciones la cual se efectuó mediante el análisis de la Tabla 22, en donde se reportan los gramos obtenidos de polvo total de extracción por cada gramo de hoja empleado.

Tabla 21 Concentración de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra certificada y en las muestras de cada nivel de agitación

Dato	Concentración dentro de la muestra					Muestra certificada
	Nivel de agitación					
	2	4	6	8	10	
Esteviósido	3.64	4.52	3.81	4.36	4.36	52.75
Rebaudiósido A	23.82	25.57	20.00	26.22	26.98	42.20

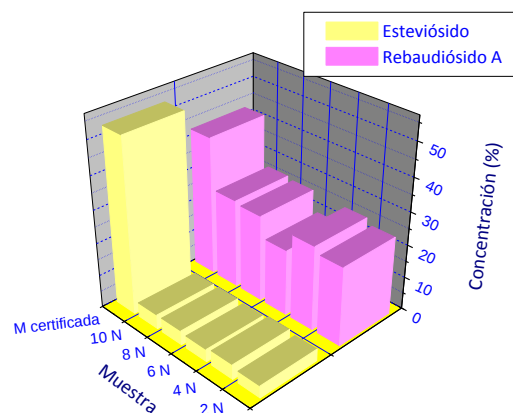


Figura 48 Concentración obtenida de cada nivel de agitación

Tabla 22 Cantidad de producto obtenido de acuerdo a la agitación en que se llevó a cabo la extracción

Dato	Masa (g)				
	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N
Polvo total obtenido	0.3974	0.4256	0.3379	0.4229	0.4054
Esteviósido	0.0144	0.0192	0.0144	0.0184	0.0176
Rebaudiósido A	0.0946	0.1088	0.0758	0.1108	0.1093

NOTA: Las cantidades son referidas a un gramo de hojas de Stevia y a la concentración correspondiente

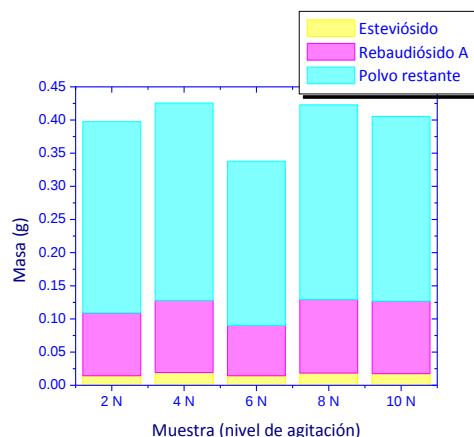


Figura 49 Cantidad de masa obtenida de polvo en cada nivel de agitación

Con los resultados de la tabla anterior, que a su vez son los mismos presentados en la Figura 49 cambió el panorama, ya que la extracción que presenta una mayor producción de polvo es la que se obtuvo manteniendo una agitación nivel 4, seguida de la efectuada con nivel 8 y pasando a tercer término la de nivel 10; sin embargo, al ver la producción real de cada glucósido de interés con respecto a la concentración, que son los valores

mostrados en la tabla, cambió nuevamente la situación debido a que presentó mayor producción de los glucósidos de interés el polvo resultante de una agitación nivel 8, seguido del nivel 10 y en tercer lugar el nivel 4.

Evaluando las tres situaciones y tomando en cuenta el hecho de que es más productivo efectuar la extracción a un nivel 8 de agitación, queda descartado por completo la opción de agitación nivel 10, además de que ésta última opción presentó problemas al efectuarse la filtración para obtener el líquido libre de sólidos debido a la fragmentación de las hojas ocasionada por fuerte intensidad de la misma, lo cual implicó la implementación de un filtro adicional.

Dicho lo anterior, solo quedaron dos opciones, el polvo resultado de la agitación nivel 4 y el de nivel 8, de donde aunque arrojó mejores resultados el segundo, cabe resaltar que la diferencia porcentual entre la cantidad de polvo total obtenida entre ellos es de tan solo un 0.64%, mientras que la diferencia porcentual existente entre las cantidades reales de esteviosido y rebaudiósido A dentro de las muestras es de un 4.26% y un 1.82% respectivamente, lo cual implica a gran escala una pérdida considerable pero si se toma en consideración la cantidad de energía necesaria para mantener dicha agitación y el costo que ésta generaría, se perfiló como mejor opción la extracción efectuada con una agitación nivel 4 que es el resultado que se presenta como final.

III.2.10 Prueba optimizada de extracción

Tomando los mejores resultados de cada prueba, se dio a la tarea de realizar una nueva corrida con esos parámetros (relación 1/27, duración de 1 hora, temperatura de 35°C y una agitación de nivel 4), con la finalidad de evaluar la eficacia de ellos en conjunto para la extracción obteniendo como resultante el siguiente cromatograma (Figura 50) y cuyos resultados numéricos se muestran en la Tabla 23.

El cromatograma presenta ambos picos de interés bien definidos, así como una disminución de la altura de los picos representantes de las impurezas, esto último en relación con los mostrados en apartados anteriores. Los datos numéricos de la Tabla 23

corroboraron la definición de los picos de los glucósidos de interés (Figura 51) de la misma forma en que se pudo apreciar la buena concentración de éstos con la que contó la muestra final (ver Figura 52). Al comparar los resultados de esta corrida con los de la muestra certificada analizada se nota el alcance de un 62.77% del porcentaje presente en ella, o visto de otra manera, la muestra final cuenta con más de un 26% de rebaudiósido A que sumado con el 3.59% del esteviósido, se concluye que la muestra al menos contiene una concentración del 30% en glucósidos.

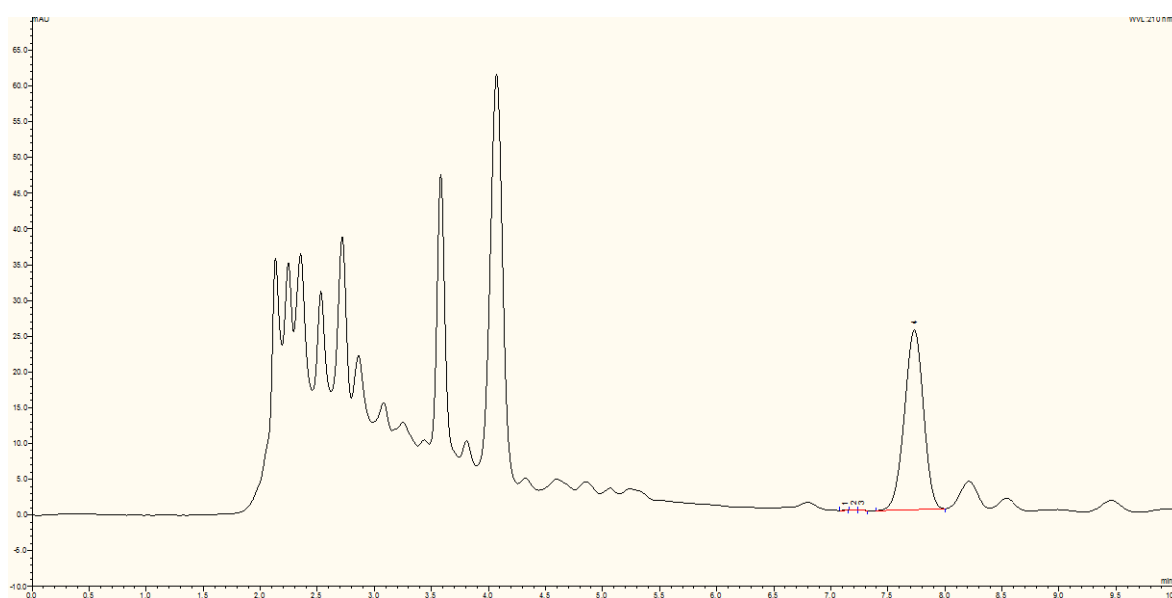


Figura 50 Cromatograma de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra final

Por su parte, tomando en cuenta que el total de polvo resultante de la prueba fue de 0.4626 gramos se concluyó que el total de esteviósido y rebaudiósido A obtenido fue de 0.0166 y 0.1225 gramos respectivamente, cifras a las que se llegaron mediante los cálculos hechos bajo el mismo procedimiento que en apartados anteriores y que simbolizan el 1.6 y 12.25% de esteviósido y rebaudiósido A respectivamente en base al peso seco de la hoja.

Tabla 23 Resultados y concentración de esteviósido y rebaudiósido A en la muestra final

Dato	Área de pico en la muestra final	Concentración dentro de la muestra final
Esteviósido	0.65	3.59
Rebaudiósido A	4.86	26.49

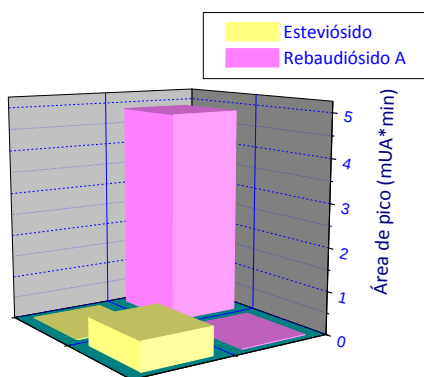


Figura 51 Área de pico de los glucósidos en la prueba final de extracción

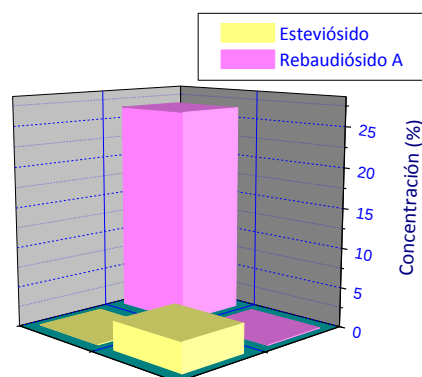


Figura 52 Concentración de los glucósidos en la prueba final de extracción

Ahora bien, con el fin de determinar la mejor extracción se llevó a cabo una comparativa entre los mejores resultados obtenidos individualmente para cada parámetro y los de la prueba final de extracción de forma tal, que se pudiera apreciar las diferencias existentes entre ellas y así tomar una decisión sobre cuál es la mejor opción para llevar a cabo la extracción a nivel macro. Por lo anterior se recopilaron, los datos citados, en la Tabla 24 de donde se desglosan las dos siguientes figuras (53 y 54) para exponer mejor los resultados y de esa forma distinguir que, no obstante en términos de concentración resulta mejor la prueba realizada para el tiempo de una hora, al presentar un 28.56% (nivel más alto, ver Figura 53), la prueba final tiene una mayor producción de rebaudiósido A (Figura 54) aunque con un 26.49% de concentración que, estrictamente en términos numéricos, refleja una diferencia porcentual de aproximadamente un 7.5% con respecto a la otra mientras que, para las cantidades máxicas logradas entre las mismas pruebas la diferencia porcentual asciende aproximadamente a 3.65% equivalente casi a la mitad del porcentaje anterior.

Tabla 24 Recopilación datos de concentración y masa de la prueba optimizada

Dato	Compendio de los mejores resultados										Muestra certificada
	Concentración					Masa					
	Relación 1/27	T 35 °C	Tiempo 1 hora	Agitación 4N	Prueba final	Relación 1/27	T 35 °C	Tiempo 1 hora	Agitación 4N	Prueba final	
Estevisósido	4.26	4.52	4.41	4.52	3.59	0.0144	0.0198	0.0182	0.0192	0.0166	52.75
Rebaudiósido A	22.57	26.27	28.56	25.57	26.49	0.0763	0.1153	0.1181	0.1088	0.1225	42.20

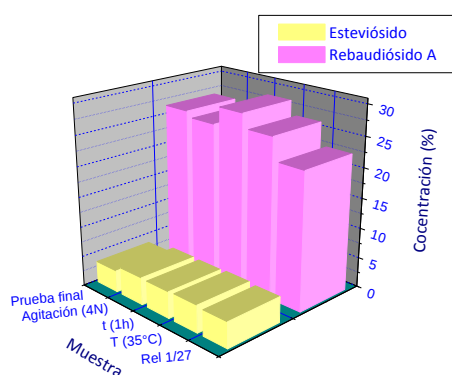


Figura 53 Concentración de estevisósido y rebaudiósido A en las mejores corridas de cada parámetro vs prueba final

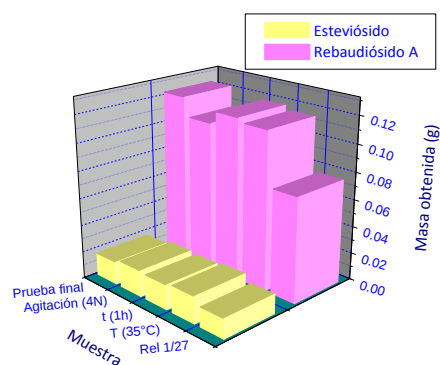


Figura 54 Masa obtenida de estevisósido y rebaudiósido A en las mejores corridas de cada parámetro vs prueba final

Por lo anterior, se considera a la prueba final de extracción como la mejor opción, al ser además de la que ofrece los mejores resultados (cantidad de producto), la que requiere una menor temperatura y menor nivel de agitación, lo que repercute en ahorro de energía alcanzando así su objetivo al ahorrar tiempo, energía y por ende costos.

III.2.11 Efectividad de la floculación

La finalidad de la floculación fue lograr una clarificación del líquido resultante de la extracción. Se llevó a cabo por medio de la adición de los floculantes (sulfato de aluminio y carbonato de calcio) para la remoción de las sustancias coloidales presentes mediante su aglutinación, decantación y posterior filtración.

El resultado obtenido de la floculación a primera instancia es mostrado en la Figura 55, en donde claramente se ve una pérdida de coloración, la cual es referida únicamente al efecto de la floculación ya que la ilustración muestra a la solución tal y como resulta de ella, sin permitir que se sedimente y por lo tanto sin haber sido filtrada.

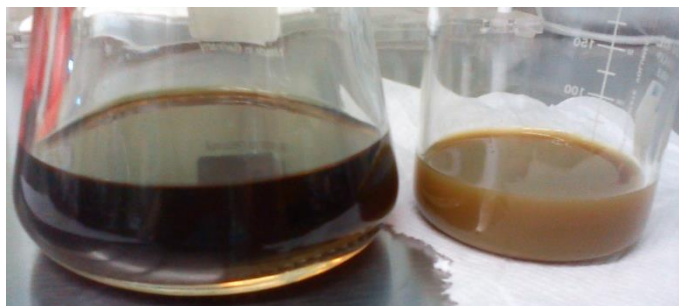


Figura 55 Extracto de Stevia antes y después de la floculación

Para el análisis de su efectividad fueron tomadas muestras tanto de la solución de extracción como de la resultante de la floculación para someterlas al análisis de cromatografía de líquidos y de esa manera determinarla.

Las muestras a leer en el cromatógrafo de líquidos fueron, en el caso de extracción, una muestra recién elaborada de extracto ya filtrada y, en cuanto a las muestras de después de la floculación se tomaron en dos tiempos, una en seguida del término de la misma y la otra tomada al día siguiente de efectuada para ver la influencia que ejerció el tiempo en ella y percibir si así se logra obtener una mayor efectividad.

Del análisis hecho por HPLC se derivaron los cromatogramas presentados en la Figura 56 en donde el inciso a corresponde al análisis del extracto de los glucósidos ya filtrados (solución a aclarar), mientras que los dos siguientes incisos corresponden a la misma solución pero ya floculada, una muestra tomada exactamente terminada la agitación correspondiente a la floculación (inciso b) y la otra después de 18 hs de haberse dado por terminada (inciso c).

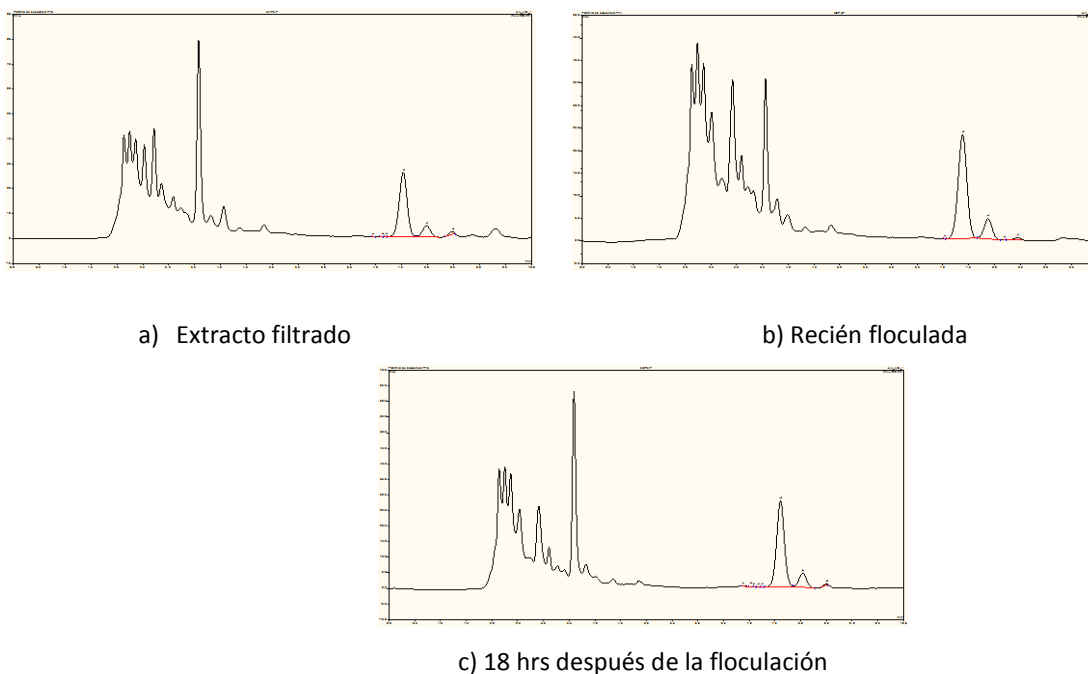


Figura 56 Cromatogramas de efectividad de la floculación en dos distintos tiempos

NOTA: Los cromatogramas presentan la escala de tiempo de cero hasta el minuto 10. Por su parte, el eje de las unidades de absorbancia, en mUA, es: a) de -10 a 90, b) de -6 a 50 y c) de -10 a 70.

Tabla 25 Área de esteviósido y rebaudiósido A antes y después de la floculación

Floculación	Sin	Recién terminada	18 horas después de terminada
Dato	Área de pico (mUA*min)		
Esteviósido	0.75	0.80	0.75
Rebaudiósido A	4.57	4.59	4.80

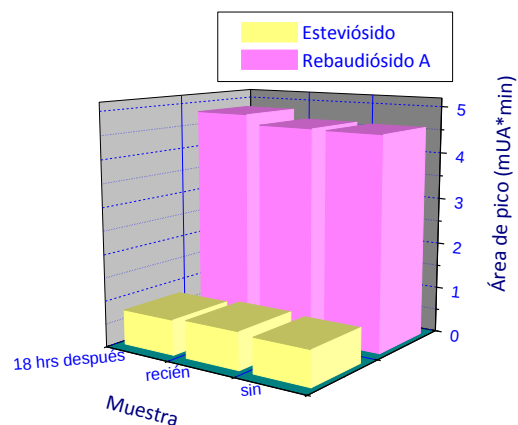


Figura 57 Comparación entre las áreas de los glucósidos de interés de una muestra con y sin floculación

Por su parte, los datos numéricos aproximados correspondientes al área tanto del esteviósido como del rebaudiósido A arrojados por el software para cada uno de los cromatogramas de la figura anterior se presentan en la Tabla 25 y que con el fin de hacer más fácil su comparativa se ilustran en la Figura 57.

El efecto de la floculación en el esteviósido denota, en un inicio, un incremento en el área relacionada con la separación de este glucósido de los demás elementos que conforman la muestra pero trascurrido el tiempo (las 18 horas) vuelve a caer en el mismo rango inicial. Por su parte, al analizar el comportamiento del rebaudiósido A, se percibe el caso contrario al lograr una mejor separación del glucósido de interés mientras más tiempo se deja reposar, es decir sedimentar. Sin embargo, al hacer un análisis del porcentaje de diferencia existente entre las áreas logradas por el efecto del tiempo una vez terminada la floculación, se obtiene un 4.47% de diferencia para el rebaudiósido A, lo que comparado al 6.45% de discrepancia existente entre el esteviósido resulta que, el tiempo de espera, no refleja un gran aporte por lo que resulta mejor efectuar la filtración en cuanto termina el tiempo de la floculación ya que de lo contrario, se tendría almacenado el líquido por bastante tiempo resultando un tanto contraproducente.

Tabla 26 Concentración de glucósidos debido a la floculación

Floculación	Sin	Recién terminada	18 horas después de terminada	Muestra Certificada
Dato	Concentración (%)			
Esteviósido	4.14	4.41	4.14	52.75
Rebaudiósido A	24.79	24.90	26.04	42.20

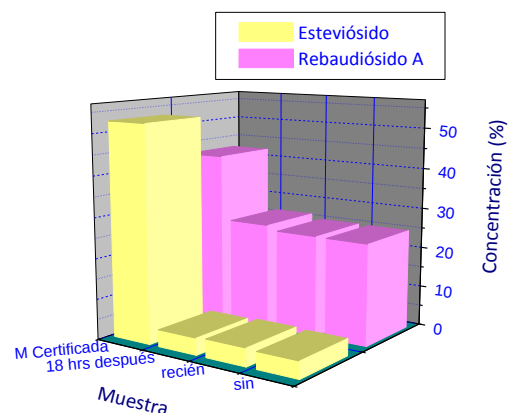


Figura 58 Porcentaje de concentración de los glucósidos en la muestra debido a la floculación

Ahora bien, del análisis de las mismas muestras pero en términos de porcentaje de concentración se obtuvieron los valores numéricos aproximados que contiene la Tabla 26 y que originan el gráfico de la Figura 58, ambos mostrados a continuación.

Evidentemente, el porcentaje de diferencia existente entre los valores sigue siendo aproximadamente el mismo y por lo tanto la tendencia es la misma, la diferencia radica en la concentración que se quiera lograr al final, aun así como la diferencia en el porcentaje de concentración del rebaudiósido A es de aproximadamente un 1.14% sigue siendo contraproducente el almacenamiento de 18 horas para la sedimentación.

Haciendo la comparativa de la concentración ganada con la floculación sin el tiempo de 18 horas que se lleva la sedimentación, se observó el alcance de aproximadamente el 59% de la concentración de rebaudiósido A que tiene la muestra certificada y tan sólo un 8.36% de esteviósido de esa misma muestra por lo que todavía está muy por debajo de ella pero ya presenta una buena intensidad de sabor.

Ya para finalizar este apartado, retomando los cromatogramas de la Figura 56 se logra apreciar, aunque muy poco, la acción que ejerce la floculación en la disminución de las hasta ahora llamadas impurezas al presentar un ligero descenso en las miliunidades de absorbancia detectadas, ya que con el paso de la acción del tiempo se reduce su altura hasta en aproximadamente 5mUA (18 hrs después de la floculación).

Mención aparte requiere el pico dentro de las impurezas que sobresale (minuto 3.5 aproximadamente) al reflejar una mayor disminución de altura en el cromatograma presentado en el inciso b que cuando se deja transcurrir el tiempo, ya que con la sedimentación retoma aproximadamente la mitad de la altura perdida inicialmente. En este último caso, habría que realizar otro estudio ya que la localización de dicho pico cae dentro del rango tiempo de retención que presenta el rebaudiósido D, otro de los glucósidos existentes en la planta de *Stevia rebaudiana Bertoni*.

Concluyendo, la floculación tiene un buen efecto en lo que a pérdida de coloración a simple vista refiere, pero a la hora de analizar el efecto que ejerce para la remoción de las

impurezas, al parecer no es tan efectivo, esto último dependerá de si el pico más elevado es o no la presencia del otro glucósido ya que de no serlo entonces si se podría definir su efectividad lograda al disminuir su intensidad al nivel de los demás. La caracterización de dicho pico no se llevó a cabo debido a la falta del estándar o en su defecto una muestra certificada.

III.2.12 Seguimiento de la corrida completa de obtención del edulcorante (prueba optimizada con semi purificación)

En esta sección se hizo el seguimiento completo del proceso de obtención del edulcorante a nivel laboratorio desde el momento del pesaje de la hoja seca hasta la filtración hecha después de la floculación tal y como lo muestra en el diagrama de flujo que comprende la Figura 59 con la finalidad de ver las aportaciones de cada una de las etapas al proceso de concentración y/o cantidad de masa obtenida. El proceso de extracción se hizo bajo las condiciones en que se realizó la prueba final debido a que fue la prueba que obtuvo los mejores resultados.

El paso uno es el pesaje de la hoja seca, aunque hasta ahora se ha manejado un gramo de hoja seca, debido a que se toman varias muestras a lo largo del proceso, se opta por iniciar la corrida con 5 gramos de hoja seca.

Una vez pesada la cantidad de hoja seca se le agregan (paso dos) los respectivos 135mL de agua, esto debido a la relación 1/27 (w/w) sólido/líquido.

Ya agregada el agua, se sumerge el vaso con la muestra en el baño maría y se da comienzo a la etapa de la extracción de los glucósidos, paso tres, bajo las condiciones ya establecidas (prueba final) hasta culminar el tiempo de extracción (1 hora).

Transcurrida la hora se saca el vaso que contiene al extracto del baño maría y se toma lo que es la primer muestra (M1PF), que comprende 10 mL del extracto obtenido y que se vierte en otro vaso para su pesaje y secado con la finalidad de llevar el control sobre los

resultados obtenidos. El resto del líquido que conforma al extracto se deja enfriar a temperatura ambiente para su posterior almacenamiento en refrigeración (completamente cerrado y cubierto por papel aluminio para que no exista ningún tipo de contaminación y/o degradación ocasionada por la luz).

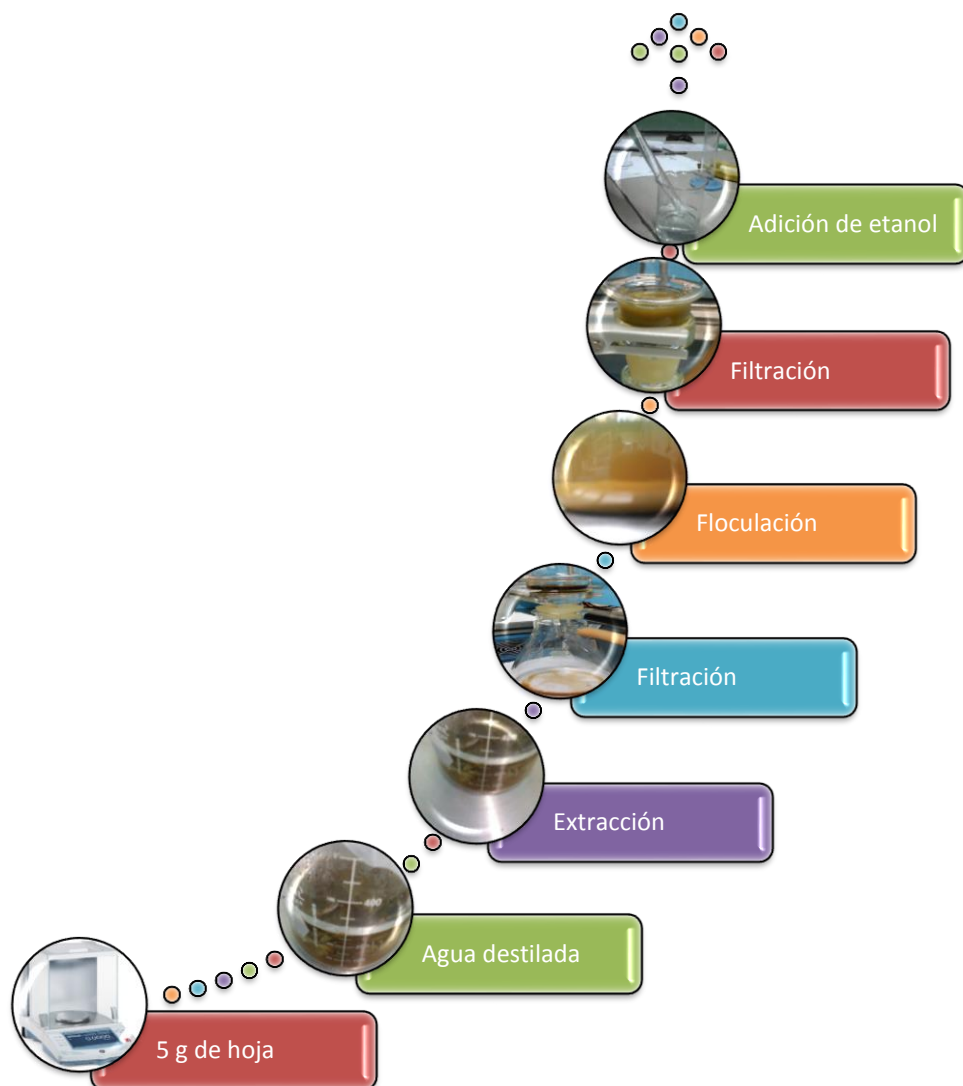


Figura 59 Diagrama de flujo del proceso completo de obtención a nivel laboratorio del edulcorante a base de *Stevia*

Al día siguiente, se saca del refrigerador el extracto almacenado y se procede a la toma de la segunda muestra (M2PF), la cual se vierte en un segundo vaso. Al igual que se hizo con la

M1PF se pesa y seca para la obtención del polvo. El líquido restante se somete a filtración bajo la acción de vacío (paso cuatro) al pasarlo por un filtro de papel con el tamaño de poro de 8 a $12\mu\text{m}$, una vez filtrado se sustraen diez mililitros que conforman la muestra tres (M3PF) y el líquido restante se filtra por segunda ocasión bajo las mismas condiciones pero con el filtro cuyo tamaño de poro fue $0.2\mu\text{m}$ donde se retiran nuevamente diez mililitros conformándose así la muestra cuatro (M4PF). Ambas muestras, M3PF y M4PF fueron vertidas en vasos limpios, pesadas y sometidas a su respectivo secado.

La muestra cinco (M5PF) resulta de la toma de diez mililitros de la solución resultante de la floculación (paso cinco) efectuada al extracto una vez pasado por ambos filtros, dicha muestra tomada inmediatamente después de terminado el proceso de agitación de la floculación. La solución restante se refrigera para de esa manera permitir la sedimentación además de impedir la degradación de la muestra.

Transcurridas 18 horas de refrigeración, se sustraen otros diez mililitros (M6PF) y el líquido restante se pasa por el proceso de filtración (paso seis). El primer filtro nuevamente es el que tiene el tamaño de poro de $8\text{-}12\mu\text{m}$, bajo condiciones de vacío, de donde, una vez terminada dicha filtración resultan los diez mililitros de la M7PF para dar paso inmediatamente después a la segunda filtración del líquido restante, filtro con tamaño de poro de $0.2\mu\text{m}$, y así originar la última muestra (M8PF) sustrayendo los respectivos diez mililitros.

Todas las muestras fueron pesadas y sometidas a secado. Una vez secas, se trituraron hasta obtener el polvo respectivo, logrado esto se hizo la preparación y lectura de las muestras en el cromatógrafo de líquidos, todo lo anterior bajo las condiciones descritas en la metodología respectiva a cada paso.

Del análisis hecho en el HPLC a cada muestra se obtuvieron los cromatogramas presentados en la Figura 60 de manera consecutiva y ordenada de acuerdo al orden de toma de muestras al momento de la realización de la corrida.

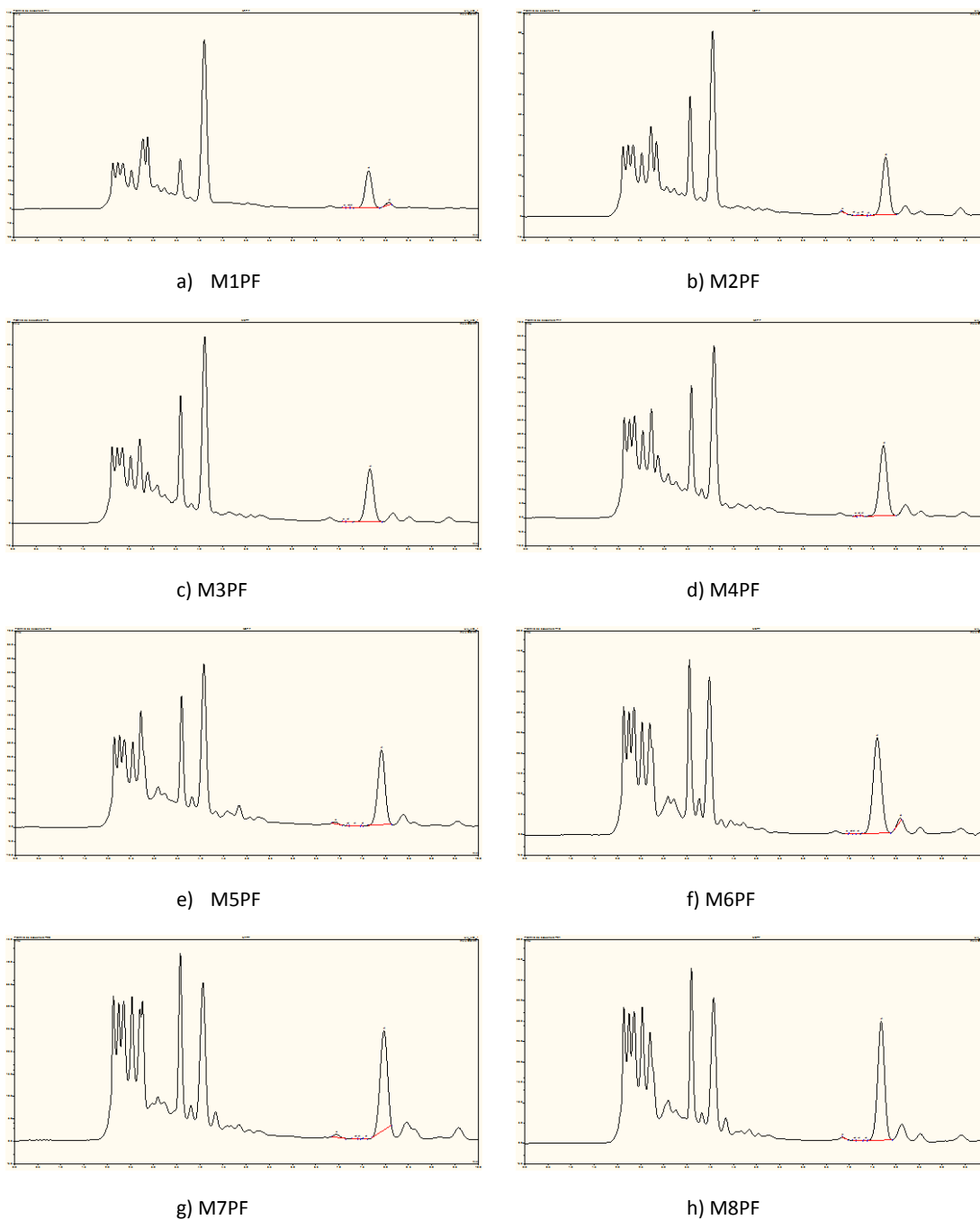


Figura 60 Cromatogramas del proceso completo hecho en el laboratorio para la obtención del edulcorante de *Stevia*

NOTA: Los cromatogramas presentan la escala de tiempo de cero hasta el minuto 10. Por su parte, el eje de las unidades de absorbancia, en mUA, es: a) de -20 a 140, b) de -10 a 100, c) de -10 a 90, d) de -10 a 70, e) de -10 a 70, f) de -5 a 50, g) de -5 a 45 y el inciso h) de -5 a 50.

Aunque a simple vista no se perciben grandes cambios de un cromatograma a otro, fue necesario prestar especial atención a los rangos de amplitud que establece cada imagen, ya que al tener en claro las miliunidades de amplitud que cada una de ellas presenta, es como se puede definir si cada paso dado en el proceso de obtención del edulcorante influye de manera favorable o desfavorable al mismo. Basado en ello y a manera de ejemplo, se puede establecer el hecho de que en el caso de la transición del inciso a al b cuyas amplitudes son de 140 y 100 mUA respectivamente y que refieren a la extracción, la primera inmediatamente terminada y la segunda a horas después de hecha, es decir, bajo un tratamiento de maceración, para el análisis de los glucósidos de interés se logró observar que no existe una gran diferencia (aproximadamente 5 mUA); sin embargo, si se enfoca desde el punto de vista de la extracción de otras sustancias que no son de interés, influye de manera perjudicial al presentar una mayor intensidad de amplitud de los picos que reflejan las llamadas impurezas de la muestra, siendo el pico más notorio el presentado en el minuto 3.5 aproximadamente, en donde, para el inciso b se intensifica de manera muy notoria. La misma tendencia, aunque de manera no muy clara, se refleja en los picos presentes entre el minuto 2 y 3 del tiempo de retención al intensificarse la altura de dichos picos con el paso del tiempo (paso del inciso a al b).

Para determinar de manera más clara los cambios sufridos por los dos glucósidos de estudio se presentan a manera de tabla, los números aproximados correspondientes a las áreas de cada uno de ellos en las diferentes etapas presentadas en este apartado (ver Tabla 26). Al igual que con los cromatogramas, la aparición de los números referentes a las áreas de los glucósidos corresponden al orden en que fueron tomadas las muestras para facilitar así la observación de los cambios sufridos en el paso de una etapa a otra.

Con la finalidad de visualizar de manera más clara los altibajos en las áreas de cada glucósido generados entre cada etapa a lo largo del proceso de obtención del edulcorante se graficaron los datos de la Tabla 27, generando la Figura 61 en donde se distingue mejor, a pesar de las fluctuaciones, el alcance de la finalidad del proceso al ser la muestra final (M8PF) el punto más alto obtenido para el principal glucósido de interés (rebaudiósido A).

Tabla 27 Área aproximada de los picos correspondientes a los glucósidos en cada etapa del proceso de obtención del edulcorante a base de *Stevia*

Muestra	M1PF	M2PF	M3PF	M4PF	M5PF	M6PF	M7PF	M8PF
Dato	Área de pico (mUA*min)							
Esteviósido	0.65	0.66	0.64	0.65	0.55	0.68	0.75	0.70
Rebaudiósido A	4.56	4.88	4.59	4.86	4.94	4.91	4.75	5.06

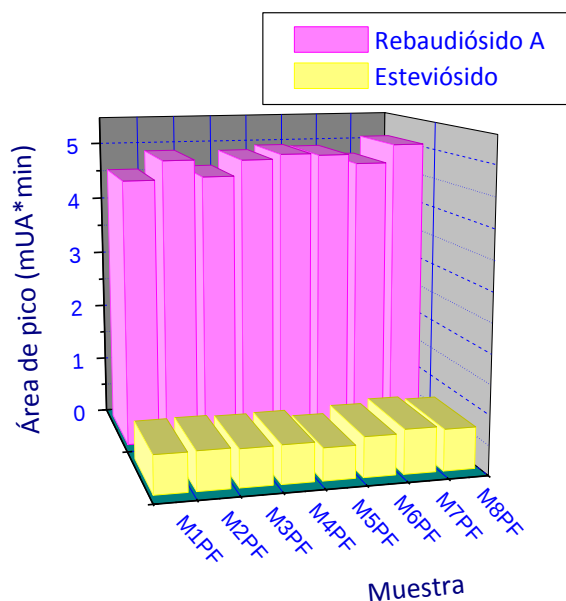


Figura 61 Área aproximada de esteviósido y rebaudiósido A en cada etapa del proceso de obtención del edulcorante a base de *Stevia*

Haciendo el análisis de los altibajos presentes en el seguimiento del rebaudiósido A a lo largo de todo el proceso tenemos que, se obtiene una buena extracción (M1PF) pero al dejar macerar la muestra se obtiene un mejor resultado, lamentablemente con ello también se arrastran otras sustancias que al momento de filtrar el extracto por el papel filtro de 8-12 μ m pasan más de esas sustancias que las que se retienen en él reflejándose un decremento del área del glucósido (M3PF), al pasar por el segundo filtro se retienen algunas de las impurezas por lo que el área del pico se incrementa (M4PF). El objetivo de

la floculación se alcanzó al manifestarse un nuevo aumento del área de pico, M5PF y M6PF, pero como puede observarse se consigue una mejor área cuando se tomó la muestra inmediatamente después de terminado el proceso de floculación (M5PF) que cuando se dejó decantar la muestra (M6PF) por lo que para el futuro procesamiento de la obtención del edulcorante se efectuará la filtración inmediatamente después de finalizado el tiempo del proceso de floculación. Así mismo, se visualiza que al momento de efectuar la primer filtración post-floculación (M7PF) se vuelve a presentar una caída en el área de los glucósidos pero que, con la segunda filtración se supera lo ocurrido mejorando el resultado obteniendo así, la mejor área de todo el proceso (M8PF).

Una situación similar presenta el esteviósido, el cual sufre también de oscilaciones en su área a lo largo del proceso. La principal diferencia entre el comportamiento de éste glucósido con el anterior radica en el hecho de que, éste alcanza la mejor área antes de efectuarse la segunda filtración post-floculación (M7PF) en vez de hacerlo en el punto final; sin embargo, como es el glucósido que aporta el regaliz al producto final y en realidad la diferencia que existió entre los dos últimos puntos del proceso no fue muy grande (aproximadamente un 6.9%), no resulta perjudicial al producto final por el contrario, la disminución de su área beneficia al momento de la degustación quedando sobreentendido el hecho de que el punto final del proceso es el mejor.

Pero como la presentación y análisis de los datos numéricos aproximados obtenidos por el software de las áreas de los picos no genera un buen entendimiento de los logros obtenidos en cada etapa, se transformaron dichos datos, mediante el mismo procedimiento que en los apartados anteriores, a términos de porcentajes de concentración para así poder compararlos entre ellos y por supuesto con la muestra certificada analizada, logrando así los datos de la Tabla 28 y que para mejor perspectiva se muestra la Figura 62 observándose la atribución de cada etapa a la concentración del producto final.

Tabla 28 Porcentaje de concentración de cada etapa del proceso de obtención del edulcorante a base de *Stevia* vs muestra certificada

Muestra	M1PF	M2PF	M3PF	M4PF	M5PF	M6PF	M7PF	M8PF	Muestra Certificada
Dato	Concentración (%)								
Esteviósido	3.59	3.64	3.53	3.59	3.03	3.75	4.14	3.86	52.75
Rebaudiósido A	24.86	26.60	25.02	26.49	26.93	26.77	25.89	27.58	42.20

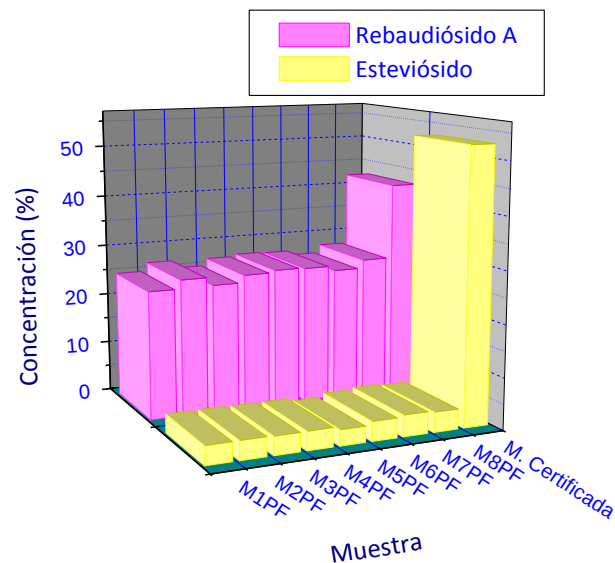


Figura 62 Porcentaje de concentración de los glucósidos en cada etapa del proceso de obtención del edulcorante a base de *Stevia* vs la muestra certificada

Mediante el gráfico y tabla anteriores puede percatarse que el porcentaje de concentración obtenido mediante el proceso a nivel laboratorio inicia aproximadamente para el rebaudiósido A en un 24.86%, momento de la extracción (M1PF), pasando por una serie de oscilaciones que van desde alrededor del 25 hasta el 26.97% hasta lograr una concentración final de aproximadamente el 27.58% (M8PF). Lo anterior implica que tan sólo al realizar la extracción, para este glucósido en particular se obtiene cerca del 59.28% de la concentración de la muestra certificada y que al término del proceso de obtención ha ganado un 6% más, es decir alcanza el 65.35% de lo reportado por la muestra

certificada. Por su parte, el esteviósido, siguió presentando un nivel muy bajo de concentración lo cual es de esperarse dada la composición que tiene la hoja de *Stevia rebaudiana Bertoni* en estudio, para este caso los porcentajes de concentración van desde el 3% pasando por una serie de fluctuaciones en el rango del 3.59 a 3.75% hasta lograr un máximo en la muestra M7PF con un 4.14% pero obteniendo un porcentaje de concentración final de 3.86%, esto debido a que el producto final presenta una mayor concentración del otro glucósido en esta última etapa y dado que es el que proporciona el mayor dulzor al producto como ya se había mencionado.

Tabla 29 Masa obtenida de glucósido en cada etapa tomando como base 1 gramo de hoja seca de *Stevia rebaudiana Bertoni*

Muestra	M1PF	M2PF	M3PF	M4PF	M5PF	M6PF	M7PF	M8PF
Dato	Masa obtenida (g)							
Esteviósido	0.0170	0.0164	0.0179	0.0214	0.0179	0.0230	0.0268	0.0274
Rebaudiósido A	0.1182	0.1198	0.1270	0.1582	0.1595	0.1644	0.1677	0.1959

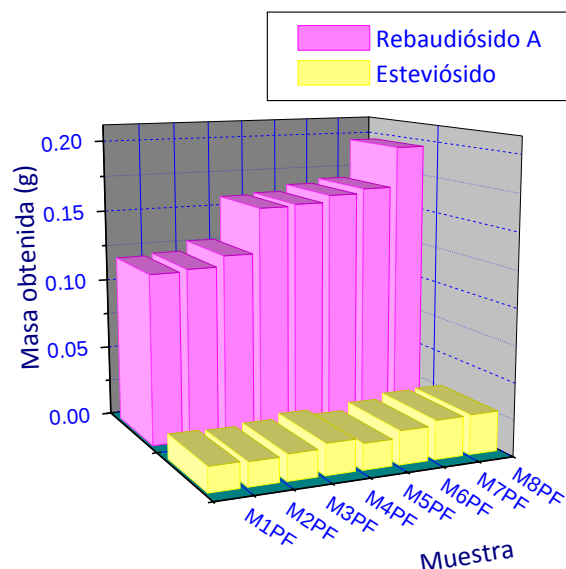


Figura 63 Masa obtenida de glucósido en cada etapa tomando como base 1 gramo de hoja seca de *Stevia rebaudiana Bertoni*

Una vez conocidas las diferencias de concentraciones obtenidas en cada etapa del proceso se procede a determinar la cantidad aproximada de polvo obtenida bajo esos parámetros en caso de detener el proceso en cualquiera de las etapas intermedias que se desee generándose así los números mostrados en la Tabla 29 que a su vez conformó el gráfico de la Figura 63 observándose como a cada paso dado en el proceso se va incrementando la cantidad de masa obtenida. Los dos puntos más notorios del incremento de masa obtenida son los presentados por el rebaudiósido A en el líquido resultante de la segunda filtración tanto antes como después de la floculación, este hecho se puede atribuir a la retención de impurezas en el filtro empleado, que para ambos casos es del mismo tamaño de poro. Por su parte, el esteviósido presenta una tendencia muy similar, la diferencia radica al igual que en el caso de las concentraciones, en que el máximo nivel encontrado se presentó en la etapa previa a la finalización del proceso pero tal y como ya se mencionó resulta más favorable para el producto la disminución de su contribución al producto final al restarle parte del regaliz que proporciona.

En conclusión, al adicionar las etapas de floculación y filtración al proceso de extracción se logra incrementar tanto la cantidad másica de producto como la concentración del extracto.

III.2.13 Proceso de la empresa vs corrida completa optimizada

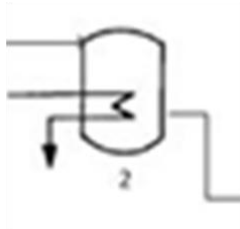
Con el fin de dejar en claro las ventajas del proceso seguido en el laboratorio sobre el proceso seguido en la Empresa se presenta de manera breve una comparativa entre ambos procesos, el cual es presentado por etapas a continuación:

Extracción.

Tanto las diferencias como las semejanzas que presentan entre ambos procesos son mostrados en la Figura 64 de donde se destaca la superioridad del proceso elaborado en el laboratorio al presentar un ahorro de tiempo, energía y por ende los costos que ellos generan además del costo evitado al no requerir de alcohol.

Proceso de la Empresa

- Hoja entera
- Relación sólido/líquido
 $2/3$ (v/v)
- $T = 45^{\circ}\text{C}$
- $t = 4$ h
- Sin agitación



Proceso prueba optimizada

- Hoja entera
- Relación sólido/líquido
 $1/27$ (w/w)
- $T = 35^{\circ}\text{C}$
- $t = 1$ h
- Agitación 4N

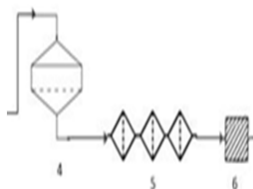
Figura 64 Extracción de la Empresa vs Prueba optimizada

Aunado a lo anterior, el proceso de la prueba optimizada tiene la ventaja de que, al no emplear alcohol para la extracción, el producto saliente del difusor puede ser consumido tal cual, es decir, puede comercializarse como infusión.

Filtración.

Proceso de la Empresa

- Filtro de arena
- Tren de housing
(20, 10, 5 y $1\ \mu\text{m}$)
- Filtro de carbón activado



Proceso prueba optimizada

- Filtro a $0.45\ \mu\text{m}$
- Filtro a $0.20\ \mu\text{m}$

Figura 65 Filtración de la Empresa vs prueba optimizada

La etapa de filtración encuentra su diferencia principal en el número de filtros empleados para la retención de partículas suspendidas que son arrastradas por el líquido que contiene a los glucósidos, ya que mientras el proceso de la empresa requiere de tres tipos

de filtros, la prueba optimizada solo emplea dos con un tamaño de poro menor a los empleados en el tren de housing de forma tal que reducirá pasos en esta sección (ver Figura 65).

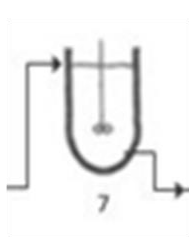
Además, al realizar a nivel laboratorio la filtración mediante el carbón activado, éste le añade a la infusión color que tuvo que ser removido después.

Floculación.

Al referirnos a la etapa de floculación se tiene básicamente el mismo principio, tal y como puede verse en la Figura 66; sin embargo, se logra un gran avance al no tener que dejar que decante la solución por el periodo de tiempo que establece el proceso de la Empresa lo que le da además un plus al poder establecer un proceso más dinámico.

Proceso de la Empresa

- 1 g/L de CaOH
- 1 g/L de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$
+AGITACIÓN
X 15 MIN
- Decantación = 8 h



Proceso prueba optimizada

- 1 g/L de CaOH
- 1 g/L de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$
+AGITACIÓN
X 15 MIN
- Sin Decantación

Figura 66 Floculación de la Empresa vs la prueba optimizada

Los pasos seguidos a lo antes comparado son: la remoción de clorofila, una nueva etapa de filtración, concentración del líquido, almacenamiento y secado del mismo, correspondientes a la etapa de purificación y terminado del producto lo cual no se llevó a cabo en el presente trabajo, motivo por el cual no se realizó dicha comparativa.

III.2.14 Recuperación mediante prensado de parte del líquido perdido por hidratación de las hojas en el proceso de extracción

Debido a que el proceso de extracción de los glucósidos se realizó empleando hojas secas de *Stevia*, cuyo contenido de humedad debiera corresponder a un máximo del 10%, parte del agua empleada en la extracción se transfiere a ellas con la finalidad de hidratarlas para así poder dar pie a la extracción de los edulcorantes. Es por ello, que para poder recuperar parte del líquido empleado en la hidratación de las hojas secas de *Stevia*, se recurrió a la implementación de un prensado manual el cual consistió simplemente en presionar las hojas lo más posible para sustraerles el líquido retenido.



Figura 67 Esquema de la recuperación de extracto mediante prensado

Lo anterior puede ser resumido mediante la Figura 67, en donde como puede verse la cantidad de líquido recuperado por el prensado manual, perteneciente al extracto contenido en las hojas después de efectuada la extracción, es de aproximadamente 3 mL

por cada gramo de hoja seca empleada por lo que resulta atractiva la implementación de esta etapa en el proceso a nivel industrial, para de esa manera efectuar la recuperación del mayor líquido posible contenido en ellas y obtener por ende, una mayor cantidad de extracto a purificar.

Es necesario precisar el hecho de que por cuestiones de tiempo no fue posible el análisis mediante HPLC del líquido resultante del prensado infiriendo que de él resultará una mayor cantidad de producto final o al menos en caso de no ser así, se logrará una mayor cantidad de clorofila contenida en el líquido a purificar siendo este subproducto, en caso de purificarse, un producto extra a comercializar.

Cabe mencionar que para conocer los datos numéricos presentados anteriormente fue preciso, antes y después de cada paso mostrado, pesar y determinar el volumen mediante una probeta del líquido presente en cada etapa.



Conclusiones

CONCLUSIONES

De acuerdo con lo observado en el estudio de SEM realizado a las diferentes variedades de hojas en análisis, se puede establecer que no existe mucha diferencia entre ellas, por lo que los parámetros empleados en la extracción del rebaudiósido A de una variedad, serán útiles para la extracción del mismo en cualquiera de ellas.

Al efectuarse el análisis mediante HPLC se demostró que los mejores resultados para cada parámetro en estudio en que se llevó a cabo la extracción de los glucósidos fueron:

- ✿ Para la relación sólido-líquido la de 1/27 (w/w)
- ✿ Para el tiempo de extracción el de 1 hora
- ✿ En el caso de la temperatura 35°C y,
- ✿ En lo referido a la agitación la mejor fue a un nivel 8 de la parrilla empleada.

Pero que al realizar la extracción del edulcorante empleando todos ellos al mismo tiempo, el producto resulta aún mejor en cuanto a la cantidad y porcentaje de contenido de glucósidos en él.

Por su parte, al someter las muestras a un análisis de FT-IR se llegó a la conclusión de que es funcional como método rápido de cuantificación únicamente en muestras derivadas de esta variedad de planta de *Stevia rebaudiana Bertoni*, siempre y cuando efectuara una curva de calibración de concentración de rebaudiósido A (glucósido principal); al tener otra variedad de planta de *Stevia*, dicho análisis no es útil ya que el pico de esteviósido y rebaudiósido A se traslapan y no es posible su identificación por lo tanto tampoco su cuantificación. De igual forma, al efectuar este mismo análisis para la determinación de la existencia de una disminución, parcial o total, del contenido de clorofila en la muestra final, no resultó efectivo determinando así que para ello se requerirá de otro tipo de análisis más exhaustivo.

En lo referente al proceso implementado para la semi-purificación del extracto (floculación y filtración) se concluyó que: en el proceso de filtración realizado mediante la implementación de ambos filtros se obtuvo una reducción, en una buena proporción, de las impurezas contenidas en el producto lo que pone en evidencia su efectividad mientras

que la etapa de floculación sirvió únicamente para eliminación de la intensidad de color a reserva de que se compruebe si el pico retenido en el minuto 3.5 pertenece o no al rebaudiósido C.

Al realizar las pruebas sensoriales se logró deducir que el producto obtenido presenta un agradable y un tanto penetrante olor a dulce así como, un muy buen y grato sabor al consumirlo además de que debido a que no presenta una gran cantidad de esteviósido no denota en gran medida un regaliz muy notorio; sin embargo, sigue presentando un color oscuro que comparado con el del azúcar no resulta tan atractivo pero que enfatiza su origen natural de tal forma que se puede comercializar el producto en este estado pero, si lo que se pretende es competir un poco con el mercado del azúcar se requerirá de estudios posteriores para su purificación.

De la comparativa de los procesos se derivan a simple vista las mejoras hechas al proceso al introducir los parámetros óptimos encontrados mediante la experimentación al reducir tanto tiempo de extracción (de 4 a 1 h), como el de decantación que maneja la Empresa así como una reducción energética derivada de la disminución de la temperatura de operación del difusor al trabajar en vez de 45 a 35°C.

Finalmente, el resultado obtenido del prensado de las hojas hidratadas resultantes de la extracción, aproximadamente 3 mL por cada gramo de hoja seca empleada, demostró lo atractiva y efectiva que resulta la implementación de esta etapa en el proceso a nivel industrial para la recuperación de la mayor cantidad posible de los glucósidos, o en su defecto de la clorofila que contiene el extracto, siendo ésta última un subproducto del proceso que bien puede ser comercializado después de su debida purificación.

Si lo anterior lo agregamos a las recomendaciones establecidas dentro del texto, se prevé que en poco tiempo se tendrá en las manos de los consumidores el producto envasado y/o empacado.

Bibliografía

- Aguilar, J. A. (2004). ¿Dulce alternativa? Edulcorantes artificiales. *Alimentación Y Nutrición*, 58–61. Retrieved from http://www.profeco.gob.mx/revista/publicaciones/adelantos_04/edulcorantes_abr04.pdf
- Alonso, J. R. (2010). Natural sweeteners. *La Granja*, 12(2), 3–12.
- Arakawa, F. S., Mahl, C. R. a., de Oliveira, S. P. D., da Igreja, G., Simões, M. R., & da Silva, C. F. (2012). Clarification of Aqueous Stevia Extract Using Alginate Beads — Evaluation by Factorial Design Methodology. *Adsorption Science & Technology*, 30(2), 147–158.
- Baño Montero, W. E. (2010). *Estudio del edulcorante natural (Stevia rebaudiana Bertoni) en una bebida no carbonatada cítrica*. Universidad Técnica de Ambato. Retrieved from <http://repo.uta.edu.ec/handle/123456789/868>
- Biddulph, R. (n.d.). Desventajas de la sucralosa. Retrieved May 03, 2013, from http://www.ehowenespanol.com/desventajas-sucralosa-info_203141/
- Boileau, A., Fry, J. C., & Murray, R. (2012). A new calorie-free sugar substitute from the leaf of the stevia plant arrives in the UK. *Nutrition Bulletin*, 37(1), 47–50. doi:10.1111/j.1467-3010.2011.01945.x
- Celis, D. (2012, November 20). Stevia Maya, la apuesta de Burillo en pos de un mercado de 1000 mdd para 2014. *Dinero En Imagen*. Retrieved from <http://www.dineroenimagen.com/2012-11-20/11194>
- Chatsudthipong, V., & Muanprasat, C. (2009). El esteviósido y sus compuestos relacionados: Los beneficios terapéuticos más allá de la dulzura. *Pharmacology & Therapeutics*, (121), 41–54. Retrieved from <http://www.stevigran.es/articulos/articulo1.pdf>
- Chhaya, Sharma, C., Mondal, S., Majumdar, G. C., & De, S. (2012). Clarification of Stevia extract by ultrafiltration : Selection criteria of the membrane and effects of operating conditions. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 525–532. doi:10.1016/j.fbp.2011.10.002
- Coca cola / Argentina. (n.d.). Endulzantes calóricos (Cocacola Argentina). Retrieved May 07, 2014, from <http://cocacoladeargentina.com.ar/todos-los-productos/endulzantes/#referencias>

- Cortés S, L. Y. (n.d.). Simposio de Edulcorantes no Calóricos. Retrieved from <http://www.slan.org.ve/publicaciones/pdf/Serie Cient%C3%ADfica Latinoamericana Simposio de Edulcorantes no Cal%C3%B3ricos- LILIA YADYRA CORT%C3%89S S.pdf>
- Cuadras, S. (2012). La Stevia, dulce y ligera. Retrieved from http://www.forumdelcafe.com/pdf/F-49_Stevia.pdf
- Delgado Encinas, D. C. (2007). *Estudio de pre-factibilidad para la industrialización y comercialización de la Stevia*. Pontificia Universidad Católica del Perú. Retrieved from <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/123456789/4713>
- Giannuzzi, L., & Molina Ortiz, S. E. (1995). Edulcorantes Naturales y Sintéticos: Aplicaciones y Aspectos Toxicológicos. *Acta Farm. Bonaerense*, 14(2), 119–131. Retrieved from http://www.latamjpharm.org/trabajos/14/2/LAJOP_14_2_2_1_O7PY4U1EJI.pdf
- Giraldo E., C., Marín P., L. D., & Habeych N., D. I. (2005). Obtención de Edulcorantes de Stevia Rebaudiana Bertoni. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 36(No. especial). Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220525077>
- INNATIA. (2013). La estevia para bajar la presión. Retrieved September 10, 2013, from <http://www.fundesyram.info/biblioteca/displayFicha.php?fichaID=3500>
- Jarma O, A. de J., Combatt C., E. M., & Cleves L., J. A. (2010). Aspectos nutricionales y metabolismo de Stevia rebaudiana (Bertoni). Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 199–208.
- Kovylyaeva, G. I., Bakaleinik, G. a., Strobykina, I. Y., Gubskaya, V. I., Sharipova, R. R., Al'fonsov, V. a., ... Tolstikov, a. G. (2007). Glycosides from Stevia rebaudiana. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(1), 81–85. doi:10.1007/s10600-007-0037-x
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132(3), 1121–1132. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.140
- López Torres, L. D., & Peña Guevara, L. G. (2004). *Plan estratégico para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de edulcorante a base de Stevia*.
- Loria Kohen, V. (2012). *I INFORME CIENTÍFICO La Stevia y su papel en la salud* (pp. 1–48). Retrieved from <http://es.slideshare.net/TruviaSpain/informe-cientfico-la-stevia-y-su-papel-en-la-salud>

Macia, E., & Monesterolo, V. (n.d.). Evaluación de los procesos de extracción y purificación de los compuestos endulzantes de la hoja de stevia rebaudiana. Retrieved from [http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frvm/CyTAL_2008/Trabajos y Prologo/versi%C3%B3n correlativa PDF/TFA017 Evaluaci%C3%B3n del proceso de extracci%C3%B3n y purificaci%C3%B3n - Actas.pdf](http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frvm/CyTAL_2008/Trabajos_y_Prologo/versi%C3%B3n_correlativa_PDF/TFA017_Evaluaci%C3%B3n_del_proceso_de_extracci%C3%B3n_y_purificaci%C3%B3n_Actas.pdf)

Marcial Berdugo, N. C. (2008). *Desarrollo de tecnología para la elaboración de jarabe con alto contenido de fos a partir de jícama (Smallanthus sonchifolius P&E). Desarrollo de tecnología para la elaboración de jarabe con alto contenido de fos a partir de jícama (Smallanthus sonchifolius P&E)*. Escuela Politécnica Nacional, Quito. Retrieved from [http://books.google.com.mx/books?id=zpMzAQAAIAAJ&pg=PA77&lpg=PA77&dq=jarabe+de+ma%C3%ADz+aporte+cal%C3%B3rico&source=bl&ots=KL8BJYc7Y3&sig=4sUdwPh5dUV7_BTXXPFUNrGVbu0&hl=es&sa=X&ei=2a-BURfaGKqF2AW5g4DgBA&ved=0CF0Q6AEwBg#v=onepage&q=jarabe de ma%C3%ADz aporte cal%C3%B3rico&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=zpMzAQAAIAAJ&pg=PA77&lpg=PA77&dq=jarabe+de+ma%C3%ADz+aporte+cal%C3%B3rico&source=bl&ots=KL8BJYc7Y3&sig=4sUdwPh5dUV7_BTXXPFUNrGVbu0&hl=es&sa=X&ei=2a-BURfaGKqF2AW5g4DgBA&ved=0CF0Q6AEwBg#v=onepage&q=jarabe+de+ma%C3%ADz+aporte+cal%C3%B3rico&f=false)

Miel. (n.d.). Retrieved from <http://es.wikipedia.org/wiki/Miel>

Monelina. Composición proteica, propiedades, dulzura, como un edulcorante. (n.d.). Retrieved November 26, 2013, from http://centrodeartigos.com/articulos-para-saber-mas/article_56961.html

Monesterolo, V., & Macia, E. (2002). Resultados experimentales del proceso de extracción y purificación de compuestos endulzantes de la hoja de stevia rebaudiana. Retrieved from [http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frvm/CyTAL_2010/Trabajos y Prologo/Trabajos CyTAL 2010/TF - 016 - Resultados Experimentales.pdf](http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frvm/CyTAL_2010/Trabajos_y_Prologo/Trabajos_CyTAL_2010/TF-016-Resultados_Experimentales.pdf)

Montes Rios, N. (2009). Edulcorantes calóricos y no calóricos. Retrieved October 23, 2013, from <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/14052-edulcorantes-caloricos-y-no-caloricos->

Mujer de elite. (n.d.). Información nutricional de la maltosa. Retrieved from http://www.mujerdeelite.com/guia_de_alimentos/709/maltosa

Osorio Barrera, C. (2007). *Stevia, el dulce sabor de tu vida*. Bogota Community College, Bogotá.

Polioles. (2014). Xilitol. Retrieved from <http://datossobrelospolioles.com/xylitol/>

Proceso para purificar sacarina. (n.d.). Retrieved April 08, 2014, from <http://es.patents.com/us-3988344.html>

- Purkayastha, S. (2010). Stevia, un edulcorante natural para el mercado de bebidas. Retrieved from <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/15546-stevia-un-edulcorante-natural-el-mercado-bebidas>
- Rodríguez Montoya, M. C. (2007). Alternativas a los edulcorantes. Retrieved from <http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/tendencias/2007/06/05/27823.php>
- Ronald, C., & Deis, D. (2012). Industria Sustitutos de azúcar. Énfasis. Alimentación Latinoamerica. Retrieved from <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/63985-industria-sustitutos-azucar>
- Sacarosa. (n.d.). Retrieved from <http://es.wikipedia.org/wiki/Sacarosa>
- Sorbitol. (n.d.). doi:10.1002/9780470114735.hawley14984
- Soto, A. E., & Del Val, S. (2002). Extracción de los principios edulcorantes de la Stevia rebaudiana. *Revista de Ciencias Agrarias Y Tecnología de Los Alimenros*, 20, 5–9.
- Taumatina. (n.d.). Retrieved from <http://es.wikipedia.org/wiki/Taumatina>
- Terán Elizalde, E. X. (2010). *Proyecto de inversión para la elaboración de un edulcorante natural hecho a base de Stevia en la provincia de el oro* (pp. 1–4). Retrieved from [https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8853/1/Proyecto de Inversi%C3%B3n para la elaboraci%C3%B3n de un Edulcorante Natural.pdf](https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8853/1/Proyecto%20de%20Inversi%C3%B3n%20para%20la%20elaboraci%C3%B3n%20de%20un%20Edulcorante%20Natural.pdf)
- Valdés Martínez, S. E., & Ruiz Ortiz, M. de los A. (2009). Edulcorantes en alimentos: aplicaciones y normativas. Retrieved from http://docencia.izt.uam.mx/elbm/233210/tareas/alimentacion.enfasis.com_edulcorantes.pdf
- Vergés Serra, M. (n.d.). Dextrosa, una energía muy dulce. Retrieved November 10, 2013, from <http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=760>
- Villagran Jaramillo, A., Huayamave Bravo, C., Lara García, J., & Maluk Salem, O. (n.d.). Stevia : Producción y Procesamiento de un Endulzante Alternativo, (1), 1–6. Retrieved from <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/5208/1/8555.pdf>
- Vitalimentos. (2011). Calorías de la glucosa (Vitalimentos). Retrieved from <http://www.vitalimentos.es/cuantas-calorias/3,259,azucar-y-caramelos/azucar-glucosa.html>
- Walstra, P., Walstra, P., & Wouters, J. T. M. (2005). *Dairy Science and Technology*. (C. Press, Ed.) (Second.).

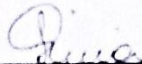


	Página
Anexo A. Certificado de muestra Rebaudiósido 40	A
Anexo B. Cromatogramas de HPLC	B
Cromatograma de variedad de especie	B
Cromatograma de tamaño de partícula	D
Cromatograma de temperatura	E
Cromatograma de tiempo	H
Cromatograma de nivel de agitación	K
Cromatograma de floculación	N
Cromatograma de la corrida completa optimizada	P

ANEXO A

INDUSTRIAL S / A		Maringá, February 5 th , 2013.
Quality Control Certificate		
Product:	Stevita RebA 40%	
Identification:	Sweetener extracted from <i>Stevia rebaudiana</i> leaves	
Description:	White to light yellow powder, odourless or having a slight characteristic odour, composed of rebaudioside A and others steviol glycosides.	
Lot Number:	2.99.104	
Manufacturing Date:	Jul/2012	
Expiry Date:	Jul/2014	

ITEMS	RESULTS	LIMIT
Total content of steviol glycosides	95,20%	Not less than 95% (dry basis)
Rebaudioside A	42,20%	Not less than 40%
Loss on drying	Complies	Not more than 6% (105°C, 2 h)
pH	Complies	Between 4.5 and 7.0 (1:100)
Solubility	Complies	Freely soluble in water
Total ash	Complies	Not more than 1%
Microbiological Analysis		
Coliforms	< 3 MPN/g	< 3 MPN/g
Heavy Metal		
Arsenic	Complies	Not more than 1 ppm
Lead	Complies	Not more than 1 ppm
Residual Solvents		
Methanol	Complies	Not more than 200 ppm
Ethanol	Complies	Not more than 5000 ppm



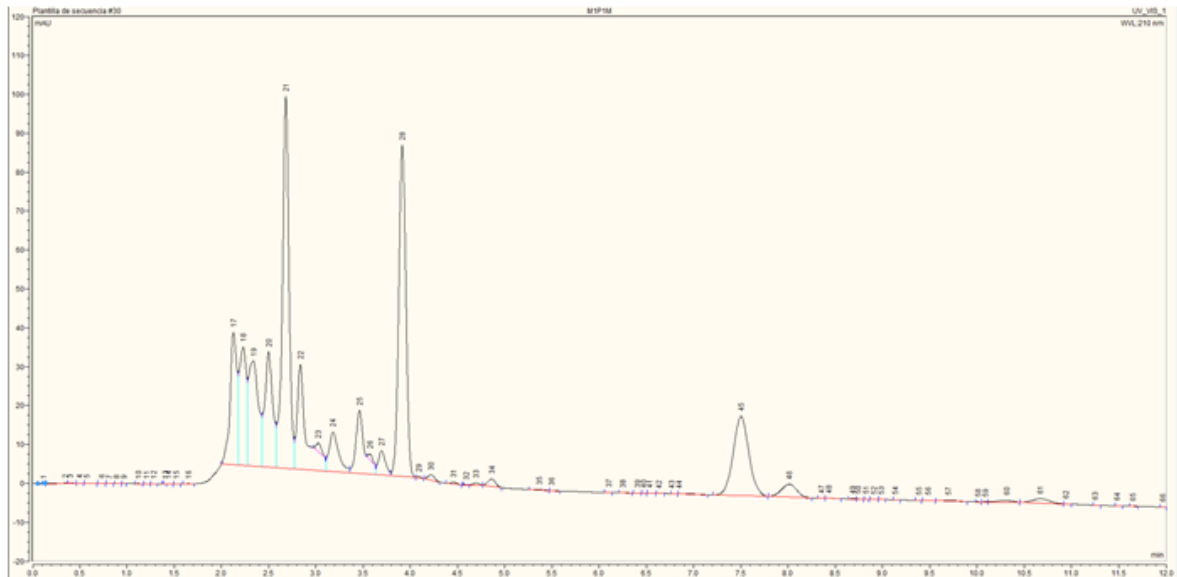
 Quality Control

STEVIAFARMA INDUSTRIAL SA
 Rua Stevia, 300 - Pq. Industrial Bandeirantes III
 CEP: 87.001-970 - Maringa - Parana -Brasil
 Tel: 55 (44) 2101-4335 - Fax: 55 (44) 2101-4343
www.stevita.com.br

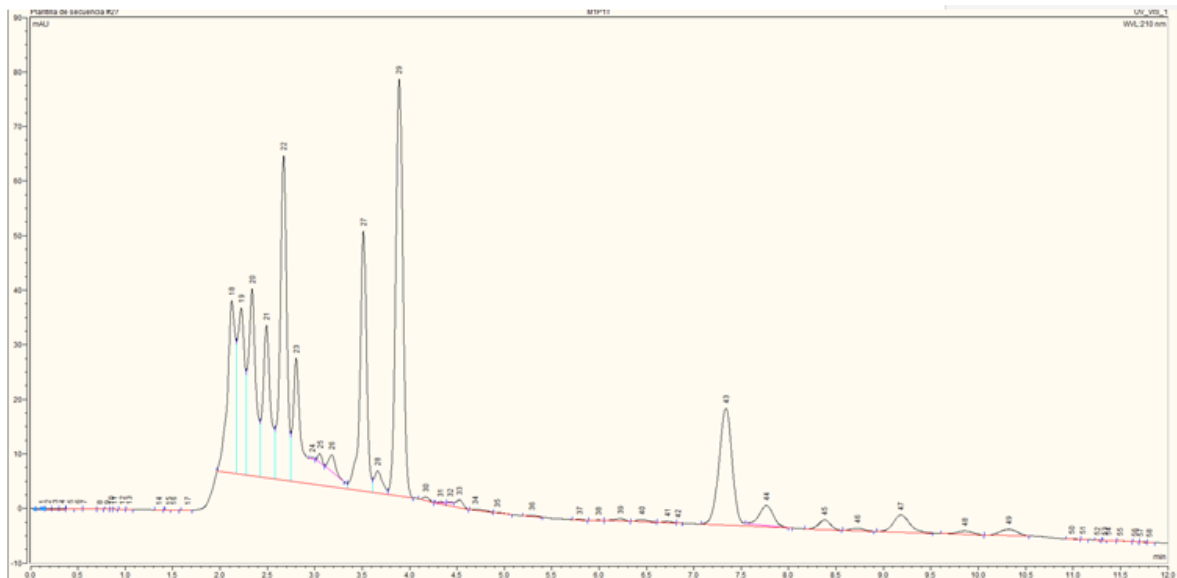
ANEXO B

Cromatogramas de variedad de especie

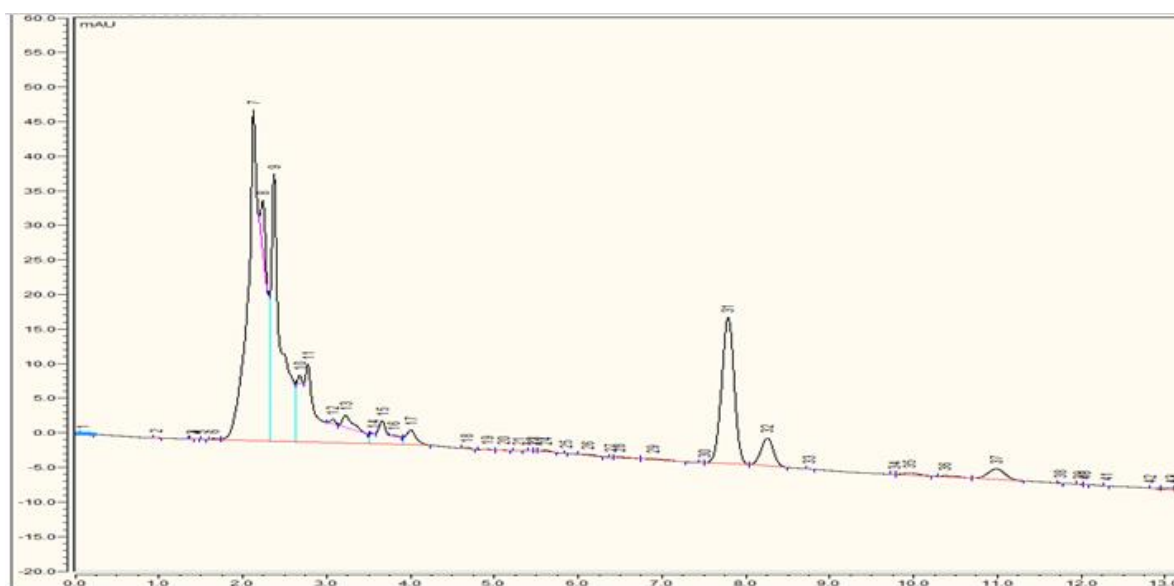
Cromatograma muestra MPM



Cromatograma muestra MPT

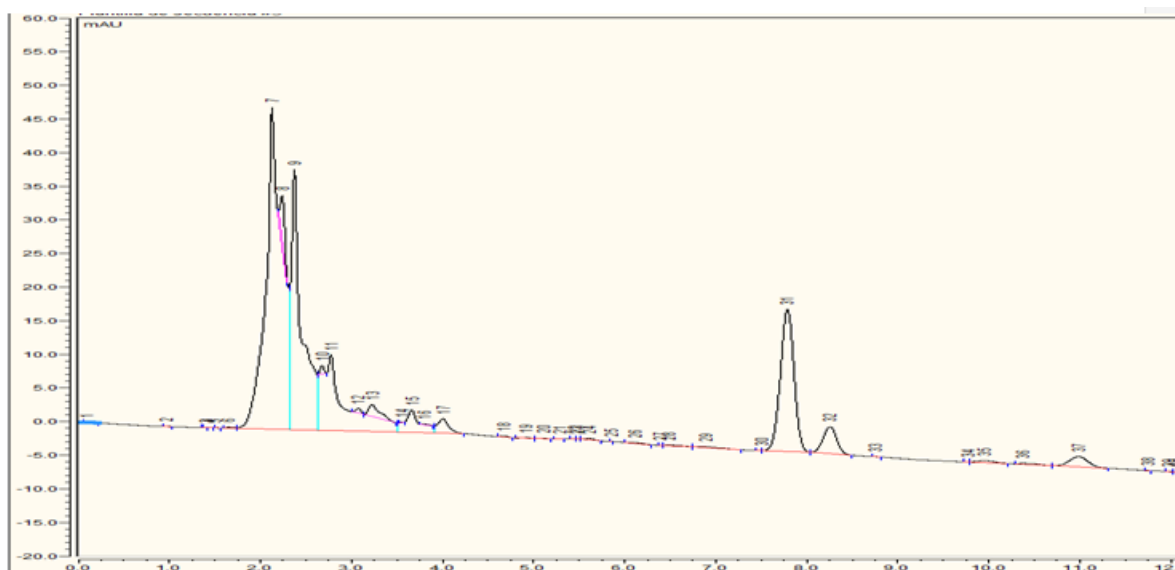


Cromatograma muestra MPV

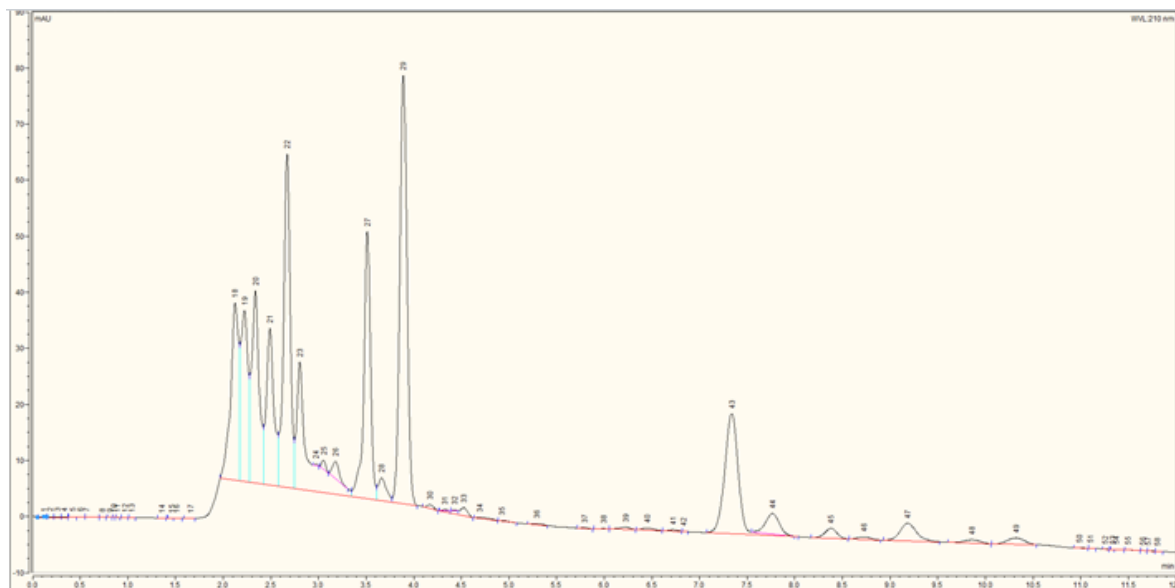


Cromatogramas de tamaño de partícula

Cromatograma polvo (1000 μ m)

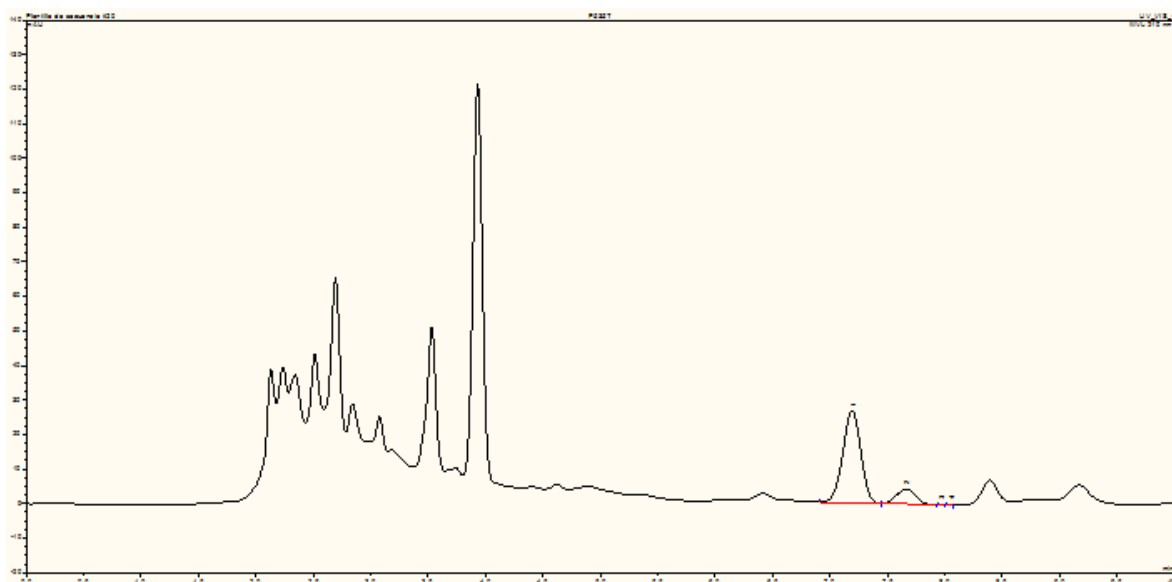


Cromatograma hoja entera

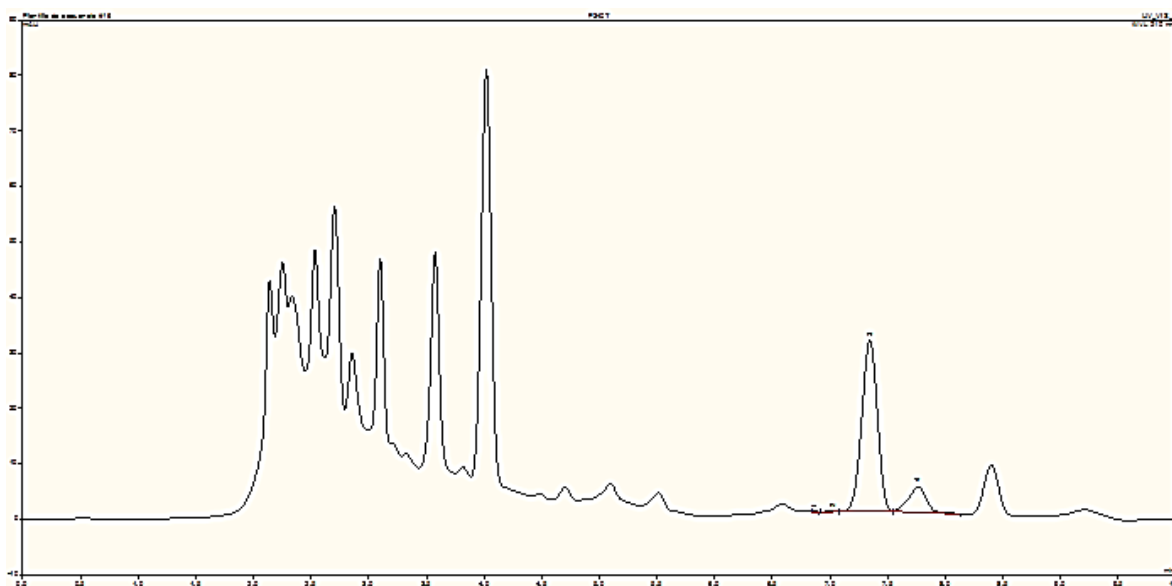


Cromatogramas de temperatura

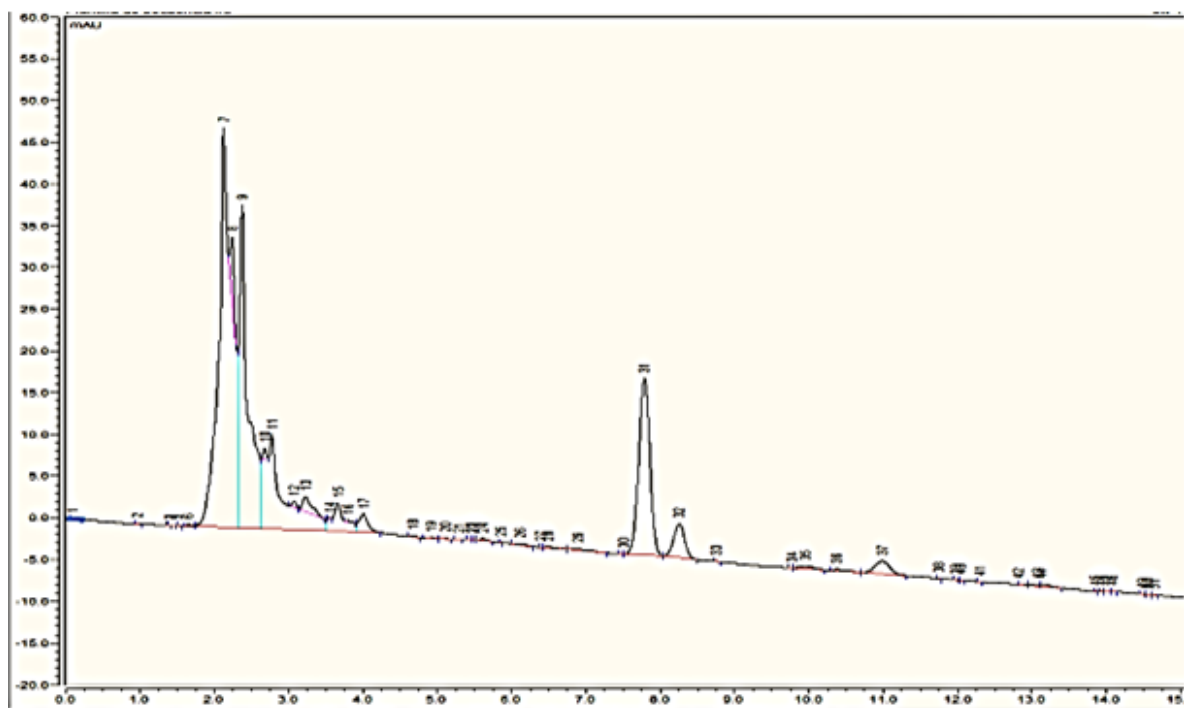
Cromatograma 35°C



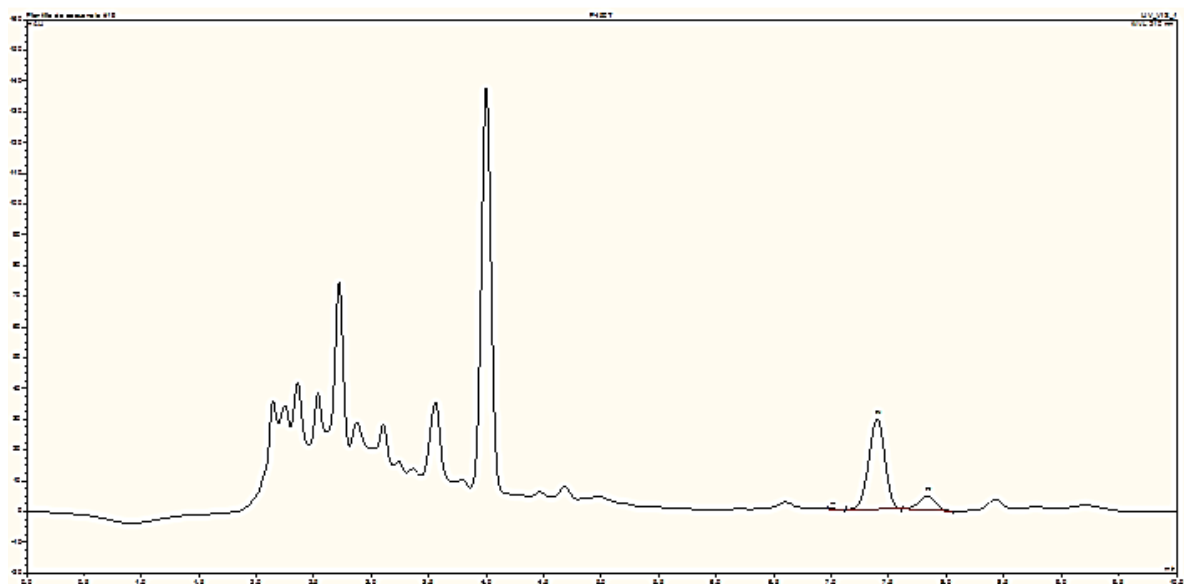
Cromatograma 40°C



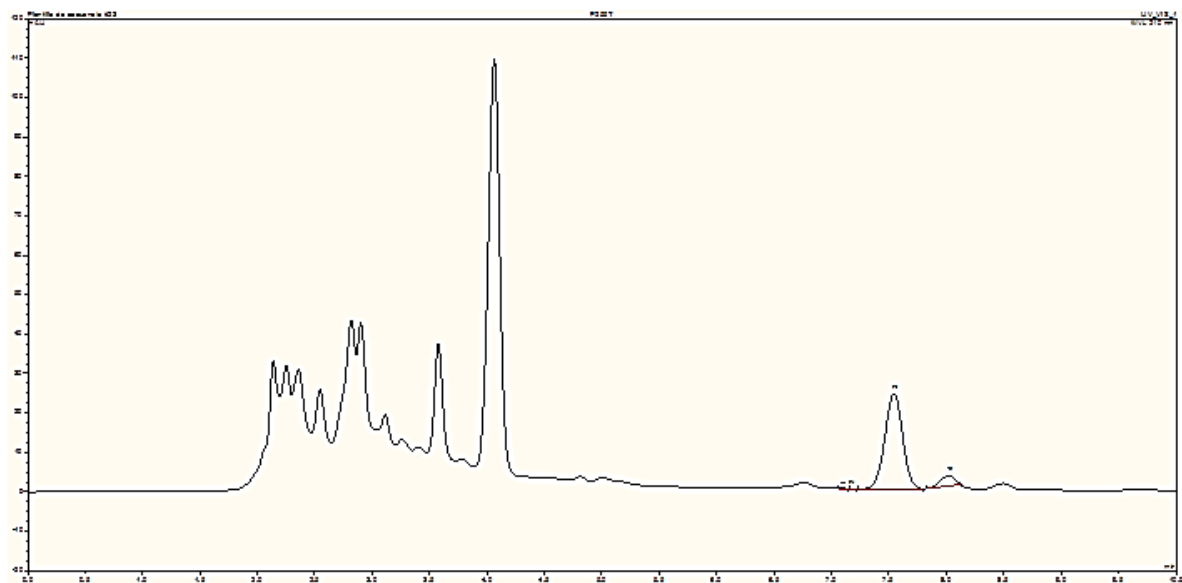
Cromatograma 45°C



Cromatograma 50°C

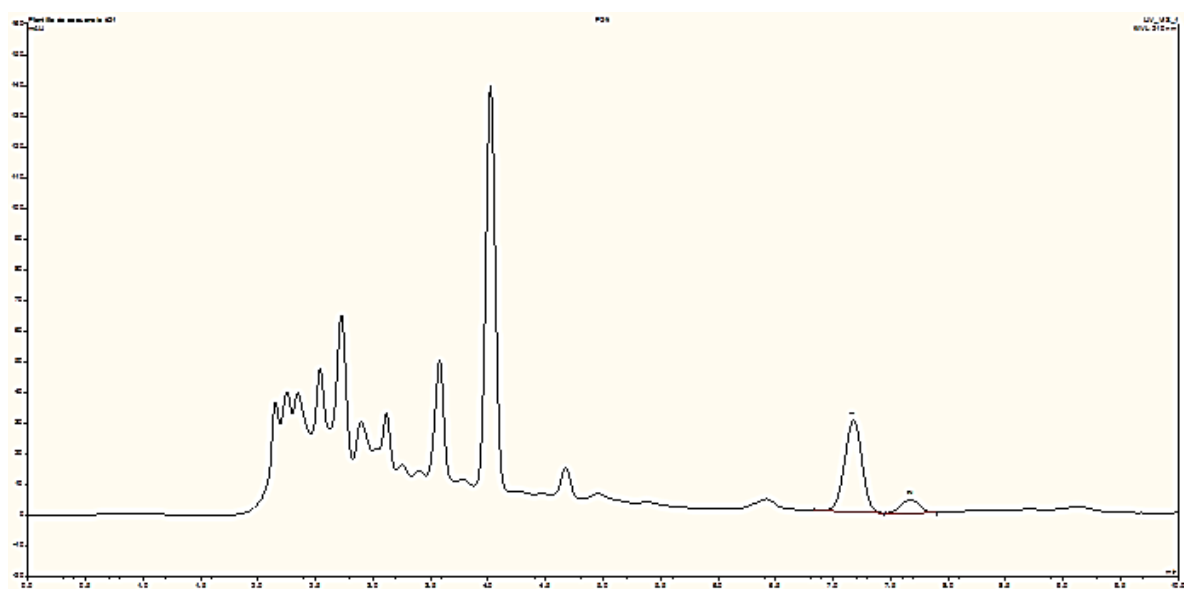


Cromatograma 55°C

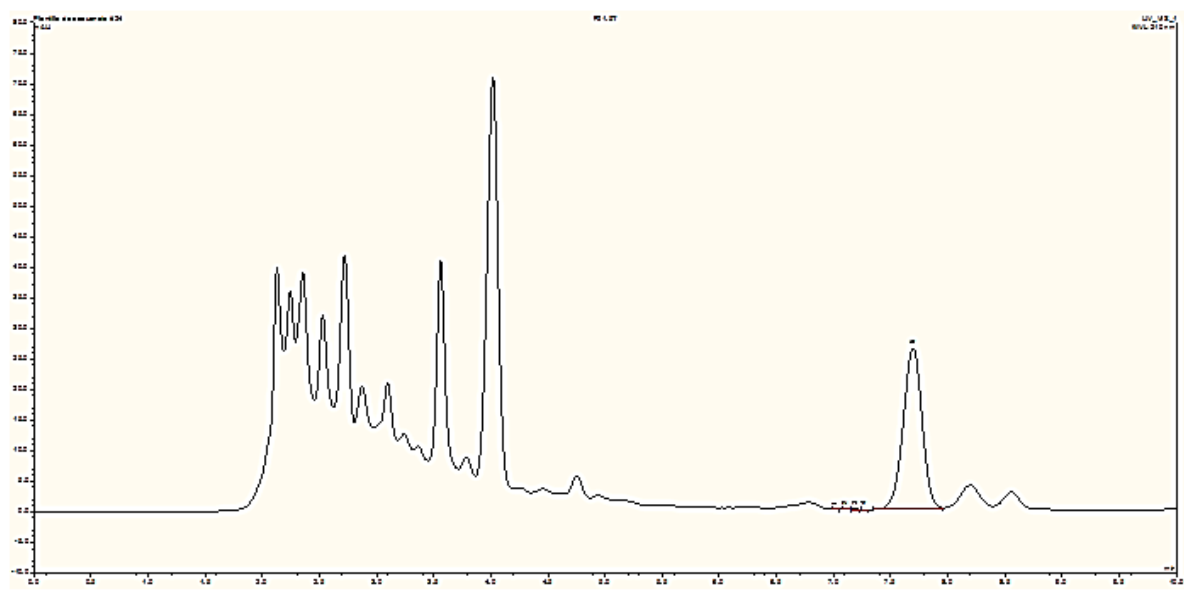


Cromatogramas de tiempo

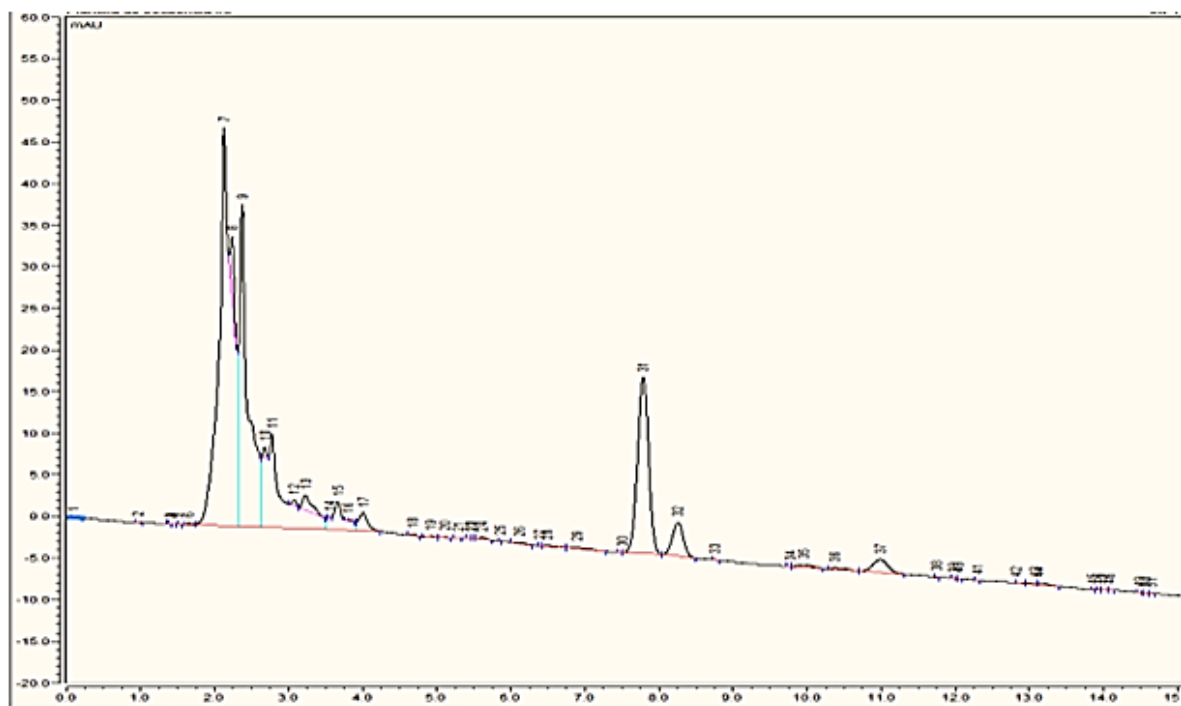
Cromatograma 1 h



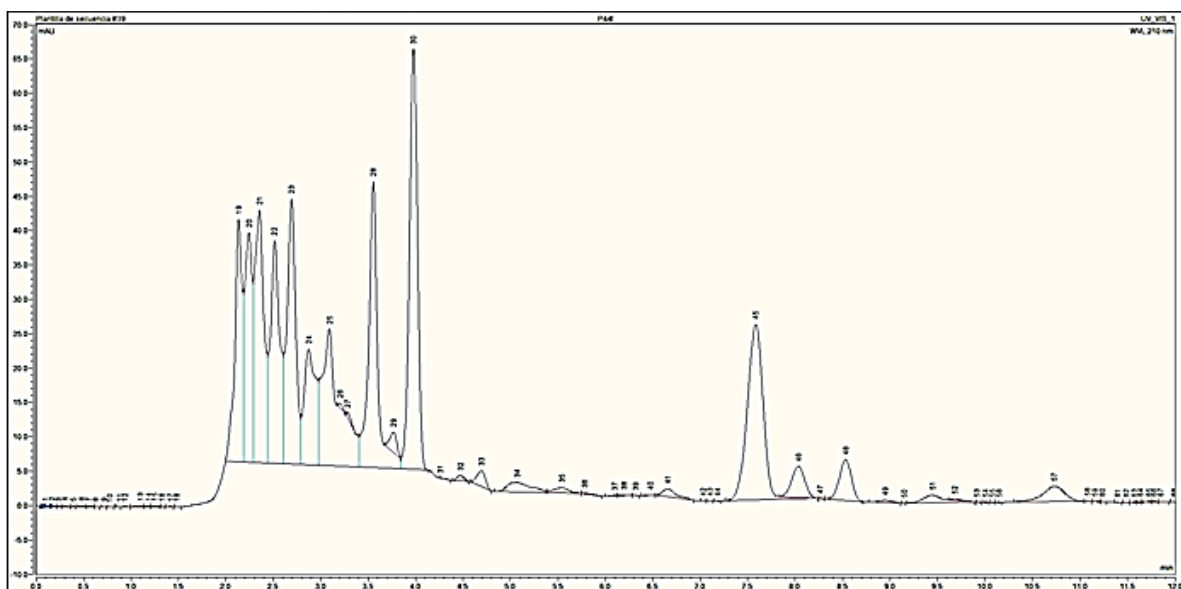
Cromatograma 1.5 h



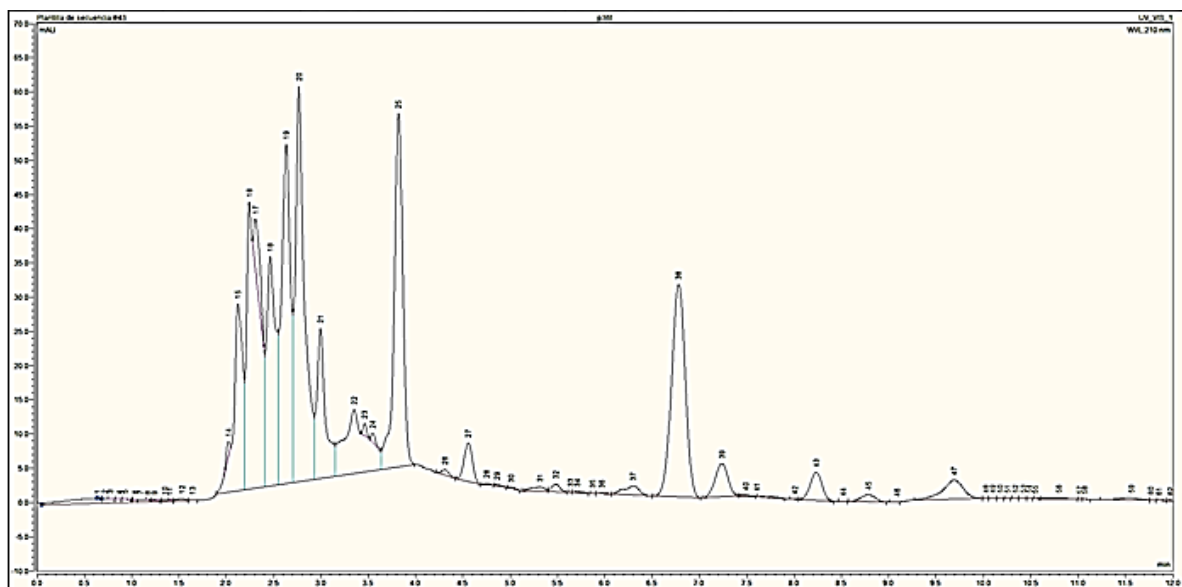
Cromatograma 2 h



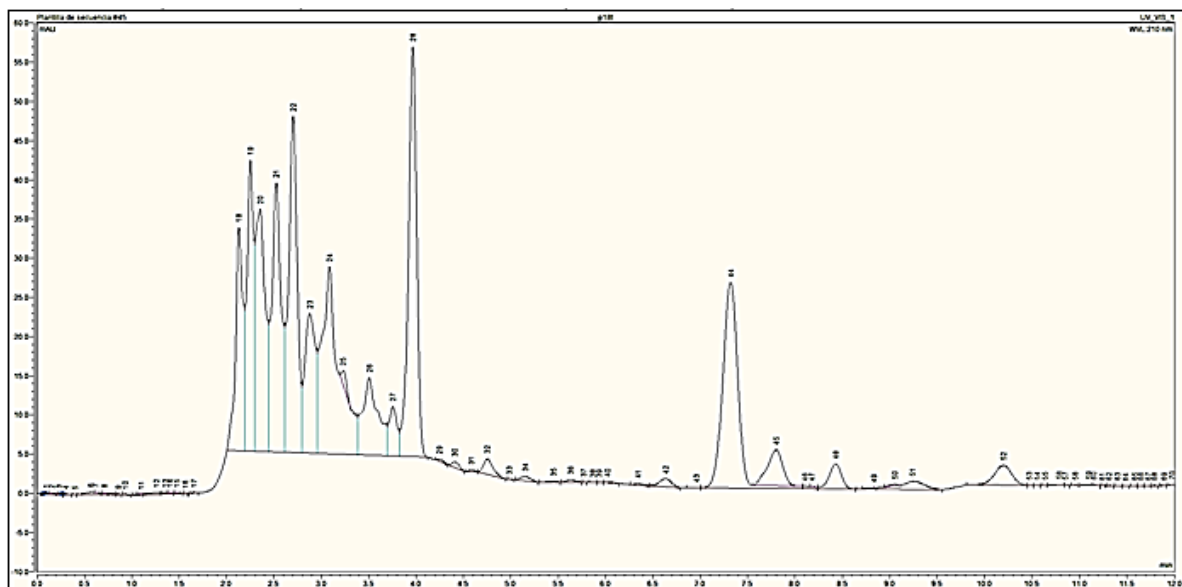
Cromatograma 4 h



Cromatograma 6 h

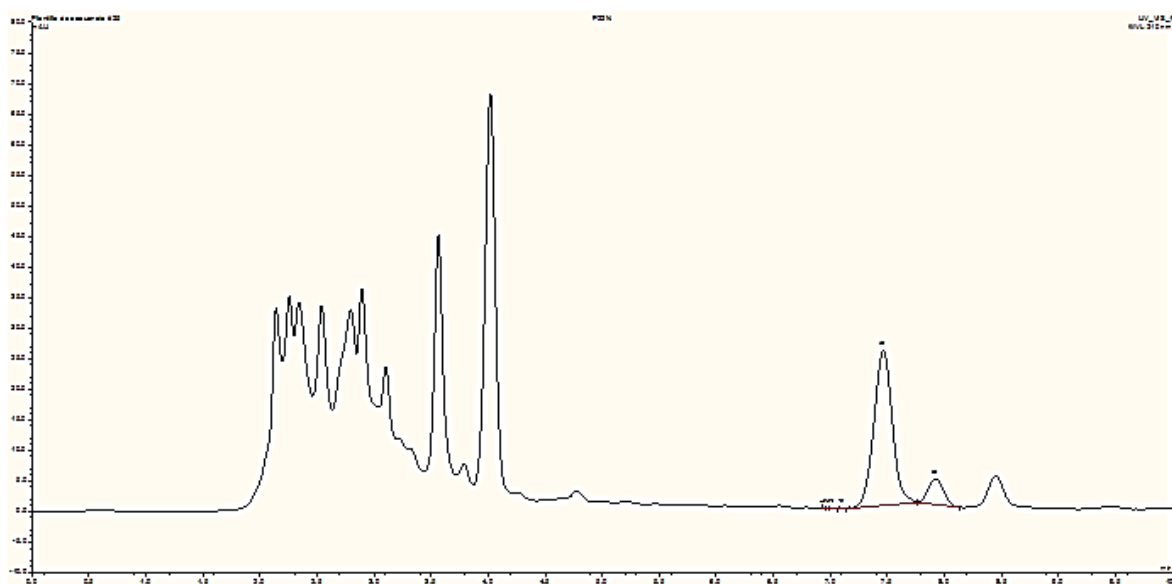


Cromatograma 8 h

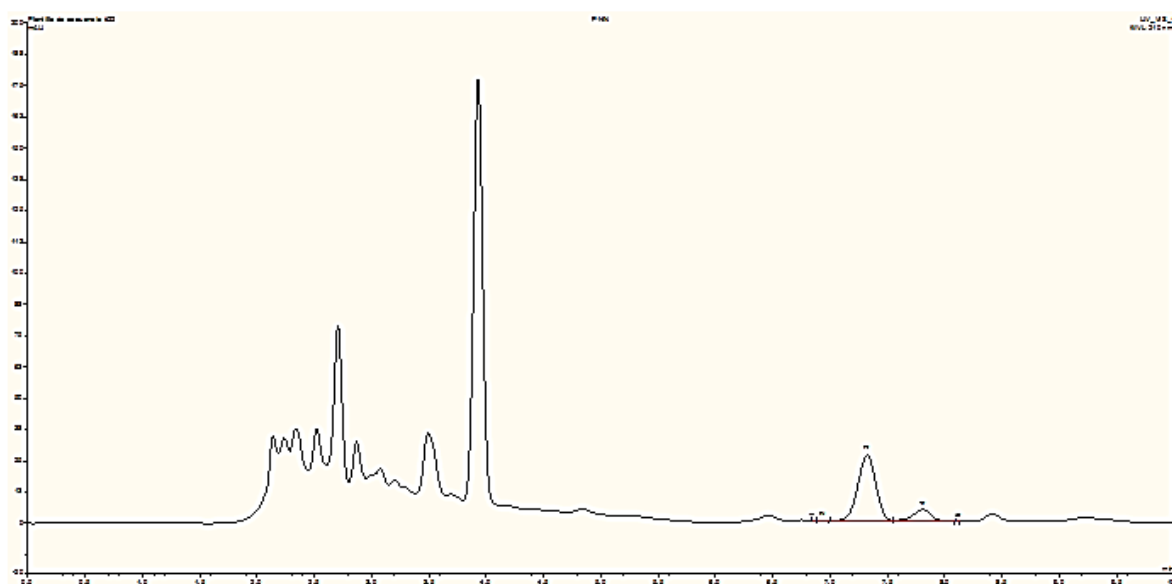


Cromatogramas de agitación

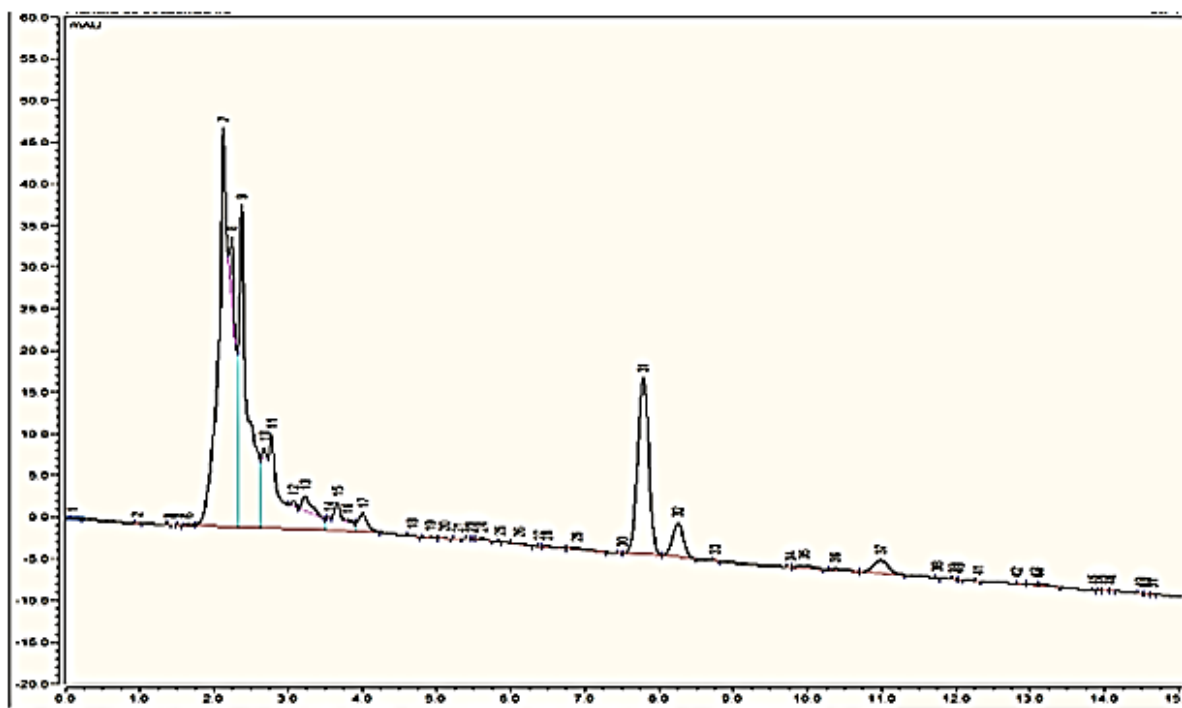
Cromatograma 2N



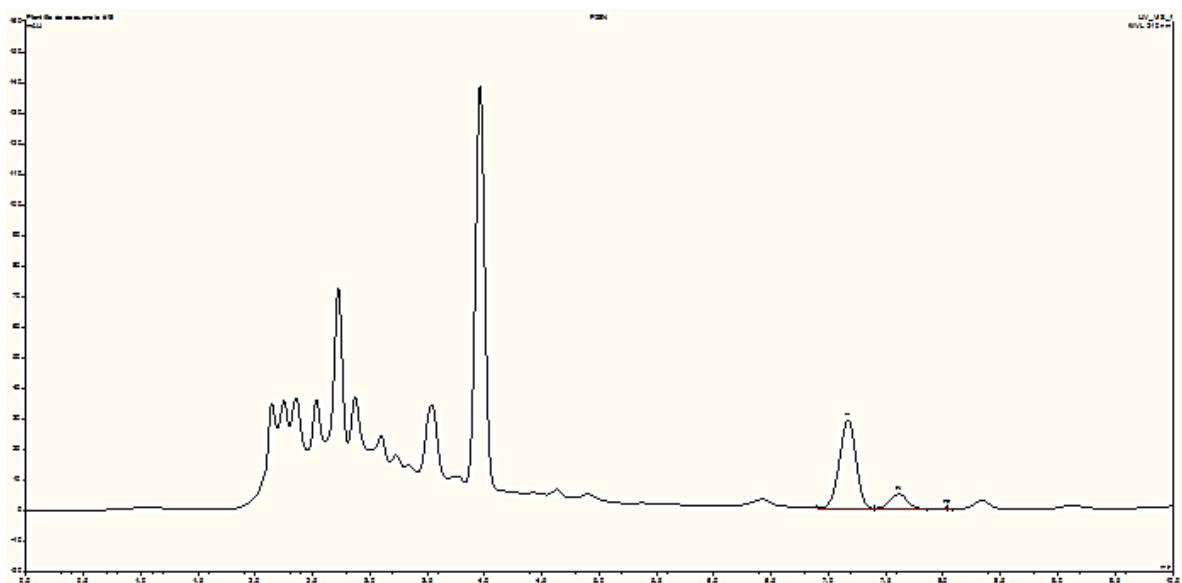
Cromatograma 4N



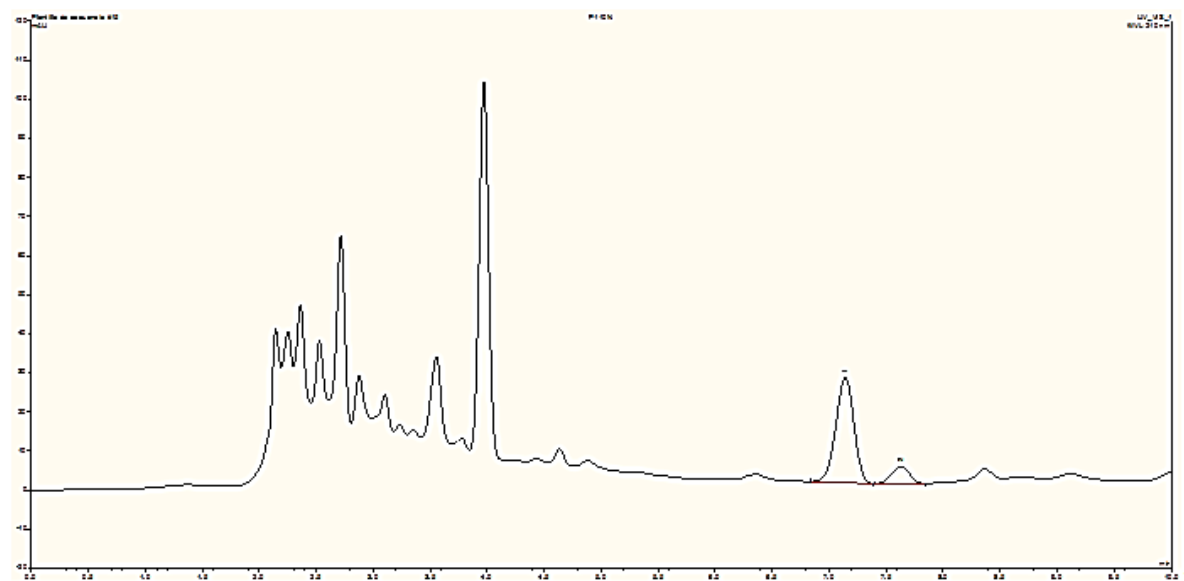
Cromatograma 6N



Cromatograma 8N

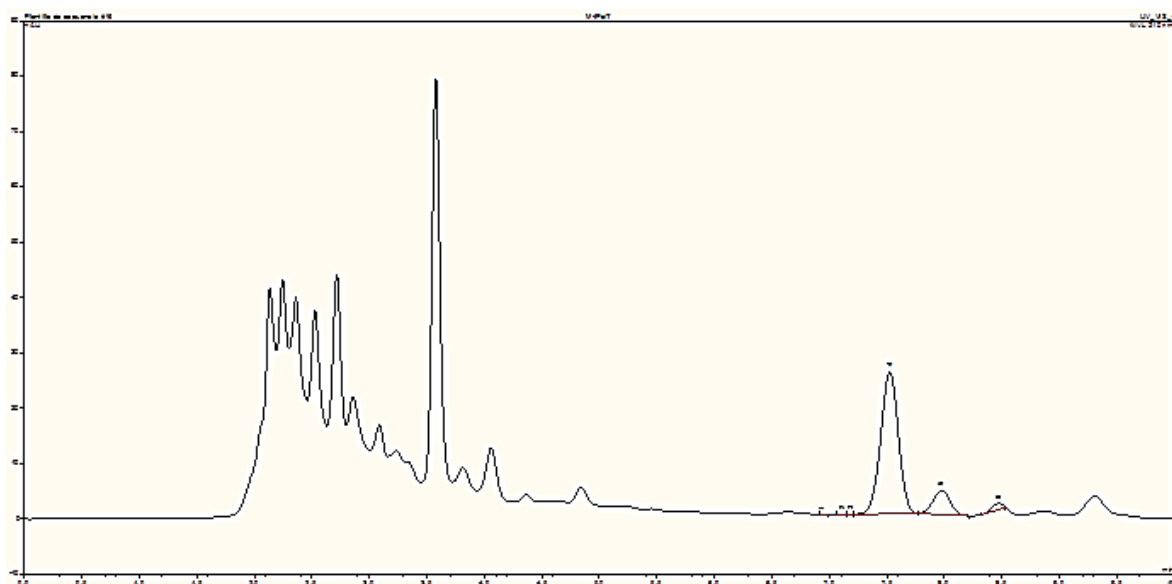


Cromatograma 10N

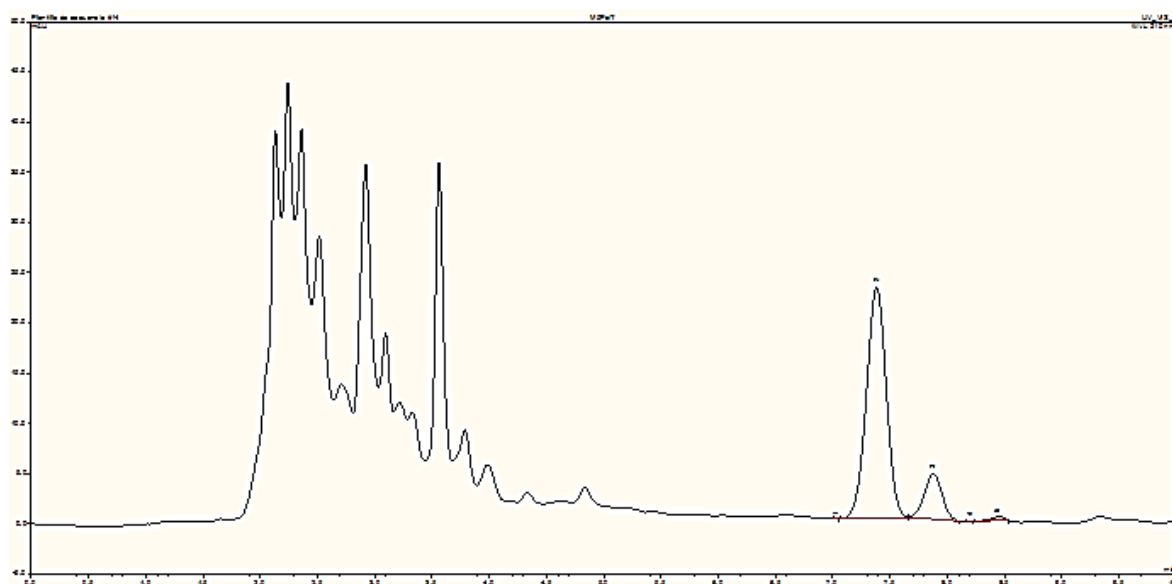


Cromatogramas de análisis de floculación

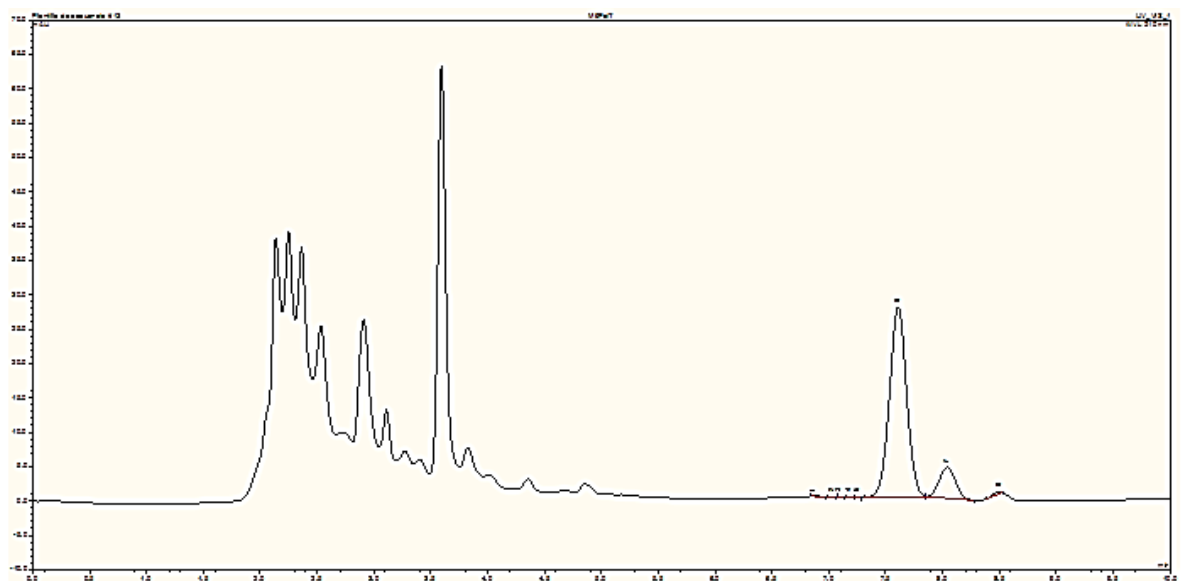
Cromatograma muestra Sin Flocular



Cromatograma muestra Floculada recién extraída

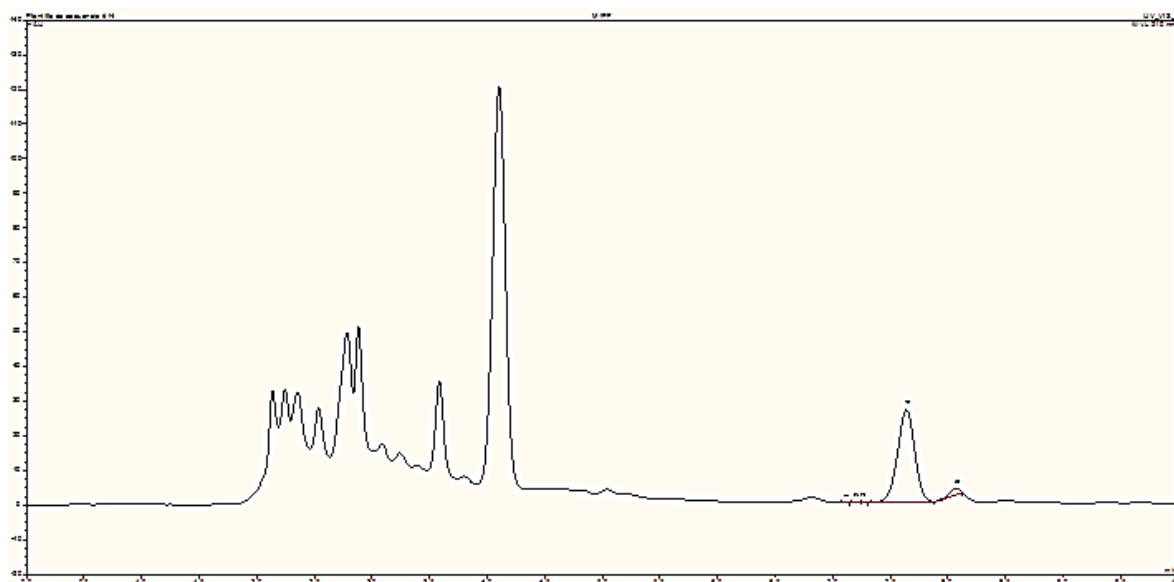


Cromatograma muestra Floculada 18 horas después

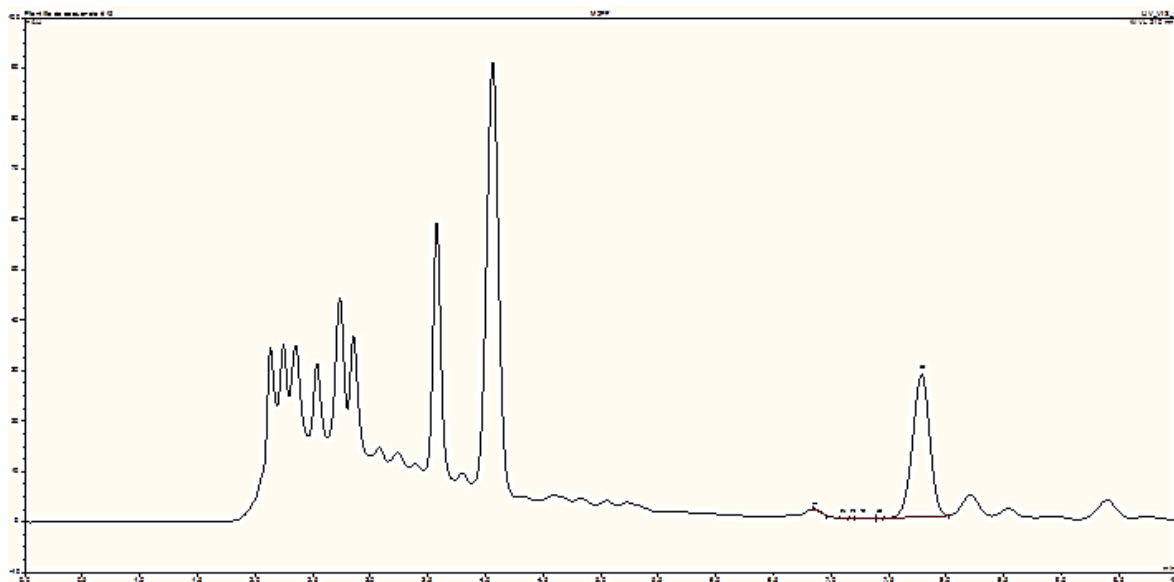


Cromatogramas de la corrida completa

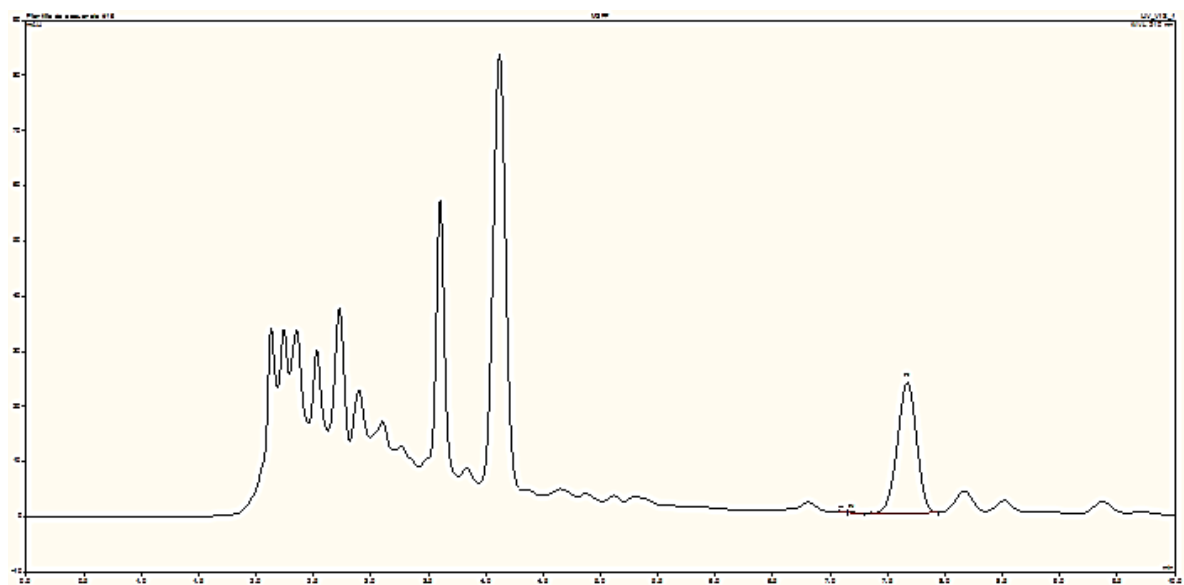
Cromatograma muestra M1PF



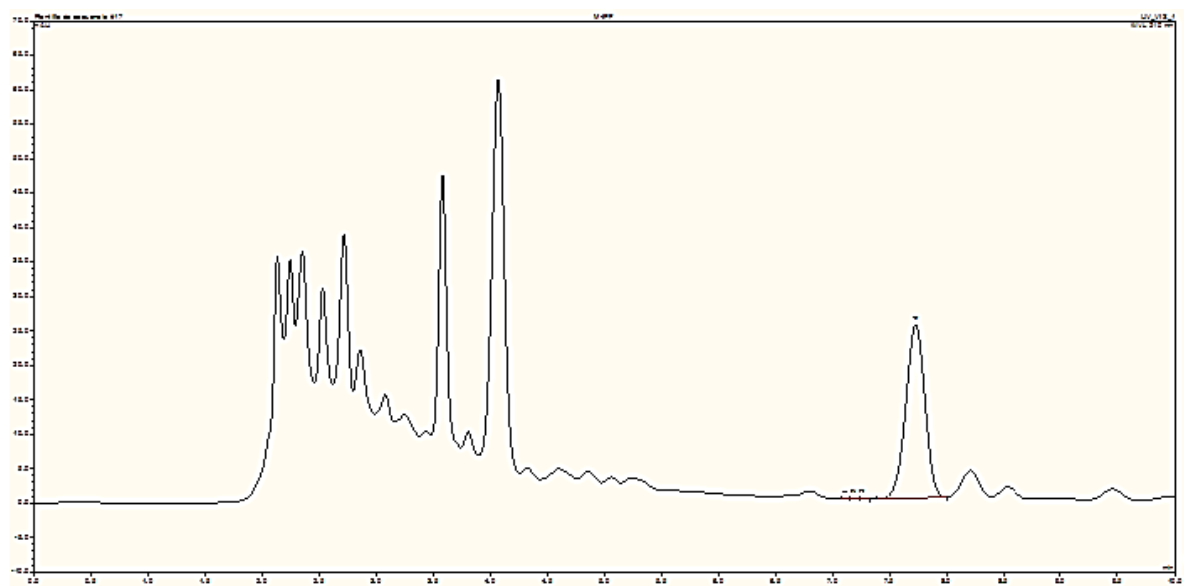
Cromatograma muestra M2PF



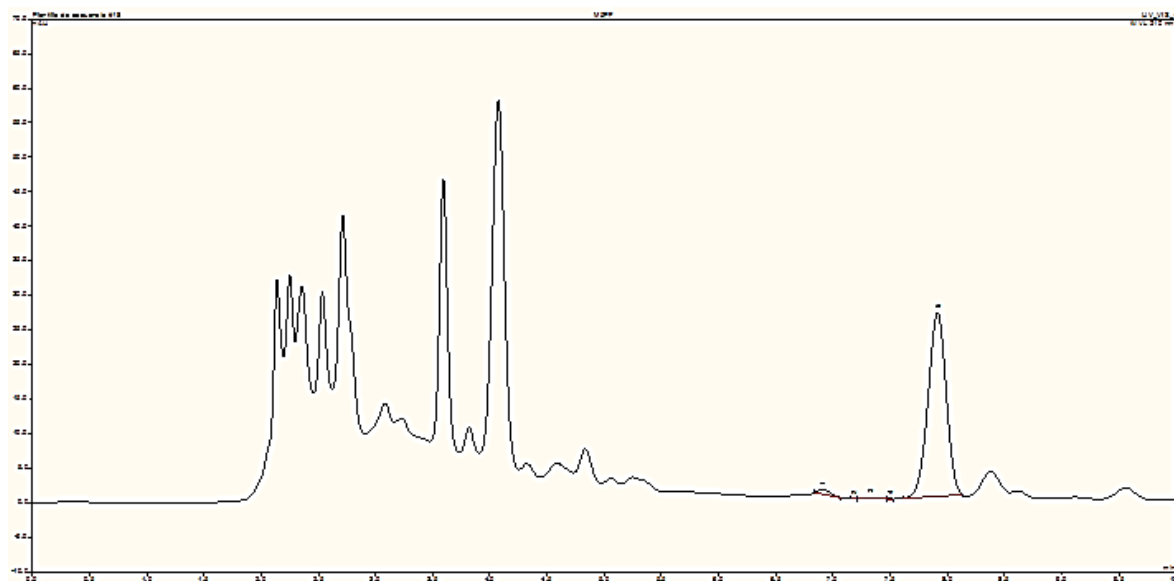
Cromatograma muestra M3PF



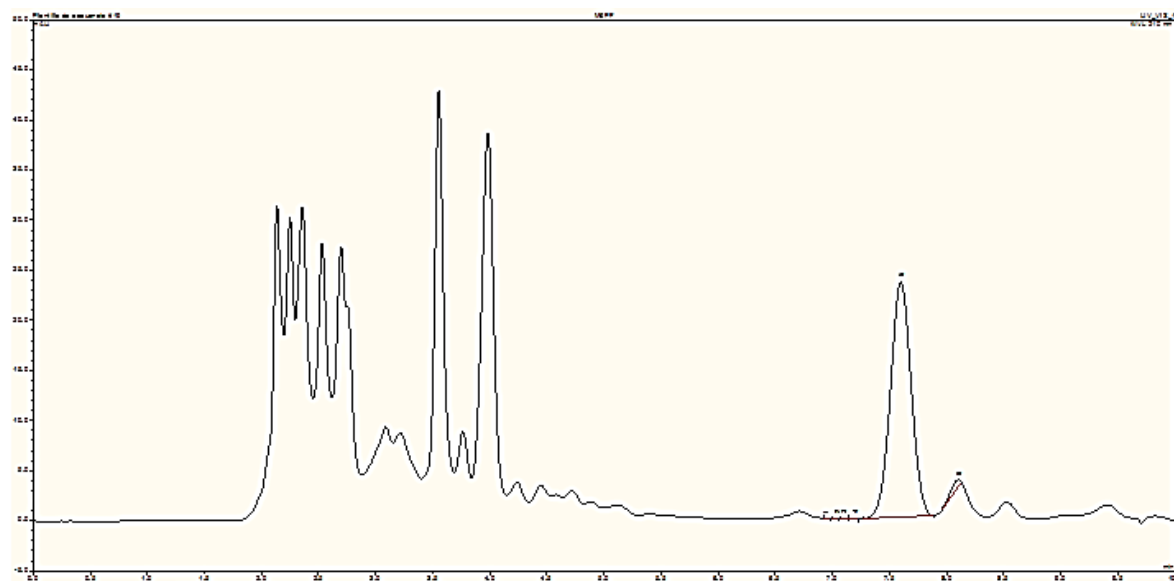
Cromatograma muestra M4PF



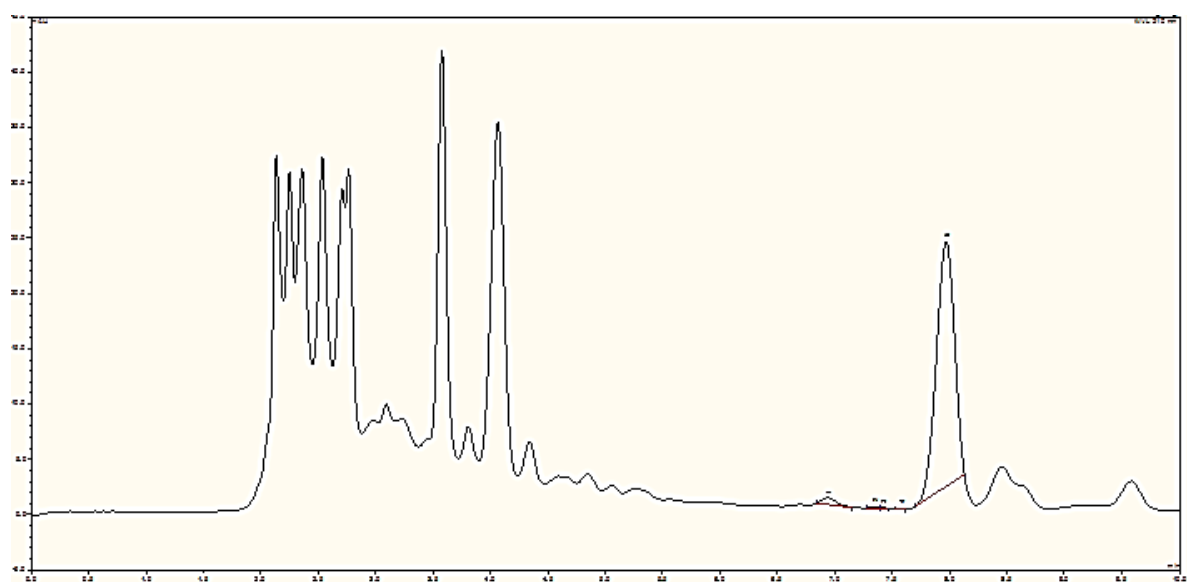
Cromatograma muestra M5PF



Cromatograma muestra M6PF



Cromatograma muestra M7PF



Cromatograma muestra M8PF

