



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE
ESTEVIÓSIDO Y REBAUDIÓSIDO A POR MÉTODOS
CONVENCIONALES Y MÉTODO ENZIMÁTICO
ASISTIDO POR ULTRASONIDO**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

VICTOR GABRIEL CANUAS LANDERO

DIRECTOR INTERNO

DRA. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO

DIRECTOR EXTERNO

M. EN B. ADA MARÍA RÍOS CORTÉS

PUEBLA, PUE.

MARZO 2015

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE ANEXOS	V
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. <i>Stevia rebaudiana</i>	3
3.2. Efectos del uso del extracto de <i>S. rebaudiana</i> en humanos	4
3.2.1. Efecto sobre la glucemia	4
3.2.2. Efecto sobre la tensión arterial	5
3.2.3. Otros efectos de relevancia	5
3.3. Glucósidos de esteviol	6
3.4. Legislación de esteviósido y rebaudiósido A como edulcorantes	8
3.4.1. Uso de <i>S. rebaudiana</i> como aditivo en alimentos	9
3.5. Métodos de extracción de glucósidos de esteviol	9
3.5.1. Métodos de extracción convencional	9
3.5.2. Métodos de extracción no convencionales	10
3.6. Métodos de clarificación y purificación del extracto de <i>Stevia rebaudiana</i>	12
3.7. Extracción enzimática asistida por ultrasonido	13
3.8. Generalidades de ultrasonido	14
3.8.1.1. Ultrasonido de Potencia	15
3.8.1.2 Ultrasonido de diagnóstico	16
3.8.2. Aplicaciones del ultrasonido	16
3.8.3 Efecto del ultrasonido sobre material vegetal	16
3.8.4 Efecto del ultrasonido sobre enzimas	17
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVOS	21
6.1. Objetivo general	21

6.2. Objetivos particulares	21
7. DIAGRAMA DE TRABAJO	22
8. MATERIALES Y MÉTODOS	23
8.1. Material de laboratorio	23
8.2. Material biológico	23
8.3. Métodos	23
9. METODOLOGÍA	24
9.1. Selección y acondicionamiento de la materia prima	24
9.2. Extracción de glucósidos de esteviol por el método convencional	24
9.3. Extracción de glucósidos de esteviol por el método de ultrasonido	25
9.4. Extracción de glucósidos de esteviol por el método enzimático	25
9.5. Extracción de glucósidos de esteviol por el método enzimático asistido por ultrasonido	25
9.6. Clarificación de extracto	25
9.7. Obtención de concentrado en polvo	26
9.8. Condiciones del análisis de esteviósido y rebaudiósido A	26
9.9. Diseño de experimentos	27
10. RESULTADO Y DISCUSIÓN	28
10.1. Preparación de la materia prima	28
10.2. Extracción convencional por equipo Soxhlet	28
10.3. Extracción asistida por ultrasonido	28
10.4. Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas en la extracción enzimática.	29
10.5. Extracción enzimática asistida por ultrasonido y su comparación con los distintos métodos de extracción	32
10.6. Método de aclarado	34
10.7. Obtención de extracto en polvo	34
10.8. Análisis de las muestras por HPLC	35
11. CONCLUSIONES	40
12. RECOMENDACIONES	41
13. BIBLIOGRAFÍA	42
14. ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.	3
Tabla 2. Comparación del poder edulcorante de los diversos compuestos derivados del esteviol de <i>S. rebaudiana</i> .	7
Tabla 3. Comparación de métodos de extracción de esteviósido y rebaudiósido A a partir de <i>S. rebaudiana</i> .	12
Tabla 4. Métodos a usar para la experimentación.	23
Tabla 5. Equipos necesarios para la experimentación.	24
Tabla 6. Rendimiento en la extracción enzimática de esteviósido.	31
Tabla 7. Rendimiento en la extracción enzimática de rebaudiósido A.	31
Tabla 8. Rendimientos de los distintos métodos de extracción.	32
Tabla 9. Condiciones del análisis por HPLC del esteviósido y rebaudiósido A.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. A) Estructura de esteviol, B) Estructura de Esteviósido y c) Estructura de	
Figura 2. Rebaudiósido A	6
Figura 3. Rango de sonido y sus aplicaciones.	15
Figura 4. Principio de la acción de cavitación en un medio líquido.	15
Figura 5. Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas en la extracción de esteviósido.	30
Figura 6. Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas en la extracción de rebaudiósido A.	30
Figura 7. Comparación de los diversos métodos de extracción de esteviósido.	33
Figura 8. Comparación de los diversos métodos de extracción de rebaudiósido A.	33
Figura 9. Cromatograma de estándar de esteviósido (5.166 min).	35
Figura 10. Cromatograma de estándar de rebaudiósido A (4.878 min).	36
Figura 11. Cromatograma de la mezcla de esteviósido (5.201min) y de rebaudiósido A (4.928min).	36
Figura 12. Cromatograma de extracción química convencional con sistema Soxhlet. Señal de esteviósido a 5.172min y señal de rebaudiósido A a 4.905min.	37
Figura 13. Cromatograma de extracción con ultrasonido. Señal de esteviósido a 5.213min y señal de rebaudiósido A a 4.839min.	38
Figura 14. Cromatograma de extracción enzimática. Señal de esteviósido a 5.013min y señal de rebaudiósido A a 4.877min.	38
Cromatograma de extracción enzimática asistida por ultrasonido. Señal de esteviósido a 5.114min y señal de rebaudiósido A a 4.951min.	39

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo A. Curva de concentración del estándar externo de esteviósido y rebaudiósido A por HPLC.	51
Anexo B. Cálculos de los rendimientos de cada método de extracción realizado posterior al análisis por HPLC.	53
Anexo C. Análisis Post-Varianza de los distintos métodos de extracción.	55
Anexo D. Publicación de la tesis en revista con factor de impacto.	57

1. RESUMEN

El esteviósido y rebaudiósido A, glucósidos derivados del esteviol, son edulcorantes naturales presentes en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Estos edulcorantes son hasta 300 veces más dulces que el azúcar estando en extracto. Los métodos de extracción de dichos componentes pueden ser agrupados como métodos convencionales y no convencionales. En el presente trabajo se desarrolló un nuevo método de extracción no convencional: la extracción enzimática asistida por ultrasonido, y se comparó con el sistema Soxhlet como método convencional y los métodos no convencionales ya existentes de extracción con ultrasonido y extracción enzimática. El material usado para los diferentes métodos de extracción fue pulverizado de hoja de stevia, los solventes usados fueron solución tampón de ácido acético a pH 5 y metanol grado reactivo, así como el uso de enzimas: celulasa, hemicelulasa y pectinasa. La extracción por el método convencional se realizó con el sistema Soxhlet a 50°C; la extracción por ultrasonido se llevó a cabo con un ultrasonificador de baño a 44 kHz por un tiempo de 60 minutos. El método enzimático se llevó a cabo usando dos concentraciones de enzimas (0.5% y 3.0%) y a 3 temperaturas de (50, 55 y 60°C) por una hora. El método de extracción enzimático asistido por ultrasonido se realizó bajo el uso del ultrasonificador de baño a 44 kHz y con 0.5 % de enzima. El análisis de las muestras se realizó por HPLC. El mejor método para la obtención de esteviósido y rebaudiósido A fue la extracción enzimática obteniéndose 20.56 ± 2.21 mg/g de hoja y 68.40 ± 7.88 mg/g de hoja respectivamente, bajo una temperatura de 50°C y 1 hora, los rendimientos fueron seguidos por la extracción con ultrasonido, extracción convencional y la extracción enzimática asistida por ultrasonido. La falta en la variación de las condiciones de trabajo afectó severamente el resultado en la extracción por ultrasonido y en la extracción enzimática asistida por ultrasonido.

2. INTRODUCCIÓN

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta nativa de la región Amambay en Paraguay, ha sido utilizada como endulzante natural, así como por sus efectos benéficos sobre la salud. Las hojas de la planta son 30 veces más dulces que el azúcar y el extracto hasta 300 veces. El extracto está mayormente compuesto por glucósidos derivados del esteviol como el esteviósido y rebaudiósido A, es éste último el que posee una capacidad edulcorante de hasta 450 veces más que el azúcar y no proporciona sabores amargos o metálicos característicos de los edulcorantes sintéticos.

Actualmente existen una gran cantidad de métodos de extracción para los compuestos de dicha planta, los cuales pueden ser clasificados entre químicos convencionales, como el uso del equipo Soxhlet, y los métodos no convencionales, que están basados en la aplicación de nuevas tecnologías tales como el uso de enzimas, las radiaciones ultrasónicas así como de microonda, el uso de fluidos supercríticos, entre otras. Debido a la actual demanda por el esteviósido y rebaudiósido A, los métodos no convencionales son cada vez más usados, esto debido al interés de obtener la mayor cantidad de dichos glucósido, igualmente se busca la creación de nuevos métodos que ofrezcan los mayores rendimientos de los edulcorantes con el uso de instrumentaria no costosa así como un gasto mínimo en solventes, resultando en el uso de métodos con “tecnología verde”.

La presente investigación se enfocó a establecer las condiciones para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni usando diferente métodos así como la implementación de un método enzimático asistido por ultrasonido (EEAU), el cual es una técnica que ha sido ocupada en otras plantas de interés comercial. Se realizó una comparación de los rendimientos obtenidos por el nuevo método desarrollado (EEAU) contra los rendimientos del uso de los métodos de extracción químico convencional y el uso de enzimas y ultrasonido como los métodos no convencionales.

3. ANTECEDENTES

3.1. *Stevia rebaudiana*

La stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es una planta silvestre proveniente de la zona Amambay del noreste de Paraguay, siendo los indios guaraníes los que iniciaron el uso de esta planta. El nombre por el cual la planta es conocida es “ka’a he’ë” que tiene como significado dominante *hierba o planta dulce*. Su descubrimiento se originó en el año de 1887, pero su clasificación y por tanto su primer conocimiento botánico fue hasta el año de 1905 por el botánico suizo-italiano, Dr. Moisés S. Bertoni (Bertoni, 1905). A la par de su descripción botánica, el Dr. Bertoni encargó su análisis al químico paraguayo Ovidio Rebaudi quien logró aislar dos componentes, actualmente conocidos como esteviósido y rebaudiósido (Bertoni, 1918). La clasificación taxonómica de la planta se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Genero	<i>Stevia</i>
Especie	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni)

Bertoni 1905

La planta posee hojas y flores, es una planta herbácea perenne, tallo erecto, subleñoso, pubescente; durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo, llegando a producir hasta 20 tallos en tres a cuatro años; puede alcanzar hasta 90 cm de altura en su hábitat natural y en los trópicos puede llegar a tener alturas superiores a 100 cm (Jaramillo, 2009). La raíz es, pivotante, filiforme, y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie. *S. rebaudiana* tiene hojas elípticas, ovales o lanceoladas, algo pubescentes;

presentan disposición opuesta en sus estados juveniles, y alternas cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica, previa a la floración (Bonilla *et al.*, 2007). La flor es hermafrodita, pequeña y blanquecina; su corola es tubular, pentalobulada, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas (Shock, 1982). La planta es autoincompatible (protandria), por lo que la polinización es entomófila; se dice que es de tipo esporofítico y clasificada como apomítica obligatoria (Monteiro, 1980).

Se han descrito más de 478 especies de *Stevia* pero sólo 181 han sido aceptadas. Existen plantas endémicas pertenecientes al género *Stevia* en Sudamérica, Centroamérica y ciertas regiones de México y Estados Unidos de América (EUA) (Kenelly, 2002).

La stevia es usada en Paraguay de forma natural y sin refinar como bactericida, inhibiendo el crecimiento bacteriano, sobre todo las bacterias responsables de la caries y los problemas de encías, también para aliviar el problema de garganta irritada, las encías sangrantes, resultado de las complicaciones más comunes que produce la diabetes (Barriocanal *et al.*, 2008).

3.2. Efectos del uso del extracto de *S. rebaudiana* en humanos

Desde la década de los 70's, el consumo de los extractos de stevia se han incrementado, de la misma manera que los estudios en modelos experimentales con animales así como también en humanos para corroborar la no toxicidad de los extractos de hoja. Se encontró que el consumo de los extractos de stevia causaban efectos benéficos a la salud de los consumidores, especialmente a personas con síndrome metabólico (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

3.2.1. Efecto sobre la glucemia

El efecto más estudiado y conocido que tiene el consumo de los extractos de stevia es el control de la glicemia tanto en personas sanas como en personas con enfermedades de tipo metabólicas tal como es el caso de la diabetes mellitus tipo 2 (White *et al.*,

1994). Susuki *et al.* (1977) mediante el uso de ratas Wistar descubrió que la molécula de esteviósido y de esteviol (moléculas mayoritarias en los extractos de stevia) disminuían los niveles de glucemia después de 4 semanas bajo una dieta alta en carbohidratos y en grasa. De igual forma, Curi *et al.* (1986) añadió que con el uso de extractos acuosos de stevia, la glucosa plasmática decrecía significativamente en la curva de tolerancia a la glucosa tras una ingesta constante del extracto. Así mismo el efecto que tiene las moléculas de esteviósido y esteviol sobre el intestino delgado (fracción yeyunal) afecta hasta en un 40% la absorción de glucosa (Toskulkao *et al.*, 1995). Otro efecto directo sobre la glucemia es la supresión de la gluconeogénesis en el hígado de ratas (Chen *et al.*, 2005) y la secreción así como la sensibilización a la insulina (Jeppesen *et al.*, 2002).

3.2.2. Efecto sobre la tensión arterial

Se ha demostrado que el extracto de stevia y esteviósido decrecen la hipertensión arterial mediante la inducción a la vasodilatación también como la estimulación a la diuresis y la natriuresis (Melis *et al.*, 1996). Este efecto anti hipertensivo requiere de una administración prolongada del extracto de stevia, reportándose que en los primeros 20 días de administración no se observó cambio significativo en ratas. En forma similar se encontró que la administración crónica en pacientes con tensión arterial normal no hubo modificación en la medición de la misma (Ferri *et al.*, 2006).

3.2.3. Otros efectos de relevancia

Debido a la amplia variedad de pruebas realizadas, se ha demostrado los efectos favorables sobre sistema inmune (Boonkaewwan *et al.*, 2006), reproductor (Filho *et al.*, 1989), digestivo (Shiozaki *et al.*, 2006), así como antibacterial (Puri *et al.*, 2011a), potente antioxidante (Yasukawa *et al.*, 2002) y con actividad anticancerígena (Mizushina *et al.*, 2005) entre otros efectos. Todo ello relacionado con el consumo de concentrados y/o purificados de esteviósido y rebaudiósido A.

Los efectos que presenta el extracto de stevia son principalmente debidos a sus componentes mayoritarios, esteviósido y rebaudiósido A, de igual forma que son éstos los compuestos puros que tienen un dulzor hasta 300 veces mayor que el azúcar, es por ello el alto interés comercial que se le ha atribuido en la industria alimentaria (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

3.3. Glucósidos de esteviol

A pesar de las numerosas especies de stevia, la *S. rebaudiana* es una de las dos especies poseedoras de varios tipos de glucósidos de esteviol dulces (Soejarto *et al.*, 1982). Estos compuestos se encuentran en su mayoría en las hojas y en menor porción en tallo y raíz. Entre las moléculas dulces se encuentra el esteviósido, los rebaudiósido A, B, C, D, E y el dulcósido A (Genus, 2003). Todos los compuestos anteriores parten de un mismo esqueleto químico, el esteviol. Químicamente, el esteviol (ácido 13-hidroxicaurenoico) (figura 1) es una molécula que es sintetizada en la planta siguiendo la ruta de la producción para giberelinas (Totté *et al.*, 2003). Partiendo de este esqueleto, el esteviósido (13 - [2-OSS-D-glucopiranosil- α -glucopiranosil oxi]-en-19 cauren-16-oico-éster del ácido β -D-glucopiranosil) es un glucósido con un glucósilo y un residuo soforosil unido a la aglicona de esteviol. Las otras moléculas dulces aisladas de stevia (rebaudiósido A-E, dulcósido A), tienen la misma estructura pero difieren en la glicosilación en los residuos C13 y C19 (Kolb *et al.*, 2001).

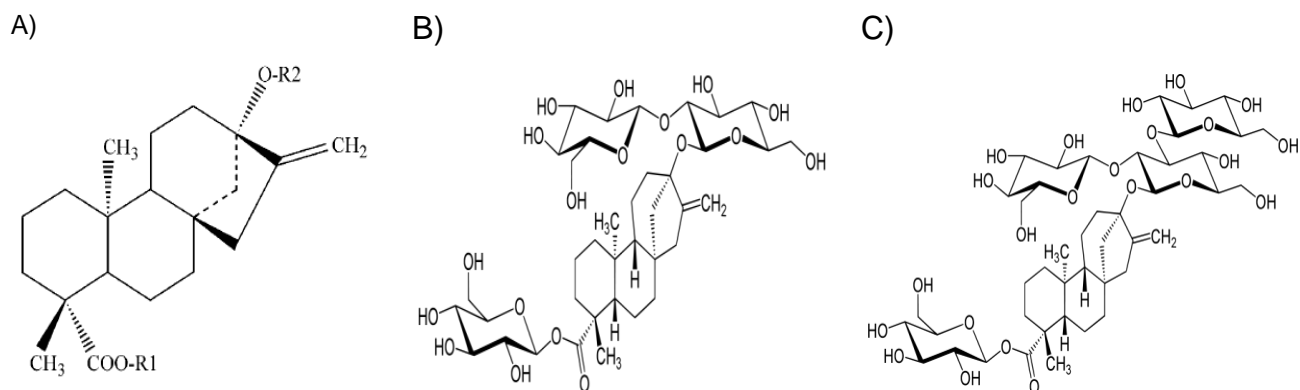


Figura 1. A) Estructura de esteviol, B) Estructura de Esteviósido y c) Estructura de Rebaudiósido A

En la tabla 2 se muestra el porcentaje y capacidad de dulzor relativo que posee cada uno de los compuestos derivados del esteviol. Se encuentra que el esteviósido y el rebaudiósido A son los compuestos mayoritarios de la planta y por tanto son los que tienen mayor interés alimenticio. Estas dos moléculas presentan una amplia estabilidad por debajo de los 120°C, teniendo una degradación sobrepasando los 140°C. Son estables a un amplio rango de pH, el cual abarca desde 2 hasta 10, lo que ofrece una gran oportunidad de ser agregados como aditivos a varios alimentos (Kroyer, 2010), es por ello la importancia de obtener los glucósidos de esteviol (esteviósido y rebaudiósido A) puros, para lo que se han desarrollado diversos métodos de extracción y purificación.

Tabla 2. Comparación del poder edulcorante de los diversos compuestos derivados del esteviol de *S. rebaudiana*.

Diterpen glucósido	% en peso*	Poder edulcorante relativo**	Sustituyentes	
			R1	R2
Esteviósido	5.0-20.0	250-300	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2-1)
Rebaudiósido A	2.0-4.0	350-450	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2-1) β-Glc(3-1)
Rebaudiósido B	<<1.0	300-350	H	β-Glc-β-Glc(2-1) β-Glc(3-1)
Rebaudiósido C (Dulcósido B)	1.0-2.0	50-120	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2-1) β-Glc(3-1)
Rebaudiósido D	<<1.0	200-300	β-Glc-β-Glc(2-1)	β-Glc-β-Glc(2-1) β-Glc(3-1)
Rebaudiósido E	<<1.0	250-300	β-Glc-β-Glc(2-1)	β-Glc-β-Glc(2-1)
Rebaudiósido F	<<1.0	Nd	β-Glc	β-Glc-β-Xyl(2-1) β-Glc(3-1)
Esteviolbiósido	<<1.0	100-125	H	β-Glc-β-Glc(2-1)
Dulcosido A	0.4-0.7	50-120	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2-1)

Fuente: Puri *et al.*, 2011

* Peso en comparación al peso total de hoja seca

** Poder edulcorante con respecto a la sacarosa (sacarosa = 1)

3.4. Legislación de estevióside y rebaudiósido A como edulcorantes.

Los extractos de stevia así como la purificación de los derivados del esteviol fueron mejor conocido por su uso en Japón. Se utilizó en lugar de la sacarina después de que fuera prohibida en la década de 1970, es por ello que los edulcorantes de stevia se han consumido más ampliamente en Japón que en cualquier otro país.

En los años 1970 y 1980, los edulcorantes derivados de stevia comenzaron a aparecer en las tiendas de hierbas y “de la comida sana” en Norteamérica y Europa (Carakostas *et al.*, 2008).

La FDA de E.U. ha negado varios intentos de comercializar la stevia como aditivo alimentario, sin embargo, las hojas de stevia o extractos sólo se ha permitido en el mismo país para su uso como suplemento dietético, todo ello debido a la aprobación de la Ley de Salud y Educación en Suplementos Dietéticos (DSHEA) en 1994 (FDA, 1995).

Por todo lo anterior, desde los años 1990's, la FDA ha restringido el uso de edulcorantes basados en stevia debido a los primeros resultados publicados que determinaban efectos benéficos en el consumo de los glucósidos de esteviol, relacionados mayormente con un control en el índice glucémico y en el sistema reproductor (FDA, 2007).

Poco antes de terminar la década, el Comité Científico de la Comisión Europea sobre la Alimentación (SCF) revisó la seguridad de los edulcorantes de stevia en varias ocasiones (SCF, 1999 a, b). Sus comentarios llegaron a la conclusión de que las lagunas e incertidumbres se quedaron en la base de datos hasta su comprobación. Debido a ello los glucósidos de esteviol quedan aprobados para su uso como edulcorante en sólo un par de países, sobre todo de Japón, Brasil, China, Corea y Paraguay. De igual forma, las hojas de stevia son aprobados para la venta como alimento en algunos otros países (por ejemplo, Israel y Tailandia), pero no como los extractos purificados.

El Comité Mixto FAO / OMS en Aditivos Alimentarios (JECFA) examinó los glucósidos de esteviol en su 58^a, 63^a, 68^a y 69^a reunión (JECFA, 2007 y 2008). En la última

reunión, las restricciones fueron removidas hasta una Ingesta Diaria Permitida (IDA) de 0-4 mg/Kg de peso corporal/día (WHO, 2009).

3.4.1. Uso de *S. rebaudiana* como aditivo de alimentos

A nivel mundial, la producción de nuevos alimentos con productos derivados de stevia ha incrementado de forma exponencial, siendo la Unión Europea el modelo de referencia durante el 2012 ya que ocupaba el 40% de lanzamiento de nuevos productos (Carreres, 2012). En México, la introducción de nuevos productos con stevia sigue en aumento, prueba de ello fue el desarrollo de un chocolate con compuestos puros de glucósidos de esteviol (esteviósido y rebaudiósido A) por el Instituto Politécnico Nacional en 2010 (IPN, 2010).

3.5. Métodos de extracción de glucósidos de esteviol

En el proceso de extracción de los metabolitos secundarios como los glucósidos de esteviol, se buscó inicialmente los mejores rendimientos con el gasto mínimo de recursos, evaluando tanto métodos químicos convencionales como el uso de nuevas tecnologías.

De manera general, la mayoría de las extracciones desarrolladas han sido empleadas con el uso de solventes, siendo estos de naturaleza orgánica o acuosa. Varios investigadores desarrollaron métodos complejos para la obtención de extractos crudos de stevia y posterior a ello ser tratados para su purificación (Puri *et al.*, 2011b), entre los cuales se han integrado en dos tipos: a) métodos de extracción convencionales y b) métodos de extracción no convencionales.

3.5.1. Métodos de extracción convencional

Los métodos de extracción convencionales se han clasificado en base a los solventes (Haga *et al.*, 1976), intercambio iónico (Unesh *et al.*, 1977), cromatografía de adsorción

(Itagaki e Ito, 1979) y el uso de solventes además de un agente decolorante (Ogawa, *et al.*, 1980).

Un método de tipo convencional que fue mejorado para la recuperación de esteviósido se estableció para una patente de EUA en la cual no requirió el uso de solventes o una separación con equipos de alto costo. En este proceso, la materia prima fue extraída con agua, el extracto acuoso resultante se trató con un agente quelante de ácido di o tricarbónico para la eliminación de metales y otras impurezas. Posteriormente, fue añadido un agente con calcio para precipitar otras impurezas. El extracto acuoso fue neutralizado con ácido, seguido de una extracción con un solvente inmiscible en agua. Los cristales purificados de esteviósido fueron recuperados por enfriamiento (Kumar, 1986).

Se ha descrito que los procesos convencionales que han mostrado los mejores rendimientos tienen cuatro etapas: extracción solvente (acuoso u orgánico), un intercambio iónico, precipitación o coagulación después del filtrado y por último la cristalización y el secado (Puri *et al.*, 2011b).

3.5.2. Métodos de extracción no convencionales

Otras formas de extracción son la extracción con fluidos supercríticos (SFE por sus siglas en inglés), uso de radiaciones como microondas y ultrasonido, el uso de solventes a altas presiones y la aplicación de enzimas. La SFE se basa en la capacidad de extracción que presentan ciertos componentes químicos como el CO₂ al ser expuestos a condiciones supercríticas de temperatura y presión para comportarse como un solvente de extracción con una baja viscosidad y alta difusividad, además de ser fácil de remover después del proceso de extracción. El uso del método para la extracción de stevia fue desarrollado por Yoda *et al.* (2003), donde usó al CO₂ a 200 bar y 30 °C como solvente. La desventaja de este método es que no todos los glucósidos son solubles en este fluido, por lo cual, se realizaron mezclas con otros co-solventes. Otra manera en la que fue usado el SFE fue para el mejoramiento del potencial de dulzor y la eliminación del sabor amargo (Tan *et al.*, 1983 y Kienle, 1992). Como parte del mejoramiento de la SFE, Erkucuk *et al.* (2009) empleó una gama de

distintas variables: temperatura, presión, concentración de mezcla de agua:etanol como co-solvente y la tasa de flujo de CO₂ dentro de un diseño estadístico de Box-Behnken, que se utilizó para evaluar el efecto que ejerce cada una de las variantes usadas, todo ello para encontrar las mejores condiciones de trabajo.

La extracción de fluidos a alta presión con agua o metanol representa otra forma para la obtención de esteviósido. El metanol mostró un mejor rendimiento para el aislamiento del esteviósido de las hojas de stevia que el agua dentro del rango de 110-160 °C, sin embargo, el agua representa la alternativa no tóxica para el consumo directo a diferencia del uso de metanol (Pol *et al.*, 2007 a, b).

El uso de la extracción de agua caliente a alta presión (PHWE por sus siglas en inglés) demostró un mejoramiento del 2.02 a 2.86% en rendimientos respecto a las extracciones convencionales, por otro lado, el rendimiento no es mayor que el uso de extracción asistida con microondas (MAE por sus siglas en inglés), el cual resultó ser un método más rápido y eficaz para esteviósido y rebaudiósido A (Jaitak *et al.*, 2009). Un trabajo similar sobre MAE fue realizado por Teo *et al.* (2009) para mejorar tanto condiciones como rendimientos, los resultados mostraron que el esteviósido y rebaudiósido A podrían ser extraídos a una temperatura elevada usando agua sin la adición de un solvente orgánico. Se observó que la eficacia de la extracción en rendimiento de PHWE y MAE fue superior en comparación con el rendimiento de extractos obtenidos por calentamiento a reflujo. Los principales parámetros que influyen en su eficacia de la extracción son la temperatura, el tiempo de extracción, velocidades de flujo y la adición de modificadores/aditivos.

Otra estrategia en el manejo de tecnologías disponibles y aplicables en las metodologías de extracción, es el uso de la extracción asistida por ultrasonido (UAE por sus siglas en inglés) la cual tiene la finalidad la producción de efectos físicos como la cavitación. La cavitación es la formación de microburbujas de gas que pueden crecer, dividirse e implotar, produciendo gradientes en la presión y temperatura. Con este método el rendimiento de los extractos de stevia se incrementó significativamente en comparación con los procedimientos de extracción clásicos (Liu *et al.*, 2010).

Por último y con el uso de técnicas biotecnológicas, Puri, *et al.* (2012) desarrolló un método totalmente nuevo, en el cual usa una combinación de tres enzimas para romper las paredes de la célula vegetal y con ello lograr que el solvente entre por completo y extraiga la mayor cantidad de esteviósido y rebaudiósido A. El método fue optimizado con una metodología de superficie de respuesta (RSM).

A continuación se muestran los mejores rendimientos de los métodos desde hace una década (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de métodos de extracción de esteviósido y rebaudiósido “A” a partir de *S. rebaudiana*.

Método	Rendimiento (%)	Tiempo de tratamiento	Referencia
Separación cromatografía (hexano, dicloroetano, acetato de etilo, metanol)	5.9	24 h	Pol <i>et al.</i> , 2007 a,b
Extracción de fluido presurizado (PFE) con metanol	20.0	50min	Pol <i>et al.</i> , 2007 a
PFE con agua	18.0		
Extracción de agua caliente a presión (PHWE)	55.2	50min	Teo <i>et al.</i> , 2009
Extracción asistida con microondas (MAE)	10.7	20min	
MAE	42.23	1min	Jaitak <i>et al.</i> , 2009
Extracción asistida con ultrasonido (UAE)	23.7	30min	
Extracción con fluidos supercríticos (SFE) con agua	18.6	100min	Erkucuk <i>et al.</i> , 2009
SFE con etanol	23.67		
UAE	72.48	32min	Liu <i>et al.</i> , 2010
Extracción Enzimática (hemicelulasa)	3.69	45min	Puri <i>et al.</i> , 2012
Hemicelulasa, celulasa y pectinasa	9.75	76min	
UAE usando etanol al 30%	33.85	6min	Gasmalla <i>et al.</i> , 2014
UAE usando isopropanol 60%	37.10	18min	

Fuente: Puri *et al.*, 2011b

Debido al aporte de varias tecnologías de reciente uso, se realiza la combinación de éstas para poder obtener mayores beneficios en el rendimiento del extracto, así como un ahorro significativo de tiempo y material.

3.6. Métodos de clarificación y purificación del extracto de *Stevia rebaudiana*

Posterior a los procesos de extracción del esteviósido y rebaudiósido A, la clarificación de los extracto son de gran importancia. Aunque ya se han descrito numerosas formas

de clarificar los extractos, se sigue en la búsqueda de mejorar un proceso que cubra las necesidades para la industria alimenticia. El proceso de clarificación es parte importante para la obtención de los glucósidos de esteviol puros. Kumar (1986) incluye el uso de sales de calcio junto con variaciones de pH. Una metodología desarrollada por Giovanetto (1990) usó una combinación con centrifugación y con hidróxido de calcio con lo que se obtuvo un precipitado usando una resina de intercambio iónico, obteniendo así la clarificación. Con el mismo fundamento pero con el uso de columnas de intercambio iónico y posterior separado con metanol, Payzant *et al.* (1999) logró la purificación a precipitados de esteviósido. Shi *et al.* (2002) sintetizaron adsorbentes poliméricos mediante la introducción de grupos aminos cuaternarios a resinas adsorbentes de uso convencional para la purificación del extracto de stevia. Se encontró como ventaja que la pérdida por adsorción de los glucósidos de esteviol disminuyó, de igual forma se pudo aumentar la eficiencia de la decoloración del extracto con el aumento de grupos amino en la columna (desde aminos primarios hasta cuaternarios). Moraes y Machado (1999) usaron procesos de adsorción para la clarificación, en el cual se usó zeolita CaX notándose que el proceso de aclarado era satisfactorio al igual que la recuperación de los edulcorantes después de la adsorción. Las tecnologías anteriormente descritas tienen la desventaja de que es necesario el uso de solventes orgánicos, lo cual dificulta la recuperación de dichos compuestos en su totalidad. Por estas razones, se desarrolló un método basado en tecnología de membranas (Chhaya *et al.*, 2012a; 2012b), esta evita cambios de fase y uso de solventes químicos, sin embargo, aún existen inconvenientes para evitar el taponamiento de las membranas y los altos costos.

3.7. Extracción enzimática asistida por ultrasonido

Actualmente existen otros métodos que han tomado gran interés como el método de extracciones enzimáticas asistidas por ultrasonido. Este método fue iniciado para la obtención de minerales con acción biológica como el Selenio (Se), el primer experimento con este método se logró un rendimiento de Se del 100% a partir de su matriz biológica, se obtuvo la recuperación total del Se en un tiempo de 30 segundos,

siendo éste un tiempo record en comparación de los métodos tradicionales, los cuales ocupaban un total de 12 horas (Capelo *et al.*, 2004). El uso de ultrasonido produce la cavitación, la cual en sonoquímica ofrece importantes beneficios, el efecto que tiene éste fenómeno sobre las enzimas es el aumento de la velocidad máxima de reacción (V_{max}) pero sin alterar la constante de Michaelis (K_m).

Una revisión de varios experimentos usando la extracción enzimática asistida por ultrasonido realizado por Vale *et al.* (2008) muestra las distintas condiciones usadas para la obtención de los componentes de interés. En el artículo se hace sugerencia en las variantes para realizar una extracción deben ser la selección de un equipo de ultrasonido, tiempo de tratamiento, potencia, temperatura, uso de enzimas adecuadas y concentración enzimática como las más importantes.

El uso de este método en el área alimenticia es relativamente nuevo. Distintos autores han logrado la extracción de varios componentes vegetales abarcando flavonoides (Quiang *et al.*, 2011), aminoácidos yodados (Romaris-Hortas, 2013) y glúcidos (Wang *et al.*, 2014). Las extracciones fueron desarrolladas con el uso de varias enzimas, entre las que destacan α -amilasa, celulasa, pectinasa y pancreatina, de igual forma todas las extracciones emplearon un baño de ultrasonido como equipo de sonicación.

3.8. Generalidades del ultrasonido

La definición de ultrasonido (US) es simplificada a “sonidos agudos inaudibles por el oído humano” (Mason, 2002). Dependiendo los rangos de la aplicación de esta radiación sonora puede aplicarse a los hogares, tal como el uso de alarmas o limpiadores de joyería. La aplicación en los hospitales abarca desde la destrucción de litos renales sin cirugía, bisturíes ultrasónicos de precisión, así como la observación del desarrollo fetal en el embarazo. En la industria se abarca desde la soldadura plástica, la observación de productos e interferencias, la síntesis de compuestos químicos finos, emulsionantes de cosméticos y alimentos, y la limpieza a gran escala. En la figura 2 se muestra los rangos de sonido y los principales campos de aplicación de los ultrasonidos. Los seres humanos pueden escuchar frecuencias de alrededor de 16 Hz a 18 kHz. La amplia gama de los ultrasonidos que abarca las frecuencias de 20

kHz a la gama de GHz se puede dividir en dos regiones: ultrasonido de potencia y ultrasonido de diagnóstico (figura 2) (Priego-Capote, *et al.*, 2007).

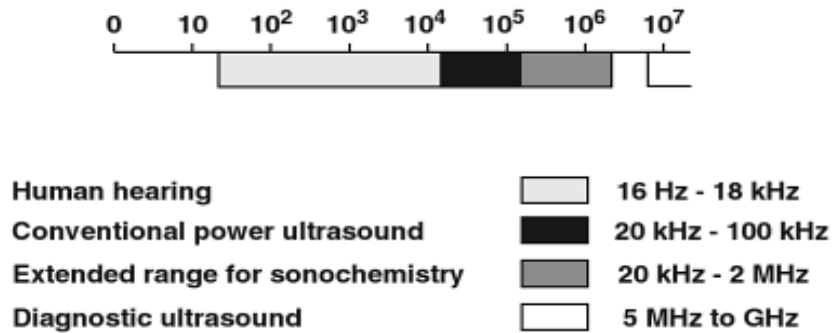


Figura 2. Rango de sonido y sus aplicaciones (Mason, 2002).

3.8.1.1. Ultrasonido de potencia

El ultrasonido de potencia (baja frecuencia, alta potencia) produce la energía acústica suficiente para que se produzca la cavitación. La cavitación es el origen de los efectos sonoquímicos (figura 3) con capacidad de alcanzar una temperatura de hasta 5000°C, presiones de 1000 atm, formación de radicales de alta reacción y la erosión mecánica de sólidos (Vale *et al.*, 2008).

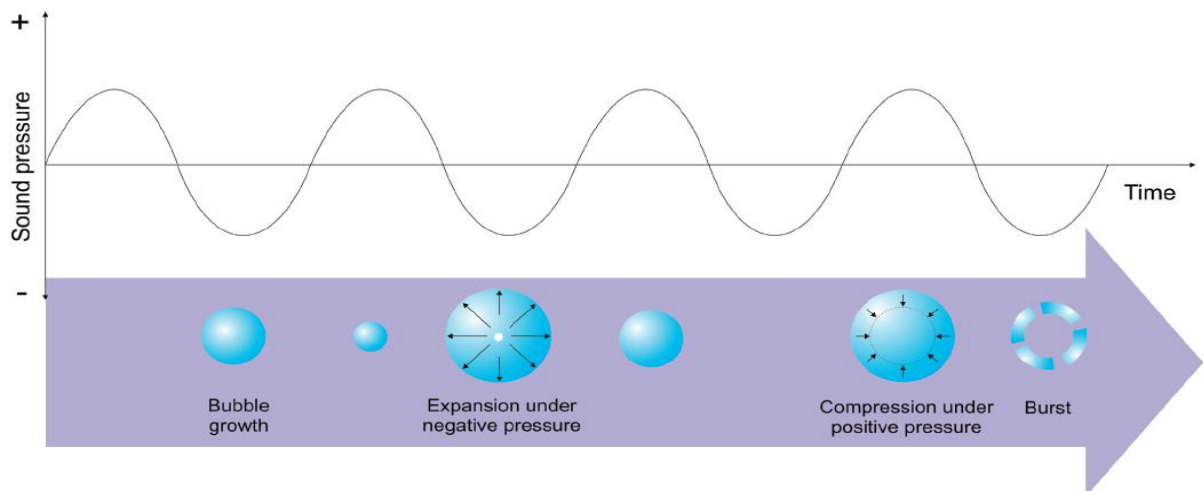


Figura 3. Principio de la acción de cavitación en un medio líquido (Brnčić *et al.*, 2009).

La sonoquímica práctica abarca frecuencias que por lo general van de 20 a 40 kHz, simplemente porque se trata de la gama normalmente ofrecida por los equipos de laboratorio. Sin embargo, la cavitación acústica en líquidos puede ser generado muy por encima de las frecuencias anteriores, nombrado como rangos recientes (100kHz) (Priego-Capote, *et al.*, 2007).

3.8.1.2. Ultrasonido de diagnóstico

El ultrasonido de diagnóstico (alta frecuencia, baja potencia) posee una amplitud baja, alrededor de los 5 MHz y por encima, lo que no produce cavitación, por lo que se puede usar para la exploración médica, análisis químicos y el estudio en los fenómenos de relajación, entre otras aplicaciones.

3.8.2. Aplicación industrial del ultrasonido

Debido al uso del ultrasonido desde los años 1900's, la aplicaciones a varias ramas de la ciencia así como la ingeniería han sido bastas. En la tabla 4 se muestra las aplicaciones más importantes en cada campo.

3.8.3. Efecto de la radiación ultrasónica sobre material vegetal

En su mayoría, los procesos de extracción de compuestos vegetales se realizan a partir de material vegetal seco. Dicha deshidratación del material vegetal produce cambios físicos y químicos sobre la laminilla media y la pared celular. Tales modificaciones ocasionan una pérdida de la difusión en la membrana así como la pérdida de la ósmosis. Por tal motivo las extracciones a partir de material vegetal seco se dividen en dos etapas:

- (i) Rehidratado del material vegetal con solventes para facilitar la hinchazón y el proceso de hidratación;
- (ii) La transferencia de constituyentes solubles del material vegetal hacia el solvente por medio de difusión y el proceso de ósmosis.

Durante la segunda etapa se requiere energía adicional para acelerar el proceso de movilización de los compuestos vegetales (Uso de agitación, aumento de la temperatura o con uso de vibración).

De acuerdo a lo publicado por Toma *et al.* (2001), se especifica que el fenómeno de la cavitación produce una mayor tasa de hinchamiento por parte de la pared celular y de la laminilla media, las cuales toman radicales hidroxilo del solvente. Este proceso incrementa la velocidad en la primera etapa de la extracción (rehidratación), creando que la laminilla media obtenga una consistencia más laxa y maleable, produciendo vibraciones y posteriormente daños mecánicos al material vegetal. Es de esta forma que el fenómeno de cavitación así como la producción de vibraciones produce agrietamientos y formación mellas en el tejido vegetal, lo que facilita la transferencia de los compuestos vegetales de interés hacia el solvente.

Es importante resaltar que los experimentos realizados por Toma *et al.* (2001) se usaron frecuencias desde los 20 kHz hasta los 500 kHz, encontrando un incremento en la hidratación de la laminilla media a frecuencias cercanas a los 500 kHz y un efecto más intenso en el daño al tejido vegetal con frecuencias alrededor de los 20 kHz.

Como conclusión, los autores enfatizan que el uso de ultrasonido en la extracción de componentes solubles mejora significativamente el rendimiento, incluso si el efecto de sonicación ha sido aplicado en un tiempo muy corto.

3.8.4. Efecto de la radiación ultrasónica sobre enzimas.

Desde hace varios años, el ultrasonido ha sido usado como un método para la inactivación enzimática, sin embargo recientemente se ha reportado que el uso de ultrasonido no inactiva a todas las enzimas, especialmente cuando es usado bajo condiciones leves (Gogate, *et al.*, 2009).

Condiciones de ultrasonidos a alta intensidad así como la sonicación a tiempos muy extensos pueden desnaturalizar a las enzimas. A diferencia de esto, el uso del ultrasonido a frecuencias y niveles de intensidad apropiados pueden mejorar la actividad enzimática (Mason, *et al.*, 1996). Se ha reportado que el ultrasonido puede

causar cambios conformacionales en las moléculas de proteínas sin la alteración de la estructura integral de la enzima (Braginskaya, *et al.*, 1990).

Actualmente se tiene reporte de trabajos en mejoramiento de la actividad de diversas enzimas con la irradiación ultrasónica (Souza, *et al.*, 2013; Guiseppi-Elie, *et al.*, 2009; Bashair, *et al.*, 2013). Nguyen *et al.* (2013) reportó que con el uso de ultrasonido a una intensidad de 12 W/ml se logró una mejora del 18% de la celulasa, sin embargo, no se hace un estudio detallado de la acción sonicación-enzima.

Recientemente, Subhedar *et al.* (2014) reportó ampliamente el efecto que tiene la cavitación sobre el grupo de las celulasas, así como las mejores condiciones de trabajo para la enzima con el uso de la sono-biotecnología. En dicho trabajo se describe el efecto que el ultrasonido tiene sobre la actividad enzimática, las constantes cinéticas, parámetros termodinámicos y la estructura de la enzima, como se muestra a continuación:

- Efecto del ultrasonido sobre la actividad enzimática: La intensidad del ultrasonido tiene un importante efecto sobre la actividad catalítica de la enzima. Esto es debido a que a intensidades leves se produce una cavitación estable, la cual produce oscilaciones capaces de afectar la conformación espacial de la enzima y por tanto el aumento de su actividad, sin embargo, el someter a la enzima a intensidades mayores a 17.33 W/cm² produce una ruptura de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals llevando a un daño en la cadena polipeptídica y a la inactivación de la enzima. Adicionalmente, el aumento extremo en temperatura y presión del medio producido por ultrasonido a altas intensidades provoca la generación de radicales hidroxilo e hidrógeno los cuales reaccionan con la enzima causando su inactivación.
- Efecto del ultrasonido sobre las constantes cinéticas: La aplicación de ultrasonido a la intensidad adecuada produce un incremento en la V_{max} indicando un aumento en el movimiento de los reactantes hacia el centro activo de la enzima. Por otro lado, hay una disminución en el valor de la K_m pudiéndose deber a las presiones intensas, fuerzas de cizalla y altas temperaturas generadas como resultado de la cavitación ultrasónica.

- Efecto del ultrasonido sobre parámetros termodinámicos: El uso del ultrasonido sobre la enzima reduce de forma marcada la energía de activación en hasta un 65%, por lo cual la reacción de hidrólisis producida por la celulosa se da fácilmente. Por otro lado, la ΔG decrece en un 1.8% después del tratamiento con ultrasonido, lo que representa el incremento de la actividad celular. De igual forma, hay una reducción en los valores de ΔH y ΔS , lo cual es debido posiblemente a cambios conformacionales experimentados por la enzima. Dichos cambios pueden ser atribuidos a la ruptura de enlaces por puente de hidrógeno o modificaciones oxidativas en residuos amino terminales produciendo entrecruzamiento y agregaciones.
- Efecto del ultrasonido sobre la estructura enzimática: La radiación ultrasónica tiene un efecto sobre la estructura secundaria de la enzima, esto debido probablemente a la ruptura de enlaces, lo cual afecta la estructura terciaria, haciendo que haya una reducción de regiones hidrofóbicas en la superficie de la enzima, así como la posible exposición de su sitio activo. Tal resultado fue confirmado mediante el efecto de fluorescencia que presentan ciertos aminoácidos aromáticos.

Es por los resultados obtenidos que el uso de radiación ultrasónica para el mejoramiento en la actividad enzimática se vuelve una herramienta para el uso de la misma en obtención de residuos así como de compuestos logrados por catálisis enzimática.

4. JUSTIFICACIÓN

La tendencia actual de los consumidores a buscar edulcorantes que sean naturales y con bajo índice calórico se ha convertido en un reto para la industria alimentaria. Los glucósidos de esteviol pertenecientes a la *Stevia rebaudiana* son una alternativa natural de edulcorantes sin calorías. Dichos compuestos poseen efectos positivos a la salud humana; tal como el control de los niveles de glucosa en sangre, sobre la tensión arterial, prevención de caries, entre otros. Actualmente existen varios procedimientos tanto convencionales como no convencionales para la obtención de los glucósidos de esteviol cuyo principal objetivo es la mejora de los rendimientos, sin embargo, no todos los métodos proporcionan la obtención total de dichos compuestos, además de requerir tecnología de alto costo.

La aplicación de nuevas tecnologías para la extracción óptima de los glucósidos de esteviol ofrece una alternativa viable. El uso de métodos de extracción tales como el enzimático y ultrasónicos ha mostrado buenos rendimientos en la obtención de estos glucósidos, sin embargo, el uso de un método enzimático asistido por ultrasonido aún no se ha implementado para esta planta. La aplicación de éste ya se ha llevado a cabo sobre varias muestras biológicas logrando la extracción total de los compuestos de interés, de forma que se ha comprobado una mejora en el rendimiento en contraste con el uso de las técnicas enzimáticas o ultrasónicas por separado. Es por ello que este método de extracción aplicado a *S. rebaudiana* se propone como una opción para obtener mayores rendimientos de esteviósido y rebaudiósido A en comparación de los ya reportados.

5. HIPÓTESIS

La implementación de la extracción enzimática asistida con ultrasonido proporcionará una mayor obtención de esteviósido y rebaudiósido A en comparación a métodos enzimáticos, métodos con ultrasonido y métodos convencionales de extracción.

6. OBJETIVOS

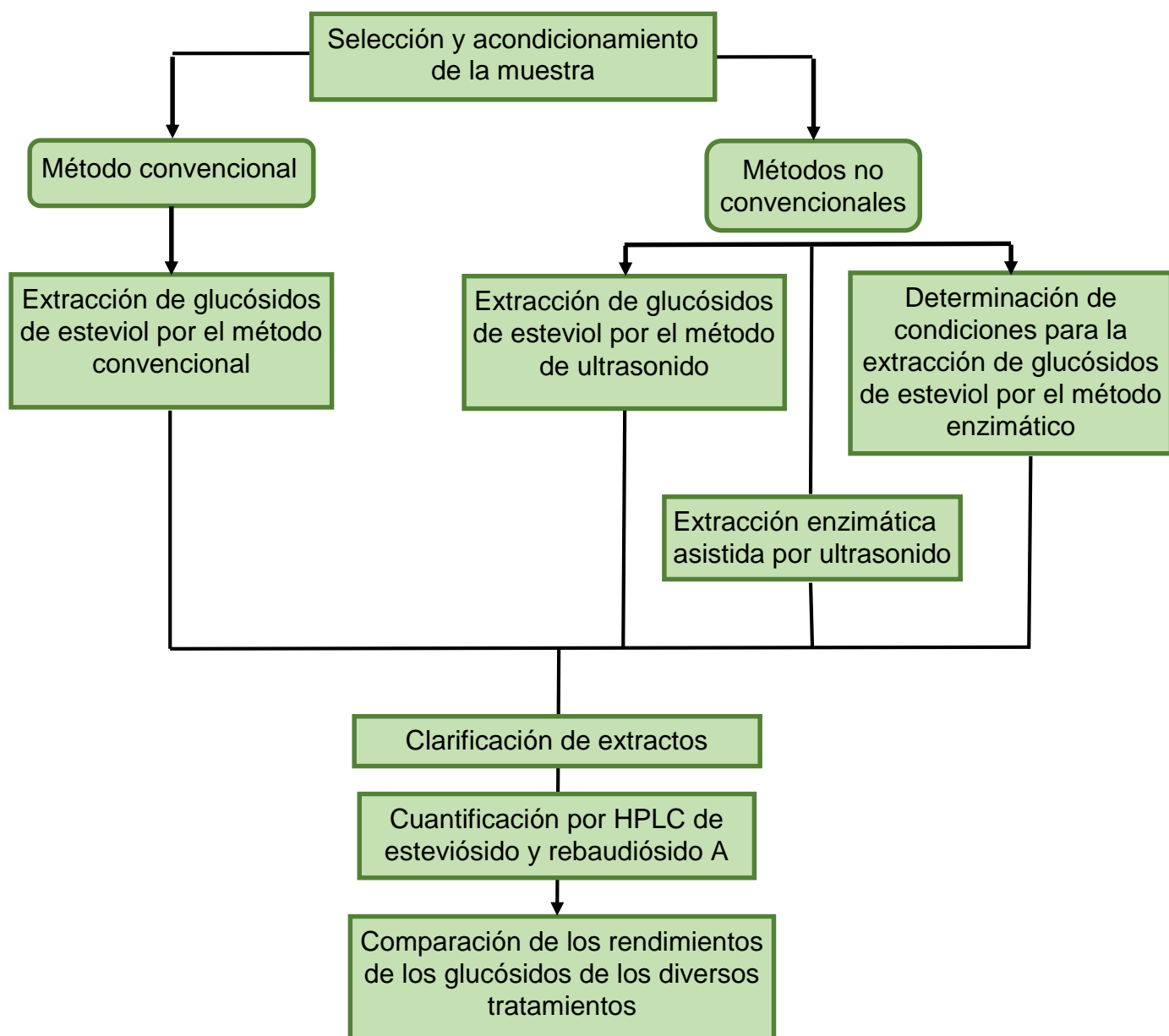
6.1. Objetivo General

Establecer las condiciones para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de un método enzimático asistido por ultrasonido y su comparación con el método convencional.

6.2. Objetivos Particulares

- Extraer por método químico convencional al esteviósido y rebaudiósido A.
- Extraer por el método de ultrasonido al esteviósido y rebaudiósido A.
- Establecer las condiciones para la extracción enzimática de esteviósido y rebaudiósido A y posteriormente la aplicación de asistencia por ultrasonido.
- Cuantificar el rendimiento de esteviósido y rebaudiósido A de los distintos métodos de extracción mediante HPLC para su comparación.

7. DIAGRAMA DE TRABAJO



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Material de laboratorio

Se usó material de vidrio y reactivos grado analítico para el proceso de extracción. Para el proceso de cuantificación se utilizó reactivos grado HPLC y estándares de esteviósido y rebaudiósido A (TCI®).

8.2. Material biológico

Hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni proporcionadas por Diabetic Tienda de Córdoba, Veracruz.

Enzimas: Celulasa, Hemicelulasa y pectinas (Enmex®).

8.3. Métodos

Los métodos se muestran a continuación en la tabla 4 y el equipo necesario se muestra en la tabla 5.

Tabla 4. Métodos a usar para el experimento.

Determinación	Método	Referencia
Extracción convencional	Extracción por Soxhlet	Afandi <i>et al.</i> , 2013
Extracción por ultrasonido	Extracción por radiación ultrasónica	Modificado de Liu <i>et al.</i> , 2010
Extracción enzimática	Enzimático	Modificado de Puri <i>et al.</i> , 2012
Extracción enzimática asistida por ultrasonido	Extracción enzimática en medio con radiación ultrasónica	Modificado de Wang <i>et al.</i> , 2014
Clarificación de extracto	Clarificación por filtración	Modificado de Afandi <i>et al.</i> , 2013
Cuantificación extractos	Cuantificación por HPLC	Modificado de Bergs <i>et al.</i> , 2012

Tabla 5. Equipos necesarios para la experimentación.

Equipo	Marca	Modelo
Balanza Analítica	Acculab	LA-200
Baño de ultrasonido	Bransonic	8510R-DTH
Columna para HPLC RP-C18	Agilent Technologies	LiChrospher 100
Cromatógrafo HPLC	HP Agilent 1100	1100 G1312A, Software: OpenLAB CDS Chem Station 490 Micro GC Driver v1.9.0
Rota evaporador	Heidolph	VV2011
Termobalanza	Ohaus	MB45

9. METODOLOGÍA

9.1. Selección y acondicionamiento de la materia prima

El material usado fue hojas de *S. rebaudiana* (Bertoni), variedad criolla, la cuales fueron proporcionadas de una sola toma y se secaron por exposición al sol dentro de un domo de plástico por 2 días. La selección de las muestras se hizo con hojas con un porcentaje de humedad no mayor al 3% y libre de manchas.

Una vez seleccionadas, se pulverizaron en un mortero, el polvo se tamizó y almacenó a temperatura ambiente en bolsas de sellado hermético, de acuerdo a lo reportado por Afandi *et al.* (2013).

9.2. Extracción de glucósidos de esteviol por el método convencional

El pulverizado de hoja se extrajo con metanol mediante un sistema Soxhlet en una proporción de 1:10 (w/v) y una temperatura de 50°C por 2 horas (equivalente a 4 reflujos) de acuerdo a lo reportado por Afandi *et al.* (2013).

9.3. Extracción de glucósidos de esteviol por el método de ultrasonido

El pulverizado, 2.5 g de hoja, se disolvió en una mezcla de 12.5 ml de una solución buffer de acetato de sodio (0.02 M, pH 5) y 25 ml de metanol. La mezcla fue expuesta a sonicación en un baño de ultrasonido de 44 kHz por 60 min a temperatura ambiente, el método es un modificado de acuerdo a lo reportado por Liu *et al.* (2010).

9.4. Extracción de glucósidos de esteviol por el método enzimático

Se pesaron 2.5 g de hoja pulverizada en un matraz Erlenmeyer y se disolvieron en una mezcla de 12.5 ml de solución buffer de acetato de sodio (0.02 M, pH 5) y 25 ml de metanol. Por otra parte se realizó una mezcla de tres enzimas: celulasa, hemicelulasa y pectinasa para obtener una concentración de 0.2 g/ml de cada enzima. La mezcla del extracto fue tratada con dos cantidades diferentes de enzimas, al 0.5% y al 3.0% con respecto al peso total del material vegetal, posteriormente la mezcla se trató a diferentes temperaturas, 50, 55 y 60°C por 60 min. Este método fue modificado de acuerdo a lo reportado por Puri *et al.* (2012).

9.5. Extracción de glucósidos de esteviol por el método enzimático asistido por ultrasonido

Se pesaron 2.5 g de pulverizado de hoja y se disolvieron en 12.5ml de solución buffer de acetato de sodio y 25 ml de metanol. Se agregó 0.5% de enzimas, según lo obtenido en el apartado 9.4. Posteriormente, la mezcla se expuso a sonicación en un baño de ultrasonido por 1 hora.

9.6. Clarificación de extracto

El extracto crudo se filtró con papel filtro de poro fino. El filtrado fue mezclado con carbón activado en una relación de 1 gramo de carbón por cada 50 ml de extracto, se dejó la mezcla en agitación por 20 minutos y después se filtró nuevamente hasta retirar el restante de carbón activado.

9.7 Obtención de concentrado en polvo

El filtrado fue concentrado por evaporación en un sistema de rotaevaporación acoplado con vacío. El concentrado se lava con metanol y nuevamente se concentró, siguiendo el ciclo de lavado por tres veces o hasta obtener un concentrado de color amarillo tenue y sin presencia de agua. El último lavado se deja a evaporación hasta obtener un polvo fino.

9.8. Condiciones del análisis de esteviósido y rebaudiósido A

Para la determinación de esteviósido y rebaudiósido se ocupó el método analítico de HPLC con equipo HP 1100 (Módulo de separación DAD) y un sistema cuantificador (Agilent OpenLAB CDS Chem Station 490 Micro GC Driver v1.9.0. Software). Se utilizó una columna LiChrospher® 100, 250-4 mm RP-18c (5 μ m, Agilent) a 20°C. Las muestras (10 μ L) fueron eluidas a un flujo de 0.7 mL/min, utilizando una fase móvil isocrática de agua (H₂O) y acetonitrilo (CH₃CN) relación 65:35 respectivamente. Los compuestos fueron detectados a 210 nm utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD Agilent HP 1100 G1312A). La cuantificación de esteviósido y rebaudiósido se realizó por el método estándar externo, por lo que se construyeron curvas de calibración con soluciones estándar de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL en agua con los compuestos puros de Esteviósido (TCI) Rebaudiósido A (TCI).

Los glucósidos extraídos por los diferentes métodos fueron analizados por HPLC utilizando un sistema isocrático de agua y acetonitrilo a la proporción de 65:35 respectivamente usando la misma columna RP-18 con un flujo de 0.7 ml/min.

Con la finalidad de conocer si existían diferencias en la producción de este tipo de compuestos, los cromatogramas obtenidos de cada material vegetal analizado fueron comparados entre sí.

9.9. Diseño de experimentos

Los experimentos se realizaron por triplicado.

Se realizó un análisis estadístico ANOVA ($p < 0.05$) para determinar diferencias entre los métodos de extracción no convencionales y convencional, para poner de manifiesto las posibles diferencias entre ambos métodos. El análisis fue desarrollado mediante el uso del Software Minitab® 17.1.0.0.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

10.1. Preparación de la materia prima

El método de secado a sol empleado en este trabajo para las hojas de *S. rebaudiana* mediante el uso de un domo tuvo un buen desempeño ya que se alcanzó una deshidratación del 97%.

La pulverización de las hojas fue uniforme, encontrándose tamaños de partícula de 850 μm . No se encontraron cambios en la apariencia del polvo tales como oscurecimiento o humedecimiento. Estos resultados son considerados buenos para el proceso de extracción.

10.2. Extracción convencional con equipo Soxhlet

Los rendimientos obtenidos de esteviósido y rebaudiósido A fueron: 17.39 ± 0.40 mg/g de hoja y 59.58 ± 0.30 mg/g de hoja respectivamente, utilizando el equipo Soxhlet. Estos resultados son mayores a los reportados por Afandi *et al.* (2013) donde se logra un máximo de 22.4 mg/g de hoja para rebaudiósido A, siguiendo las mismas condiciones de trabajo. Se encuentra que los resultados reportados por Teo *et al.* (2009) para el uso de sistema Soxhlet son de 14.07 ± 0.15 mg/g de hoja para el esteviósido y de 14.98 ± 0.15 mg/g de hoja para el rebaudiósido A, los cuales son menores a los reportados en este trabajo. En otros trabajos reportados se observaron resultados similares para el rebaudiósido A, 28.08 mg/g de hoja (Liu, *et al.*, 2010) y 12.0 mg/g de hoja (Jaitak, *et al.*, 2009).

10.3. Extracción asistida por ultrasonido

El rendimiento obtenido fue de 16.81 ± 1.09 mg/g de hoja para el esteviósido y de 61.31 ± 3.55 mg/g de hoja para el rebaudiósido A usando la extracción asistida por ultrasonido. Debido al uso de un ultrasonicador de baño, el cambio de potencia, frecuencia, y temperatura no fue posible, por lo que se tuvo que realizar a temperatura ambiente, resultando un rendimiento de glucósidos de esteviol menor al reportado por

Liu *et al.* (2010) (169 ± 1.7 mg/g de hoja), sin embargo, el rendimiento de rebaudiósido A obtenido en el presente estudio (61.31 ± 3.55 mg/g de hoja) fue mayor al reportado por el mismo autor (48.77 ± 1.55 mg/g de hoja). Resultados presentados por Gasmalla *et al.* (2014) mostraron un aumento similar en la extracción de rebaudiósido 'A' a una temperatura de extracción de 30°C. Esto posiblemente fue debido a la adición por separado de etanol e isopropanol en cantidades de 30% y 60% respectivamente, por el aumento de la potencia en el ultrasonido, así como el uso de diversas variedades de *S. rebaudiana*, LUYU-131 (Liu, *et al.*, 2010) y criolla (presente trabajo). Es por ello que la adición de metanol en el presente trabajo pudo haber tenido un efecto sinérgico resultando en una mayor extracción de rebaudiósido 'A' a pesar de la temperatura de trabajo (20°C).

Debido a la falta en la variación de la potencia del equipo, la extracción se realizó durante una hora, excediendo por 20 minutos el tiempo de extracción de Liu (*et al.*, 2010), así como el tiempo reportado por Gasmalla *et al.* (2014) (6 minutos para extracción con etanol al 30% y 18 minutos para la extracción con isopropanol al 60%).

10.4. Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas en la extracción enzimática

La temperatura tiene una importante influencia en la actividad enzimática ($p < 0.05$) encontrándose que a los 50°C se obtuvieron los mejores rendimientos tanto de esteviósido (20.56 ± 2.21 mg/g de hoja) como de rebaudiósido A (68.40 ± 7.88 mg/g de hoja). Conforme se incrementó la temperatura, el rendimiento disminuía gradualmente para el caso del uso de celulasa, hemicelulasa y pectinasa, observándose el menor rendimiento a la temperatura de 60°C (19.25 ± 0.78 mg/g de hoja para esteviósido y 61.97 ± 2.88 mg/g de hoja para rebaudiósido A), sin embargo, dichos rendimientos son mayores a los blancos como se observa en las figuras 4 y 5. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Puri *et al.* (2012) debido que a los 50°C existe una sinergia entre la mezcla enzimática y la posible degradación de la pared celular, logrando así rendimientos mayores que a temperaturas cercanas a los 60°C. Se menciona que la pectinasa y celulasa tienen un descenso en el rendimiento

sobrepasando los 60°C, siendo similar al observado en este trabajo, esto es debido a la desnaturalización de la proteína y evidente inactivación de la misma, sin embargo, la hemicelulasa tiene su mayor rendimiento a los 60°C (Puri, *et al.*, 2012).

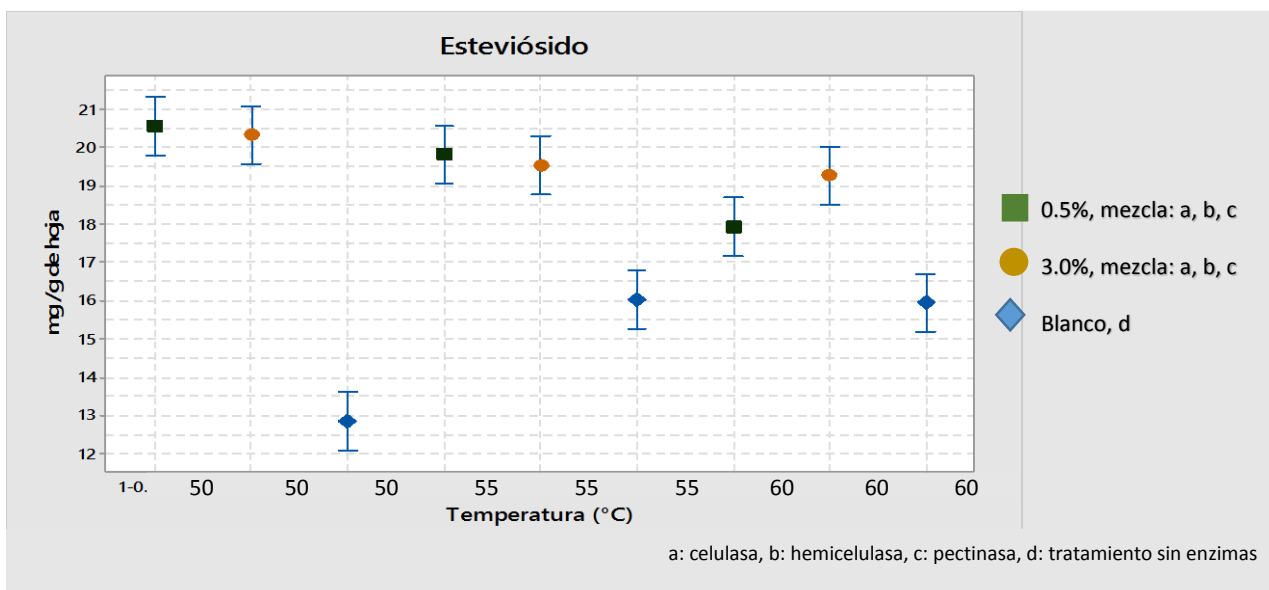


Figura 4. Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas en la extracción de esteviósido.

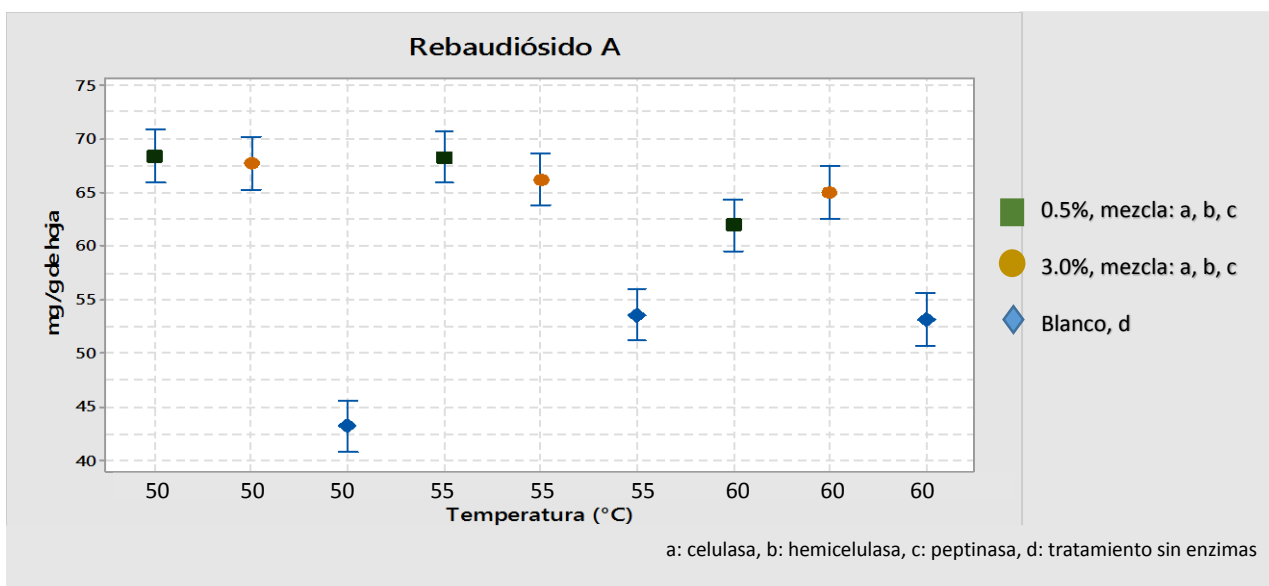


Figura 5. Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas en la extracción de rebaudiósido A.

El uso de la mezcla de celulasa, hemicelulasa y pectinasa al 0.5% incrementó los rendimientos de esteviósido y rebaudiósido A en comparación con el uso de la mezcla de enzimas al 3.0% a las temperaturas de 55 y 60°C (tablas 6 y 7) esto posiblemente debido a una competencia entre las enzimas así como una acumulación de las mismas, interrumpiendo su desempeño al utilizar el 3.0%. Por otro lado no hay diferencia significativa ($p < 0.05$) en el uso de ambos porcentajes de enzimas a 50°C, esto representa una ventaja ya que se puede obtener el rendimiento más alto con una disminución en el consumo de la enzima. Se encontró diferencias con lo reportado por Puri *et al.* (2012), ya que el uso de las mismas enzimas al 2.0% y 3.0% fueron las concentraciones que demostraron mayores rendimientos, siendo el porcentaje de 0.5% el que observó el menor rendimiento. Dichos rendimientos fueron obtenidos usando celulasa, hemicelulasa y pectinasa de forma individual, para posteriormente ser agregadas en una mezcla a los porcentajes previamente analizados con el mayor desempeño. En este trabajo no se realizó variación en las enzimas de manera individual, por lo cual no es comparable con lo reportado por Puri *et al.* (2012).

Tabla 6. Rendimiento en la extracción enzimática de esteviósido.

Temperatura (°C)	Rendimiento (mg/g de hoja seca)		
	Blanco	0.50%	3.00%
50	12.38 ± 0.12 _a	20.56 ± 2.21 _c	20.32 ± 1.18 _c
55	16.01 ± 0.04 _b	19.81 ± 1.78 _d	19.52 ± 1.06 _{d,f}
60	15.93 ± 0.27 _b	17.92 ± 0.70 _e	19.25 ± 0.78 _f

Tabla 7. Rendimiento en la extracción enzimática de rebaudiósido A.

Temperatura (°C)	Rendimiento (mg/g de hoja seca)		
	Blanco	0.50%	3.00%
50	43.15 ± 0.10 _a	68.40 ± 7.88 _c	67.77 ± 3.41 _c
55	53.59 ± 0.15 _b	68.32 ± 5.29 _c	66.22 ± 2.65 _e
60	53.14 ± 0.19 _b	61.97 ± 2.88 _d	65.03 ± 2.10 _f

10.5. Extracción enzimática asistida por ultrasonido y su comparación con los distintos métodos de extracción.

El proceso de extracción enzimática asistida por ultrasonido (EEAU) mostró un rendimiento del esteviósido de 16.19 ± 2.73 mg/g de hoja y de rebaudiósido A de 56.72 ± 9.40 mg/g de hoja, siendo menor al obtenido por los distintos métodos realizados. En la tabla 8 se muestran los rendimientos de cada método de extracción. Es importante resaltar que la EEAU se vió limitada al uso del ultrasonicador de baño, por lo que la variación en la temperatura no fue posible. Los resultados del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática muestran que la extracción debe ser a 50°C , cuando se utilizan temperaturas a 20°C afecta de forma drástica el desempeño de dichas enzimas resultando en un rendimiento menor apenas del 20% menos.

Tabla 8. Rendimientos de los distintos métodos de extracción.

Método de extracción	Glucósidos totales (mg/g de hoja)	Esteviósido (mg/g de hoja)	Rebaudiósido A (mg/g de hoja)
Enzimático 0.5%	88.96 ± 10.08	$20.56 \pm 2.21_a$	$68.40 \pm 7.88_a$
Ultrasonido	78.12 ± 4.64	$16.81 \pm 1.09_b$	$61.31 \pm 3.55_b$
Soxhlet	76.97 ± 0.68	$17.39 \pm 0.40_c$	$59.58 \pm 0.30_c$
EEAU	72.91 ± 12.13	$16.19 \pm 2.73_d$	$56.72 \pm 9.40_d$

Según Subhedar *et al.* (2014), el efecto sobre la celulasa a exposiciones prolongadas de radiación ultrasónica resulta en la inactividad de la misma. Dicho autor reportó un incremento de hasta 23.4% en la actividad enzimática hasta un tiempo de 30 minutos de exposición ultrasónica, así mismo el incremento se ve seriamente disminuido pasados los 50 minutos de exposición, llegando a rendimientos menores a los reportados con enzima sin uso de radiación. Estos resultados proporcionan sustento a lo observado en el presente trabajo, donde se llevó a una exposición mayor a la recomendada.

Por otro lado, el rendimiento observado para el rebaudiósido A por el método EEAU fue superior a lo reportado por diversos autores usando el método convencional: 22.4 mg/g de hoja (Afandi, *et al.*, 2013), 14.98 ± 0.15 mg/g de hoja (Teo, *et al.*, 2009), 48.77 ± 1.55 mg/g de hoja (Liu, *et al.*, 2010), y 12.0 mg/g de hoja (Jaitak, *et al.*, 2009).

El método con el mayor rendimiento fue la extracción enzimática, tanto para esteviósido como para rebaudiósido, siendo hasta 1.2 veces por encima de lo reportado para el método de EEAU (figuras 6 y 7). Así mismo, se encontró que hay una extracción mayor de rebaudiósido que de esteviósido, siendo el rebaudiósido A en promedio de 77.45% del total de la extracción. Dicho resultado es superior a lo reportado por diversos autores y con varios métodos de extracción. Esto posiblemente es debido a la variedad de *S. rebaudiana* usada en el presente estudio.

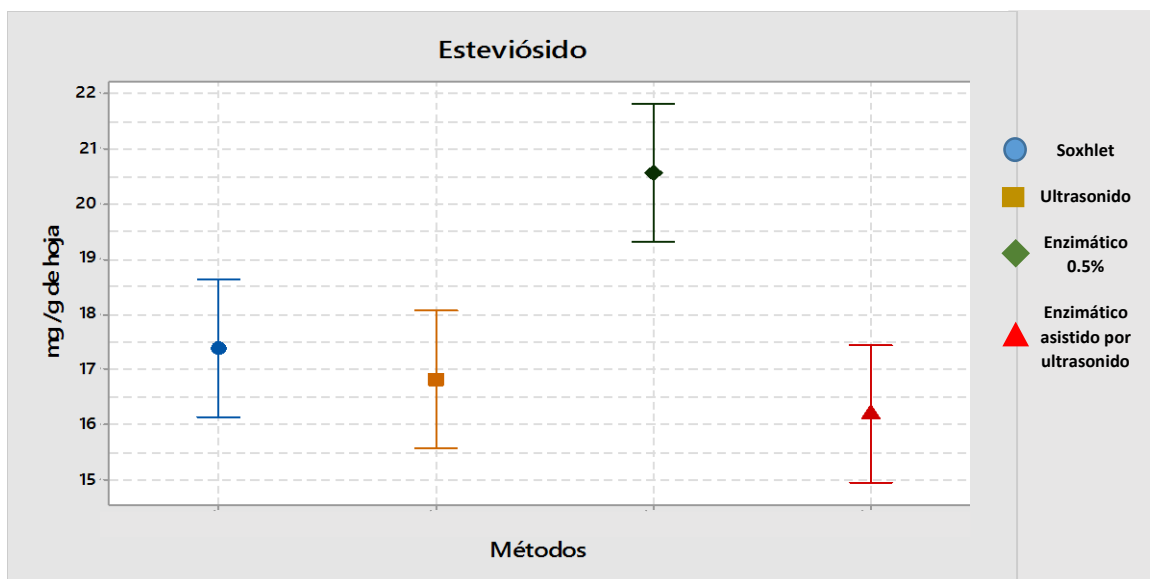


Figura 6. Comparación de los diversos métodos de extracción de esteviósido.

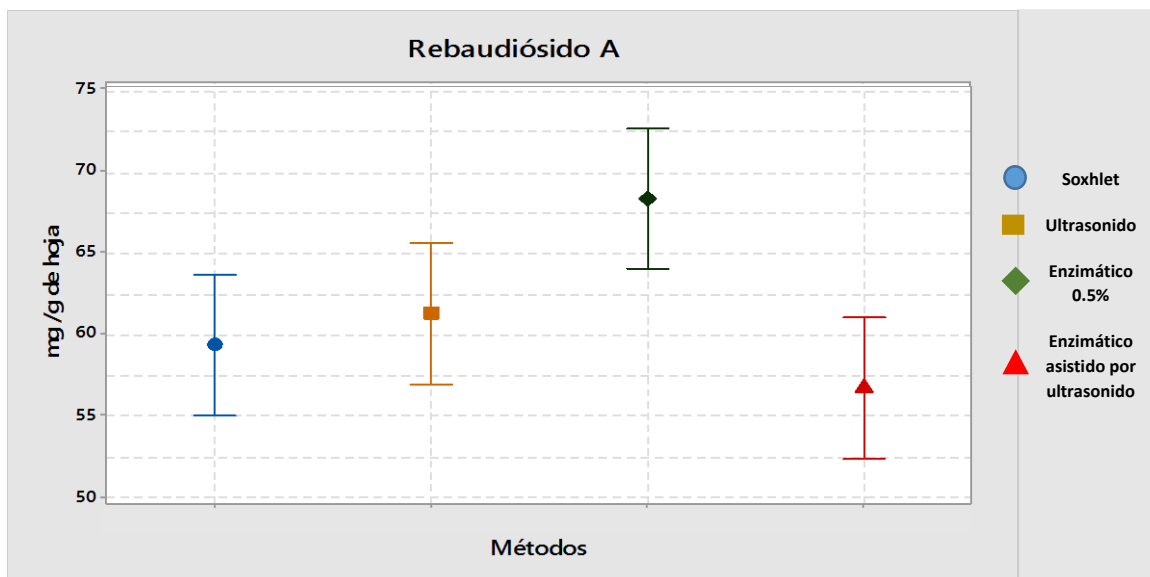


Figura 7. Comparación de los diversos métodos de extracción de rebaudiósido A.

La obtención de mayor cantidad de rebaudiósido A es de gran utilidad ya que a comparación con el esteviósido, éste tiene el máximo poder edulcorante en la planta, así como carecer del sabor amargo percibido al final del consumo del esteviósido (Afandi *et al.*, 2013).

10.6. Método de aclarado

El aclaramiento de las muestras se hizo evidente después de la primera filtración posterior al contacto del carbón activado. Se observó que el filtrado se tornaba a tonos más amarillentos con el paso de las filtraciones y enjuagues con metanol. El método de aclarado con carbón activado no ha sido reportado como agente aclarador, más bien es usado como parte de un proceso de aclarado en combinación de resinas y carbón activado (Ester-Soto, *et al.*, 2002), esto es debido a que el carbón activado no es capaz de retirar todo el color de las muestras.

Se observó que el carbón activado tenía un mejor efecto al aclarar extractos con mayor cantidad de agua, a diferencia de extractos que poseían mayor volumen de metanol.

10.7. Obtención de extracto en polvo

Los resultados obtenidos del método para la conversión del extracto líquido a polvo fueron mejores en comparación a métodos ya reportados, esto debido a que el proceso de la evaporación de los solventes (agua y metanol) fueron en un tiempo estimado de 20 minutos por muestra en comparación del proceso de más de 3 horas publicado por Afandi (*et al.*, 2013), además del mayor uso de solventes como cloroformo y butanol.

El polvo obtenido era de color amarillo pálido y de apariencia muy fina con la presencia de pequeños cristales transparentes en forma de espículas. El volumen del polvo fue variado, esto debido a la velocidad de evaporado del último lavado con metanol, así mismo como la presión de vacío generada.

10.8. Análisis de las muestras por HPLC

La adaptación del método publicado por Bergs *et al.* (2012) en el presente trabajo logró una separación adecuada de los estándares de esteviósido y rebaudiósido, los cuales fueron eluidos a los 5.194 min \pm 0.036 y 4.915 min \pm 0.044 respectivamente (figuras 8, 9 y 10). Las condiciones del análisis se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones del análisis por HPLC del esteviósido y rebaudiósido A.

Compuesto	tiempo de retención (min)*	Pendiente**	Intersección del eje Y **	Coficiente de correlación**
Esteviósido	5.194 \pm 0.036	1399.2	+48.465	0.9996
Rebaudiósido A	4.915 \pm 0.044	1225.2	+17.015	0.9985

*n=7; **A partir del área de pico de los estándares.

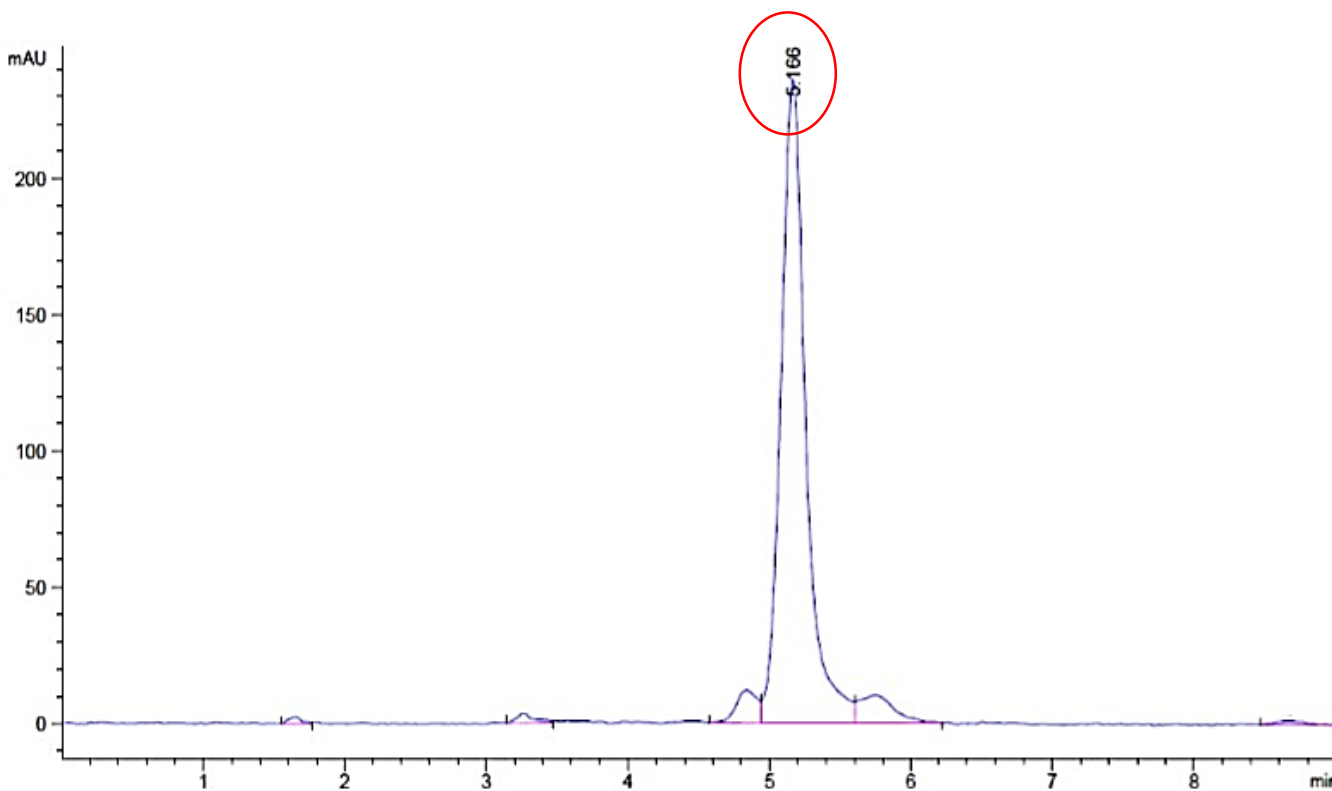


Figura 8. Cromatograma de estándar de esteviósido (5.166 min).

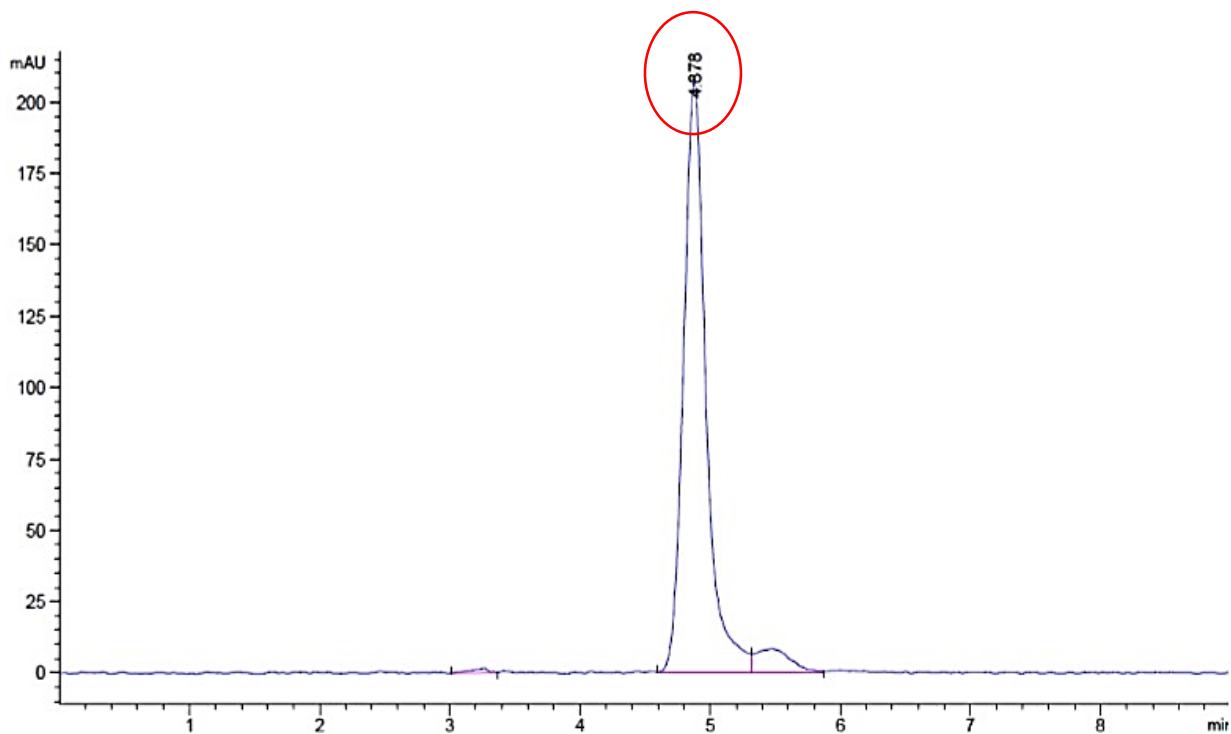


Figura 9. Cromatograma de estándar de rebaudiósido A (4.878 min).

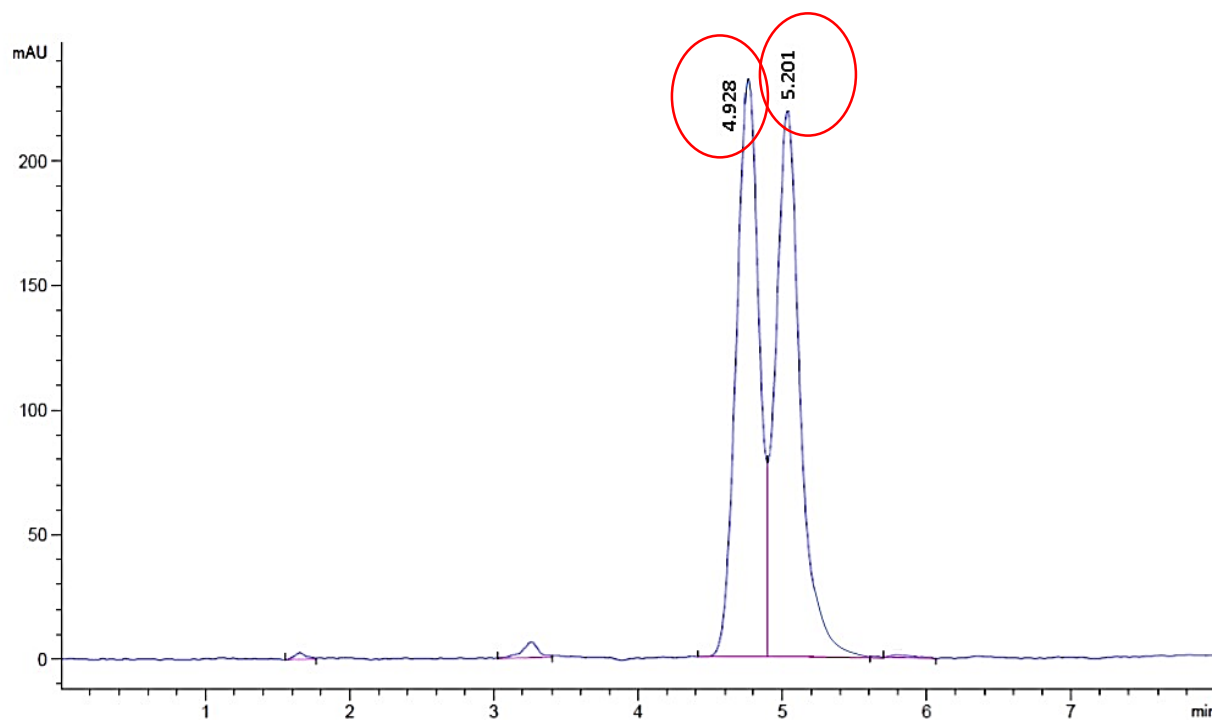


Figura 10. Cromatograma de la mezcla de esteviósido (5.201 min) y de rebaudiósido A (4.928 min).

La sensibilidad del método abarcó un mínimo de detección de hasta 0.02 mg/ml de estándar para ambos compuestos por separado, sin embargo, la sensibilidad para la detección de los compuestos en una mezcla fue de 0.1 mg/ml para cada compuesto. Dichos valores son menos sensible en comparación de 4×10^{-4} mg/mL para rebaudiósido A, según lo reportado por Bergs *et al.* (2012). Por otra parte, los tiempos de retención para ambos compuestos son menores a los reportados por el mismo autor, de modo que el tiempo de análisis por muestra es considerablemente reducido de 15 minutos a 8 minutos, lo cual en conjunto con la aplicación de un flujo de 0.7 ml/min reduce hasta un 60% el uso de solventes (fase móvil) por muestra (figuras 11 a 14). Del mismo modo, se redujo el uso de acetonitrilo reduciendo su volumen a una proporción de 35:65 (acetonitrilo:agua), a diferencia de las utilizadas por Woelwer-Rieck *et al.* (2010) de 85:15 y Kolb *et al.* (2001) de 75:25.

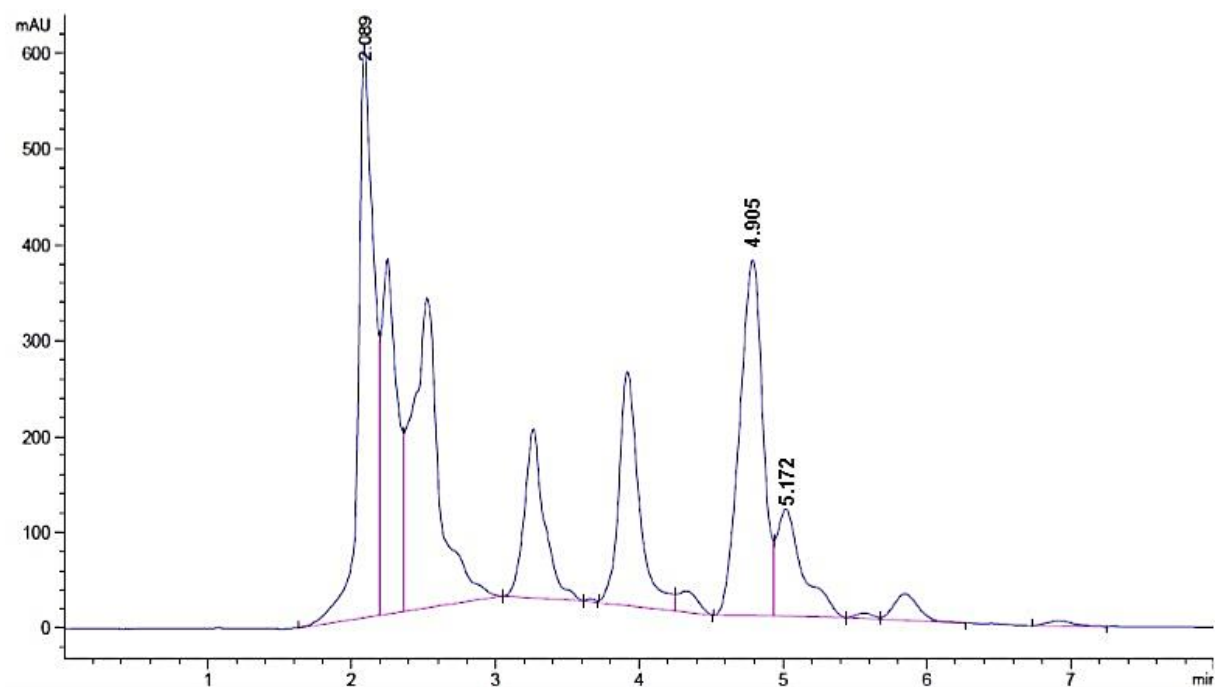


Figura 11. Cromatograma de extracción química convencional con sistema Soxhlet. Señal de esteviósido a 5.172 min y señal de rebaudiósido 'A' a 4.90 5min.

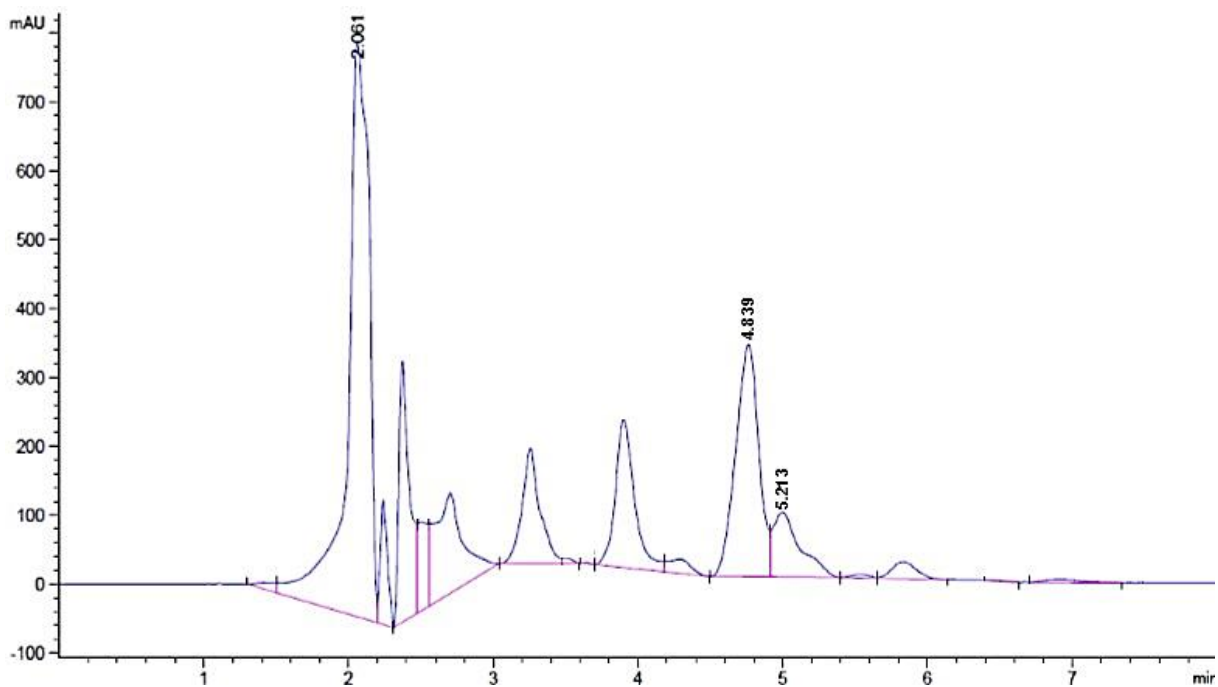


Figura 12. Cromatograma de extracción con ultrasonido. Señal de esteviósido a 5.213 min y señal de rebaudiósido 'A' a 4.839 min.

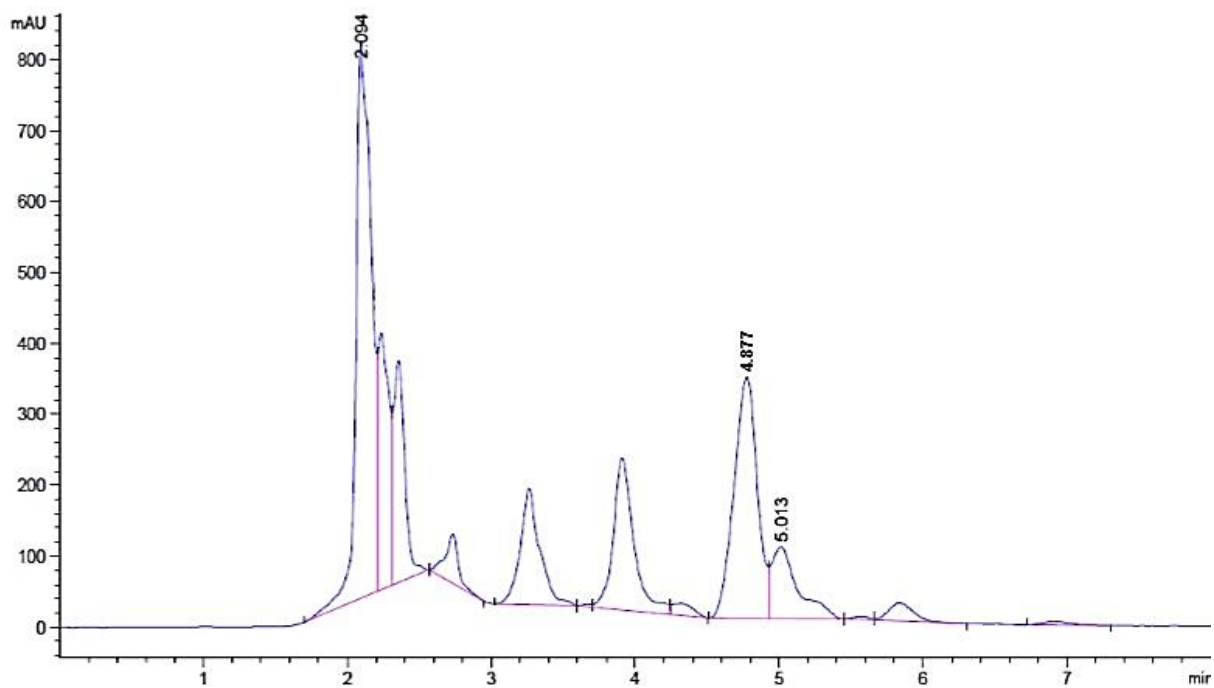


Figura 13. Cromatograma de extracción enzimática. Señal de esteviósido a 5.013 min y señal de rebaudiósido 'A' a 4.877 min.

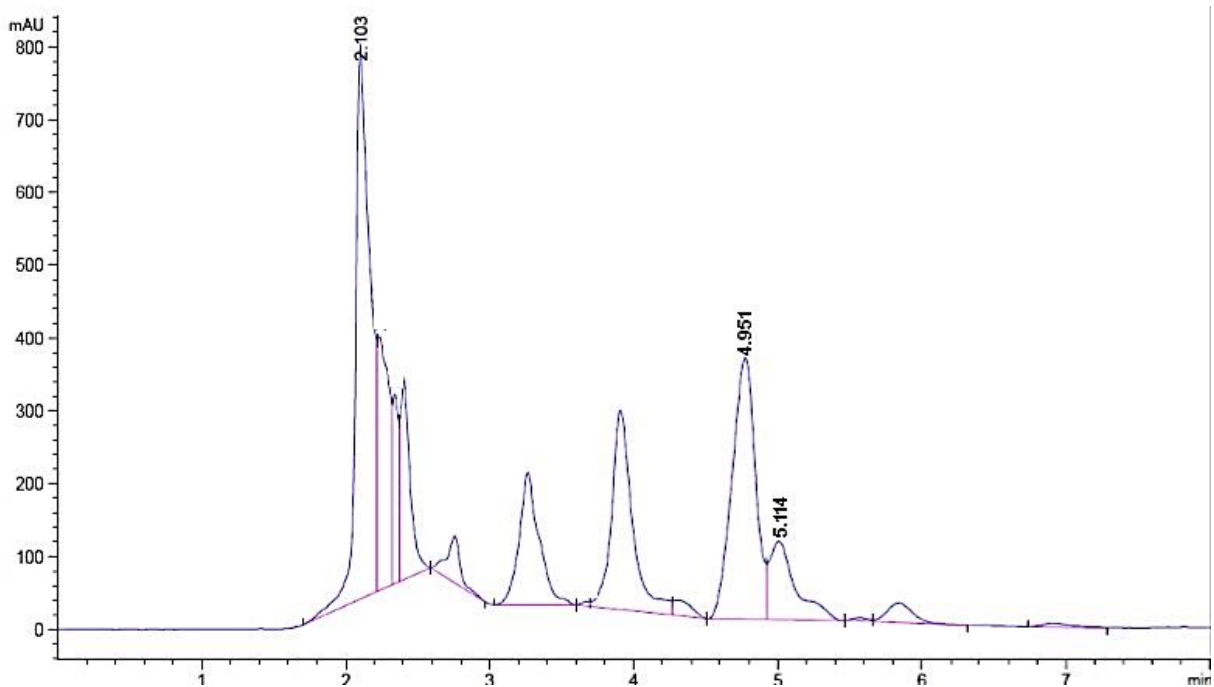


Figura 14. Cromatograma de extracción enzimática asistida por ultrasonido. Señal de esteviósido a 5.114 min y señal de rebaudiósido 'A' a 4.951 min.

Según lo reportado por Hutapea, *et al.* en 1999, el uso de columnas NH₂ aumenta la selectividad en la separación de todos los glucósidos de esteviol pero posee una baja reproducibilidad, mientras que las columnas de fase reversa, como por ejemplo la C-18, son más robustas y son adecuadas para análisis rápidos de dichos compuestos, sin embargo, tienen una poca selectividad para su separación.

11. CONCLUSIONES

- La extracción enzimática obtuvo el mayor rendimiento de glucósidos de esteviol en el presente estudio, al usar 0.5% de la combinación de celulasa, hemicelulasa y pectinasa a una temperatura de 50°C por un lapso de 60 minutos. Bajo las condiciones anteriores se logró un rendimiento de 13.9% mayor al obtenido por el método convencional.
- El uso de ultrasonido a temperatura ambiente, con una frecuencia de 44 kHz y por un lapso de 60 minutos mostró un rendimiento de 10.4% menor al método enzimático, pero 2.9% mayor al método convencional.
- El método de extracción enzimática asistida por ultrasonido demostró tener menor rendimiento en comparación con el método convencional (4.9%) y los no convencionales (17.1%), debido a una posible inactivación enzimática a las condiciones expuestas en el presente estudio.
- La extracción de rebaudiósido "A" fue en promedio 77.4% mayor en comparación con el esteviósido, esto observado en todos los métodos de extracción realizados en el presente estudio. Este fenómeno pudo haberse debido a la variedad de la planta (criolla) tanto como por el uso de metanol.
- El uso de carbón activado para el proceso de aclaramiento resultó ser efectivo en extracciones donde el volumen de agua era mayor, así mismo se corroboró que el carbón por sí solo no es capaz de remover todo el color de un extracto.
- El método adaptado para la cuantificación de esteviósido y rebaudiósido "A" demostró una adecuada separación de dichos compuestos, así como permitió el ahorro de hasta un 60% del insumo en solventes.
- De acuerdo a lo encontrado en las condiciones de temperatura, tiempo y efecto de sonicación, no hay cumplimiento de la hipótesis.

12. RECOMENDACIONES

- Usar un equipo de ultrasonido por sonda para la variación de las condiciones tales como temperatura, intensidad y frecuencia.
- Optimizar método de extracción enzimática asistida por ultrasonido para la obtención de esteviósido y rebaudiósido A.
- Estudiar la cinética enzimática de la mezcla de celulasa, hemicelulasa y pectinasa bajo una radiación ultrasónica.
- Estudiar la capacidad antioxidante que pueden tener los extractos obtenidos por los diversos métodos de extracción.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Afandi, A., Sarijan S., Kumar-Shaha, R. (2013). Optimization of rebaudioside a extraction from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) and quantification by high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science*, 1(1): 62-70.
- Barriocanal, L. A., M. Palacios, G. Benitez, S. Benitez, J. T. Jiménez, N. Jiménez y V. Rojas. (2008). Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and type 1 and type 2 diabetics. *Regulatory toxicology & Pharmacology*, 51(1):37-41.
Doi: doi:10.1016/j.yrtph.2008.02.006
- Bashari, M., Eibaid, A., Wang, J., Tian, Y., Xu, X., Jin, Z. (2013). Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (1): 155–161.
- Bergs, D., Burghoff, B., Joehnck, M., Martin, G., Schembecker, G. (2012). Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 7:147–154.
- Bertoni, M.S. (1905). Le Kaá he-é: san ature et ses propriétés. *Anales Cientificos Paraguayos*, 15:1-14.
- Bertoni, M.S. (1918). La *Stevia rebaudiana* Bertoni. La estevina y la rebaudina, nuevas substancias edulcorantes. *Anales Cientificos Paraguayos*, 6(2): 29-134.
- Bonilla C., Carmen R., Sánchez O., Manuel S., Perlaza, D. F. (2007). Evaluación de métodos de propagación, fertilización nitrogenada y fenología de stevia en condiciones del Valle del Cauca. *Acta Agronómica*, 56 (3): 131-134.
- Boonkaewwan, C., Toskulkao, C., Vongsakul, M.J. (2006). Anti- Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stevioside and Its Metabolite Steviol on THP-1 Cells, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 54: 785-9.

- Braginskaya, F.I., Zaitzeva, E.A., Zorina, O. M., Poltorak, O. M., Chukrai, E. S., Dunn, F. (1990). Low intensity ultrasonic effects on yeast hexokinase. *Radiation and Environmental Biophysics*, 29(1): 47-56.
- Brnčić M., Tripalo B., Penava A., Karlović D., Ježek D., Vikić Topić D., Karlović S., Bosiljov T. (2009) Applications of Power Ultrasound for Foodstuffs Processing. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 1(2): 32-37.
- Carakostas, M.C., Curry, L.L., Boileau, A.C., Brusick, D.J. (2008). Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology*, 46:1–10.
- Carreres, J.E. (2012). 4 aspectos clave en la innovación de nuevos productos con stevia. AINA centro tecnológico. Actualizado 12 de Noviembre de 2012. <http://tecnoalimentalia.ainia.es/web/tecnoalimentalia/consumidor-y-nuevos-productos/-/articulos/rT64/content/4-aspectos-clave-en-la-innovacion-de-nuevos-productos-con-stevia>, Visto 11 de Junio de 2014.
- Capelo, J.L., Ximénez, P., Madrid, Y., Cámara, C. (2004). Enzymatic Probe Sonication (Eps): Enhancement of Protease-Catalysed Hydrolysis of Selenium Bound To Proteins In Yeast. *Analytical Chemistry*, 76:233-237.
- Chatsudhipong, V., Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, 121: 41–54.
- Chen, T. H., Chen, S. C., Chan, P., Chu, Y. L., Yang, H. Y., Cheng, J. T. (2005). Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Planta Med*, 1(2): 108–113.
- Chhaya, Sourav, M., Majumdar, G.C., Sirshendu, D. (2012a). Clarifications of stevia extract using cross flow ultrafiltration and concentration by nanofiltration. *Separation and Purification Technology*, 89:125–134.
- Chhaya, Sourav, M., Sirshendu, D. (2012b) Prediction of ultrafiltration performance during clarification of *Stevia* extract. *Journal of Membrane Science*, 396:138– 148.

- Crammer, B., Ikan, R. (1986). Sweet glycosides from the *Stevia* plant. *Chemical Bromatology*, 22(10):915–917.
- Curi, R., Alvarez, M., Bazotte, R.B., Botion, L.M., Godoy, J.L., Bracht, A. (1986). Effect of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance in normal adult humans. *Brazil Journal of Med Biol Res*, 19(6):771–774.
- Ester-Soto, A., Del Val, S. (2002). Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*. *Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos*, 20
- Ferri, L.A.F., Alves-Do-Prado, W., Yamada, S.S., Gazola, S., Batista, M.R., Bazotte, R.B. (2006). Investigation of the antihypertensive effect of oral crude stevioside in patients with mild essential hypertension. *Phytother Res*, 20(9): 732–736.
- Filho, R.M.O., Uehara, O.A., Minetti, C.A.S.A., Valle, L.B.S. (1989). Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii in rats: Endocrine effects. *General Pharmacology: The Vascular System*, 20:187-191.
- Food and Drug Administration (FDA), (2007). Letter Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration to Hain Celestial Group Inc., Washington, DC <(www.fda.gov/foi/warning_letters/s6500c.htm)>.
- Food and Drug Administration (FDA), (1995). Letter Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration to Patrick Noonan, Washington, DC <(www.fda.gov/ohrms/dockets/DOCKETS/95s0316/m000002.pdf)>.
- Gasmalla, M.A.A., Yang, R., Musa, A., Hua, X., Faying, Y. (2014). Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia (Stevia rebaudiana bertonii)* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.06.012>.
- Genus, J.M.C. (2003). Molecules of Interest: Stevioside. *Phytochemistry*, 64:913–921.
- Giovanetto, R.H., (1990). Method for the recovery of *Stevioside* from plant raw material. U.S. Patent 4,892,938.
- Gogate, P.R., Kabadi, A.M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44 (1):60–72.

- Guisseppi-Elie, A., Choi, S.H., Geckeler, K.E. (2009). Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; 58 (1–4): 118–123.
- Hutapea, A.M., Toskulkao, C., Wilairat, P., Buddhasukh, D. (1999) .High-performance liquid chromatographic separation and quantification of stevioside and its metabolites. *Journal of Liquid Chromatography RT*, 22: 1161–1170.
- Instituto Politécnico Nacional. (2010). Elaboran politécnicos chocolates sin azúcar para diabéticos. Comunicado de prensa.
http://m.ipn.mx/pdf/CCS/CCS/WPS/WCM/CONNECT/OCA8AF80454F43C988369E9570DCE1C/COM_337_201000C3.PDF
- Jaitak, V., Bikram-Singh, B., Kaul, V. K. (2009). An Efficient Microwave-assisted Extraction Process of Stevioside and Rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Phytochem. Anal.*; 20: 240–245. DOI 10.1002/pca.1120
- Jaramillo, V. A. (2009). *Stevia*: Producción y Procesamiento de un Endulzante Alternativo. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- JECFA, (2008). Steviol glycosides. In: An ADI of 0 - 4 mg/kg bw (expressed as steviol) was established at the 69th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), FAO/JECFA Monograph 5
<(http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph5/additive-442-m5.pdf)>.
- JECFA, (2007). Steviol glycosides. In: Combined Compendium of Food Additive Specifications, 68th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, FAO/JECFA Monograph 4, pp. 61–64
<(http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-442-m4.pdf)>.

- Jeppesen, P.B., Gregersen, S., Alstrup, K.K., Hermansen, K. (2002). Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine* 9(1):9–14.
- Kenelly, J.E. (2002). *Stevia*, the Genus *Stevia*. In: Kinghom AD, editor. New York: Taylor and Francis; p.p. 68–85.
- Kienle. (1992). Method of making a natural sweetener based on *Stevia rebaudiana* and use thereof. US Patent 5,112,610.
- Kolb, N., Herrera, J. L., Ferreyra, D. J., Uliana, R. F. (2001). Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. *J. Agric. Food Chem*, 49: 4538-4541.
- Kumar, S. (1986). Method for recovery of Stevioside. U.S. Patent 4,599,403.
- Kroyer, G. (2010). Stevioside and *Stevia*-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5:225–229.
- Liu, J., Jin-Wei L., Tang, J. (2010). Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts, short communication. *Food and bioproducts processing*, 88: 215–221.
- Maringá-Payzant, J.D., Laidler, J.K., Ippolito, R.M. (1999). Method of extracting selected sweet glycosides from the *Stevia rebaudiana* plant. U.S. Patent 5,962,678.
- Mason, T.J., Lorimer, J.P. (1996). *Ultrasonics sonochemistry*, Elsevier, 3 (3): 253-260.
- Mason, T. J., Lorimer, J. P. (2002). *Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*. Copyright: Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. ISBNs: 3-527-30205-0 (Hardback); 3-527-60054-X (Electronic).
- Melis, M.S. (1996). A crude extract of *Stevia rebaudiana* increases the renal plasma flow of normal and hypertensive rats. *Journal of Med Biol Res*, 29: 669-675.
- Mizushima. Y., Akihisa. T., Ukiya, M., Hamasaki, Y., Nakai, C.M., Kuriyama, I., Takeuchi, T., Sugawara, F., Yoshida, H., (2005). Structural analysis of isosteviol

- and related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors, *Life Sciences*, 77: 2127-2140.
- Monteiro, R. (1980). Taxonomia e biologia da reproducao da *Stevia rebaudiana* Bert. Thesis, Univ. Estadual de Campinas.
- Moraes, E.P. and Machado, N.R.C.F. (1999) Purification of the Extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni Through Adsorption in Modified Zeolites. VI Seminar on Enzymatic Hydrolysis of Biomass, Proceeding of VI SHEB, CD-ROM.
- Nguyen, T.T.T., Le, V.V.M. (2013). Effects of ultrasound on cellulolytic activity of cellulase complex. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (1): 155–161.
- Pol, J., Hohnova, B., Hyotylainen, T. (2007a). Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1150: 85–92.
- Pol, J., Ostra, E.V., Karasek, P., Roth, M., Benesova, K., Kotlarikova, P., *et al.* (2007b). Comparison of two different solvents employed for pressurized fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Anal. Bioanal. Chem.*, 388: 1847–57.
- Priego-Capote, F., Luque de Castro, M. D. (2007). Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. Copyright: Elsevier B.V. ISBN-13: 978-0-444-52825-4.
- Puri, M., Sharma, D. (2011a). Antibacterial activity of stevioside towards food-borne pathogenic bacteria. *Engineering in Life Sciences*, 11 (3): 326–329.
- Puri, M., Sharma, D., Tiwary, A. K. (2011b). Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances*, 29: 781–791.
- Puri, M., Sharma, D., Barrow C. J., Tiwary, A.K. (2012) Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry* 132: 1113–1120.
- Qian, Z., Ming-Ming, Z., Pei-Lin, C., Yun-Ying, C., Xiang-Ling, T. (2011). Optimization of Ultrasonic-Assisted Enzymatic Hydrolysis for the Extraction of Luteolin and Apigenin from Celery. *Journal of Food Science*, 76(5): 680–685.

- Romaris-Hortas, V., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro A. (2013). Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis for iodinated amino acid extraction from edible seaweed before reversed-phase high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1309: 33– 40.
- Scientific Committee on Food. (1999a). Opinion on Stevioside as a Sweetener (Adopted on 17/6/99), Scientific Committee on Food (SCF). European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. Brussels, Belgium, CS/ADD/EDUL/167 Final
<http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out34_en.pdf>.
- Scientific Committee on Food. (1999b). Opinion on *Stevia frbaudina* Bertoni Plant and Leaves (Adopted on 17/6/ 99). Scientific Committee on Food (SCF). European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium, CS/NF/STEV/3 Final
<http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out36_en.pdf>.
- Shi, R., Xu, M., Shi, Z., Fan, Y., Guo, X., Liu, Y., Wang, C., He, B. (2002). Synthesis of bifunctional polymeric adsorbent and its application in purification of *Stevia* glycosides. *Reactive and Functional Polymers*, 50:107-116.
- Shiozaki. K., Fujii, A., Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M. (2006). Inhibitory effects of hot water extract of the *Stevia* stem on the contractile response of the smooth muscle of the guinea pig ileum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 489-494.
- Shock, Clinton C. (1982). Experimental Cultivation of Rebaudi's *Stevia* in California. Agronomy Prog No. 122. Univ, of California, Davis.
- Soejarto, D. D., Compadre, C.M., Medon, P. J., Kamath, S. K. and Kinghorn, A. D. (1983). Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Economic Botany* 37(1): 43-46.
- Souza, M., Mezdari, E.T., Zimmerman, E., Leaes, E.X., Bassaco, M.M., Dal Prá, V., Foletto, E., Cancellier, A., Terra, L.M., Sahn, S.L., Mazutti, M.A. (2013). Evaluation

- of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (1): 89–94.
- Subhedar, P. B., Gogate, P. R. (2014). Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101: 108–114.
- Susuki, H., Kasai, T., Sumihara, M. (1977). Effects of oral administration of stevioside on level of blood glucose and liver glycogen of intact rats. *Nippon Nogei Kagaku kaishi*, 51: 171–173.
- Tan, S., Shibuta, Y., Tanaka, O. (1983). Isolation of sweetener from *Stevia rebaudiana*. *Jpn Kokai, Patent no 1983; 63:177,764*.
- Toma, M., Vinatour, M., Paniwnyk, L., Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 137-142.
- Toskulkao, C., Sutheerawatananon, M., Wanichanon, C., Saitongdee, P., Suttajit, M. (1995). Effects of stevioside and steviol on intestinal glucose absorption in hamsters. *J Nutr Sci Vitaminol*, 41(1): 105–113.
- Totté, N., Van-den-Ende, W., Van-Damme, E.J.M., Compennolle, F., Baboeuf, I., Geuns, J. M.C. (2003). Cloning and heterologous expression of early genes in gibberellin and steviol biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Canadian Journal of Botany*, 81(5): 517-522.
- Vale, G., Rial-Otero, R., Mota, A., Fonseca, L., Capelo, J.L. (2008). Ultrasonic-assisted enzymatic digestion (USAED) for total elemental determination and elemental speciation: A tutorial. *Talanta* 75: 872–884.
- Wang, J., Sun, B., Liu, Y., Zhang, H. (2014). Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheat bran. *Food Chemistry*, 150: 482–488.
- White Jr., J.R., Kramer, J., Campbell, R.K., Bernstein, R., (1994). Oral use of a topical preparation containing an extract of *Stevia rebaudiana* and the chrysanthemum flower in the management of hyperglycemia. *Diabetes Care*, 17(8): 940.

- WHO. (2009). Joint FAONVHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additive Series: 60. Safety evaluation of certain food additives. Steviol Glycosides (addendum), pp 183-220.
- Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A., Matthias Wüst. (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *Eur Food Res Technol*, 231: 581–588.
- Yasukawa, K., Kitanaka, S., Seo, S. (2002). Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-Otetradecanoylphorbol- 13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin, *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 1488-1490.
- Yoda, S.K., Marques, M.O.M., Petenate, A.J., Meireles, M.A.A. (2003). Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂+water: extraction kinetics and identification of extracted components. *Journal of Food Eng*, 57: 125–134.

14. ANEXOS

Anexo A. Curva de concentración del estándar interno de esteviósido y rebaudiósido por HPLC.

Tabla A-1. Relación de concentración vs. área de pico en cromatograma de esteviósido.

mg/ml de estándar	Área (mAU)*	tiempo de retención
0	0	0
0.1	143.68439	5.173
0.5	839.07953	5.22
1	1420.8241	5.142
2	2878.08447	5.166
3	4262.31738	5.194
4	5679.146	5.221
5	6992.71387	5.243

* Área señalada por el reporte del cromatograma.

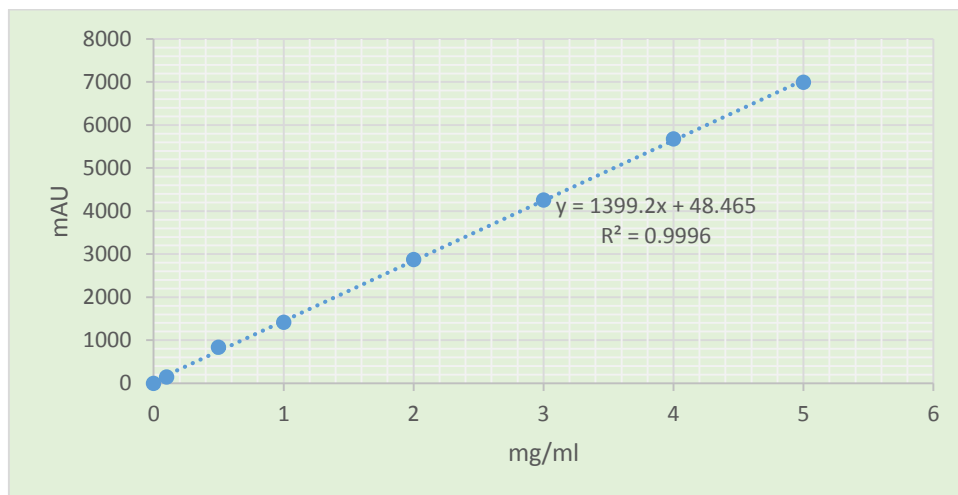
Tabla A-2. Relación de concentración vs. área de pico en cromatograma de rebaudiósido A.

mg/ml de estándar	Área (mAU)*	Tiempo de retención
0	0	0
0.1	141.90497	4.933
0.5	736.65118	4.982
1	1208.46228	4.855
2	2484.13306	4.878
3	3501.12573	4.889
4	4977.58496	4.923
5	6199.47461	4.945

* Área señalada por el reporte del cromatograma.

De acuerdo al cálculo de la pendiente en la gráfica A-1, se puede establecer una ecuación para la interpolación de futuros valores de área para el esteviósido.

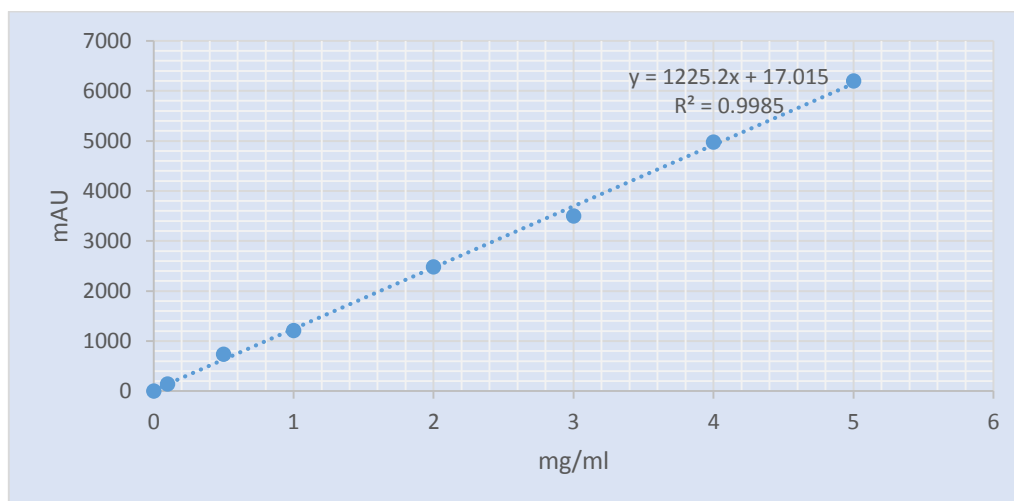
Ecuación: $y = 1399.2x + 48.465$



Gráfica A-1. Curva de relación concentración vs. área de esteviósido.

De acuerdo al cálculo de la pendiente en la gráfica A-2, se puede establecer una ecuación para la interpolación de futuros valores de área para el rebaudiósido A.

Ecuación: $y = 1225.2x + 17.015$



Gráfica A-2. Curva de relación concentración vs. área de esteviósido.

Anexo B. Cálculos de los rendimientos de cada método de extracción realizado posterior al análisis por HPLC.

Se presenta en la tabla B-1 el procedimiento matemático para el cálculo de los rendimientos. La tabla es un extracto de los datos originales.

Tabla B-1. Cálculos de rendimientos de los distintos métodos de extracción.

Muestra	Peso total (g)	Peso de muestreo (mg)	Peso en dilución (mg/ml)	Área (mAU)		Peso en muestra (miligramos/muestra)		Edulcorante total (mg)		mg de edulcorante/g de hoja	
				Esteviósido (stv)	Rebaudiósido A (RebA)	Stv	RebA	Stv	RebA	Stv	RebA
T1	1	250	20	1447.665	1242.215	$x = \frac{(y-48.465)}{1399.2}$	$x = \frac{(y-17.015)}{1225.2}$	$x = \frac{\text{Peso total (mg)} * \text{Peso en muestra (mg)}}{\text{Peso en dilución (mg)}}$		$x = \frac{\text{Edul. total}}{2.5g \text{ de hoja}}$	
						1	1	50	50	20	20
B1	0.68	250	20.00	1385.03	3890.17	0.96	3.16	32.56	107.77	13.03	43.11
B2	0.85	250.1	20.01	1365.83	3911.57	0.94	3.18	39.88	134.63	15.95	53.85
B3	0.79	250.2	20.02	1454.38	4149.56	1.00	3.37	39.57	132.84	15.83	53.14
Soxhlet	1.74	249.9	19.99	1426.09	4192.51	0.98	3.41	85.69	296.62	17.14	59.32
Ultrason	0.96	250.5	20.04	1291.22	3969.60	0.89	3.23	42.36	153.87	16.94	61.55
Enzima 0.5%/ 50°C	1.11	250.5	20.04	1334.93	3799.16	0.92	3.09	50.88	170.81	20.35	68.33
Enzima 3.0%/ 50°C	1.05	250.1	20.01	1352.83	3845.19	0.93	3.12	48.74	163.36	19.50	65.35

Tabla B-1. Cálculos de rendimientos de los distintos métodos de extracción. (Continuación)

Muestra	Peso total (g)	Peso de muestreo (mg)	Peso en dilución (mg/ml)	Área (mAU)		Peso en muestra (miligramos/muestra)		Edulcorante total (mg)		mg de edulcorante/g de hoja	
				Esteviósido (stv)	Rebaudiósido A (RebA)	Stv	RebA	Stv	RebA	Stv	RebA
Enzima 0.5%/ 55°C	0.96	250.3	20.02	1329.59	3934.99	0.92	3.20	43.72	152.69	17.49	61.08
Enzima 3.0%/ 55°C	1.04	250	20.00	1251.09	3708.15	0.86	3.01	44.76	156.90	17.91	62.76
Enzima 0.5%/ 60°C	0.97	250.7	20.06	1311.99	3890.40	0.90	3.16	43.60	152.63	17.44	61.05
Enzima 3.0%/ 60°C	1.04	250.2	20.02	1295.87	3684.40	0.89	2.99	46.34	155.60	18.54	62.24
Enzima asistida por ultrason	0.92	250.4	20.03	1340.36	4062.49	0.92	3.30	42.29	151.25	16.92	60.50

Anexo C. Análisis Post-Variación de los distintos métodos de extracción.

Tabla C-1. Rendimientos en mg/hoja seca del esteviósido. Métodos y respectivas repeticiones.

	B1	B2	B3	E. 0.5% 50°C	E. 3.0% 50°C	E. 0.5% 55°C	E. 3.0% 55°C	E. 0.5% 60°C	E. 3.0% 60°C	Ultra	Enz son	Soxhlet
Datos	13.03	15.95	15.83	23.16	19.90	21.64	17.91	18.78	19.79	18.06	12.78	17.14
	12.97	16.03	16.17	23.09	19.88	21.96	17.86	18.68	20.01	18.03	12.57	17.20
	12.85	16.02	16.10	23.26	19.87	20.67	18.73	18.69	19.81	18.00	12.67	17.08
	12.92	16.02	16.02	20.35	18.68	17.49	20.16	17.21	18.54	15.56	18.89	16.98
	12.68	16.01	16.05	20.47	19.59	17.57	20.00	18.32	17.92	15.44	18.54	17.14
	12.68	15.94	15.93	20.40	19.50	17.58	20.11	17.44	18.43	15.53	18.83	18.05
	12.80	16.03	16.08	18.36	21.68	20.57	20.51	17.76	19.91	16.94	16.92	17.37
	12.80	16.03	15.94	18.02	21.86	20.49	20.16	17.47	19.12	16.91	17.27	17.50
	12.74	16.09	15.25	17.90	21.88	20.31	20.29	16.96	19.79	16.80	17.25	18.02
Promedio	12.83	16.01	15.93	20.56	20.32	19.81	19.52	17.92	19.26	16.81	16.19	17.39
Desv. Estand.	0.12	0.04	0.27	2.21	1.18	1.78	1.06	0.70	0.78	1.09	2.73	0.40

Tabla C-2. Tabla ANOVA con análisis de medias para los rendimientos de esteviósido.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadro medio	F_{exp} o F_0	F tablas	LSD Mínima diferencia significativa
Entre tratamiento	523.063807	11	47.5512552	27.7552281	1.886	0.35356741
Error	164.470653	96	1.71323597			
Total	687.53446	107			p < 0.05	

Tabla C-3. Rendimientos en mg/hoja seca del rebaudiósido A. Métodos y respectivas repeticiones.

	B1	B2	B3	E. 0.5% 50°C	E. 3.0% 50°C	E. 0.5% 55°C	E. 3.0% 55°C	E. 0.5% 60°C	E. 3.0% 60°C	Ultra	Enz son	Soxhlet
Datos	43.11	53.85	53.14	77.68	65.82	71.86	62.76	65.66	67.03	65.40	44.49	59.32
	43.10	53.58	52.86	77.69	66.10	72.40	62.63	65.67	66.83	65.32	44.70	59.22
	43.05	53.55	53.15	77.36	65.66	71.92	62.73	65.54	66.69	65.47	44.27	59.01
	43.19	53.58	53.09	68.33	64.81	61.08	67.74	60.88	62.24	57.06	65.45	59.05
	43.07	53.76	53.05	68.29	65.28	61.43	67.82	61.46	62.37	57.52	65.00	59.25
	43.07	53.40	53.21	68.12	65.35	61.34	67.75	61.05	62.25	57.01	65.09	59.53
	43.13	53.42	53.42	59.50	72.20	71.60	68.46	59.12	66.13	61.55	60.50	59.49
	43.27	53.50	53.38	59.47	72.29	72.04	68.03	59.28	65.83	61.19	60.55	59.54
	43.34	53.66	52.91	59.18	72.39	71.26	68.10	59.02	65.89	61.32	60.43	60.01
Promedio	43.15	53.59	53.14	68.40	67.77	68.32	66.22	61.97	65.03	61.31	56.72	59.38
Desv. Estand.	0.10	0.15	0.19	7.88	3.41	5.29	2.65	2.88	2.10	3.55	9.40	0.30

Tabla C-4. Tabla ANOVA con análisis de medias para los rendimientos de rebaudiósido A.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadro medio	<i>F_{exp}</i> o <i>F₀</i>	<i>F</i> tablas	LSD Minima diferencia significativa
Entre tratamiento	5860.27256	11	532.752051	28.7227695	1.886	1.16335709
Error	1780.61509	96	18.5480739			
Total	7640.88765	107			p < 0.05	

Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences



An International Peer Review E-3 Journal of Sciences

Available online at www.jcbpsc.org

Section A: Food Biotechnology

CODEN (USA): JCBPAT

Research abstract

Stevioside And Rebaudioside Extraction By Non-Conventional Techniques

Victor G. Canuas-Landero¹, Lluvia Rodriguez², Saúl Ramírez², Sandra L. Cabrera-Hilerio¹, Gabriel Ríos-Cortés², Alma L. Martínez³, Joel Reyes⁴, Minerva Rosas-Morales⁴, Ada Ma. Ríos-Cortés^{4*}.

¹Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, México, ²Instituto Tecnológico de Orizaba, Ingeniería Química, México ³CEPROBI-IPN México, ⁴CIBA-IPN, México.

Abstract: Stevioside and rebaudioside A, diterpene glycosides, are gaining an increasing interest because of their sweetness taste, non-caloric characteristic, and medical properties. New non-conventional extractions techniques have been used instead of classical extractions with chemical methods due to high yields, rate extraction, and high efficiency on the use of solvents. Enzymatic assisted extraction, ultrasound-assisted extraction, and ultrasound-assisted enzymatic extraction were evaluated as non-conventional extraction methods under similar condition and same enzymes as well. All the extractions showed a similar behaviour with the yields of stevioside and rebaudioside A. The concentration of rebaudioside A was found 75% upper than that of stevioside which is favourable because rebaudioside A has more commercial interest.

Keywords: Stevioside and rebaudioside A, enzymatic assisted extraction, ultrasound-assisted extraction, non-conventional extraction methods.

Corresponding Author: Ada Ma. Ríos-Cortés

* adarioscort@yahoo.com.mx