

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Extracción de un edulcorante a partir de plantas de *Stevia rebaudiana*
cultivadas en Costa Rica**

Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de
Alimentos

Elisa Flores Rojas

A72555

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

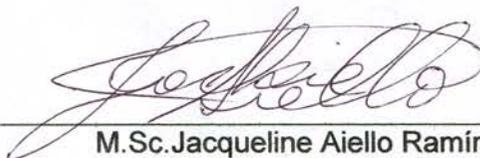
Diciembre 2012

Hoja de aprobación del trabajo final de graduación

Proyecto de graduación presentado en la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

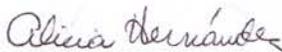
Elaborado por:
Elisa Flores Rojas

Aprobado por:



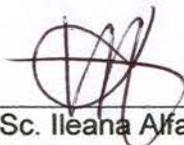
M.Sc. Jacqueline Aiello Ramírez

Presidente del Tribunal



M.Sc. Alicia Hernández Peñaranda

Directora del Proyecto



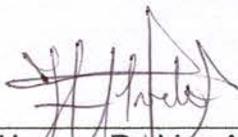
M.Sc. Ileana Alfaro Álvarez

Asesora del Proyecto



Ph.D. Elba Cubero Castillo

Asesora del Proyecto



M.Sc. Hermes Rodrigo Alvarado Montero

Profesor Designado

Agradecimientos

Después de meses de trabajo, quiero darle gracias a Dios por poder haber llegado a completar un proyecto más en mi vida.

A Carla y a Fran, quienes por más de 10 años me han inspirado a dar lo mejor de mí, a no rendirme y a siempre seguir adelante. Gracias por ese apoyo incondicional que siempre he encontrado en ustedes y que me ayudó a ser la persona que soy hoy.

A mi papá, por insistirme en no desistir y ayudarme en este proceso siempre que tuvo la oportunidad.

A Víctor, por esa eterna paciencia, comprensión y apoyo que me brindó durante este último año. Gracias por siempre esperar lo mejor de mí e impulsarme a no desistir de mis metas.

A mi directora de tesis Doña Alicia y a mis asesoras Elba e Ileana. Gracias por brindarme una mano siempre que lo necesité. Gracias por ayudarme a cumplir mi objetivo y siempre motivarme a creer que era capaz de hacerlo.

Godo y Lore, sin su respaldo y ayuda jamás hubiera podido avanzar. Gracias por tener la paciencia de guiarme y explicarme cada vez que lo necesité. De ustedes dos obtuve una educación invaluable en este último año.

Diego y María Belén, gracias por ser mis compañeros de almuerzos, risas y frustraciones.

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y al Fondo de Incentivos del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) del Gobierno de Costa Rica por el apoyo otorgado para el desarrollo de este estudio.

Índice General

Hoja de aprobación del trabajo final de graduación.....	ii
Agradecimientos	iii
Índice de figuras.....	ix
Índice de cuadros.....	xi
Glosario	xiv
Resumen.....	xv
1. Justificación	1
2. Objetivos.....	5
2.1. Objetivo general.....	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. Marco teórico.....	6
3.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	6
3.1.1. Generalidades sobre la planta.....	6
3.1.2. Principales compuestos presentes en la planta.....	7
3.1.2.1. Esteviol glicósidos	7
3.1.2.2. Proteínas	8
3.1.2.3. Cenizas	9
3.1.2.4. Otros compuestos	9
3.2. Edulcorante extraído de las plantas de <i>Stevia rebaudiana</i>	9
3.2.1. Aplicaciones importantes en la industria alimentaria	9
3.2.2. Normativa vigente con respecto al uso del edulcorante en alimentos.....	12
3.3. Proceso de extracción del edulcorante a partir de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	13
3.3.1. Métodos de extracción reportados en la literatura	14
3.3.2. Factores que afectan la extracción del edulcorante.....	15
3.3.2.1. Tipo de disolvente	15
a. Disolventes orgánicos	15
b. Agua	15

3.3.2.2.	Granulometría de las hojas.....	16
3.3.2.3.	Proporción hojas:disolvente.....	17
3.3.2.4.	Temperatura de extracción.....	18
3.4.	Proceso de purificación del extracto edulcorante	20
3.4.1.	Eliminación de impurezas por floculación.....	21
3.4.2.	Purificación por medio del uso de resinas de intercambio iónico	21
3.4.2.1.	Estructura física y química de las resinas de intercambio iónico	22
3.4.2.2.	Tipos de resinas de intercambio iónico.....	23
3.4.3.	Resinas adsorbentes poliméricas.....	24
3.4.4.	Uso industrial y regulación de las resinas de intercambio iónico y los adsorbentes poliméricos	24
3.4.5.	Factores que afectan la capacidad de purificación de una resina	26
4.	Materiales y métodos.....	28
4.1.	Localización	28
4.2.	Materia Prima.....	28
4.3.	Metodología	28
4.3.1.	Pretratamiento de la materia prima	28
4.3.1.1.	Secado	28
4.3.1.2.	Molienda.....	29
4.3.1.3.	Tamizado.....	29
4.3.2.	Evaluación de distintas condiciones de extracción para determinar su efecto sobre la extracción del rebaudiósido A y el esteviósido de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	29
4.3.2.1.	Efecto de la granulometría de las hojas, el tiempo de agitación y la proporción hojas:agua sobre la extracción del rebaudiósido A y del esteviósido.....	29
a.	Diseño experimental y análisis estadístico	30
4.3.2.2.	Efecto de la temperatura y la proporción hojas:agua sobre la extracción del rebaudiósido A y del esteviósido	31
a.	Diseño experimental y análisis estadístico	32

4.3.3. Proceso de purificación del extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	33
4.3.3.1. Centrifugación y filtración	34
4.3.3.2. Floculación con $\text{Ca}(\text{OH})_2$	34
a. Efecto del pH de floculación sobre la eliminación de impurezas y la concentración de rebaudiósido A y esteviósido después de la floculación	34
b. Floculación del extracto acuoso de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	35
4.3.3.3. Neutralización.....	35
4.3.3.4. Purificación del extracto acuoso floculado y neutralizado de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> con resinas de adsorción y de intercambio iónico.....	36
a. Determinación del perfil de elución de los esteviol glicósidos de interés a través de las resinas 1, 2 y 3	36
b. Evaluación del efecto de varias corridas de purificación sobre la concentración de rebaudiósido A y esteviósido en el edulcorante	37
4.3.3.5. Concentración del extracto de <i>Stevia rebaudiana</i>	41
4.3.3.6. Liofilización del residuo acuoso obtenido luego del proceso de concentración del extracto previamente purificado de <i>Stevia rebaudiana</i>	41
4.3.3.7. Determinación del grado mínimo de purificación requerido para eliminar el sabor residual amargo del edulcorante obtenido a partir de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	41
4.3.4. Análisis químicos y sensoriales.....	42
4.3.4.1. Humedad.....	42
4.3.4.2. Cenizas	42
4.3.4.3. Proteínas	43
4.3.4.4. Cuantificación de los esteviol glicósidos	45
4.3.4.5. Prueba sensorial.....	47
a. Localización	47
b. Muestra.....	47
c. Procedimiento	48

5. Resultados y discusión	50
5.1. Evaluación de distintas condiciones de extracción para determinar su efecto sobre la cantidad del rebaudiósido A y el esteviósido extraídos de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	50
5.1.1. Efecto de la granulometría de las hojas, el tiempo de agitación y la proporción hojas:agua sobre la extracción del rebaudiósido A y del esteviósido	50
5.1.2. Efecto de la proporción hojas:agua y la temperatura sobre la extracción del rebaudiósido A y del esteviósido	57
5.2. Proceso de purificación del extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	60
5.2.1. Efecto del pH de floculación sobre la eliminación de impurezas y la concentración de rebaudiósido A y esteviósido después de la operación de floculación	60
5.2.2. Purificación del extracto acuoso floculado y neutralizado de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> con resinas de adsorción y de intercambio iónico	63
5.2.2.1. Determinación del perfil de elución de los esteviol glicósidos de interés a través de las resinas 1, 2 y 3	63
5.2.2.2. Evaluación del efecto de varias corridas de purificación sobre la concentración de rebaudiósido A y esteviósido en el edulcorante.....	65
5.2.3. Resultados obtenidos en la evaluación sensorial realizada para determinar el grado de dulzor y de amargor de los extractos purificados con diferentes números de corridas a través de las resinas de intercambio iónico	70
5.3. Caracterización fisicoquímica de las hojas y el extracto acuoso de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	75
6. Conclusiones.....	79
7. Recomendaciones.....	81
8. Bibliografía	83
9. Anexos	96
A.1. Curvas de cuantificación de proteínas y de esteviol glicósidos	96
A.2. Evaluación del efecto de distintos parámetros de extracción sobre la concentración extraída de esteviol glicósidos	97

A.3. Evaluación del proceso de purificación con resinas de intercambio iónico y su efecto sobre la concentración de los esteviol glicósidos.....	99
A.4. Valores obtenidos en la caracterización fisicoquímica de las hojas y el extracto acuoso de <i>Stevia rebaudiana</i>	104

Índice de figuras

Figura 1. Hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	6
Figura 2. Estructura de los esteviol glicósidos presentes en <i>Stevia rebaudiana</i>	8
Figura 3. Resina tipo gel (izquierda) y resina macroporosa.	22
Figura 4. Clasificación de las resinas de intercambio catiónicas y aniónicas.	23
Figura 5. Operaciones unitarias propuestas para el proceso de purificación del extracto acuoso de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	33
Figura 6. Resinas de intercambio utilizadas en el proceso de purificación del extracto acuoso de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	36
Figura 7. Proceso de purificación del extracto floculado y neutralizado de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> con la resina de adsorción (resina 1) y las resinas de intercambio iónico (resinas 2 y 3).	39
Figura 8. Proceso de purificación del extracto de <i>Stevia rebaudiana</i> al realizarse varias corridas a través de las resinas 2 y 3.	40
Figura 9. Pasos a seguir en el método de Bradford para cuantificar proteínas en los extractos acuosos de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	43
Figura 10. Orden de aparición de las muestras presentadas a los panelistas en la prueba de 2-escogencia forzada alternativa (2-AFC) llevada a cabo para los extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> con distinta cantidad de corridas de purificación.....	48
Figura 11. Interacciones ($p < 0,0006$) entre la granulometría y el tiempo de agitación (Figuras 11-A y 11-B) y la proporción hojas:agua y el tiempo de agitación (Figuras 11-C y 11-D) para analizar las concentraciones del esteviósido (Figuras 11-A y 11-C) y el rebaudiósido A (Figuras 11-B y 11-D) extraídos de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	52

Figura 12. Interacción ($p < 0,0001$) entre los factores granulometría y proporción hojas:agua para analizar la concentración del rebaudiósido A extraído de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	56
Figura 13. Variaciones en las concentración extraída del rebaudiósido A ($p < 0,0001$) debido a la implementación de distintas temperaturas durante la extracción acuosa de hojas molidas a 60 mesh de <i>Stevia rebaudiana</i> por tres horas.	59
Figura 14. Diferencias observadas en la coloración del extracto acuoso de <i>Stevia rebaudiana</i> y en la cantidad de flóculo formado al utilizar distintos valores de pH para la floculación.	62
Figura 15. Variación en la concentración del esteviósido y el rebaudiósido A al irse eluyendo el extracto de <i>Stevia rebaudiana</i> a través de la resina 1 (Figuras 16-A y 16-B) y a través de las resinas 2 y 3 (Figuras 16-C y 16-D).	64
Figura 16. Variaciones en la concentración de los esteviol glicósidos recuperados en cada operación del proceso de purificación con respecto a la concentración existente en la operación previa.	66
Figura 17. Variaciones en la concentración de los esteviol glicósidos recuperados en cada operación del proceso de purificación reportados en forma de rendimiento con respecto a la concentración inicial en el extracto sin purificar.	69
Figura 18. Curva de calibración para la cuantificación de proteína por el método de Bradford.	96
Figura 19. Curva de calibración para la cuantificación del esteviósido por HPLC.	96
Figura 20. Curva de calibración para la cuantificación del rebaudiósido A por HPLC.	97

Índice de cuadros

Cuadro I. Efecto de la proporción hojas:agua en el contenido de esteviósido extraído encontrado por Abou-Arab <i>et al.</i> (2010).	18
Cuadro II. Diseño experimental para la evaluación del efecto del tiempo de agitación, la granulometría de las hojas y la proporción hojas:agua sobre la concentración de rebaudiósido A y esteviósido extraídos.	31
Cuadro III. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la temperatura de extracción y la proporción hojas:agua sobre la cantidad de rebaudiósido A y esteviósido extraídos.	32
Cuadro IV. Diseño experimental para la evaluación del efecto del pH de floculación sobre la concentración de rebaudiósido A y esteviósido en el extracto acuoso.	35
Cuadro V. Valores de F y probabilidades obtenidas en el análisis de varianza de los dos esteviol glicósidos de interés presentes en los extractos acuosos de <i>Stevia rebaudiana</i> preparados con dos granulometrías de la hoja distintas y extraídos por un máximo de seis horas de agitación ($\alpha=0,05$)..	51
Cuadro VI. Valores de F y probabilidades obtenidas en el análisis de varianza de los dos esteviol glicósidos de interés presentes en los extractos acuosos de <i>Stevia rebaudiana</i> preparados a tres distintas temperaturas de extracción y proporciones hojas:agua ($\alpha=0,05$).....	58
Cuadro VII. Valores de F y probabilidades obtenidas en el análisis de varianza de los dos esteviol glicósidos de interés presentes en los extractos acuosos de <i>Stevia rebaudiana</i> posterior al proceso de floculación a diferentes valores de pH ($\alpha=0,05$).	61

Cuadro VIII. Número de escogencias obtenidas para cada par de muestras presentadas a los panelistas en las pruebas de discriminación, tanto para el sabor amargo como para el dulce, en disoluciones con 0,7 mg/mL de edulcorante y con distinto número de corridas de purificación a través de las resinas de intercambio iónico ($\alpha=1\%$).	72
Cuadro IX. Concentración de esteviol glicósidos presente en las muestras purificadas y liofilizadas que se emplearon en la preparación de las disoluciones presentadas a los panelistas en las pruebas de discriminación.	73
Cuadro X. Comparación entre los resultados del análisis fisicoquímico de las hojas secas y el extracto acuoso de <i>Stevia rebaudiana</i> y los valores reportados por la literatura.	76
Cuadro XI. Variaciones en la extracción de los esteviol glicósidos al emplear diferentes tiempos de agitación y diferentes granulometrías de las hojas.	97
Cuadro XII. Variaciones en las concentraciones del rebaudiósido A al emplear diferentes proporciones de hojas:agua y diferentes granulometrías durante el proceso de extracción.	98
Cuadro XIII. Variaciones en las concentraciones de rebaudiósido A y del esteviósido al emplear diferentes proporciones de hojas:agua y diferentes tiempos de agitación durante el proceso de extracción.	98
Cuadro XIV. Variación en las concentraciones del rebaudiósido A y el esteviósido presente en los extractos antes y después del proceso de purificación con las resinas de intercambio.	100
Cuadro XV. Resultados obtenidos al evaluar la eficiencia tanto de cada operación por separado como del proceso global de purificación.	103
Cuadro XVI. Valores necesarios para calcular la concentración de los esteviol glicósidos en el liofilizado utilizado para las pruebas de discriminación.	104

Cuadro XVII. Determinación de la humedad presente en las hojas frescas de <i>Stevia rebaudiana</i>	104
Cuadro XVIII. Determinación de la humedad presente en las hojas secas y molidas de <i>Stevia rebaudiana</i>	105
Cuadro XIX. Determinación de la concentración de cenizas presentes de las hojas secas y molidas de <i>Stevia rebaudiana</i>	105
Cuadro XX. Cuantificación de las proteínas presentes en el extracto acuoso de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> mediante el método de Bradford.....	105
Cuadro XXI. Cuantificación de los esteviol glicósidos presentes en el extracto acuoso de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> mediante HPLC.	106

Glosario

%: porcentaje	M: molar (mol/L)
±: incertidumbre	mAu: miliunidades de absorbancia
°C: grados Celsius	MeCN: acetonitrilo
µL: microlitros	mg: miligramos
2-AFC: 2-Alternative Forced Choice	min: minutos
A: absorbancia	mL: mililitros
ANDEVA: Análisis de Varianza	mm: milímetros
BV: volúmenes de columna	NC: no cuantificable
cm: centímetros	NR: no reporta
Cn: concentración	p: probabilidad
estev.: esteviósido	pulg: pulgadas
g: gramos	reb. A: rebaudiósido A
GRAS: Generally Recognized as Safe	rpm: revoluciones por minuto
h: horas	δ: desviación estándar
HOAc: ácido acético	vs.: <i>versus</i>
HPLC: high performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)	
HSD: Honestly Significant Difference	
LC: límite de cuantificación	
LD: límite de detección	
m/m: masa/masa	

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar las condiciones de extracción y purificación del edulcorante obtenido de las hojas de *Stevia rebaudiana* cultivadas en Costa Rica, para determinar su efecto sobre la concentración de esteviósido y rebaudiósido A, así como la reducción del sabor amargo en el extracto obtenido.

Primeramente se llevaron a cabo una serie de pruebas para determinar el tiempo de agitación, la granulometría y el grado de dilución en la proporción hojas:agua que permitió extraer la mayor concentración de rebaudiósido A posible. Se encontró que, bajo las condiciones de extracción empleadas y a pesar de que hubo diferencias a nivel estadístico, desde el punto de vista práctico, la diferencia en la concentración de los esteviol glicósidos fue muy pequeña.

Seguidamente, se evaluó el efecto de la temperatura y la proporción hojas:agua en la extracción del rebaudiósido A presente en las hojas de *Stevia rebaudiana*; para tales fines se evaluaron tres condiciones distintas de temperatura de extracción y de proporción hojas:agua. Se determinó que, bajo las condiciones de extracción empleadas, las proporciones de hojas:agua evaluadas no generaron diferencias significativas en la extracción de los esteviol glicósidos, pero una alta temperatura sí aumentó de manera significativa la extracción del rebaudiósido A.

Para el proceso de purificación, primero se evaluó el efecto del pH de floculación sobre la recuperación del rebaudiósido A. Se concluyó que este no afectaba de manera significativa la concentración del esteviol glicósido en el extracto. Esto conllevó a la selección de un pH de floculación de 12, pues fue el que generó la mayor despigmentación y la mayor cantidad de flóculo.

Luego se determinó el número de corridas que se podían realizar por las resinas de intercambio iónico 2 y 3, para disminuir el sabor amargo sin afectar los rendimientos del rebaudiósido A en el edulcorante final. Para tal fin, se determinó mediante una prueba de discriminación, si los panelistas detectaban diferencias en el dulzor y en el amargor de edulcorantes con una sola corrida o con varias corridas de purificación. Estos resultados

fueron comparados con la concentración de rebaudiósido A y de esteviósido que estaba presente en las muestras ofrecidas mediante una cuantificación por HPLC.

Los resultados obtenidos indicaron que los panelistas no encontraron diferencias significativas de dulzor ni de amargor entre el edulcorante obtenido con una corrida de purificación y el obtenido con varias corridas de purificación. Las concentraciones de ambos esteviol glicósidos, cuantificadas mediante HPLC, indicaron que se dio una pérdida proporcional de masa de ambos esteviol glicósidos conforme se fue realizando un mayor número de corridas de purificación. Sumando estos dos resultados, se concluyó que no era recomendable realizar más de una corrida de purificación por las resinas 2 y 3.

Finalmente, se caracterizaron fisicoquímicamente las hojas de *Stevia rebaudiana* cultivadas en Costa Rica, para así determinar la humedad y cenizas en la materia prima, y la concentración de esteviol glicósidos y de proteínas en el extracto acuoso. Se encontró que las hojas presentaban un porcentaje de humedad de $(77,9 \pm 0,8)\%$ y que luego de secarse por 48 h a 45°C alcanzaron una humedad final de $(7,8 \pm 0,1)\%$. El contenido de cenizas encontrado fue de $(6,98 \pm 0,07)\%$, mientras que, el extracto acuoso presentó un $(9,9 \pm 0,9)\%$ de proteínas, un $(0,38 \pm 0,01)\%$ de rebaudiósido A y un $(11,6 \pm 0,1)\%$ de esteviósido. Todos estos resultados fueron reportados en base seca de las hojas de *Stevia rebaudiana*.

1. Justificación

En la actualidad, problemas de salud como la obesidad, diabetes y enfermedades cardíacas, así como también problemas de caries en los dientes, han ido en aumento. Esto es debido a una combinación entre un estilo de vida sedentario y malos hábitos alimentarios, los cuales incluyen una ingesta elevada de azúcares (Popkin, 2007).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2012) cada año mueren en el mundo 2,8 millones de personas debido al sobrepeso o la obesidad, y entre 1980 y 2008 el porcentaje de obesidad tanto de mujeres y hombres se vio prácticamente duplicado. En Costa Rica, en el 2008, la tasa de mortalidad de personas entre 30 y 70 años debido a enfermedades cardiovasculares y diabetes ocupó el segundo lugar con 118 personas por cada 10 mil habitantes.

En el 2010 un estudio realizado por la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS) demostró que un 36,1% de la población presentaba sobrepeso y un 25,1% obesidad, mientras la diabetes presentó un aumento de 2,5% entre el 2004 y el 2010. Estas cifras alarmaron a las autoridades sanitarias, las cuales vieron como necesario fomentar un cambio en la dieta de los costarricenses para prevenir la incidencia de enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Rodríguez, 2010).

Uno de los cambios más importantes que se debe realizar en la dieta de los costarricenses es disminuir la ingesta de azúcares simples. Según la última Encuesta de Consumo Aparente de Alimentos, realizada en 1997, el consumo de azúcar simple era un 15% del valor energético total (VET), cuando la cifra recomendada es de un 10% (Esquivel, 2005). Una alternativa para reducir esta ingesta es el consumo de sustitutos de azúcar que no presenten un aporte calórico importante a la dieta.

Por lo general, este criterio es cumplido por los edulcorantes sintéticos que tienen un poder edulcorante mayor que la sacarosa (considerándose esta como el 100% de dulzor), lo que hace que se requieran cantidades muy pequeñas de ellos para endulzar los alimentos (Salminen y Hallikainen, 2001).

Los edulcorantes sintéticos han sido polémicos desde hace muchos años por ser potencialmente peligrosos para la salud; tal es el caso de la sacarina y el ciclamato, que

han sido ligados al aumento en la incidencia del cáncer de vejiga (Berdanier, 2008; Salminen y Hallikainen, 2001). Dentro de los más utilizados en el mercado se encuentran: sucralosa, sacarina, acesulfame K, aspartame y ciclamato, entre otros.

Además de sus cuestionamientos en temas de salud, una gran mayoría de los edulcorantes sintéticos son importados, por lo que representan un gasto para el país. De acuerdo con la Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER) (2012), los edulcorantes sintéticos en general se clasifican como una preparación alimenticia con partida arancelaria 2106.90.99.90; las importaciones provienen principalmente de Norte América, Sur América y Asia (en orden de prioridad descendente) y sólo en el 2011 se importaron 14 547 kg, lo que representó un gasto de \$18 188,0 (aproximadamente ¢9 184 940).

Ante la situación planteada, los consumidores actuales buscan productos naturales pues hacen la equivalencia de que natural es inofensivo y saludable. Esto ha hecho que el consumo de alimentos sin aditivos haya ido en aumento, motivándose así la utilización de edulcorantes naturales en empresas como Coca-Cola Company y Cargill Incorporated (Prakash *et al.*, 2008; Tristán, 2011; XTC World Innovation, 2011).

Una de estas alternativas naturales que ha llamado la atención de la industria alimentaria en los últimos años es el edulcorante obtenido a partir de las plantas de *Stevia rebaudiana*. Este presenta ventajas frente a otros edulcorantes pues no es un azúcar fermentable por los microorganismos de la boca (por lo tanto no es cariogénico), no proporciona calorías a la dieta y puede ser utilizado por personas que sufren de diabetes tipo II, fenilcetonuria u obesidad (Silva *et al.*, 2007).

Mundialmente, el mercado de la *Stevia* se encuentra en crecimiento acelerado; entre mediados del 2009 y mediados del 2010, el lanzamiento de nuevos productos con *Stevia* se incrementó en un 200% con productos lanzados en 35 países, de acuerdo con estudio de mercado realizado por la firma Mintel's Global New Product Database (GNPD). Predicciones de empresas líderes en este edulcorante proyectan que antes del 2015, la industria global de productos de *Stevia* se valorará en 10 mil millones de dólares. Además, la OMS estima que la ingesta de *Stevia* podría llegar a sustituir entre el 20% y el 30% de todos los edulcorantes dietéticos (*Stevia First Corporation*, 2012).

Debido a este crecimiento acelerado del mercado de la *Stevia*, es necesario que Costa Rica no se quede rezagada en la producción de este edulcorante, más cuando se tiene la ventaja de que la planta puede ser cultivada en ciertos sectores del territorio nacional (como Sarapiquí). Esto permitiría competir en el mercado internacional e innovar en el sector alimentario nacional, cuyas tendencias mundiales instan a presentar al consumidor un producto natural y que beneficie su apariencia y salud (Hidalgo *et al.*, 2009; Tristán, 2011).

También se podría dar una disminución de costos de producción y una disminución de las importaciones de edulcorantes, en general, ya que empresas como LAICA (Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar) importan el extracto de rebaudiósido A debido a que, a nivel nacional, no existe su producción industrial (Arias, 2011). Esta situación se une al hecho de que hay productores de *Stevia* en el país, que están perdiendo sus cultivos por la ausencia de compradores.

Con esta investigación se tendrían los cimientos de una metodología controlada de extracción y purificación del edulcorante, lo que ayudaría a todos los pequeños y medianos productores nacionales de *Stevia* a posicionarse en el mercado, ya sea como proveedores de la materia prima para las industrias que produzcan el extracto (como LAICA) o como productores del extracto edulcorante.

Aunque internacionalmente existen muchos estudios sobre las propiedades edulcorantes, las características fisicoquímicas y los procesos de extracción y purificación del extracto edulcorante obtenido a partir de *Stevia rebaudiana*, a nivel nacional hay muy poca investigación al respecto.

En el 2005, dos estudiantes de la EARTH (Escuela de la Agricultura de la Región Tropical Húmeda) desarrollaron su tesis de grado al comparar la extracción del edulcorante de las plantas de *Stevia rebaudiana*, realizada con agua o con etanol. Debido a la falta de cultivos en el país en ese momento, debieron utilizar plantas liofilizadas extranjeras, por lo cual no caracterizaron la materia prima nacional, y utilizaron como método de purificación filtros de carbón activado (Rodríguez y Sáenz, 2005).

Además, no realizaron una cuantificación de los esteviol glicósidos presentes en el extracto, si no que mediante cromatografía de capa fina (TLC por sus siglas en inglés) vieron de manera cualitativa qué tipo de compuestos (polares, medianamente polares o no polares) se lograban extraer con los distintos disolventes. En el análisis sensorial que llevaron a cabo, encontraron que la mejor extracción se realizaba con agua caliente pues con etanol el extracto final tenía mayor sabor amargo (Rodríguez y Sáenz, 2005).

Debido a que los estudios fueron realizados con plantas de otro país y bajo condiciones experimentales distintas, y dado el auge en la comercialización del edulcorante extraído de las plantas de *Stevia rebaudiana*, se hace necesario un estudio que caracterice las plantas sembradas en territorio nacional, y determine un método de extracción y purificación eficaz para la obtención del edulcorante.

Se sabe que la composición química de la planta depende de las condiciones bajo las cuales fue sembrada, por lo que el contenido de esteviol glicósidos, humedad, cenizas, entre otros, serán diferentes dependiendo del lugar geográfico donde se haya cultivado la *Stevia rebaudiana* (Gardana *et al.*, 2010; Kovylyayeva *et al.*, 2007).

Debido a lo anterior, y a que en Costa Rica aún no hay estudios en los cuales se haya caracterizado las hojas de las plantas sembradas en la zona de San Ramón de La Virgen de Sarapiquí, se genera la necesidad de analizar características importantes como cenizas, proteínas y contenido de esteviol glicósidos. La cuantificación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en la materia prima es de especial importancia, pues son los compuestos de mayor importancia e interés económico, y permite reportar la eficiencia del proceso de extracción.

Entre los beneficios más importantes que esta investigación brinda al país, está la elaboración de una metodología de extracción estandarizada y relativamente sencilla que permita a productores nacionales de *Stevia rebaudiana* puedan llevarla a cabo. Debido a su posible aplicación a nivel industrial, esta investigación cuenta con confidencialidad parcial.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Evaluar las condiciones de extracción y purificación del edulcorante obtenido de las hojas de *Stevia rebaudiana* cultivadas en Costa Rica sobre la concentración de esteviósido y rebaudiósido A así como la reducción del sabor amargo en el extracto obtenido.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la temperatura y la proporción hojas: agua en la extracción del rebaudiósido A y esteviósido presentes en las hojas de *Stevia rebaudiana* cultivadas en Costa Rica.
- Determinar el grado mínimo de purificación requerido para reducir el sabor amargo propio del extracto de *Stevia rebaudiana*, mediante comparación entre pruebas sensoriales y análisis de glicósidos por HPLC.
- Caracterizar fisicoquímicamente las hojas de *Stevia rebaudiana* cultivadas en Costa Rica para determinar las características de la materia prima.

3. Marco teórico

3.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni

3.1.1. Generalidades sobre la planta

Stevia rebaudiana Bertoni es originaria de las regiones montañosas del noreste de Paraguay. En esta zona los indios guaraníes conocían los atributos medicinales y edulcorantes de las hojas de la planta desde hace cientos de años y la llamaban “*kaa he-he*” que se traduce como “hierba dulce” (Yadav *et al.*, 2011).



Figura 1. Hojas de *Stevia rebaudiana*¹.

La especie *rebaudiana* taxonómicamente pertenece al género *Stevia* (el cual contiene entre 220 y 230 especies distintas), este género pertenece a la tribu Eupatorieae la cual a su vez pertenece a la familia Compositae (Djendoel, 2001).

Esta planta crece principalmente en las regiones no amazónicas de América del Sur y hacia el sur de la región central de Argentina. Requiere un clima semi-húmedo subtropical, una temperatura promedio de 23°C y precipitaciones anuales que rondan entre 1500 mm y 1800 mm (Yadav *et al.*, 2011).

¹ Tomado de http://www.anniesremedy.com/herb_detail160.php

3.1.2. Principales compuestos presentes en la planta

3.1.2.1. Esteviol glicósidos

La importancia comercial de la planta se debe primordialmente al descubrimiento de los esteviol glicósidos presentes de manera mayoritaria en las hojas de la planta, ya que estos son los responsables del efecto edulcorante. La planta acumula más de 30 diferentes esteviol glicósidos que pueden llegar a sumar hasta el 20% de la masa en base seca de las hojas. Todos tienen en común la aglicona (grupo “no azúcar” del glicósido) llamada esteviol y difieren según el número y tipo de azúcares adheridos a la misma (O'Brien-Nabors, 2011; Wolwer-Rieck, 2012).

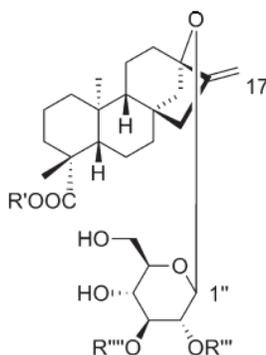
En un estudio realizado por Bondarev *et al.* (2003) se analizó el contenido de esteviol glicósidos en varios órganos de la planta y se determinó que el mayor contenido de los mismos está en las hojas, mientras que los tallos presentan un contenido entre 12 y 13 veces menor. Algunos de los esteviol glicósidos más conocidos son: esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido F, dulcósido A, rubusósido y esteviolbiósido (Pieri *et al.*, 2011). Las estructuras de los mismos se presentan en la Figura 2.

El esteviósido y el rebaudiósido A son los glicósidos más abundantes en la planta, y son los de mayor valor comercial; los otros glicósidos se encuentran en porcentajes bastante pequeños (Woelwer-Rieck *et al.*, 2010). El esteviósido es el glicósido de mayor abundancia, su contenido varía entre un 4% y un 20% del peso total de las hojas secas, es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa y presenta un sabor residual amargo (Kovylyayeva *et al.*, 2007). El rebaudiósido A es el segundo más abundante y es el que presenta mayor dulzor, su contenido es de aproximadamente un 3% del peso total de las hojas secas y es de 350 a 450 veces más dulce que la sacarosa (Kenelly, 2001; Pieri *et al.*, 2011).

Además de sus propiedades como edulcorante, hay estudios que demuestran que tanto el esteviósido como los extractos de *Stevia rebaudiana* presentan propiedades medicinales, entre las cuales caben recalcar (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009):

- Efecto antihiperglicémico.

- Efecto antihipertensivo.
- Efecto antiinflamatorio y anticancerígeno.
- Efecto antidiarreico.



St	R'=R'''= β -D-Glc, R''''=H
RbA	R'=R'''=R''''= β -D-Glc
RbB	R'=H, R''''=R'''= β -D-Glc
RbC	R'=R''''= β -D-Glc, R'''= α -L-Rha
RbD	R'= β -D-Glc- β -D-Glc(2 \rightarrow 1) R''''=R'''= β -D-Glc
RbF	R'=R''''= β -D-Glc, R'''= β -D-Xyl
DuA	R'= β -D-Glc, R'''= α -L-Rha, R''''=H
Rub	R'= β -D-Glc, R''''=R'''=H
Stb	R'=H, R''''= β -D-Glc, R'''=H

St= esteviósido; RbA= rebaudiósido A, RbB= rebaudiósido B; RbC= rebaudiósido C; RbD= rebaudiósido D; RbF= rebaudiósido F; DuA= dulcósido A; Rub= rubusósido; Stb: esteviolbiósido; Glc= glucosa; Rha= ramnosa; Xyl= xilosa

Figura 2. Estructura de los esteviol glicósidos presentes en *Stevia rebaudiana*. Tomado de Pieri *et al.* (2011).

3.1.2.2. Proteínas

Se reporta la presencia de proteínas en las hojas (aproximadamente 11,41% del peso seco) (Abou-Arab *et al.*, 2010), las cuales aportan características favorables al edulcorante. Por ejemplo, debido a su alto contenido proteico, el edulcorante en polvo tiene una alta capacidad de retención de agua, lo que ayuda a dar viscosidad a productos

como sopas y salsas. También, debido a la capacidad de las proteínas de brindar estabilidad a emulsiones, el extracto acuoso de las hojas tendría aplicación en productos como pastas de pastelería, queques, productos lácteos, postres congelados entre otros (Lemus *et al.*, 2012).

3.1.2.3. Cenizas

Existen reportes previos de análisis en plantas de *Stevia rebaudiana* sembradas en otros países, los cuales demuestran que son ricas en algunos minerales. Abou-Arab *et al.* (2010) reportaron la presencia de diversos minerales en las hojas, como por ejemplo potasio (21,15 mg/ 100 g de materia seca), calcio (17,70 mg/ 100 g de materia seca), sodio (14,93 mg/ 100 g de materia seca).

3.1.2.4. Otros compuestos

Las hojas de *Stevia rebaudiana* tienen, además de los esteviol glicósidos, flavonoides, alcaloides, clorofilas y xantófilas solubles en agua, ácidos hidroxicinámicos (como el cafeico, clorogénico, entre otros), oligosacáridos neutros solubles en agua, azúcares libres, aminoácidos, lípidos, aceites esenciales, proteínas y elementos traza (Kholtoev *et al.*, 2003).

3.2. Edulcorante extraído de las plantas de *Stevia rebaudiana*

3.2.1. *Aplicaciones importantes en la industria alimentaria*

El rebaudiósido A y el esteviósido extraídos de las plantas de *Stevia rebaudiana* son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como edulcorante no calórico y natural, principalmente el rebaudiósido A por ser el de mayor sabor dulce.

Los extractos de *Stevia rebaudiana* ya han sido usados a nivel mundial como edulcorantes. Japón es actualmente el país con el uso más amplio y diverso de los extractos. En ese país, los extractos purificados de *Stevia rebaudiana* se empezaron a utilizar comercialmente a mediados de los años 70's como sustituto de edulcorantes y saborizantes que habían sido prohibidos por ley en esa época (Kingham, 2001). En

Japón, la *Stevia rebaudiana* se ha comercializado principalmente en tres presentaciones (Mizutani y Tanaka, 2001):

- Extracto de *Stevia*: es un polvo blanquecino-amarillento que contiene esteviósido, rebaudiósidos A y C, y dulcósido. Estos deben sumar mínimo un 80% del extracto final.
- Extracto de *Stevia* “azúcar transferido”: El extracto de *Stevia* se trata con ciclomaltodextrin-glucanotransferasa (CGTasa) y un almidón soluble. Las unidades α -glucosídicas del almidón se transfieren a la cuarta posición de las fracciones glucosílicas de los esteviol glicósidos, mejorándose así la calidad del sabor.
- Rebaudiósido A (extracto enriquecido de *Stevia*): Es un extracto rico en rebaudiósido A, pues este es el glicósido más dulce de la planta y el que tienen un sabor más similar a la sacarosa. Se prepara a partir de hojas de una variedad mejorada de *Stevia rebaudiana* que tienen proporciones mayores de rebaudiósido A.

Corea del Sur ha presentado un crecimiento en el consumo de *Stevia rebaudiana* bastante importante en los últimos años. Utilizan el extracto como edulcorante en el soju (bebida alcohólica destilada a partir de camote) (Kim *et al.*, 2001).

Varias aplicaciones en el sector alimentario hacen que el extracto edulcorante de *Stevia rebaudiana* sea muy llamativo a nivel comercial. Entre ellos está su uso como sustituto del azúcar de mesa (sacarosa), tal es el caso de productos como Vida *Stevia* y Pure Via™. Se ha probado el extracto en polvo de *Stevia rebaudiana* como edulcorante en yogur y este ha demostrado ser efectivo (Galvis, 2009).

El sector de bebidas es uno de los que más emplea este edulcorante como sustituto del azúcar de mesa. Coca-Cola Company® tiene 25 productos distintos endulzados con esteviol glicósidos en Japón, Argentina, Canadá, Francia, Turquía y los Estados Unidos (Coca-Cola® Great Britain, 2010). En Estados Unidos destacan Sprite Green® endulzada con Truvia® (BevReview, 2009) y Sprite® endulzada con Truvia®. En

Francia se encuentra Fanta Still® endulzada con extracto de *Stevia* (Coca-Cola® France, 2011), Sprite® y Nestea® endulzados con Truvia® (Coca-Cola® France, 2012).

Otras marcas de refrescos carbonatados que también utilizan extractos de *Stevia* son Zevia® (Zevia®, 2012) y SANS Natural Diet Soda, endulzado con Rebiana® (SANS® Natural diet soda, 2001) ambos productos distribuidos en Estados Unidos y Canadá.

PepsiCo. también ha sacado productos endulzados con *Stevia*, entre ellos destacan la versión cero calorías de SoBe® LifeWater® en Estados Unidos (BevReview, 2009) y Green by 7Up® en Argentina (Ingredientes y Productos Funcionales (IPF), 2012). Además, en 2009, Dr Pepper Snapple Group introdujo al mercado estadounidense “All Sports Naturally Zero”, la primera bebida deportiva sin calorías endulzada con Rebiana® (Dr Pepper Snapple Group, 2009).

En Costa Rica, la planta ha sido introducida en el sector agrícola, sin embargo, la ausencia de un proceso estandarizado para la extracción y purificación del edulcorante ha imposibilitado su producción a nivel nacional. Hace poco tiempo LAICA introdujo al mercado nacional, un edulcorante con base en *Stevia rebaudiana* llamado Natuvia, que como se mencionó con anterioridad, está elaborado a partir de un extracto importado. En los supermercados nacionales se encuentran otras marcas importadas, como por ejemplo:

- Vida *Stevia*: ofrecen el edulcorante en dos presentaciones diferentes; en polvo y líquido (para usar en gotas).
- Pure Via™: se vende en su presentación en polvo. Es una mezcla entre dextrosa, rebaudiósido A de 97% de pureza, extracto de celulosa y sabores naturales (PURE VIA™, 2012).

El principal problema de usar extractos de *Stevia rebaudiana* como edulcorante es el sabor residual amargo que repercute en su aceptabilidad comercial (Kaushik *et al.*, 2010). Se ha determinado que el sabor amargo del extracto se debe principalmente al contenido de esteviósido. Entre mayor sea el porcentaje de rebaudiósido A en el extracto final, mayor dulzor y mejor sabor tendrá (Rank y Midmore, 2006) mientras que altos

contenidos de esteviósido propician un sabor residual amargo (Kovylyaeva *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007).

Hay estudios que demuestran que los receptores presentes en la lengua, responsables de detectar el sabor residual amargo en los extractos de *Stevia*, son el hTAS2R4 y el hTAS2R14. Además, se encontró que la estructura de los esteviol glicósidos es determinante en la intensidad del sabor amargo, pues entre más moléculas de glucosa presente la estructura, mayor será el sabor dulce y menor el amargo. Esto explica por qué el rebaudiósido A, al tener una molécula de glucosa más que el esteviósido, presenta un mayor sabor dulce (Hellfritsch *et al.*, 2012).

Otros compuestos asociados al amargo de la *Stevia rebaudiana* son las sesquiterpenlactonas (Cardello *et al.*, 1999) y los polifenoles. Se ha determinado también que un iminoazúcar (azúcar con un átomo de nitrógeno en la posición donde va el oxígeno endocíclico) alcaloide soluble en agua, llamado esteviamina, aporta sabor amargo a la *Stevia rebaudiana* (Michalik *et al.*, 2010).

3.2.2. Normativa vigente con respecto al uso del edulcorante en alimentos

En Estados Unidos y en Europa el uso de este edulcorante en alimentos ha sido cuestionado por el esteviol; un metabolito secundario del esteviósido producido por la microflora del tracto intestinal. Este metabolito ha sido considerado como genotóxico (que afecta los ácidos nucleicos del ADN) y desarrollador de toxicidad (Kinghorn, 2001). Sin embargo, su uso ha sido aprobado recientemente por diversas entidades gubernamentales.

En Estados Unidos, el extracto de rebaudiósido A, también conocido como rebiana, recibió el status de GRAS en el 2008; por su parte, el extracto altamente purificado de esteviol glicósidos recibió el status de GRAS en el 2009 (FDA, 2009; Woelwer-Rieck *et al.*, 2010). La FDA adjudica el estatus otorgado a que no encontraron bases para oponerse al uso y mercadeo de los extractos purificados de *Stevia* (FDA, 2011b).

La FDA aprobó como GRAS los extractos purificados de rebaudiósido A preparados por Sweet Green Fields, Blue California, Cargill, Inc. y Whole Earth Sweetener

Company, así como el extracto elaborado por McNeil Nutritionals de esteviol glicósidos purificados conteniendo rebaudiósido A como componente principal. El ente internacional JECFA (Joint FAO²/WHO³ Expert Committee on Food Additives), en el 2008, aumentó el IDA (Ingesta Diaria Admisible) de 2 a 4 mg/kg del peso corporal (Woelwer-Rieck *et al.*, 2010). En el 2010, la EFSA (European Food Safety Authority) publicó una opinión científica en la cual, el Panel de EFSA en Aditivos Alimenticios y Fuentes de Nutrientes adicionados a los Alimentos (ANS), concluía que los extractos glicosídicos de *Stevia rebaudiana* que cumplan con las especificaciones de JECFA no son carcinogénicos, genotóxicos ni están asociados con ninguna toxicidad reproductiva y/o de desarrollo (EFSA, 2010).

En Europa se aprobó el uso de los extractos de *Stevia rebaudiana* como edulcorante el 12 de noviembre del 2011, después de una larga investigación por parte de la EFSA. El único país europeo que había utilizado los extractos de *Stevia rebaudiana* antes de la fecha de aprobación fue Francia, donde la marca Danone fabrica yogures con ese edulcorante desde el 2009 (Fundación OPTI, 2011).

En Australia y en Nueva Zelanda, FSANZ (Food Standards Australia New Zealand) aprobó en el 2008 el uso de los esteviol glicósidos como edulcorantes naturales (Ferre, 2008).

3.3. Proceso de extracción del edulcorante a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana*

La extracción de los esteviol glicósidos se hace principalmente en las hojas debido al bajo contenido de estos compuestos en otros órganos de la planta (Abou-Arab *et al.*, 2010; Bovanová *et al.*, 1998; Chhaya *et al.*, 2012; Dacome *et al.*, 2005; Gardana *et al.*, 2010; Kolb *et al.*, 2001; Kovylyaeva *et al.*, 2007; Kumar, 1986; Payzant *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2007; Soto y Del Val, 2002; Wallin, 2004; Woelwer-Rieck *et al.*, 2010).

² Food and Agriculture Organization of the United Nations

³ World Health Organization (Organización Mundial de la Salud u OMS)

Las condiciones de extracción serán importantes en términos de la calidad del edulcorante, pues de ellas dependerá el tipo y cantidad de impurezas que se extraigan. Dentro de las impurezas que se extraen se encuentran pigmentos, sesquiterpenlactonas, ácidos orgánicos entre otros. Algunos de los factores de mayor influencia en la extracción de los esteviol glicósidos son la temperatura, el tipo de disolvente y la proporción disolvente: hojas (Abou-Arab *et al.*, 2010; Pól *et al.*, 2007).

Otro aspecto importante de la calidad del edulcorante, que se ve afectado por las condiciones de extracción, es la ausencia o disminución en el sabor amargo. El sabor amargo del extracto se debe principalmente a la mezcla de esteviol glicósidos que se logren extraer de la planta. Dado que los estudios demuestran que el esteviósido es el esteviol glicósido mayoritariamente responsable del sabor amargo, se busca obtener un extracto con un alto contenido de rebaudiósido A y bajo contenido de esteviósido (Rank y Midmore, 2006).

Es por las razones antes mencionadas, que se busca encontrar la condición que genere una mayor extracción de los esteviol glicósidos de interés y una menor extracción de impurezas.

3.3.1. Métodos de extracción reportados en la literatura

Existen diversos métodos reportados para la extracción del edulcorante entre los que resaltan:

- Extracción por fluido presurizado (Pól *et al.*, 2007).
- Reflujo (Kovylyeva *et al.*, 2007).
- Método de Soxhlet (Kolb *et al.*, 2001)
- Extracción a partir de inmersión de la materia prima en un disolvente por un tiempo y temperatura específicos (Abou-Arab *et al.*, 2010; Chhaya *et al.*, 2012).
- Extracción y purificación con MARs (Mixt mode macroporus adsorption resin, por sus siglas en inglés) (Liu *et al.*, 2011).

El método de extracción por inmersión es uno de los métodos más usados por ser el más sencillo y barato entre los mencionados.

3.3.2. Factores que afectan la extracción del edulcorante

3.3.2.1. Tipo de disolvente

a. Disolventes orgánicos

El metanol es uno de los alcoholes mencionados como posible medio de extracción ya que ha demostrado una extracción superior del esteviósido y una menor extracción de impurezas, lo que conlleva a un proceso de purificación más corto y por lo tanto menos costoso. Sin embargo, debido a su alta toxicidad tanto para el ser humano como para el medio ambiente y mayor extracción del esteviósido (compuesto responsable del sabor residual amargo) no se recomienda utilizar este alcohol (Abou-Arab *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2006).

Soto y Del Val (2002) utilizaron etanol, acetato de etilo y una mezcla de acetato de etilo con etanol como medios de extracción y no obtuvieron resultados finales satisfactorios con respecto a la pureza del extracto. Otros disolventes orgánicos, como por ejemplo cloroformo, también son mencionados como posibles medios de extracción (Kolb *et al.*, 2001), pero debido a su toxicidad ponen en riesgo la inocuidad del edulcorante.

b. Agua

El agua es mencionada en varios estudios como un medio de extracción eficaz, por ser un disolvente amigable con el medio ambiente y por la reducción de costos que implica su utilización con respecto a otros disolventes. Entre estos estudios se encuentran los hechos por:

- Chhaya *et al.* (2012) utiliza como medio de extracción agua destilada y ponen la muestra en un baño a 78°C por 56 minutos.
- Wallin (2004) describe una extracción con agua caliente por inmersión entre 20 y 30 minutos.

- Payzant *et al.* (1999) se basan en el método de extracción descrito por Giovanneto (1990) en el cual se usa como medio de extracción agua destilada a temperaturas entre ambiente y 65°C.

La desventaja que presenta utilizar agua es que disuelve una mayor cantidad de impurezas. Entre las impurezas que se extraen con el agua están clorofilas, xantofilas y oligosacáridos solubles en agua. Otra desventaja es la limitada solubilidad de los esteviol glicósidos con respecto a otros disolventes como el metanol y el etanol (Bovanová *et al.*, 1998; Kholtoev *et al.*, 2003; Pól *et al.*, 2007)

3.3.2.2. Granulometría de las hojas

La difusión del soluto disuelto dentro de un sólido (en este caso los esteviol glicósidos disueltos dentro de la matriz de las hojas) hacia el disolvente es el paso limitante del proceso de transferencia (Cacace y Mazza, 2003), y este se puede explicar mediante las leyes de Fick de difusión sólido-líquido, las cuales explican los fenómenos de transferencia de masa.

La segunda ley de Fick explica el fenómeno de transferencia que se da en un estado no estacionario, es decir, cuando en zonas determinadas del sólido el flujo de difusión y el gradiente de difusión varían con el tiempo, generando agotamiento o acumulación de las sustancias que se difunden (Castelló, 2006; Departamento de Química Física de la Universitat de Valencia, 2010) La ecuación que ilustra ese principio es la siguiente:

$$\frac{\delta C}{\delta t} = k \frac{\delta^2 C}{\delta^2 x}$$

Donde:

- δ es la derivada parcial
- t es el tiempo (s)
- C es la concentración del soluto
- C/t es la velocidad de flujo del soluto
- D es la difusividad del soluto o coeficiente de difusión (m²/s)

- x es la distancia de difusión del soluto.

De acuerdo a la ecuación anterior entre menor sea la distancia de difusión, más rápida será la transferencia. Es decir que entre menor sea la granulometría, se espera una transferencia más rápida de esteviol glicósidos.

Por otro lado, una derivación de la ley de Fick permite relacionar la superficie de contacto con la transferencia del soluto, en procesos de extracción donde el volumen del disolvente se mantiene constante a través del tiempo (como es el caso de la extracción llevada a cabo en esta investigación) (Brennan, 2006). La ecuación que explica esta relación es:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{kA (C_s - C)}{V}$$

Donde

- $\frac{dC}{dt}$ es el cambio en la concentración del soluto (C) a través del tiempo (t).
- k es el coeficiente de transferencia de masa.
- A es el área superficial expuesta.
- V es el volumen total de la disolución. Es un volumen constante a través del tiempo.
- C es la concentración del soluto en el seno del disolvente.
- C_s es la concentración del soluto en la superficie del sólido.

De acuerdo a la ecuación anterior, entre mayor sea el área o superficie de contacto del sólido, mayor será la tasa de transferencia del soluto, y una mayor superficie de contacto se logra con un mayor grado de molienda.

3.3.2.3. Proporción hojas:disolvente

De acuerdo con las leyes de Fick de transferencia de masa, una alta proporción sólido:disolvente promueve un incremento en el gradiente de concentración, lo que se traduce en un aumento en la velocidad de difusión que permite una mayor extracción del soluto de interés (en este caso los esteviol glicósidos) por parte del disolvente (Tan *et al.*, 2011).

En el estudio realizado por Abou-Arab *et al.* (2010) se demostró que la proporción empleada de hojas y agua influye en la cantidad de esteviósido extraído. En ese experimento los autores dejaron las hojas secas y pulverizadas en inmersión en agua a 65°C por 3 horas. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro I.

Cuadro I. Efecto de la proporción hojas:agua en el contenido de esteviósido extraído encontrado por Abou-Arab *et al.* (2010).

Proporción hojas:agua	Concentración de esteviósido extraído* (%m/m)
1:15	6,75 a
1:25	7,13 b
1:35	7,53 c
1:45	7,59 d
1:65	7,61 f
1:55	7,60 df
1:75	7,60 df

*La concentración de esteviósido extraído está dado en g de esteviósido/ 100 g de hojas secas y molidas. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa con un 5% de significancia.

Otras proporciones hojas:agua reportadas en la literatura son las siguientes:

- Chhaya *et al.* (2012); Soto y Del Val (2002) utilizaron una proporción de 1:14.
- Kovylyaeva *et al.* (2007) utilizaron una proporción de 1:20.
- Dacome *et al.* (2005) utilizaron una proporción de 1:35.

3.3.2.4. Temperatura de extracción

La temperatura es un factor importante en los fenómenos de extracción sólido líquido pues afecta la difusividad o constante de difusión (k) que se mencionó en la ecuación de la segunda ley de Fick, esto debido a lo establecido en la ecuación de Stokes-Einstein (Cussler, 1997):

$$k = \frac{k_B \times T}{6\pi \times \mu \times R_0}$$

Donde:

- k_B es la constante de Boltzmann.
- μ es la viscosidad del disolvente.
- T es la temperatura absoluta.
- R_0 es el radio del soluto.

Una derivación de esta ley establece que (Cacace y Mazza, 2003):

$$k \propto (T/\eta)$$

Donde:

- T es la temperatura absoluta
- η es el coeficiente de viscosidad dinámico

Por lo tanto, entre mayor sea la temperatura mayor será el coeficiente de difusión y por ende mayor será la velocidad de transferencia de soluto.

Se ha reportado que la temperatura del medio de extracción influye en la calidad y pureza del extracto de *Stevia rebaudiana*. En general, hay una relación directa entre la temperatura y la cantidad de impurezas y esteviol glicósidos que se extraen.

A bajas temperaturas se extraen menos impurezas, en este caso compuestos de alto peso molecular como lípidos, proteínas, polifenoles y pigmentos (clorofila siendo el más importante), simplificándose así el proceso de purificación. Algunos estudios demuestran que la reducción en la extracción de impurezas puede llegar hasta un 70% (Chabot y Beulieu, 2012; Kenelly, 2001).

Dentro de las desventajas que presenta la extracción a bajas temperaturas está una reducción en la capacidad de extracción de los esteviol glicósidos. El estevióside presenta una solubilidad de tan solo 0,13% en agua a temperatura ambiente (aproximadamente 1 g en 800 mL de agua) mientras el rebaudiósido A tiene una solubilidad de 0,80% bajo esas mismas condiciones (Kinghorn, 2001; Kumar, 1986).

En el caso de altas temperaturas de extracción, se sabe que al aumentar la temperatura, la solubilidad de los esteviol glicósidos es favorecida. Abou-Arab *et al.* (2010) reportaron que se logra una mayor extracción del rebaudiósido A si se usan temperaturas altas. La desventaja de usar altas temperaturas es que, así como aumenta la solubilidad de los esteviol glicósidos, también aumenta la solubilidad de las impurezas.

3.4. Proceso de purificación del extracto edulcorante

La purificación del extracto es un proceso sumamente importante de estandarizar, ya que el consumidor tiene expectativas específicas de un producto que se declare como natural, entre ellas la ausencia de residuos de disolventes (Pieri *et al.*, 2011), que sumado a otros parámetros de calidad como ausencia de pigmentos que puedan teñir el alimento, y un bajo sabor residual (mayor semejanza posible al sabor de la sacarosa), hacen necesario establecer las condiciones a las cuales el consumidor considera que el producto es aceptable y que la presencia de contaminantes es mínima.

Además, la purificación es uno de los procesos más costosos en la elaboración del edulcorante y por ende es necesario establecer un procedimiento sencillo y de bajo costo, que sea rentable y factible para pequeños y medianos productores.

Para eliminar las impurezas de los extractos existe una gran diversidad de métodos y combinaciones de ellos:

- Uso de distintos ácidos y bases para modificar el pH y eliminar las impurezas (Kumar, 1986).
- Tratamiento enzimático y uso de resinas de intercambio iónico (Abeylan *et al.*, 2010; Payzant *et al.*, 1999).
- Extracción por inyección de vapor y posterior purificación por tratamiento con sal básica para flocular y resinas de intercambio iónico (Jonnala *et al.*, 2006).
- Utilización de zeolitas y membranas (Silva *et al.*, 2007).
- Ultrafiltración del extracto (Chhaya *et al.*, 2012).

- Utilización de hidróxido de calcio y resinas de intercambio iónico. Este método puede hacerse con diferentes volúmenes de extracto a diferencia de métodos como la microfiltración. Además no utiliza gran cantidad de reactivos químicos y es más sencillo que la utilización de enzimas (Abou-Arab *et al.*, 2010; Giovanneto, 1990).

A continuación se mencionan con más detalle, tres de los métodos de purificación mencionados.

3.4.1. Eliminación de impurezas por floculación

La floculación es un término fácilmente confundible con la coagulación; no hay un acuerdo general sobre cuándo se debe utilizar cada término. Sin embargo, una de las convenciones establece que ambos términos forman parte del fenómeno de agregación y precipitación de impurezas; así, la coagulación es la desestabilización generada por medio de ciertos aditivos y la floculación implica la formación de agregados (Gregory, 2005).

En general, la floculación se lleva a cabo para eliminar partículas coloidales que se encuentran estabilizadas por su superficie cargada y, por lo tanto, suspendidas en un medio líquido. También se utiliza para la eliminación de proteínas, las cuales al variar la carga ya sea su grupo ácido carboxílico o su grupo amino, pueden precipitar. Una de las formas mediante las cuales se puede generar la precipitación de estas impurezas es aumentando o disminuyendo el pH del medio (Gregory, 2005).

3.4.2. Purificación por medio del uso de resinas de intercambio iónico

La purificación por resinas de intercambio iónico, consiste en la sustitución de los iones de una solución, por los iones contenidos en la estructura sólida de una resina. Este fenómeno es una adsorción química, en la cual ocurre intercambio iónico en puntos definidos de la resina (Ibarz y Barbosa, 2002).

Las resinas de intercambio iónico son polímeros en forma de pequeñas esferas porosas con un medio acuoso en su interior, en las cuales se da la fijación mediante enlace covalente de un ión que no puede ser removido o reemplazado. Para que la

estructura interna de la resina se mantenga neutra, se debe agregar un contraión (con carga opuesta al ión) el cual puede salir y entrar con libertad de la resina (Rohm and Haas, 2008; Sigma Aldrich, 2011).

Cuando la resina es inmersa en un medio en el cual es insoluble, el contraión se puede mover fuera de la estructura polimérica y puede ser intercambiado por otro contraión del medio circundante ya que la resina por si misma busca la neutralidad. Este intercambio se da cuando los iones o impurezas en el extracto, presentan una mayor afinidad con el ión fijo de la resina, que el contraión. Esto es conocido como la exclusión de Donnan y es el mecanismo que permite eliminar impurezas a través del intercambio iónico (Sigma Aldrich, 2011).

3.4.2.1. Estructura física y química de las resinas de intercambio iónico

Las resinas pueden ser fabricadas en alguna de dos estructuras físicas: una estructura tipo gel o una estructura macroporosa. Las estructuras tipo gel son polímeros homogéneos entrecruzados y tienen sitios de intercambio distribuidos de manera homogénea en toda la esfera. Son las más encontradas en el mercado pues presentan la mayor eficiencia de funcionamiento y son de bajo costo. Las estructuras macroporosas están hechas con grandes poros que permiten el acceso a sitios internos de la resina para el intercambio y tienen un aspecto esponjoso (Avilla, 2002).



Figura 3. Resina tipo gel⁴ (izquierda) y resina macroporosa⁵.

⁴ Tomado de http://www.iotech.ru/en/ion_exchange_resins/

3.4.2.2. Tipos de resinas de intercambio iónico

Dependiendo del tipo de ión que esté inmovilizado en la estructura de la resina se pueden hablar de dos tipos de resinas (Grandison y Lewis, 1996):

- Resinas de intercambio catiónicas: Presentan un anión fijado en su estructura, por lo que el contraión es un catión el cual puede ser intercambiado con el medio.
- Resinas de intercambio aniónicas: Presentan un catión fijado en su estructura, por lo que el contraión es un anión el cual puede ser intercambiado con el medio.

Estas a su vez se subdividen, según Avilla (2002), como se muestra en la Figura 4. Las resinas catiónicas fuertemente ácidas derivan su funcionalidad del ácido sulfónico, por lo que se caracterizan por tener como anión fijo el sulfonato ($^{-}\text{SO}_3$) y por trabajar a cualquier pH. Por su parte las resinas catiónicas débilmente ácidas se derivan del ácido carboxílico por lo que se caracterizan por tener como anión fijo el carboxilato (COO^{-}). Ambos tipos de resinas presentan como contraión ya sea el H^{+} o el Na^{+} (Avilla, 2002).

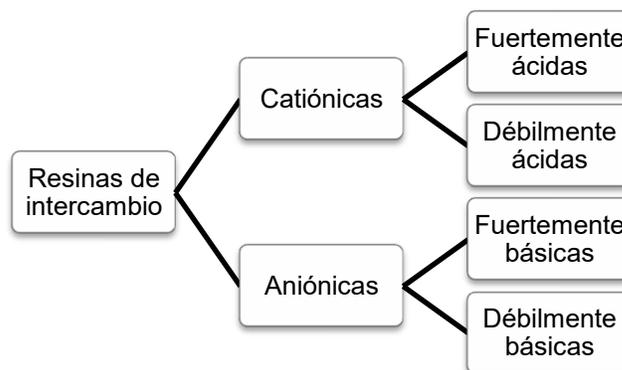


Figura 4. Clasificación de las resinas de intercambio catiónicas y aniónicas.

⁵ Tomado de <http://www.topfreebiz.com/product/2386569/Macroporous-Type-Polyacrylate-Weak-Base-Anion-Exchange-Resin-Sqd-815.htm>

Las resinas aniónicas fuertemente básicas se derivan del amonio cuaternario por lo que este es su catión fijo (N^+R_3). Las resinas aniónicas débiles tienen un grupo funcional de poliamina el cual ayuda en la eliminación de ácidos fuertes, por lo que se suele hacer un tratamiento con esta resina luego de haber realizado un tratamiento con resina catiónica fuertemente ácida. Ambos tipos de resinas aniónicas presentan como contraión ya sea el Cl^- o el OH^- (Avilla, 2002).

3.4.3. Resinas adsorbentes poliméricas

Son estructuras altamente porosas cuyas superficies internas pueden adsorber una gran variedad de compuestos dependiendo del medio en que sean usados. Entonces, si se utiliza un disolvente polar como el agua, la resina tendrá un comportamiento no polar y, por lo tanto, adsorberá compuestos orgánicos mientras que si es utilizada con un disolvente no polar, como hidrocarburos, tendrá un comportamiento polar y adsorberá especies con algún grado de polaridad (Dow, 2012; Rohm and Haas, 2000).

Dependiendo del compuesto que se quiera eliminar, así será el tipo de resina adsorbente que se deberá utilizar; por ejemplo, las resinas XADTM7HP y XADTM761 se utilizan para purificación de extractos de plantas y enzimas (Dow, 2012).

3.4.4. Uso industrial y regulación de las resinas de intercambio iónico y los adsorbentes poliméricos

Las resinas de intercambio iónico son ampliamente utilizadas en varias áreas de la industria alimentaria, por ejemplo (LanXESS, 2012):

- Refinación y purificación de edulcorantes.
- Desmineralización, eliminación del sabor amargo y de la acidez de jugos.
- Refinamiento de ácidos de grado alimentario y de glicerol.
- Ablandamiento de jugos con pectina.
- Desmineralización de jugos de gelatina y de suero lácteo.

Con respecto al uso en alimentos de las resinas, la FDA establece que resinas sulfonadas, copolímeros de divinilbenceno y estireno, así como poliestireno con cloro metilada y luego aminada con trimetilamina, pueden ser utilizadas para el tratamiento de alimentos bajo condiciones específicas (FDA, 2011a). Las resinas utilizadas en esta investigación cumplen con las regulaciones establecidas, de acuerdo a la información de sus fichas técnicas.

La implementación tanto de resinas de intercambio iónico, como de resinas de adsorción es uno de los métodos de purificación más utilizados para la elaboración del edulcorante obtenido a partir de la *Stevia rebaudiana*. Empresas como Coca-Cola Company y Cargill Inc. tienen una metodología establecida de purificación con resinas de intercambio para la producción de Rebiana[®], el extracto de rebaudiósido A altamente purificado que se encuentra en el edulcorante Truvia[®] (Prakash *et al.*, 2008).

La implementación de resinas de intercambio iónico y de resinas de adsorción en el proceso de purificación del extracto obtenido a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana*, también ha sido reportada por:

- Chabot y Beulieu (2012): Evaluaron dos distintos tipos de resinas de adsorción y un tipo de resina aniónica fuerte.
- Chen *et al.* (2012): Evaluaron 21 diferentes resinas macroporosas de adsorción (MARs por sus siglas en inglés) en forma de camas mixtas para separar el rebaudiósido A de una mezcla de esteviol glicósidos.
- Chiang *et al.* (2011): Implementaron resinas de adsorción para realizar una separación cromatográfica del rebaudiósido A y el esteviósido.
- Jonnala *et al.* (2006): Purificaron el extracto primero con una resina catiónica fuerte y luego con una resina aniónica débil. Después de secar el eluido obtuvieron un sólido con aproximadamente 60% de esteviósido.
- Payzant *et al.* (1999): Utilizaron tres distintas resinas de intercambio iónico y después de secar el eluido obtuvieron un sólido con aproximadamente 70% de esteviol glicósidos.

- Shi *et al.* (2002): Sintetizaron una resina de adsorción que además tuviera la capacidad de eliminar color (como las resinas aniónicas). Para ello, le agregaron grupos amino cuaternarios.
- Soto y Del Val (2002): Implementaron una resina de adsorción, una resina aniónica fuerte y una resina catiónica fuerte para purificar el extracto. Reportaron un rendimiento de aproximadamente un 5% de esteviol glicósidos (sobre la base de hojas secas).

3.4.5. Factores que afectan la capacidad de purificación de una resina

La capacidad de intercambio iónico o de adsorción en una resina se ve influenciada por una gran diversidad de factores, los cuales deben ser tomados en consideración a la hora de escoger una resina y las condiciones bajo las cuales se va a utilizar. GE Water & Process Technologies (2009) y Kammerer *et al.* (2011) mencionan los siguientes:

- Existencia de un daño mecánico en las esferas de la resina.
- Temperatura de elución a través de las resinas.
- La profundidad o altura de la cama (especialmente en resinas de tipo gel), pues entre menor sea la profundidad, menor la cantidad de intercambio.
- La carga (cantidad de muestra por purificar) que se le aplique a la resina, pues si la carga es muy grande puede ser que se sobrepase la capacidad de intercambio de la resina.
- El flujo, ya que afectará el tiempo de contacto de la muestra con la resina.
- La distribución del tamaño de partícula de la resina, pues afecta la pérdida de presión al pasar disolvente a través de la columna que contiene la resina.
- La superficie interna o área específica de la resina, ya que por lo general esto representa el lugar donde la adsorción ocurre, y por ende se deben

buscar resinas con la máxima área interna para promover una mayor adsorción.

- La distribución del radio de poro, pues tiene un impacto en la difusión de los solutos hacia el interior de la resina.

Cuando todos estos factores no son controlados de manera adecuada, se generan problemas en la eficiencia y la reproducibilidad del proceso, lo que al final se traduce en bajos rendimientos de recuperación y por ende pérdidas a nivel económico (Kammerer *et al.*, 2011).

4. Materiales y métodos

4.1. Localización

El desarrollo experimental se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), ubicado en la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica. La molienda y tamizado de la materia prima se llevó a cabo en la Planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) mientras el análisis sensorial se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Sensorial de la Escuela de Tecnología de Alimentos, ambos lugares ubicados en la Facultad de Ciencias Agroalimentarias, en la Sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica.

4.2. Materia Prima

Se utilizaron plantas de *Stevia rebaudiana* sembradas en el poblado de San Ramón del distrito La Virgen del cantón de Sarapiquí en la provincia de Heredia. Las hojas fueron cosechadas cuando las plantas estaban en “botón floral” o hasta el 10% de floración pues en esta etapa los esteviol glicósidos alcanzan su máximo contenido en la planta (INCAGRO, 2008).

4.3. Metodología

4.3.1. *Pretratamiento de la materia prima*

4.3.1.1. Secado

Las hojas de *Stevia rebaudiana* se secaron en el secador de aire caliente de la planta piloto del CIPRONA a una temperatura de 45°C por 48 horas, condiciones que fueron previamente establecidas en pruebas experimentales. Las hojas presentaban una humedad inicial de $(77,9 \pm 0,8)\%$ y se llevaron a una humedad final de $(7,8 \pm 0,1)\%$ (medida después de la operación de molienda). Lo recomendado en la operación de secado es llegar a una humedad final de 10% o menos (INCAGRO, 2008).

4.3.1.2. Molienda

Se utilizó el molino de martillos marca Fitz Mill, serie 1030 de la Planta Piloto del CITA. Para las pruebas preliminares se utilizaron mallas de 0,33 pulg (aproximadamente 8,4 mm) y 0,60 pulg (aproximadamente 15,2 mm). Para la molienda del lote de hojas que iba a ser utilizado en el desarrollo experimental se utilizó únicamente la malla de 0,33 pulg.

4.3.1.3. Tamizado

Para las pruebas preliminares se tamizaron las hojas secas y molidas utilizando tamices de 30 mesh y 60 mesh, los cuales permitieron seleccionar partículas con un tamaño de aproximadamente 0,595 mm y 0,250 mm respectivamente. Se utilizó el agitador mecánico de la Planta Piloto del CITA, mientras que para el resto del desarrollo experimental las hojas secas y molidas se tamizaron de manera manual con un tamiz de 60 mesh.

4.3.2. Evaluación de distintas condiciones de extracción para determinar su efecto sobre la extracción del rebaudiósido A y el esteviósido de las hojas de *Stevia rebaudiana*

Primeramente, se evaluó el efecto del tiempo de extracción, la granulometría de las hojas y la proporción hojas:agua, sobre la extracción de los esteviol glicósidos de interés. Posteriormente, se evaluó el efecto de la temperatura y otras proporciones hojas:agua sobre la extracción de estos compuestos. A continuación se detalla el procedimiento seguido para tales evaluaciones.

4.3.2.1. Efecto de la granulometría de las hojas, el tiempo de agitación y la proporción hojas:agua sobre la extracción del rebaudiósido A y del esteviósido

Se evaluaron dos granulometrías de las hojas y seis distintos tiempos de agitación, con el fin de determinar con cuál condición se extraía la mayor concentración de rebaudiósido A. Además, se evaluaron tres distintas proporciones hojas:agua, para así determinar que tan diluido se podía elaborar el extracto sin tener pérdidas significativas de

rebaudiósido A. Se trabajaron granulometrías de 30 y 60 mesh, tiempos de agitación que iban desde una hora hasta seis horas y proporciones hojas:agua de 1:15, 1:35 y 1:55.

Para llevar a cabo el experimento, se trabajó con tubos de centrifuga que fueron agitados a 160 rpm en un agitador orbital marca HOTECH Instruments, modelo 721. Además se trabajó a una temperatura de extracción intermedia (temperatura B). A cada tubo se le agregaron 25,00 mL de agua destilada (medidos con una bureta de 50,00 mL) y la masa de hojas secas y molidas con balanza (analítica).

Para evitar interferencias en los resultados como pérdida de volumen de disolvente o pérdida de hojas al tomar cada muestra, se utilizaron tubos de centrifuga separados para cada hora de muestreo. Se decidió escoger como límite 6 horas de agitación para tener un margen de tres horas más que el propuesto por Abou-Arab *et al.* (2010), quienes agitaron por un máximo de tres horas. La cuantificación de los esteviol glicósidos extraídos bajo las condiciones evaluadas se llevó a cabo con la metodología descrita en la sección 4.3.4.4.

a. Diseño experimental y análisis estadístico

Se planteó un diseño experimental irrestricto aleatorio con un arreglo factorial de 3X2X6 para un total de 36 tratamientos, los cuales se detallan en el Cuadro II. El factor granulometría se evaluó a dos niveles, mientras que los factores proporción hojas:agua y tiempo de agitación, se evaluaron a tres y seis niveles respectivamente. La variable respuesta fue el contenido de rebaudiósido A y esteviósido, la cual se cuantificó mediante el método propuesto en la sección 4.3.4.4. Se estableció realizar tres repeticiones de cada tratamiento por motivos de tiempo, cantidad de materia prima y reactivos disponibles, por lo que se trabajó con un total de 108 muestras.

Los datos fueron analizados mediante un ANDEVA con el programa XLSTAT versión 2012.5.02 de Addinsoft. Se empleó un nivel de significancia del 5% (en el caso de datos perdidos se le indicó al programa recalcularlos con base en el promedio). Se analizaron interacciones hasta dos niveles, y para aquellas condiciones en las que existiera diferencia significativa se realizó una prueba de comparación de medias con el HSD de Tukey, para saber entre cuáles de los distintos tratamientos existía la diferencia.

Cuadro II. Diseño experimental para la evaluación del efecto del tiempo de agitación, la granulometría de las hojas y la proporción hojas:agua sobre la concentración de rebaudiósido A y esteviósido extraídos.

Tiempo de agitación (h)	Granulometría (mesh)	Proporción hojas:agua (m/v)		
		1:15	1:35	1:55
1	30	1:15	1:35	1:55
	60	1:15	1:35	1:55
2	30	1:15	1:35	1:55
	60	1:15	1:35	1:55
3	30	1:15	1:35	1:55
	60	1:15	1:35	1:55
4	30	1:15	1:35	1:55
	60	1:15	1:35	1:55
5	30	1:15	1:35	1:55
	60	1:15	1:35	1:55
6	30	1:15	1:35	1:55
	60	1:15	1:35	1:55

4.3.2.2. Efecto de la temperatura y la proporción hojas:agua sobre la extracción del rebaudiósido A y del esteviósido

Se evaluó el efecto de la temperatura de extracción sobre la cantidad extraída de rebaudiósido A y de esteviósido, para esto se evaluaron tres temperaturas distintas; una baja (temperatura A), una intermedia (temperatura B) y una alta (temperatura C). Además, se quiso determinar si el aglutinamiento de las hojas, observado a nivel experimental, estaba generando una disminución importante en la superficie de contacto de las hojas y por ende en la cantidad extraída de rebaudiósido A. Para esto, se evaluó nuevamente la proporción 1:15 y además dos proporciones ligeramente más diluidas (1:20 y 1:25).

Se utilizaron nueve erlenmeyers de 125 mL y a cada uno se le agregaron 50,00 mL de agua destilada (vertida con una bureta de 50,00 mL) y la masa exacta de hojas necesaria para cumplir la proporción que se iba a evaluar. Los erlenmeyers fueron agitados a 160 rpm en un agitador orbital marca HOTECH Instruments, modelo 721. Se utilizaron el tiempo de agitación y la granulometría de las hojas que generaron la mayor

extracción de rebaudiósido A según las pruebas realizadas en la sección 4.3.2.1. Tanto para la extracción en alta temperatura como para la extracción en baja temperatura las muestras se dejaron diez minutos. más en agitación tomando en cuenta el tiempo que les tardaba llegar a la temperatura deseada (temperaturas A o C). La cuantificación de los esteviol glicósidos extraídos bajo las condiciones evaluadas se llevó a cabo con la metodología descrita en la sección 4.3.4.4.

a. Diseño experimental y análisis estadístico

Se planteó un diseño experimental irrestricto aleatorio con un arreglo factorial de 3×3 o 3^2 para un total de nueve tratamientos, los cuales se detallan en el Cuadro III. Tanto el factor temperatura como el factor proporción hojas:agua se evaluaron a tres niveles. La variable respuesta fue el contenido de rebaudiósido A y esteviósido, la cual se cuantificó mediante el método propuesto en la sección 4.3.4.4. Se estableció realizar tres repeticiones de cada tratamiento por motivos de tiempo, cantidad de materia prima y reactivos disponibles, por lo que se trabajó con un total de 27 muestras.

Cuadro III. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la temperatura de extracción y la proporción hojas:agua sobre la cantidad de rebaudiósido A y esteviósido extraídos.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Proporción hojas:agua (m/v)
1	A	1:15
2	A	1:20
3	A	1:25
4	B	1:15
5	B	1:20
6	B	1:25
7	C	1:15
8	C	1:20
9	C	1:25

Los datos fueron analizados mediante un ANDEVA con el programa XLSTAT versión 2012.5.02 de Addinsoft. Se empleó un nivel de significancia del 5% (en el caso de datos perdidos se le indicó al programa recalcularlos con base en el promedio). Se analizaron interacciones hasta dos niveles y para aquellas condiciones en las que existiera diferencia significativa, se realizó una prueba de comparación de medias con el HSD de Tukey para saber entre cuáles de los distintos tratamientos existía la diferencia.

4.3.3. Proceso de purificación del extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana*

El proceso de purificación se realizó con el objetivo primordial de eliminar compuestos que puedan brindarle sabor amargo al edulcorante, así como también eliminar pigmentos, azúcares, ácidos orgánicos e inorgánicos y proteínas, entre otros (Kovylyaeva *et al.*, 2007). Todas las evaluaciones realizadas al proceso de purificación se hicieron a partir de un extracto acuoso obtenido de hojas molidas con una granulometría de 60 mesh, una proporción hojas:agua de 1:15, un tiempo de agitación de tres horas y una alta temperatura de extracción (temperatura C).

Los pasos seguidos se ilustran en la Figura 5. Estos tratamientos fueron escogidos pues permiten trabajar con bajos volúmenes de extracto a diferencia de métodos como la microfiltración. Además, no utilizan gran cantidad de reactivos químicos y es más sencillo que la utilización de enzimas (Abou-Arab *et al.*, 2010; Giovanneto, 1990).

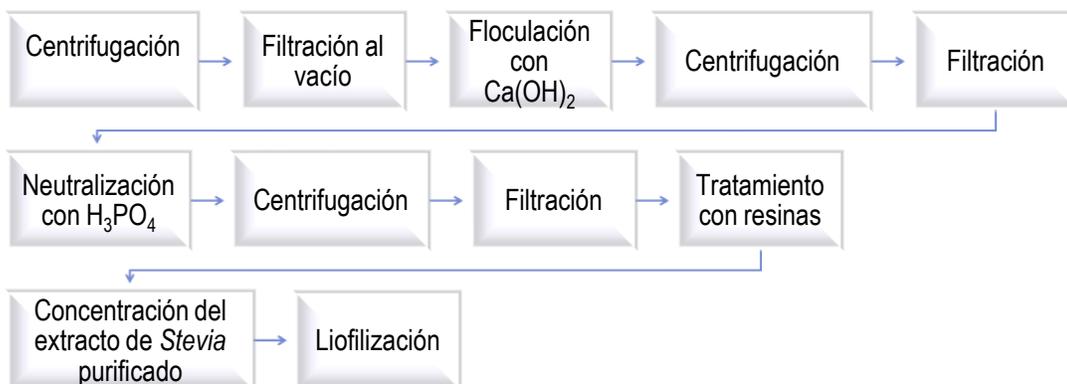


Figura 5. Operaciones unitarias propuestas para el proceso de purificación del extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana*.

4.3.3.1. Centrifugación y filtración

Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por diez minutos con una centrifuga marca Damon de IEC Division para sedimentar las impurezas y así facilitar el proceso de filtración. Una vez que la muestra fue centrifugada, se procedió a filtrar al vacío para separar los precipitados del sobrenadante. Se utilizó un papel Whatman No 4.

4.3.3.2. Floculación con Ca(OH)₂

a. Efecto del pH de floculación sobre la eliminación de impurezas y la concentración de rebaudiósido A y esteviósido después de la floculación

El objetivo de la floculación fue precipitar impurezas como azúcares reductores y pigmentos que se encontraban en el extracto acuoso. Se determinó el pH de floculación que permitiera eliminar la mayor cantidad de impurezas y que al mismo tiempo no afectara la cantidad de rebaudiósido A y de esteviósido en el extracto acuoso. Para tal fin, se evaluó de manera cualitativa el efecto del pH de floculación sobre la eliminación de impurezas y además se cuantificó el rebaudiósido A y el esteviósido presente en el extracto después de haber sido floculado. Esta cuantificación se realizó con el método descrito en la sección 4.3.4.4.

Una vez obtenido el filtrado, fue subdividido para poder realizar la floculación por triplicado a cuatro valores de pH distintos y además tener una muestra control (extracto sin flocular). Los valores de pH analizados fueron 9, 10, 11 y 12, y se utilizó como agente floculante Ca(OH)₂ en polvo, que según Giraldo *et al.* (2005) presenta la mejor remoción de color en comparación con el CaCO₃ y el CaCl₂. El extracto se mantuvo en agitación constante con una pastilla de agitación magnética mientras se ajustaba el pH, y una vez llegado al pH de interés se mantuvo en agitación por 60 minutos. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 3500 rpm por diez minutos y filtrada por gravedad con papel Whatman N°4.

Finalmente, para poder cuantificar la cantidad de rebaudiósido A y esteviósido presente en las muestras, estas fueron llevadas al pH del extracto original el cual oscila entre 5,30 y 5,67. Esto se hizo agregando HOAc glacial gota a gota. Se utilizó HOAc glacial pues el buffer empleado como eluente en el método de HPLC contiene ácido

acético. El diseño experimental llevado a cabo para la cuantificación de los esteviol glicósidos de interés se detalla en el Cuadro IV.

Cuadro IV. Diseño experimental para la evaluación del efecto del pH de floculación sobre la concentración de rebaudiósido A y esteviósido en el extracto acuoso.

Tratamiento	pH al que se llegó en la floculación
1	No se floculó
2	9
3	10
4	11
5	12

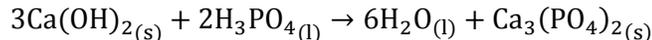
Cada tratamiento se evaluó por triplicado y se realizó un ANDEVA a los resultados obtenidos con el programa XLSTAT versión 2012.5.02 de Addinsoft. Se empleó un nivel de significancia del 5%. Para aquellas condiciones en las que existiera diferencia significativa, se realizó una prueba de comparación de medias con el HSD de Tukey para saber entre cuáles de los distintos tratamientos existía la diferencia.

b. Floculación del extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana*

El extracto acuoso obtenido bajo las condiciones de extracción especificadas en la sección 4.3.3, se llevó al pH encontrado en la sección 4.3.3.2-a. Esto se hizo mediante agitación constante con una pastilla de agitación magnética y utilizando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en polvo como agente floculante. El pH se midió con un pHmetro marca Thermo Scientific, modelo ORION 3STAR. Se escogió $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pues es permitido como aditivo alimenticio (Codex Alimentarius, 1995).

4.3.3.3. Neutralización

El filtrado se neutralizó con H_3PO_4 concentrado antes de ser pasado por las resinas. Se utilizó este ácido porque de acuerdo al Codex Alimentarius (1995) es permitido como aditivo alimenticio. Además, al haber $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en el medio se propicia la siguiente reacción:



Debido a que todos los fosfatos son insolubles en agua (excepto los que presenten metales alcalinos y amonio), el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ formado en el medio precipitó, permitiendo así eliminar el exceso de calcio (Moore *et al.*, 2009). Otra ventaja de precipitar el calcio es que previene la saturación de la resina catiónica fuerte. El precipitado formado se eliminó centrifugando a 3500 rpm por diez minutos y luego filtrando el sobrenadante con papel Whatman No 4.

4.3.3.4. Purificación del extracto acuoso floculado y neutralizado de las hojas de *Stevia rebaudiana* con resinas de adsorción y de intercambio iónico

a. Determinación del perfil de elución de los esteviol glicósidos de interés a través de las resinas 1, 2 y 3

Para poder reducir la pérdida de rebaudiósido A durante la elución del extracto floculado y neutralizado por las resinas, fue necesario determinar en cada resina cómo los esteviol glicósidos se iban eluyendo a través del tiempo. Se utilizaron tres resinas diferentes: una de adsorción (resina 1), una catiónica fuerte (resina 2) y una aniónica débil (resina 3), las cuales se empacaron en columnas de 20cm x 2cm. Se trabajó a temperatura ambiente y con un flujo de 7 mL/min, el cual fue regulado con bombas peristálticas marca VWR. En la Figura 6 se pueden apreciar las resinas utilizadas.

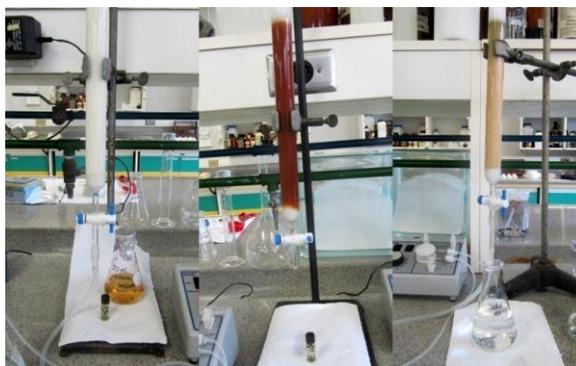


Figura 6. Resinas de intercambio utilizadas en el proceso de purificación del extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana*. De izquierda a derecha resina 1, resina 2 y resina 3.

En las pruebas realizadas, el extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana*, se eluyó a través de las tres resinas de intercambio. A la salida de las resinas, se recolectaron fracciones de 20 o 10 mL, a las cuales se les cuantificó la concentración de esteviol glicósidos mediante la metodología descrita en la sección 4.3.4.4 para así elaborar una curva del comportamiento de elución de los mismos a través de las resinas.

Para la evaluación de la resina 1, se partió de 50 mL del extracto floculado y neutralizado, que se eluyó por la resina con agua y luego, para recuperar los esteviol glicósidos, se eluyó con etanol al 70%. Se recolectaron fracciones en diferentes tiempos (y por ende volúmenes) de elución para definir en qué momento empezó a eluir el extracto.

En el caso de las resinas 2 y 3, estas fueron conectadas en serie a través de bombas peristálticas, por lo que las fracciones se recolectaron a la salida de la resina 3. Lo que se eluyó a través de estas resinas fue la combinación de las fracciones etanólicas obtenidas de la resina 1, que tuvieron la mayor concentración de rebaudiósido A de acuerdo a la metodología de cuantificación descrita en la sección 4.3.4.4. Nuevamente, se recolectaron fracciones en diferentes tiempos (y por ende volúmenes) de elución para definir en qué momento empezó a eluir el extracto.

b. Evaluación del efecto de varias corridas de purificación sobre la concentración de rebaudiósido A y esteviósido en el edulcorante

Para la elaboración del extracto acuoso, se utilizó un único erlenmeyer de 1 L al cual se le agregaron 750 mL de agua destilada y la masa de hojas necesaria para cumplir la proporción hojas:agua seleccionada. Luego, al extracto acuoso obtenido, se le realizaron las operaciones de purificación descritas en las secciones 4.3.3.1, 4.3.3.2-b y 4.3.3.3.

Posteriormente, se procedió a tratar el extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana*, con las resinas de intercambio y bajo las condiciones previamente mencionadas en la sección 4.3.3.4-a. La purificación con las resinas de intercambio iónico se realizó un máximo de cinco veces, según lo establecido por Jonnala *et al.* (2006), con

el fin de evaluar el efecto de cada corrida sobre la concentración del rebaudiósido A y del esteviósido, así como su efecto sobre el amargor y el dulzor del edulcorante.

El extracto acuoso floculado y neutralizado se pasó primeramente por la resina 1, la cual adsorbió al esteviósido y al rebaudiósido A, así como pigmentos (clorofila principalmente), ácidos orgánicos y taninos. Lo que salió de esta primera columna fue un líquido amarillento que contenía principalmente sales inorgánicas (Shi *et al.*, 2002; Soto y Del Val, 2002). Este líquido fue analizado por HPLC y se determinó que no contenía los esteviol glicósidos de interés por lo que fue desechado y no se consideró necesario pasar el extracto neutralizado más de una vez por esta resina. Para poder recuperar los esteviol glicósidos de la resina 1, se eluyó etanol al 70% a través de la misma. El volumen de elución utilizado para obtener la mayor recuperación posible de rebaudiósido A, fue el determinado en la sección 4.3.3.4-a.

Posteriormente el extracto etanólico se pasó primero por la resina 2, con el fin de desmineralizarlo (en caso de que quedaran residuos de ácidos y sales inorgánicas) y por último por la resina 3, la cual se encargó principalmente de eliminar polifenoles y pigmentos (Kammerer *et al.*, 2011); esta operación se repitió un máximo de cinco veces. El volumen de elución necesario para recuperar la mayor cantidad de rebaudiósido A fue el determinado en la sección 4.3.3.4-a En la Figura 7 se puede apreciar el proceso general de elución por las resinas.

Para las purificaciones sucesivas fue necesario realizar una interrupción en el proceso de purificación ya que, de no hacerlo, se iba a tener que trabajar con volúmenes muy grandes de elución, los cuales eran difíciles de manejar a nivel de laboratorio. Por esta razón, después de la primera corrida por las resinas 2 y 3, el extracto fue separado en dos partes, una parte fue liofilizada (L1) y representa el edulcorante con una sola corrida de purificación, mientras que la otra parte fue liofilizada (LA) y redisuelta en la menor cantidad posible de etanol al 70% (100 mL).

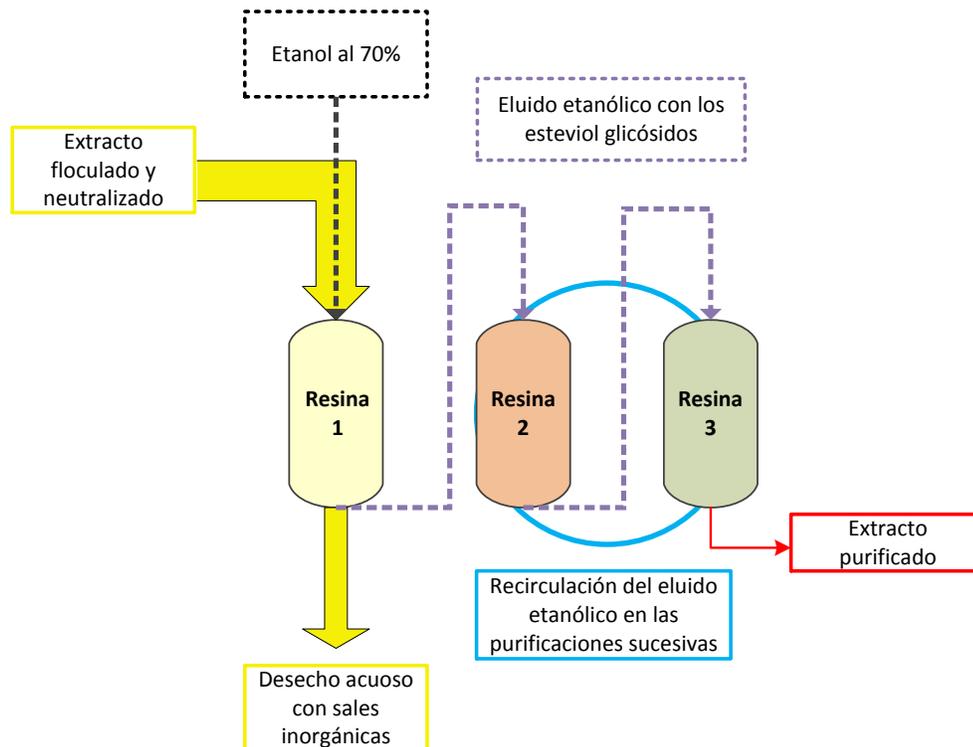


Figura 7. Proceso de purificación del extracto floculado y neutralizado de las hojas de *Stevia rebaudiana* con la resina de adsorción (resina 1) y las resinas de intercambio iónico (resinas 2 y 3).

Esta disolución de liofilizado se pasó por la resina 2 y por resina 3 nueva, ya que después de haber pasado una carga muy alta por la resina 3, estaba completamente teñida por los pigmentos que eliminó, esto se consideró como la segunda corrida de purificación. Una cuarta parte del extracto que se obtuvo de esta corrida se liofilizó para obtener el edulcorante con dos corridas de purificación (L2), mientras al resto se le realizó la tercera corrida de purificación.

Nuevamente, el extracto obtenido de esta corrida se subdividió: una tercera parte se liofilizó para obtener el edulcorante con tres corridas de purificación (L3) mientras al resto se le realizó la cuarta corrida, de lo obtenido de la cuarta corrida de purificación, la mitad se liofilizó para obtener el edulcorante con cuatro corridas de purificación (L4). Finalmente a la mitad sobrante de la cuarta corrida, se le realizó la quinta corrida de purificación y fue liofilizada en su totalidad para obtener el edulcorante con cinco corridas de purificación, este procedimiento se puede ver resumido en la Figura 8. En cada

operación del proceso de purificación, se tomaron muestras para poder cuantificar, mediante la metodología descrita en la sección 4.3.4.4, los cambios en las concentraciones de los esteviol glicósidos.

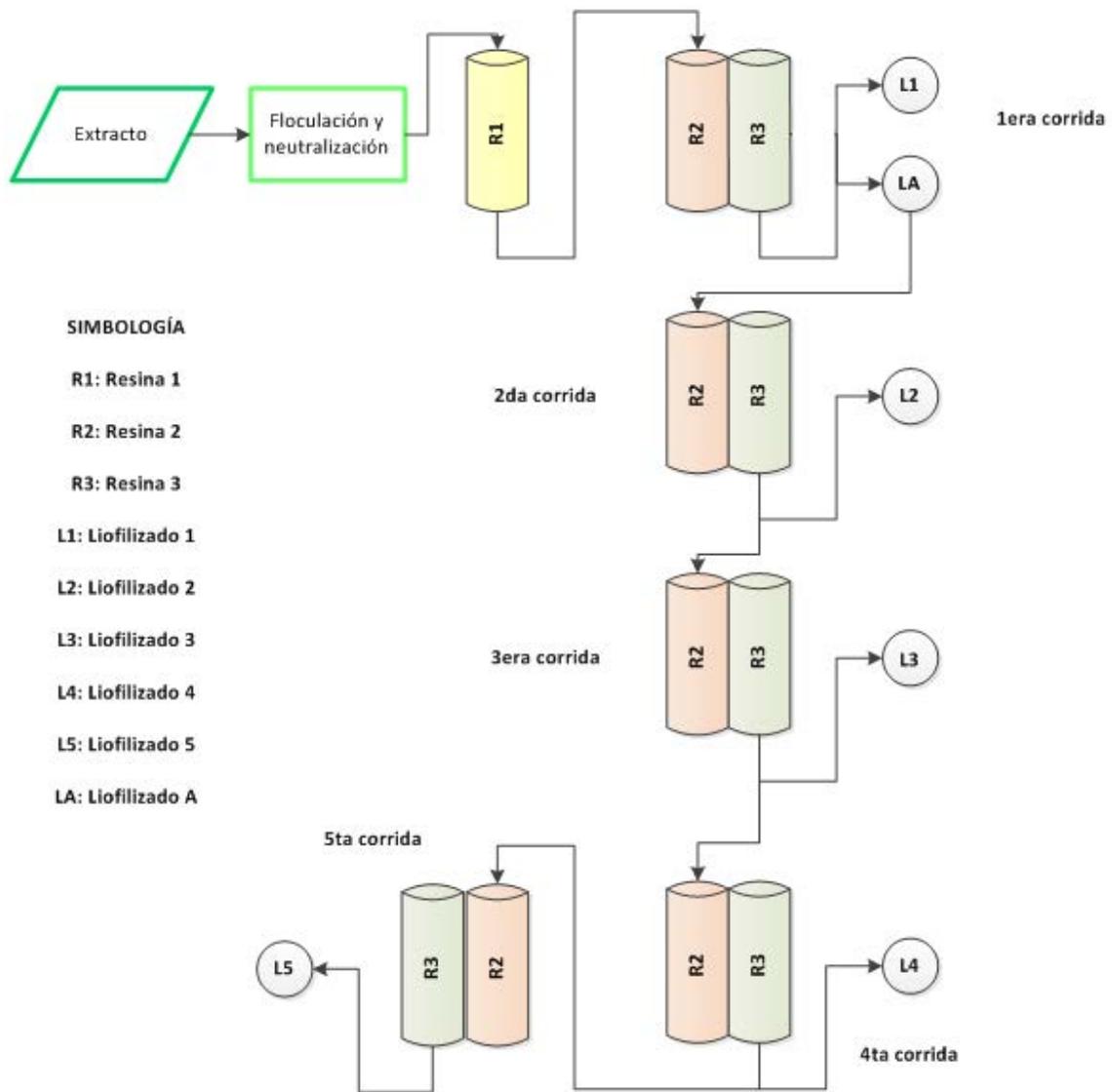


Figura 8. Proceso de purificación del extracto de *Stevia rebaudiana* al realizarse varias corridas a través de las resinas 2 y 3.

4.3.3.5. Concentración del extracto de *Stevia rebaudiana*

Para eliminar el etanol presente en los extractos ya purificados, se procedió a evaporarlo con un rotavapor marca Büchi modelo EL131 y a una temperatura de a 45°C, hasta obtener el extracto acuoso.

4.3.3.6. Liofilización del residuo acuoso obtenido luego del proceso de concentración del extracto previamente purificado de *Stevia rebaudiana*

El extracto acuoso se congeló con nitrógeno líquido y luego se liofilizó en un liofilizador marca LABCONCO modelo FreeZone12. Se optó por este método de eliminación del agua para evitar cualquier posible daño térmico de los esteviol glicósidos (aunque se reporta que son estables a temperaturas de hasta 200°C (Kroyer, 2010)) y para obtener el edulcorante en polvo.

4.3.3.7. Determinación del grado mínimo de purificación requerido para eliminar el sabor residual amargo del edulcorante obtenido a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana*

Se determinó cuántas corridas a través de las resinas 2 y 3 se deben hacer para que el consumidor deje de percibir el sabor amargo. Esto se hizo mediante una prueba de discriminación (2-AFC) de los extractos con varias corridas de purificación descrita en la sección 4.3.4.5. A las muestras presentadas a los panelistas se les realizó una cuantificación de los esteviol glicósidos, mediante la metodología descrita en la sección 4.3.4.4. para determinar si las concentraciones de rebaudiósido A y esteviósido influyeron en el sabor de las muestras.

A las concentraciones de los esteviol glicósidos obtenidas mediante la metodología de cuantificación descrita en la sección 4.3.4.4. se les realizó un ANDEVA con el programa XLSTAT versión 2012.5.02 de Addinsoft, para determinar si existían diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas. Se empleó un nivel de significancia del 5%. Para el análisis de los resultados en la prueba de discriminación forzada, se utilizaron las tablas binomiales de Roessler *et al.* (1978) para determinar el

número mínimo de discriminadores (o aciertos) requeridos para establecer la significancia de la prueba. Específicamente se usó la “Tabla 3” (mínimo número de escogencias para establecer diferencia significativa a varios niveles de probabilidad para las pruebas de diferencia pareada con $p = 1/2$ y una cola).

4.3.4. Análisis químicos y sensoriales

4.3.4.1. Humedad

Se utilizó el método 920.151 de la AOAC (2005) y acreditado en el Laboratorio de Química del CITA (2009a) por el Ente de Acreditación Costarricense (ECA), según norma INTE-ISO/IEC 17 025.

Se pesaron muestras por triplicado de aproximadamente 5,00 g en una balanza analítica AND HM-200. Las muestras se pesaron en cápsulas de humedad y se secaron por cinco horas a 70°C en una estufa de vacío marca NAPCO modelo 5831 en el CIPRONA. Una vez concluidas las cinco horas, las muestras se trasladaron a un desecador y cuando se enfriaron se pesaron nuevamente en la balanza analítica.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{masa}_{\text{muestra+cápsula}} - \text{masa}_{\text{muestra deshidratada+cápsula}}}{\text{masa}_{\text{muestra}} - \text{masa}_{\text{cápsula}}} \times 100$$

Se analizó la humedad tanto de las hojas frescas como la de las hojas después de la operación de secado y molienda.

4.3.4.2. Cenizas

Se utilizó el método 940.26 de la AOAC (2005) y acreditado en el Laboratorio de Química del CITA (2009b) por el Ente de Acreditación Costarricense (ECA), según norma INTE-ISO/IEC 17 025.

Se pesaron por diferencia muestras por triplicado de aproximadamente 5,00 g en crisoles de porcelana previamente incinerados usando una balanza analítica AND HM-200. Las muestras se incineraron con mechero hasta obtener cenizas blancas y posteriormente se incineraron en una mufla Sybron Thermoline a temperaturas entre 550°C y 600°C hasta alcanzar masa constante.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{masa}_{\text{cenizas+crisol}} - \text{masa}_{\text{crisol}}}{\text{masa}_{\text{muestra+crisol}} - \text{masa}_{\text{crisol}}} \times 100$$

4.3.4.3. Proteínas

Se utilizó el método espectrofotométrico detallado por Bradford (1976), descrito por Giraldo *et al.* (2010) con una serie de modificaciones. Se escogió este método pues es más sencillo, rápido y sensible que el método de Lowry y presenta menos problemas de interferencias (Kruger, 2002).

El método de Bradford se basa en la unión entre el tinte azul de Coomasie G y las proteínas presentes en la muestra. El colorante tiene cuatro formas iónicas y la que se usa en el análisis es la forma azul iónica, la cual presenta absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 595 nm (Kruger, 2002). Presenta interferencias en presencia de compuestos fuertemente alcalinos, polifenoles y detergentes (Bradford, 1976).

En la Figura 9 se mencionan los pasos a seguir para el análisis. Para la medición de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 25 UV/VIS del laboratorio de espectrometría del CIPRONA. Las modificaciones realizadas en el método se detallan a continuación:

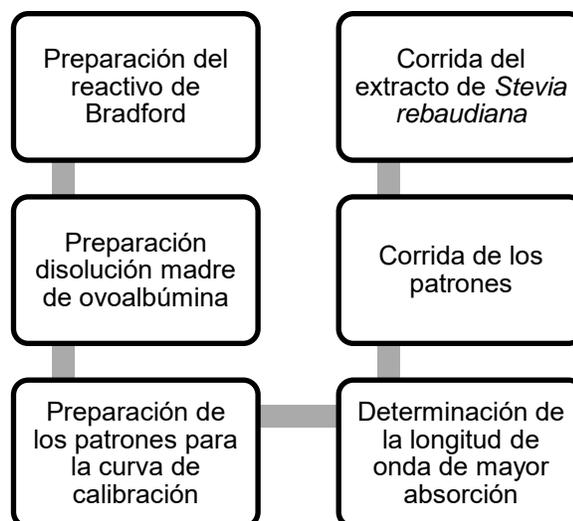


Figura 9. Pasos a seguir en el método de Bradford para cuantificar proteínas en los extractos acuosos de las hojas de *Stevia rebaudiana*.

Para realizar la curva de cuantificación, se utilizó ovoalbúmina en lugar de seroalbúmina. Debido a que la ovoalbúmina presenta una menor respuesta que la seroalbúmina (Morozin *et al.*, 2005) se hizo una corrección en la cantidad de reactivo de Bradford que se agregó a cada patrón y en el ámbito de detección de la curva. El ámbito de cuantificación se hizo de 15 mg/mL hasta 50 mg/mL y a cada 100 μ L de patrón se le agregaron 3 mL de reactivo de Bradford.

Los patrones con el reactivo se prepararon uno por uno de tal forma que todos los patrones se leyeron después de dos minutos de haber adicionado el reactivo, pues el método presenta variabilidad a través del tiempo.

Como blanco en cada medición se utilizó agua, y además se preparó una muestra con sólo la disolución de NaCl 0,15 M y reactivo de Bradford (denominada blanco de reactivo). Se leyó la absorbancia de esta muestra y se utilizó como factor de corrección para cada uno de los patrones. Es decir que la absorbancia corregida de cada patrón fue:

$$A \text{ corregida del patrón} = A \text{ patrón} - A \text{ del blanco de reactivo}$$

De la curva de cuantificación se obtuvo una ecuación de la recta con la forma:

$$y = mx + b$$

Donde:

- “y” es la absorbancia de la proteína a 595 nm.
- “x” es la concentración en mg/mL de proteína presente en la muestra evaluada.
- “m” es la pendiente de la curva.
- “b” es la intersección de la curva con el eje “y”.

Debido a que en los espectros de absorción se obtuvo el valor de absorbancia, la cuantificación se realizó despejando la ecuación de la siguiente forma:

$$\text{Cn. de proteína (x)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra (y)} - b}{m}$$

La curva de cuantificación de proteína se encuentra en la sección de anexos A.1., en la Figura 18. Para la cuantificación de proteína en el extracto acuoso de *Stevia rebaudiana*, se realizó por triplicado una extracción acuosa de las hojas de *Stevia rebaudiana* bajo las condiciones encontradas en la sección 4.3.2.

Para asegurar que la absorbancia de las muestras estuviera dentro de los valores en los cuales se cumple la ley de Beer, se realizaron una serie de diluciones a las mismas. Dado que el extracto presenta una coloración verdosa debido a la clorofila, se realizó un “blanco de la muestra” además del “blanco de reactivo”, este se basaba en 100 μ L del extracto y 300 mL de la disolución 0,15 M de NaCl. Es decir que la absorbancia corregida de cada patrón fue:

$$A \text{ corregida de la muestra} \\ = A \text{ muestra} - A \text{ del blanco de la muestra} - A \text{ del blanco de reactivo}$$

Una vez obtenida la cantidad de proteína en el extracto, se procedió a reportar la cantidad de proteína en base seca con respecto a las hojas de la planta. El cálculo se realizó de la siguiente forma:

$$\left(\frac{\text{Cn de proteína} \left(\frac{\text{g Proteínas}}{\text{L de extracto}} \right) \times \text{L de extracto}}{\text{g de hojas secas empleadas en la extracción}} \right) \times 100 = \% \frac{\text{g proteína}}{\text{g de hojas secas}}$$

4.3.4.4. Cuantificación de los esteviol glicósidos

Se determinó la concentración de glicósidos en la *Stevia rebaudiana* utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con base en el método de análisis propuesto por Clos *et al.* (2008).

Se utilizó una columna Phenomenex Synergi 4u Polar-RP80A por la cual se eluyó una fase móvil que consistía en 30% MeCN y 70% buffer de NH_4OAc y HOAc (0,0284% de NH_4OAc y 0,0116% de HOAc). Los disolventes se programaron de forma isocrática, empleando un flujo de 0,3 mL/min, un volumen de inyección de 20 μ L y una temperatura de la columna de 55°C. El detector se ajustó a una longitud de onda de 215 nm con un ancho de banda de 4 nm y una longitud de onda de referencia de 260 nm.

Únicamente se cuantificó el rebaudiósido A y el esteviósido porque sólo se contaba con esos dos estándares para el HPLC y porque son los dos de mayor importancia comercial. Para tal fin se emplearon los patrones de rebaudiósido A ASB-00018224-005 y esteviósido ASB-00019353-050, ambos marca ChromaDex.

El cromatógrafo empleado fue marca Dionex modelo UltiMate 3000, el cual consistía en una bomba modelo LPG-3400 SD, un automuestreador modelo ACC-3000, un horno para la columna modelo TCC-3000RS y un detector de diodos modelo DAD-3000RS.

Se escogió este método pues es el más utilizado en investigaciones actuales y se considera como uno de los métodos más confiables para esta determinación (Kovylyeva *et al.*, 2007). Organismos internacionales, como por ejemplo JECFA, tienen validado un método de HPLC como método para la detección de glicósidos en *Stevia rebaudiana* (JECFA, 2010).

Para poder cuantificar los esteviol glicósidos se debió realizar una curva de calibración para el rebaudiósido A y otra para el esteviósido; los estándares se prepararon de acuerdo a lo establecido por Clos *et al.* (2008). A partir de estas curvas se obtuvo una ecuación de la recta del tipo:

$$y = mx + b$$

Donde:

- “y” es el área de absorción a 215 nm en mA obtenida en el cromatograma ya sea del rebaudiósido A o del esteviósido.
- “x” es la concentración en mg/mL de rebaudiósido A o de esteviósido presente en la muestra que se evaluó.
- “m” es la pendiente de la curva.
- “b” es la intersección de la curva con el eje “y”.

Debido a que en los cromatogramas se obtuvo el área de absorción, la cuantificación se realizó despejando la ecuación de la siguiente forma:

$$Cn \text{ de reb. A o estev. (x)} = \frac{\text{Área de absorción del reb. a o el estev. (y)} - b}{m}$$

Las curvas de cuantificación del esteviósido y del rebaudiósido A, con sus respectivas ecuaciones de recta se encuentran en la sección de anexos A.1., respectivamente en las Figura 19 y en la Figura 20. En el caso de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para ambas curvas se calcularon en el programa Microsoft Excel 2007 a partir de la función “estimación lineal”; la cual implementa el método de los mínimos cuadrados. Estos fueron calculados a partir de las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{S_y}{m} \times 3,3$$

$$LC = \frac{S_y}{m} \times 10$$

Donde S_y corresponde al error estándar para el cálculo de la variable dependiente (y) y m corresponde a la pendiente de la curva. Ambos valores son dados por la función “estimación lineal”.

4.3.4.5. Prueba sensorial

a. Localización

El panel se llevó a cabo el día 22 de octubre del 2012 en el Laboratorio de Análisis Sensorial de la Escuela de Tecnología de Alimentos en la Universidad de Costa Rica (Sede Rodrigo Facio). La temperatura promedio ese día fue de 25°C; se hizo uso del extractor de aromas y se iluminó el laboratorio con luz blanca.

b. Muestra

Se utilizaron extractos purificados y liofilizados de *Stevia rebaudiana* disueltos en agua. En total se prepararon cinco muestras distintas las cuales se diferenciaban en la cantidad de veces que habían sido pasadas por las resinas de intercambio iónico (resinas

2 y 3). Así se tenían muestras desde una corrida hasta cinco corridas de purificación por las resinas de intercambio iónico (resinas 2 y 3). Todas fueron preparadas a una concentración de 0,7 mg/mL, para que fueran probadas por los panelistas en una solución de agua de *Stevia*.

c. Procedimiento

Se llevaron a cabo dos pruebas de discriminación, del tipo 2-escogencia forzada alternativa (2-AFC), una para determinar si los panelistas detectaban diferencias en el sabor dulce y otra para ver si detectaban diferencias en el sabor amargo. Las muestras fueron balanceadas, aleatorizadas y codificadas con números de tres dígitos y se utilizó el software Fizz para la recolección de los resultados. En el panel participaron 50 jueces sin entrenamiento.

En cada una de las dos pruebas, se presentaron cuatro pares de 4,5 mL de una disolución acuosa del edulcorante, ordenados de la manera en la que se indica en la Figura 10 (para un total de ocho pares de muestras por panelista). El orden de presentación varió dentro de cada par, pero no entre pares.



Figura 10. Orden de aparición de las muestras presentadas a los panelistas en la prueba de 2-escogencia forzada alternativa (2-AFC) llevada a cabo para los extractos de *Stevia rebaudiana* con distinta cantidad de corridas de purificación.

Primero se realizó la evaluación del dulzor y luego la del amargor. En la prueba del dulzor, se le presentó a cada juez, además de los cuatro pares de muestras, una muestra de prueba, la cual el panelista probó pero no evaluó. Esto se hizo con el fin de evitar el sesgo de la primera impresión.

En las indicaciones que se les dio a los panelistas antes de la prueba, se les dijo que probaran las muestras de izquierda a derecha y que seleccionaran aquella muestra dentro de cada par que consideraran como la más dulce o la más amarga, dependiendo de la prueba que estuvieran realizando.

Además se les solicitó que realizaran una serie de enjuagues entre cada par de muestras para eliminar los esteviol glicósidos de los receptores sensoriales. Primero debían enjuagarse con una disolución al 3% de etanol y expectorar. Luego debían enjuagarse dos veces con agua y expectorar cada enjuague. Esto se hizo con el fin de eliminar el sabor residual amargo del paladar.

5. Resultados y discusión

5.1. Evaluación de distintas condiciones de extracción para determinar su efecto sobre la cantidad del rebaudiósido A y el esteviósido extraídos de las hojas de *Stevia rebaudiana*

Las extracciones sólido-líquido se ven afectadas por parámetros del proceso de extracción, como por ejemplo la naturaleza del disolvente que se utilice, la estructura de la matriz sólida (granulometría), la temperatura y el tiempo de agitación (Gião *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, se vio la necesidad de evaluar cómo la alteración de ciertas condiciones en el proceso de extracción, afectaron la extracción del rebaudiósido A y del esteviósido. Todos los valores fueron reportados como concentración en base seca de hojas, para así poder evaluar el rendimiento de la extracción al variar las condiciones.

5.1.1. Efecto de la granulometría de las hojas, el tiempo de agitación y la proporción hojas:agua sobre la extracción del rebaudiósido A y del esteviósido

Como se mencionó en la metodología, inicialmente se determinó la granulometría, la proporción hojas:agua y el tiempo de agitación que resultaran en una mayor extracción de rebaudiósido A. Se evaluaron dos granulometrías distintas (60 mesh y 30 mesh), tres distintas proporciones hojas:agua (1:15, 1:35 y 1:55) y un máximo de seis horas de agitación. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se aprecia en el Cuadro V.

De acuerdo con los resultados obtenidos, para los efectos simples de tiempo de agitación y proporción hojas:agua, existió una diferencia significativa en la concentración del rebaudiósido A, ($p < 0,002$). En el caso del esteviósido, este presentó diferencias significativas en su concentración, ($p < 0,0001$), para los efectos simples de granulometría y proporción hojas:agua.

Debido a la presencia de interacciones significativas, los efectos simples no deben ser analizados individualmente (Stevens, 1999). Al existir interacciones se debieron analizar por encima de los efectos simples, pues estas permitieron determinar la combinación de factores que generó una mayor o menor extracción de los esteviol

glicósidos. De acuerdo con el Cuadro V, todas las interacciones fueron significativas ($p < 0,0006$), excepto la de granulometría*proporción hojas:agua para el esteviósido ($p > 0,05$).

Cuadro V. Valores de F y probabilidades obtenidas en el análisis de varianza de los dos esteviol glicósidos de interés presentes en los extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* preparados con dos granulometrías de la hoja distintas y extraídos por un máximo de seis horas de agitación ($\alpha = 0,05$).

Característica por evaluar	Rebaudiósido A	Esteviósido	Grados de libertad
Granulometría (mesh)	3,6340 ($p=0,06$)	50,528 ($p < 0,0001$)	1
Tiempo de agitación (h)	5,2754 ($p=0,0003$)	1,702 ($p=0,144$)	5
Repetición	1,1467 ($p=0,3229$)	0,001 ($p=0,999$)	2
Proporción hojas:agua (g:mL)	9,6665 ($p=0,0002$)	13,694 ($p < 0,0001$)	2
Granulometría * Tiempo de agitación	4,1818 ($p=0,002$)	5,159 ($p=0,0004$)	5
Granulometría * Proporción hojas:agua	17,6912 ($p < 0,0001$)	2,834 ($p=0,065$)	2
Tiempo de agitación * Proporción hojas:agua	3,5604 ($p=0,0006$)	5,126 ($p < 0,0001$)	10
Cuadrado medio del error (MEC)	0,002	2,852	-

Para analizar las interacciones entre los factores, no se pudo realizar una comparación de medias (Tukey) pues esto es estadísticamente factible sólo cuando se analizan los efectos simples. Por esta razón, se analizó el comportamiento de ambos esteviol glicósidos, al combinar distintas condiciones de extracción.

En la Figura 11 se aprecian las interacciones granulometría de las hojas* tiempo de agitación (Figuras 11-A y 11-B) y proporción hojas:agua*tiempo de agitación (Figuras 11-C y 11-D). A partir de estas dos interacciones, se pudo observar la cinética de transferencia de masa en el proceso de extracción sólido-líquido. Los valores específicos junto con sus respectivas desviaciones estándar se encuentran en el anexo A.2. y en los Cuadros XI y XIII.

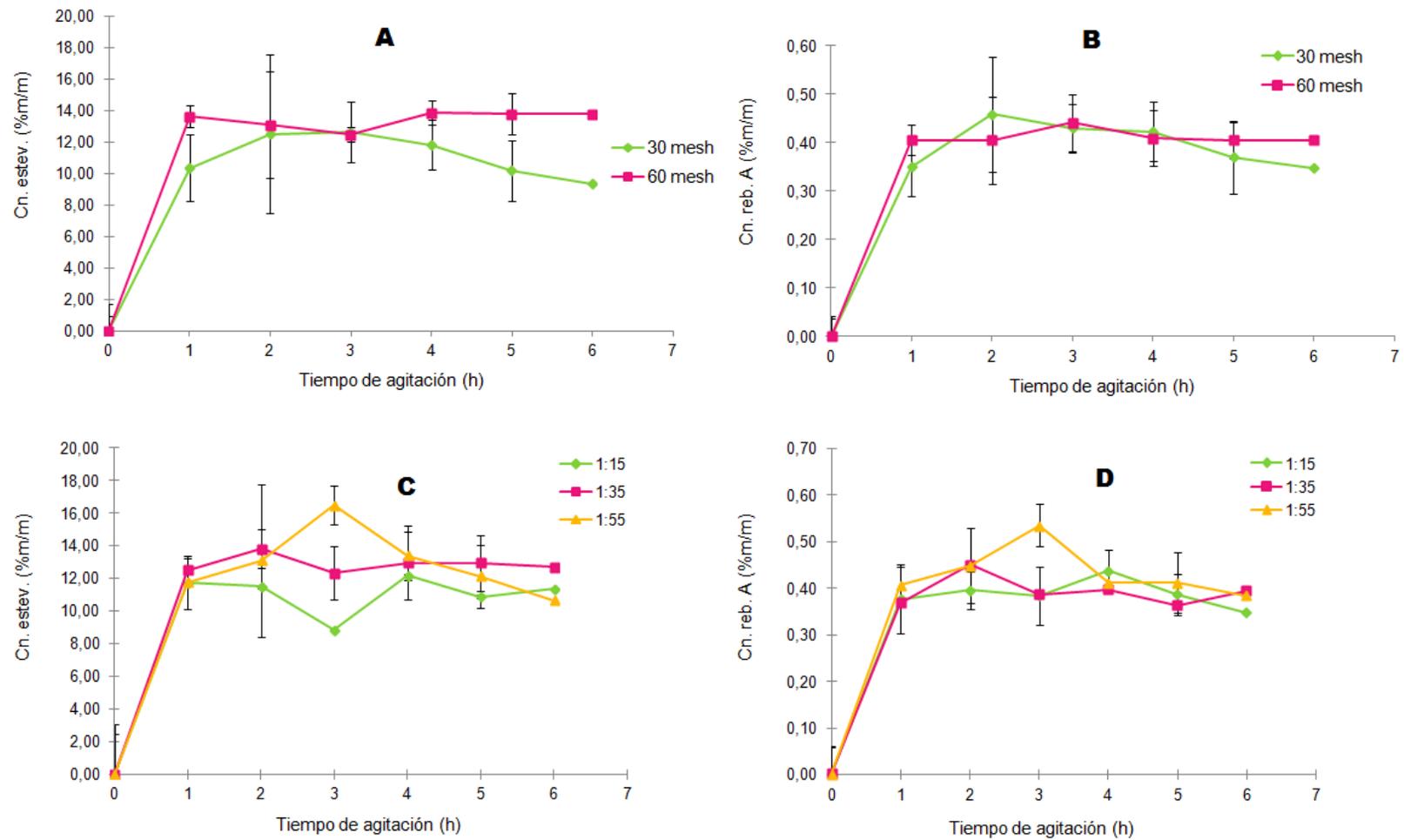


Figura 11. Interacciones ($p < 0,0006$) entre la granulometría y el tiempo de agitación (Figuras 11-A y 11-B) y la proporción hojas:agua y el tiempo de agitación (Figuras 11-C y 11-D) para analizar las concentraciones del estevósido (Figuras 11-A y 11-C) y el rebaudiósido A (Figuras 11-B y 11-D) extraídos de las hojas de *Stevia rebaudiana*.

Al observar las cinéticas de la Figura 11, se puede apreciar de manera general, que tanto la concentración de esteviósido como de rebaudiósido A tuvieron un aumento desde el tiempo cero hasta la primera hora de extracción, para posteriormente presentar un comportamiento relativamente constante desde la primera hasta la sexta hora de agitación. En las curvas típicas de una cinética de transferencia de masa (en extracciones sólido-líquido), se observa primero un aumento gradual en la extracción de los solutos y luego un momento a partir del cual, las concentraciones de los mismos en el disolvente se mantienen relativamente constantes. Ese momento se aprecia gráficamente como una línea horizontal constante o meseta y se habla de que se alcanzó el equilibrio (Bucić-Kojić *et al.*, 2007; Cacace y Mazza, 2003; Espinoza *et al.*, 2007; Gião *et al.*, 2009; Jokić *et al.*, 2010). Sabiendo lo anterior, se pudo advertir que las distintas concentraciones de los esteviol glicósidos producidas por los diferentes tratamientos, se encontraban en la zona de equilibrio desde la primera hora de agitación.

Además de lo anterior, las interacciones presentes en la Figuras 11-A y 11-B, revelaron un cambio en la tendencia de la extracción del esteviósido y el rebaudiósido A a través del tiempo, al emplear distintas granulometrías. Según esta tendencia, la extracción de ambos esteviol glicósidos presentó un comportamiento ligeramente decreciente a través del tiempo cuando se empleó una granulometría de 30 mesh y otro ligeramente creciente, cuando se empleó la granulometría de 60 mesh.

A pesar de que las diferencias entre las tendencias fueron estadísticamente significativas, estas representaron como máximo, una diferencia en la extracción del esteviósido y del rebaudiósido A, de un 3% y un 0,02% respectivamente. Se concluyó que, debido a lo pequeñas que fueron las diferencias en las concentraciones extraídas de ambos esteviol glicósidos, estas no eran importantes para fines prácticos y, que por lo tanto, después de una hora de extracción, era irrelevante el tiempo y la granulometría de las hojas que se escogiera utilizar.

El mismo principio se observó en las Figuras 11-C y 11-D, en las cuales se pueden observar diferentes tendencias en la extracción tanto del esteviósido como del rebaudiósido A, dependiendo de la proporción hojas:agua que se haya utilizado. Tanto en la Figura 11-D como en la Figura 11-C, las mayores diferencias entre las distintas proporciones se presentaron en la tercera hora de extracción; sin embargo, en esa hora

en particular, los puntos que generaron las diferencias, se consideraron como puntos desviados. Es decir, que las diferencias significativas presentes en la interacción, se debieron principalmente a la variabilidad en el método de extracción, o lo que es lo mismo, debido al ruido inherente en el método. Esta variación que generó los puntos desviados, se puede deber a problemas como:

- El mecanismo de agitación empleado no fue el más adecuado para estimular una agitación uniforme.
- El espacio reducido de los tubos de centrifuga no permitió un flujo homogéneo del disolvente a través de las hojas, por lo que no todas las muestras tuvieron la misma cantidad de hojas en contacto con el disolvente.

Nuevamente, las diferencias entre las tendencias, no fueron lo suficientemente importantes a nivel práctico, por lo que se concluyó que era irrelevante la proporción hojas:agua y el tiempo de agitación que se escogiera, pues cualquiera de las combinaciones generó prácticamente la misma extracción. La razón a la cual se adjudican los resultados obtenidos es que, bajo las condiciones de extracción utilizadas (temperatura, disolvente y tipo de agitación), después de la primera hora de agitación ya se había alcanzado la fase de equilibrio en la cinética de extracción y, que al no existir un gradiente de concentración, la extracción de los esteviol glicósidos se mantuvo constante a través del tiempo (Brennan, 2006; Cacace y Mazza, 2003), lo que explicaría por qué no se dieron variaciones importantes en la extracción de los mismos.

Como la zona de equilibrio se alcanzó desde la primera hora de extracción, todas las evaluaciones se realizaron en tiempos en los cuales ya no existía gradiente de concentración, por lo tanto, variar la granulometría o la proporción hojas:agua no iba a aumentar la velocidad de difusión de los esteviol glicósidos.

Según el estudio realizado por Cacace y Mazza (2003), para poder evaluar el efecto de distintas condiciones de granulometría o de proporción hojas:agua, es necesario realizar tal evaluación cuando aún existe gradiente de concentración, de forma tal que se logre alterar la pendiente de la gradiente (o lo que es lo mismo, la velocidad de

transferencia) y, por ende, se generen varias curvas de cinéticas, con diferencias significativas en su concentración de equilibrio. Las horas de extracción evaluadas fueron escogidas a partir de las reportadas en la literatura, en las cuales los tiempos oscilaban entre dos y seis horas de extracción (Abou-Arab *et al.*, 2010; Kumar, 1986; Rajab *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2007; Soto y Del Val, 2002), por lo que no se esperaba, que bajo las condiciones de extracción utilizadas, a esos tiempos ya se hubiera alcanzado el equilibrio.

Lo que se anticipaba, de acuerdo a los principios de transferencia de masa derivados de la ley de Fick (ver sección 3.3.2.2), era que la granulometría de 60 mesh (250 μm), al tener un menor tamaño de partícula que la de 30 mesh (595 μm), promoviera una mayor extracción de los esteviol glicósidos. Esto porque, asumiendo que cada granito de hoja molida fuera una esfera, entre menor fuera el tamaño de la esfera menor sería su radio y por ende, menor la distancia que debían recorrer los solutos para difundirse (Pinelo *et al.*, 2006). Además, al tener la misma cantidad de material con un menor tamaño de partícula, la sumatoria de sus áreas superficiales individuales fue mayor, por lo que la superficie de contacto total iba a ser mayor y según una de las ecuaciones derivadas de la ley de Fick (ver sección 3.3.2.2) esto aumenta la velocidad de difusión del soluto, facilitándose así su extracción.

También se esperaba que la proporción hojas:agua de 1:15 promoviera una mayor extracción de los esteviol glicósidos, pues la ley de Fick establece que la fuerza impelente en una transferencia de masa es el gradiente de concentración existente entre el sólido y el disolvente. Por lo tanto, era de suponer, que cuanto mayor fuera la cantidad de hojas en el disolvente, mayor iba a ser la cantidad de esteviol glicósidos disponibles y, por ende, se iba a dar un mayor gradiente de concentración (Tan *et al.*, 2011). Es decir, no se utilizó una concentración de hojas lo suficientemente baja como para no saturar la disolución.

En el caso de la interacción proporción hojas:agua*granulometría, se dieron diferencias a nivel estadístico en la concentración extraída del rebaudiósido A, según la combinación de granulometría y proporción hojas:agua que se utilizase. En la Figura 12, se puede apreciar como, para la granulometría de 30 mesh, se presentó un comportamiento ligeramente creciente conforme se fue disminuyendo la concentración de hojas en el medio, mientras que para la granulometría de 60 mesh la concentración se

mantuvo relativamente constante, independientemente de la proporción hojas:agua empleada.

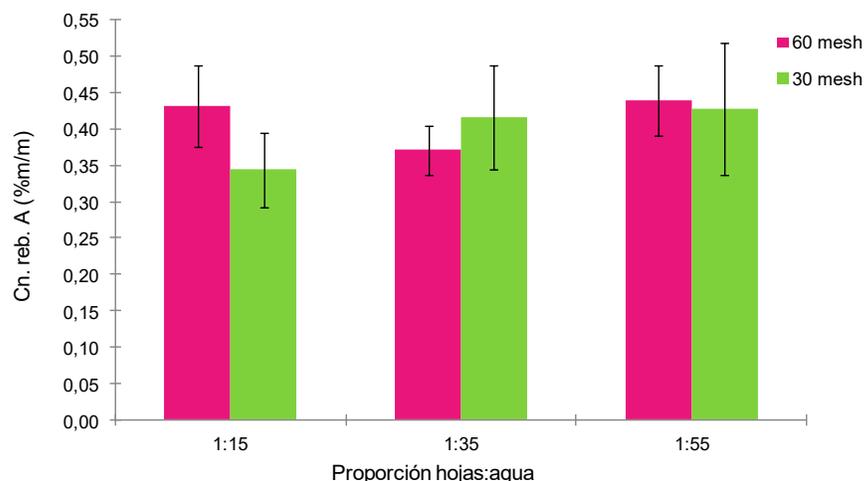


Figura 12. Interacción ($p < 0,0001$) entre los factores granulometría y proporción hojas:agua para analizar la concentración del rebaudiósido A extraído de las hojas de *Stevia rebaudiana*.

Sin embargo, al analizar las diferencias existentes, nuevamente se concluyó que eran muy pequeñas como para poder ser consideradas como relevantes a nivel práctico, y que muy probablemente esas pequeñas variaciones se debían otra vez a la variabilidad de método de extracción. Debido a lo anterior, se consideró indiferente la proporción hojas:agua o la granulometría que se escogiese para llevar a cabo la extracción, pues con cualquiera de las combinaciones se iba a extraer prácticamente la misma cantidad de rebaudiósido A.

A partir de los resultados obtenidos en esta sección, se concluyó que, bajo las condiciones de extracción utilizadas, la granulometría, el tiempo de agitación y la proporción hojas:agua no generaron un efecto que se considerase como importante para fines investigativos sobre la extracción del rebaudiósido A o del esteviósido. Esto se adjudicó al hecho de que a los tiempos de extracción evaluados, ya se había alcanzado el equilibrio.

Para poder determinar si las distintas condiciones de extracción cumplen con lo establecido por la ley de Fick, estas deberán ser reevaluadas, empleando tiempos de

extracción que oscilen entre 1 y 60 minutos. De esta manera, bajo las condiciones de extracción utilizadas, se aseguraría aún tener gradiente de concentración y saber que se tiene la concentración de hojas y tiempo de agitación mínimo para obtener el máximo de extracción.

Finalmente, sabiendo que ninguna de las condiciones evaluadas generaron diferencias importantes a nivel experimental, en la extracción del rebaudiósido A, se escogieron aquellas que en teoría podrían mejorar la extracción. Se eligió trabajar con la granulometría que, de acuerdo a la ley de Fick, debió haber aumentado la velocidad de transferencia (60 mesh) y por un tiempo de agitación de 3 horas. Con respecto a la proporción hojas:agua, se evaluaron proporciones hojas:agua un poco más diluidas que la de 1:15, para determinar si el aglutinamiento de las hojas observado experimentalmente estaba generando una disminución importante en la superficie de contacto.

5.1.2. Efecto de la proporción hojas:agua y la temperatura sobre la extracción del rebaudiósido A y del esteviósido

Se evaluó el efecto de la temperatura y la proporción hojas:agua en la concentración de rebaudiósido A y de esteviósido que se pueden extraer en agua. Con base en lo mencionado con anterioridad, la extracción se realizó por tres horas de agitación, con hojas secas y molidas con una granulometría de 60 mesh.

La extracción se ejecutó utilizando tres temperaturas distintas: A, B y C, para evaluar si existía alguna diferencia significativa en la cantidad de los esteviol glicósidos extraídos; además se evaluaron las proporciones hojas:agua de 1:15, 1:20 y 1:25. En el Cuadro VI se muestra el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

De acuerdo con estos resultados, la temperatura de extracción no afectó de manera significativa la concentración extraída de esteviósido ($p > 0,05$), pero sí la concentración extraída de rebaudiósido A ($p < 0,0001$). Este fenómeno se puede adjudicar a la diferencia entre las solubilidades en agua de ambos compuestos. El esteviósido reporta una solubilidad en agua de 0,13% mientras que el rebaudiósido A, debido a la molécula de glucosa extra en su estructura, reporta una solubilidad ligeramente mayor (0,80%) (Kinghorn, 2001). Esta mayor solubilidad del rebaudiósido A, hizo que la

extracción de este compuesto se viera favorecida al aumentar la temperatura (Abou-Arab *et al.*, 2010; Pól *et al.*, 2007).

Cuadro VI. Valores de F y probabilidades obtenidas en el análisis de varianza de los dos esteviol glicósidos de interés presentes en los extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* preparados a tres distintas temperaturas de extracción y proporciones hojas:agua ($\alpha=0,05$).

Factor por evaluar	Rebaudiósido A	Esteviósido	Grados de libertad
Proporción hojas:agua (g:mL)	0,44 (p=0,6)	0,965 (p=0,4)	2
Temperatura (°C)	18,938 (p<0,0001)	1,242 (p=0,3)	2
Repetición	0,159 (p=0,8)	1,263 (p=0,3)	2
Proporción * Temperatura	0,634 (p=0,6)	0,691 (p=0,6)	4
<i>Cuadrado medio del error (MEC)</i>	0,0004	0,262	-

En la Figura 13 se puede apreciar la comparación de medias, mediante el HSD de Tukey, que se realizó para determinar entre cuáles temperaturas de extracción existían diferencias significativas. En esta figura se puede observar que sí existió, con un 95% de confianza, una diferencia significativa entre la concentración del rebaudiósido A que se extrajo utilizando una alta temperatura (temperatura C) y la que se extrajo utilizando ya fuera una baja temperatura (temperatura A) o una temperatura intermedia (B). Además, no se dieron diferencias significativas entre la concentración del rebaudiósido A extraído a baja temperatura (A) y el extraído a temperatura intermedia (B).

A pesar de que, bajo las condiciones de extracción empleadas, ya se había alcanzado la fase de equilibrio, al aumentar la temperatura de extracción se logró generar un mayor gradiente de concentración, lo que ultimadamente conllevó a un aumento en la extracción del rebaudiósido A. Según la ecuación de Einstein (ver sección 3.3.2.4), la temperatura tiene una relación directa con el coeficiente de difusión (k), razón por la cual, al aumentar una, la otra también aumentó. Además, según la adaptación a la ley de Fick (ver sección 3.3.2.2), el coeficiente de difusión (k) tiene una relación directa con el gradiente de concentración (dC/dt) (Cacace y Mazza, 2003). Ello ocasionó que, al

aumentar la temperatura, se pasara de una concentración de aproximadamente 0,33 mg/mg, al emplear la temperaturas A o B, a una concentración de 0,39 mg/mg al emplear la temperatura C. Es decir, que se logró extraer un 18% más de rebaudiósido A al utilizar temperaturas de extracción altas que al utilizar temperaturas de extracción intermedias o bajas.

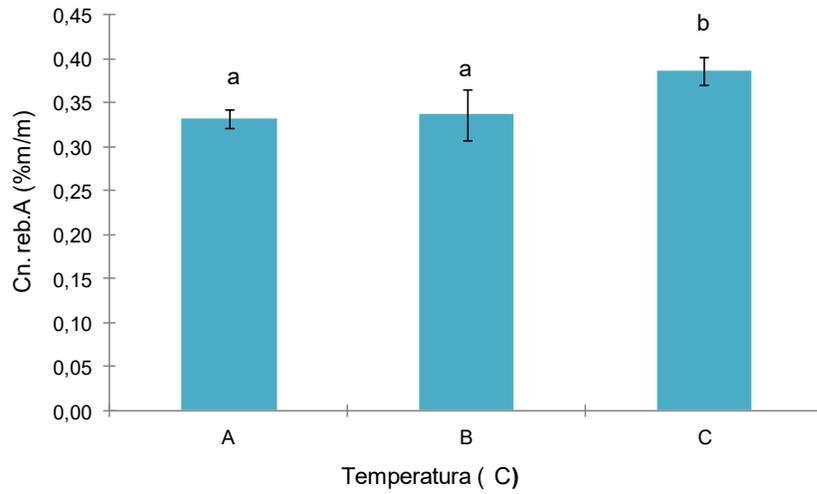


Figura 13. Variaciones en las concentración extraída del rebaudiósido A ($p < 0,0001$) debido a la implementación de distintas temperaturas durante la extracción acuosa de hojas molidas a 60 mesh de *Stevia rebaudiana* por tres horas. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa con un 95% de confianza.

El hecho de que la concentración de esteviósido extraído no se viera favorecida a altas temperaturas fue beneficioso, porque al propiciar una mayor extracción de rebaudiósido A aumentando la temperatura no se estaría provocando una mayor extracción de esteviósido y, por ende, no se estaría produciendo un edulcorante más amargo que el que se produciría a temperaturas intermedias o bajas de extracción.

Por otro lado, al no existir diferencias significativas ($p > 0,05$) en la concentración de rebaudiósido A extraída a temperatura baja (A) o a intermedia (B), se demostró que era factible realizar una extracción a baja temperatura sin afectar la concentración del rebaudiósido A. La ventaja que presenta una baja temperatura de extracción es que promueve una menor difusión de impurezas, sin embargo, debido al alto costo energético que implica llegar a bajas temperaturas, no se recomienda este proceso de extracción en

nivel industrial. Finalmente, la proporción hojas:agua no generó diferencias significativas ($p>0,05$) en la concentración extraída tanto de rebaudiósido A como de esteviósido. Ello debido a lo explicado en la sección 5.1.1.

El hecho de que la proporción hojas:agua no generase diferencias significativas en la concentración extraída de ambos esteviol glicósidos fue beneficioso, porque indicó que el aglutinamiento observado experimentalmente no contribuyó a una pérdida importante en la superficie de contacto, por lo que, se pueden utilizar proporciones concentradas de hojas:agua. Esto es favorable pues, para este proceso productivo en particular, todo el disolvente que se tenga en el extracto deberá ser eliminado en algún momento y, entre mayor cantidad de agua se tenga, mayor será el costo de eliminarla. Como no existió una interacción entre la proporción hojas:agua y la temperatura de extracción ($p>0,05$), se puede decir que el aumento en la concentración extraída de rebaudiósido A al incrementar la temperatura se dio independientemente de la proporción hojas:agua utilizada. Esto permite concluir que, bajo las condiciones de extracción utilizadas, un aumento en la temperatura favoreció el proceso de extracción.

5.2. Proceso de purificación del extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana*

5.2.1. Efecto del pH de floculación sobre la eliminación de impurezas y la concentración de rebaudiósido A y esteviósido después de la operación de floculación

En los estudios realizados por Jonnala *et al.* (2006), Giraldo *et al.* (2005) y Soto y Del Val (2002), los valores de pH para la floculación de extractos de *Stevia rebaudiana* oscilan entre 9 y 10. Sin embargo, al flocular a esos valores de pH en los extractos elaborados, se obtenían coloraciones muy verdosas y oscuras que dificultaban el proceso de purificación con las resinas. Por esta razón, fue necesario evaluar si un aumento en el pH de floculación generaba una disminución significativa en el contenido de rebaudiósido A, y si además, de manera cualitativa, se observaba una disminución en el color del floculado y un aumento en el flóculo.

Se evaluó la variación en la concentración de ambos esteviol glicósidos al flocular en un intervalo de pH entre 9 y 12, así como la concentración de estos en el extracto antes de ser floculado. En el Cuadro VII se aprecian los resultados del análisis estadístico realizado.

Cuadro VII. Valores de F y probabilidades obtenidas en el análisis de varianza de los dos esteviol glicósidos de interés presentes en los extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* posterior al proceso de floculación a diferentes valores de pH ($\alpha=0,05$).

Característica por evaluar	Rebaudiósido A	Esteviósido	Grados de libertad
pH de floculación	1,581 (p=0,3)	0,650 (p=0,7)	4
Repetición	0,513 (p=0,6)	0,966 (p=0,4)	2
<i>Cuadrado medio del error (MEC)</i>	0,002	2,026	-

De acuerdo con los resultados presentados en el Cuadro VII, no existieron diferencias significativas en la concentración tanto de rebaudiósido A como de esteviósido, antes y después del proceso de floculación a distintos valores de pH ($p>0,05$). Es decir, la concentración de ambos esteviol glicósidos no se vio afectada de manera significativa por el pH de floculación.

En general, la literatura reporta que los esteviol glicósidos son estables en un amplio ámbito de pH. Los estudios demuestran que el esteviósido presenta una gran estabilidad en valores de pH que oscilan entre dos y diez, a temperaturas de hasta 60°C y por tiempos de hasta dos horas (Kroyer, 2010; Silva *et al.*, 2007). Kumar (1986) realizó una floculación con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como agente floculante y llevó el extracto a un pH entre 10 y 13; así estableció que el extracto resultante tenía una importante pérdida de color sin alteraciones en la concentración de ambos esteviol glicósidos luego de la floculación.

De acuerdo con los resultados obtenidos, y a la información reportada por la literatura, se pudo escoger el valor de pH de manera cualitativa, para que generara una mayor disminución en el color del extracto y una mayor cantidad de flóculo. En la Figura 14 se aprecian los cambios en la coloración y en la cantidad de flóculo.



Figura 14. Diferencias observadas en la coloración del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* y en la cantidad de floculo formado al utilizar distintos valores de pH para la floculación.

Después de comparar las muestras de la Figura 14, se decidió escoger un pH de floculación de 12, pues fue el que generó cambios más notables en la coloración del extracto (mayor clarificación) y la mayor cantidad percibida de floculo, lo que finalmente conllevó a una mayor reducción de impurezas. Aunque se requirió una mayor cantidad de Ca(OH)_2 y un mayor tiempo para llegar a pH de 12, se decidió escoger esta condición primordialmente por dos motivos:

- Vida útil de las resinas: Altas concentraciones de clorofila dificultaban el proceso de purificación, ya que manchaban rápidamente las resinas y estas debían regenerarse con mayor frecuencia. Esto disminuye su vida útil y no se desea dado que se cuenta con cantidades limitadas.
- Vida útil de la columna para HPLC: Los extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* presentaban una gran cantidad de impurezas y pigmentos que se quedaban dentro de la columna y precolumna cuando eran inyectados en el HPLC para su cuantificación. Se requirieron lavados constantes de la columna para eliminar todas estas impurezas, lo que conllevó un mayor gasto de disolventes y tiempo. Además, las precolumnas se saturaban rápidamente de impurezas, debían ser cambiadas con regularidad y se incurría en un gasto mayor.

5.2.2. Purificación del extracto acuoso floculado y neutralizado de las hojas de *Stevia rebaudiana* con resinas de adsorción y de intercambio iónico

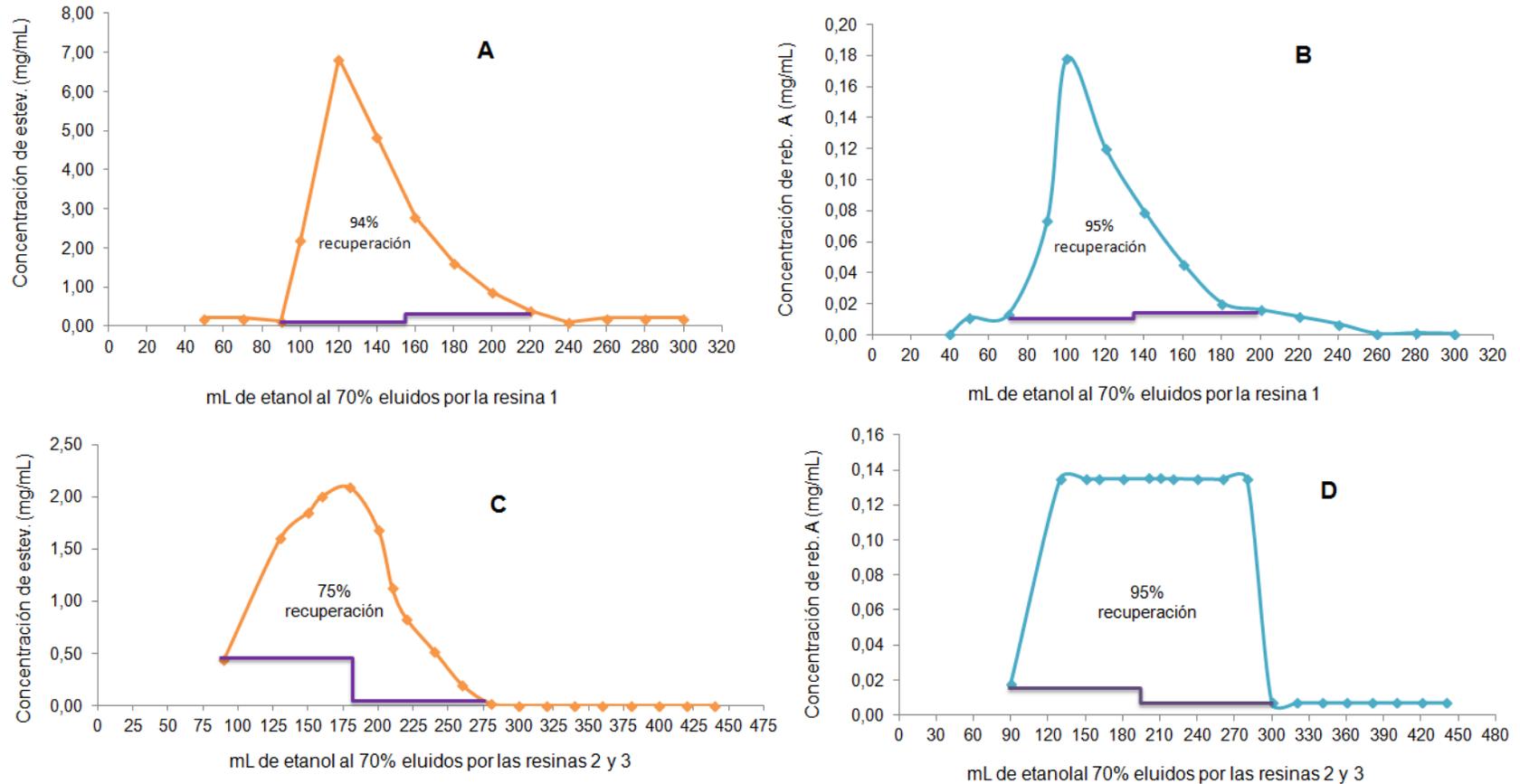
5.2.2.1. Determinación del perfil de elución de los esteviol glicósidos de interés a través de las resinas 1, 2 y 3

Como evaluar los distintos tipos de resinas y condiciones de elución no era un objetivo de esta investigación, se decidió adecuar un método con las resinas disponibles y asemejar las condiciones propuestas por Chabot y Beulieu (2012), Jonnala *et al.* (2006) y Soto y Del Val (2002).

Bajo las condiciones establecidas de: flujo, volumen de cama (BV), temperatura de elución, tipos de resinas y tipos de eluentes, fue necesario evaluar el comportamiento de elución, tanto del rebaudiósido A como del esteviósido, para así asegurar la mayor recuperación de ambos esteviol glicósidos al eluir los extractos a través de las resinas. Esto se logró mediante la recolección de fracciones a la salida de cada resina, para luego cuantificar la cantidad de rebaudiósido A y de esteviósido en cada fracción por medio del método descrito en la sección 4.3.4.4. De esta manera, se logró tener una trazabilidad de ambos esteviol glicósidos conforme el extracto era eluído por las resinas. Los resultados obtenidos se aprecian en la Figura 15.

Cuando se analizó el porcentaje de recuperación en la resina 1, se observó como antes de los 60 mL de eluido, la concentración de ambos esteviol glicósidos fue prácticamente despreciable, pero esta empezó a aumentar a partir de los 70 mL de elución. Esto significa que hasta después de eluir 70 mL de etanol al 70%, empezó a surgir el extracto purificado y, por ende, los primeros 60 mL de eluido que salieron de la resina podían ser desechados.

Se encontró además que, si se recolectaba desde los 70 mL de eluido hasta los 200 mL (para un total de 130 mL recolectados), se daba un porcentaje de recuperación de rebaudiósido A y de esteviósido de 95% y 94% respectivamente. Esto mostró que para obtener tales porcentajes de recuperación, se necesitaba eluir por la resina 1 un volumen de etanol al 70% igual a 2,6 el volumen del extracto floculado y neutralizado. Los valores necesarios para realizar este cálculo, así como su explicación se encuentran en la sección de anexos A.3. y en el Cuadro XIV.



*La línea color morado encierra el área debajo de la curva a la cual corresponde el porcentaje de recuperación.**La resina 1 corresponde a la resina de adsorción y las resinas 2 y 3 corresponden a las resinas de intercambio iónico.

Figura 15. Variación en la concentración del estevióside y el rebaudiosido A al irse eluyendo el extracto de *Stevia rebaudiana* a través de la resina 1 (Figuras 16-A y 16-B) y a través de las resinas 2 y 3 (Figuras 16-C y 16-D).

En el caso de las curvas para las resinas 2 y 3 (Figura 15-C y Figura 15-D), fue evidente que había diferencias entre el comportamiento del rebaudiósido A y el del esteviósido. El esteviósido presentó una desorción gradual que simuló el comportamiento reportado por Chabot y Beulieu (2012) para resinas de intercambio de tipo aniónicas. Por su parte, el rebaudiósido A cumplió el perfil descrito por Rengaraj *et al.* (2007), para un fenómeno de adsorción-desorción rápido en resinas de intercambio iónico; en este fenómeno, es típico llegar a un punto de concentración constante de elución, pues se genera un equilibrio entre la cantidad adsorbida y la cantidad desorbida del soluto.

A partir de estos resultados, se concluyó que tanto el rebaudiósido A como el esteviósido, estaban siendo adsorbidos por las resinas de intercambio iónico (resinas 2 y 3) y que para obtener un porcentaje de recuperación del 75% de esteviósido y del 95% del rebaudiósido A, se debía recolectar desde los 90 mL hasta los 300 mL de elución (para un total de 210 mL recolectados). Por lo que se necesitaba eluir por las resinas 2 y 3 un volumen de etanol al 70% igual a 3 veces el volumen del extracto purificado proveniente de la resina 1.

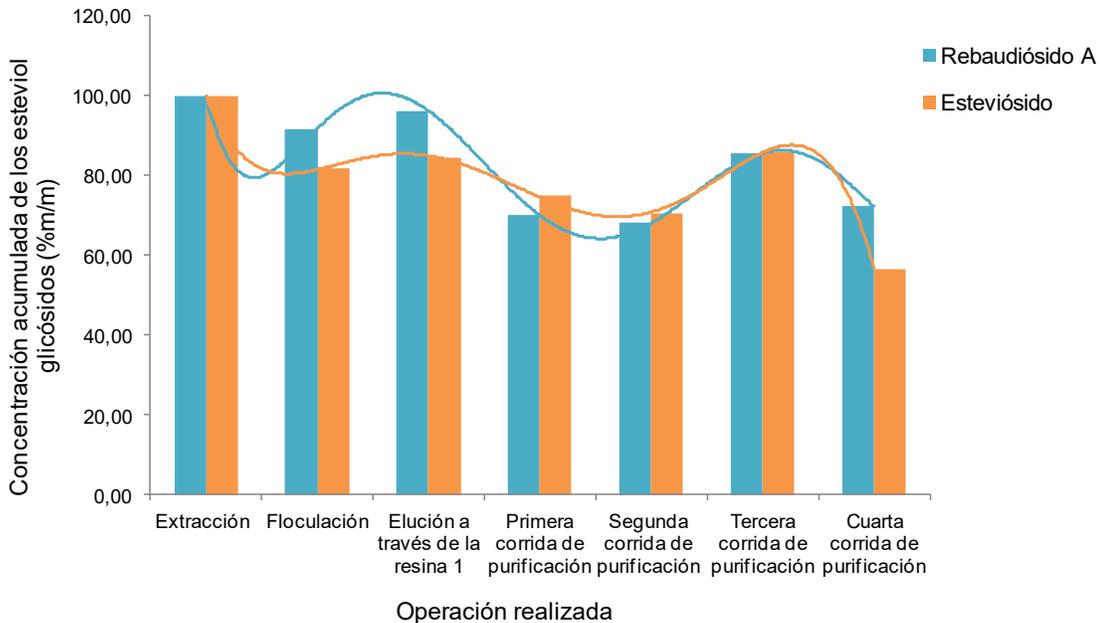
No se intentó aumentar el porcentaje de recuperación del esteviósido, ya que al ser este uno de los compuestos que le dan el sabor residual amargo al edulcorante de *Stevia rebaudiana*, cuanto menor sea su concentración en el producto final, mayor agrado tendrá comercialmente.

5.2.2.2. Evaluación del efecto de varias corridas de purificación sobre la concentración de rebaudiósido A y esteviósido en el edulcorante

El proceso de purificación de un producto es una parte crítica en la producción industrial, ya que en ella se generan algunas de las pérdidas más importantes de producto y además suele ser una de las etapas más costosas en la cadena de valor. Por lo anterior, para una industria es indispensable establecer una metodología de purificación altamente eficiente.

Dado que esta investigación pretende establecer bases para un futuro escalamiento del proceso a nivel industrial, se consideró importante evaluar la eficiencia de cada una de las operaciones que comprendieron el proceso general de purificación del

extracto, con el fin de determinar cuál de todas fue la más ineficiente y, por lo tanto, podría ser inadecuada industrialmente. Este cálculo de rendimiento se consideró como un rendimiento por operación y se efectuó según lo descrito en sección de anexos A.3. y en el Cuadro XV. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16.



*Las curvas representan las líneas de tendencia polinomial que presentaron las concentraciones de ambos esteviósidos en las distintas operaciones

Figura 16. Variaciones en la concentración de los esteviósidos recuperados en cada operación del proceso de purificación con respecto a la concentración existente en la operación previa.

Al analizar los resultados obtenidos en la Figura 16, se observa como la floculación presentó un porcentaje de recuperación de rebaudiósido A de aproximadamente el 90%, lo cual corroboró los resultados obtenidos en las pruebas de floculación; en ellas se determinó que un pH de floculación de 12 no iba a afectar significativamente la cantidad de rebaudiósido A. Aunque el porcentaje de recuperación de esteviósido no fue mayor a un 90%, esto no se consideró importante, pues debido al sabor residual amargo que genera, no se requieren altas concentraciones de él en el edulcorante.

Otro factor importante por considerar cuando se analiza el rendimiento de la operación de floculación es la capacidad que tuvo para eliminar las impurezas. En este

caso, como se mencionó en la sección 3.4.1, una de las impurezas que se buscaba eliminar eran las proteínas extraídas. Para evaluar la eficacia de esta operación en la eliminación de proteínas, se realizó una cuantificación (metodología descrita en la sección 4.3.4.3) de las proteínas presentes en el extracto acuoso, antes y después de la operación de floculación.

Los resultados obtenidos indicaron que con la metodología de floculación establecida se lograron eliminar todas las proteínas que estaban presentes en el extracto acuoso. Debido al alto porcentaje de recuperación de rebaudiósido A y a su efectividad para la eliminación de impurezas, la floculación se consideró una operación altamente eficiente.

Por su parte, el proceso de elución a través de la resina 1 presentó una recuperación de más del 95% para ambos esteviol glicósidos. Ello corroboró que el volumen de elución definido en la sección 4.3.3.4-a efectivamente permitía una recuperación del 95% del rebaudiósido A. Nuevamente, el rendimiento obtenido para el esteviósido fue inferior al 90%, sin embargo, por las razones ya antes explicadas, esto no se consideró como un factor que disminuyera la eficiencia de esta operación.

A partir de la primera corrida por las resinas 2 y 3 se vio una disminución importante en la recuperación de ambos esteviol glicósidos, pues sólo se recuperó el 70% de la cantidad de esteviósido y rebaudiósido A que había en el extracto eluido de la resina 1. Para la segunda corrida, la recuperación se mantuvo prácticamente igual, mientras que en la tercera corrida de purificación se notó un aumento de aproximadamente el 15% en la recuperación de ambos esteviol glicósidos. Finalmente, en la cuarta corrida, se disminuyó el porcentaje de recuperación del rebaudiósido A en aproximadamente un 13%.

El comportamiento inestable en la recuperación de ambos esteviol glicósidos, sumado al hecho de que en ninguna de las corridas se alcanzó el rendimiento teóricamente esperado según los resultados de la sección 4.3.3.4-a, permitió determinar la causa de la ineficiencia mostrada por las resinas de intercambio iónico, la cual se ve en el comportamiento sinusoidal que presenta la recuperación de ambos esteviol glicósidos a través de las corridas por las resinas 2 y 3.

Este comportamiento sinusoidal observado en Figura 16, se adjudica al hecho de que las resinas 2 y 3 presentaron una mayor capacidad de adsorción que la calculada en la sección 4.3.3.4-a. Al adsorber una mayor concentración de esteviol glicósidos, se requería un mayor volumen de elución de etanol al 70% que el calculado para asegurar una recuperación de más del 90% del rebaudiósido A. El aumento en la recuperación en la tercera corrida ocurre, porque, hasta para momento, se logró eluir el volumen adecuado de etanol como para desorber el rebaudiósido A adsorbido desde la primera y la segunda corridas de purificación (para esta corrida se había eluido un volumen de etanol igual a 9 veces la carga que se les había colocado originalmente a las resinas 2 y 3).

En la quinta corrida no se obtuvieron resultados pues la muestra se encontraba muy diluída a la hora de inyectarla en el HPLC. El valor de área obtenido para ambos esteviol glicósidos fue inferior al límite de cuantificación calculado para ambos compuestos; no se logró concentrar esta muestra pues sólo se contaba con 2 mL de la misma (esto para no afectar de manera significativa los volúmenes y por ende las concentraciones de esteviol glicósidos en las muestras para liofilizar).

Además del rendimiento en cada operación, se consideró importante establecer el grado de pérdida de ambos esteviol glicósidos a través del proceso global de purificación para determinar la factibilidad de realizar varias corridas de purificación, sin incurrir en pérdidas importantes de los compuestos de interés. Este cálculo se consideró como un rendimiento global por operación y se efectuó según lo descrito en la sección de anexos A.3. y en el Cuadro XV, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17.

En esta figura se puede apreciar que conforme se fue realizando cada una de las operaciones de purificación, se fue dando una pérdida gradual de ambos esteviol glicósidos con un comportamiento prácticamente lineal (porque el r^2 en ambos casos es cercano a uno) y de manera proporcional, pues al ser las pendientes tan similares indicaron que se perdió la misma proporción de esteviósido y de rebaudiósido A, con respecto al extracto sin purificar. Esto significó que la cantidad perdida de ambos esteviol glicósidos entre una operación y otra, fue prácticamente la misma, y que conforme se realizaron más operaciones de purificación, se fueron sumando las pérdidas de ambos esteviol glicósidos.

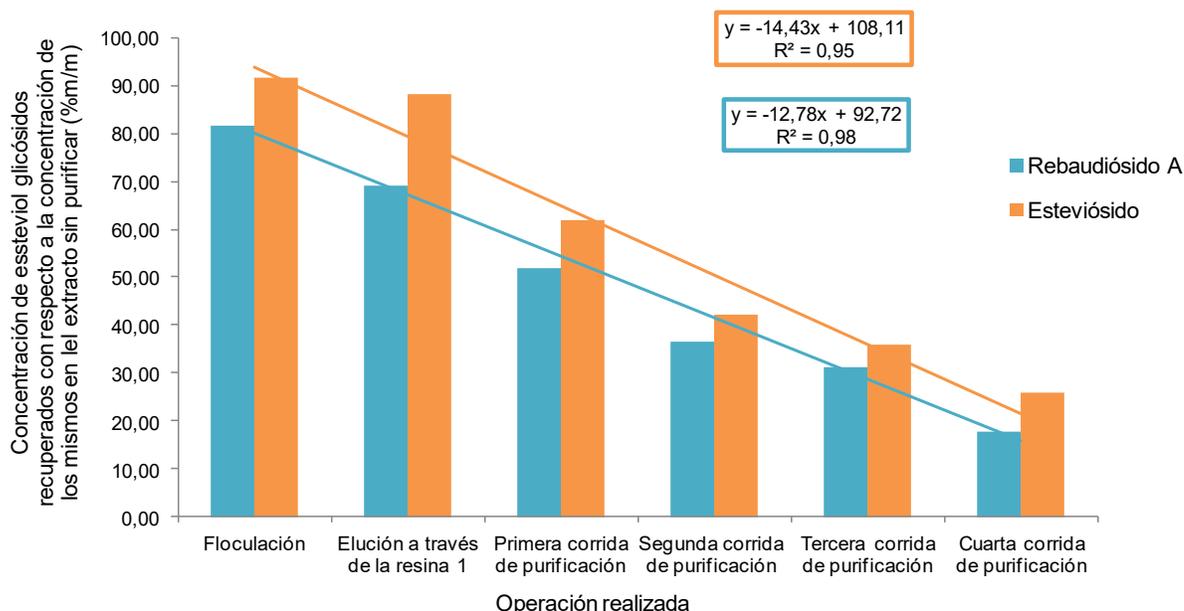


Figura 17. Variaciones en la concentración de los esteviol glicósidos recuperados en cada operación del proceso de purificación reportados en forma de rendimiento con respecto a la concentración inicial en el extracto sin purificar.

Por lo tanto, se concluye que entre menos operaciones de purificación por las resinas de intercambio iónico se realicen, menores serán las pérdidas tanto de esteviósido como de rebaudiósido A. Por consiguiente, no es recomendable realizar más de una corrida a través de las resinas de intercambio iónico pues cada vez que se practica una nueva corrida, la concentración de rebaudiósido A y de esteviósido se reduce en aproximadamente un 13%.

A partir de estos resultados se pudo extrapolar que, así como se dio una proporcionalidad en la pérdida de los esteviol glicósidos conforme se aumentaron las operaciones de purificación por las resinas de intercambio iónico, así también se aumentó la pérdida de impurezas en el extracto, por ejemplo la clorofila. Por ende, conforme se trató de eliminar la coloración en el extracto edulcorante final, también se fue eliminando el compuesto de interés (el rebaudiósido A).

Según Soto y Del Val (2002), uno de los motivos principales por el cual se implementan corridas sucesivas a través de las resinas de intercambio iónico, es la eliminación del color generado por los pigmentos presentes en las hojas de *Stevia rebaudiana* (principalmente la clorofila) en el extracto edulcorante final. Una característica

típica de los pigmentos es que dan coloraciones intensas aun a bajas concentraciones, por lo que se requería eliminarlos prácticamente por completo del extracto edulcorante para que este sea incoloro, lo que conllevaría a realizar múltiples corridas de purificación por las resinas 2 y 3 (porque es en estas resinas que se remueven los pigmentos).

Es necesario evaluar en futuras investigaciones la implementación de otros métodos que eliminen el color en el extracto sin generar pérdidas de rebaudiósido A, como por ejemplo la microfiltración (Chhaya *et al.*, 2012) o la utilización de compuestos como carbón activado (Soto y Del Val, 2002), zeolitas (Silva *et al.*, 2007) o una mezcla entre carbón granulado y celite (Rajab *et al.*, 2009).

5.2.3. Resultados obtenidos en la evaluación sensorial realizada para determinar el grado de dulzor y de amargor de los extractos purificados con diferentes números de corridas a través de las resinas de intercambio iónico

Según lo mencionado en la sección 4.3.3.7, se realizó una prueba de discriminación a los extractos purificados con diferente número de corridas a través de las resinas 2 y 3, con el fin de determinar si los consumidores detectaban diferencias en el sabor amargo y en el dulce y si estos resultados presentaban alguna relación con la concentración de rebaudiósido A o de esteviósido presentes en el edulcorante.

Se decidió utilizar una prueba de discriminación, pues al probar las distintas muestras se estableció que la diferencia entre ellas, tanto en el sabor amargo como en el dulce, eran muy pequeñas (Lawless y Heyman, 2010). Como se sabía en cuales atributos existía la diferencia (dulzor y amargor), se decidió utilizar la técnica del descremado (indicarle al panelista cuál es la diferencia entre las muestras), porque esta genera una mayor sensibilidad en la prueba y, por consiguiente, se requiere una menor cantidad de panelistas para detectar la diferencia (en caso de que exista) con respecto de otras pruebas, como por ejemplo la prueba del triángulo (Rousseau *et al.*, 2002).

Las pruebas de discriminación que utilizan la técnica del descremado son la 2-AFC y la 3-AFC. La diferencia entre estas pruebas radica en que al presentarse un menor número de muestras a los panelistas en la prueba 2-AFC, se generan menores

inconsistencias en la memoria y se facilita así la comparación entre el estímulo (dulce o amargo) presentado en esa muestra y el estímulo de la muestra anterior (O'Mahony y Rousseau, 2002).

Para escoger la cantidad de panelistas requeridos, fue necesario analizar la hipótesis nula establecida con el propósito de valorar cuál tipo de error iba a ser el más crítico en el experimento. El error tipo I (α) es la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera, mientras el error tipo II (β) es la probabilidad de aceptar la hipótesis nula siendo falsa (Lawless y Heyman, 2010).

Para este experimento, la hipótesis nula establecía que no existían diferencias significativas entre las muestras. Entonces, al cometer el error tipo I, se concluía que todas las muestras eran diferentes en dulzor o en amargor cuando esto no era cierto. Mientras que al cometer el error tipo II se supondría que las muestras no eran diferentes en términos de dulzor y de amargor cuando esto no era verdadero.

Para esta investigación el error más crítico es el tipo I, pues el proceso de purificación que se establezca como el mejor, en el laboratorio, es el que se sugerirá escalar para la producción industrial del extracto edulcorante. Si se cometiera el error tipo I se podrían efectuar más etapas de purificación para reducir el sabor amargo, cuando en realidad no había diferencias. Esto repercutiría negativamente en el costo de producción del edulcorante, sin que realmente se afecte el sabor.

Debido a lo anterior, se consideró necesario establecer un valor pequeño de α y una potencia de prueba alta, ya que cuanto mayor sea la potencia de una prueba, es más probable que se detecte una diferencia sensorial si esta existe (Rousseau *et al.*, 2002). La potencia de prueba está dada por:

$$1 - \beta$$

De acuerdo a la ecuación anterior, para tener una alta potencia de prueba, se requería un valor bajo de β . A partir de la tabla T9 de Meilgaard *et al.* (1999) se escogió que el grado de dificultad fuera que al menos un 40% de los panelistas logaran verdaderamente detectar la diferencia entre las muestras ($p_d=0,40$); además se estableció un α de 0,01 y un β de 0,4.

Por lo tanto, el número de panelistas necesarios fue de 42, pero para mantener mayor holgura, se decidió convocar a un total de 50 panelistas, por si alguno se equivocaba a la hora de efectuar el panel y se eliminaban sus resultados. Los resultados obtenidos para esta prueba se pueden apreciar en el Cuadro VIII.

Cuadro VIII. Número de escogencias obtenidas para cada par de muestras presentadas a los panelistas en las pruebas de discriminación, tanto para el sabor amargo como para el dulce, en disoluciones con 0,7 mg/mL de edulcorante y con distinto número de corridas de purificación a través de las resinas de intercambio iónico ($\alpha=1\%$).

Par	Cantidad de corridas de purificación por las resinas de intercambio iónico	Cantidad de personas que la escogieron como la más dulce	Cantidad de personas que la escogieron como la más amarga
1 vs. 2	1	29	19
	2	21	31
1 vs. 3	1	24	28
	3	26	22
1 vs. 4	1	28	26
	4	22	24
1 vs. 5	1	23	21
	5	27	29

Según las tablas de distribución binomial de Roessler *et al.* (1978), para establecer diferencias significativas en el sabor dulce o en el amargo de las muestras con el valor de α seleccionado, se deben poseer como mínimo 34 escogencias.

Como en ninguna de las pruebas se obtuvo esa cantidad de escogencias, se puede decir con un 99% de confianza que los jueces no sintieron diferencias, ni en el amargor ni en el dulzor de las muestras con distinto número de corridas a través de las resinas de intercambio iónico. Para determinar si este resultado se debió a diferencias en la concentración de rebaudiósido A o de esteviósido de las muestras presentadas a los panelistas, se cuantificó el contenido de estos en esas muestras mediante el método de HPLC descrito en la sección 4.3.4.4. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro IX.

Cuadro IX. Concentración de esteviol glicósidos presente en las muestras purificadas y liofilizadas que se emplearon en la preparación de las disoluciones presentadas a los panelistas en las pruebas de discriminación.

Número de corridas de purificación	Concentración de reb. A en el liofilizado (%m/m)	Concentración de estev. en el liofilizado (%m/m)
Una corrida	3,33	58,37
Dos corridas	3,22	63,84
Tres corridas	2,92	56,76
Cuatro corridas	3,12	59,85
Cinco corridas	3,23	51,53

De acuerdo con estos resultados, y con un 95% de confianza, las muestras presentaron una variación de $\pm 0,2$ en la concentración de rebaudiósido A y de ± 4 en la concentración de esteviósido. Al realizar un ANDEVA a estos resultados se encontró que no existían diferencias significativas en la concentración de rebaudiósido A ni en la de esteviósido presentes en las muestras que probaron los panelistas. Es decir, todas las muestras tenían aproximadamente la misma cantidad de esteviol glicósidos. Este resultado se logró explicar gracias a lo establecido en la sección 5.2.2.2 a partir de la Figura 17.

De acuerdo con la Figura 17, la pérdida de ambos esteviol glicósidos se dio de manera proporcional y prácticamente lineal conforme se iban realizando las corridas de purificación. La tendencia lineal provocó que entre cada una de las corridas, a través de las resinas 2 y 3, se fuera perdiendo prácticamente la misma cantidad de rebaudiósido A y de esteviósido. Además, según la metodología de purificación descrita en la Figura 8, se partió de un único extracto, el cual se fue fraccionando de forma tal que todas las corridas generaran la misma cantidad de liofilizado. Al final, fue la unión de estas dos condiciones la que provocó que por proporcionalidad, los liofilizados empleados en la prueba sensorial tuvieran prácticamente la misma concentración de esteviol glicósidos.

Contemplando los resultados obtenidos en la sección 5.2.2.2 y 5.2.3, se concluyó que la elución a través de las resinas de intercambio iónico (resinas 2 y 3) es una operación ineficiente dentro del proceso de purificación, la cual fue generando una pérdida gradual, tanto del rebaudiósido A como del esteviósido, conforme se fueron aumentando el número de corridas. Por eso, cuanto menos corridas a través de estas

resinas se realicen, mayor será la recuperación de rebaudiósido A en el extracto edulcorante.

Además, era esperable que los panelistas no sintieran diferencias en el sabor amargo o dulce de las muestras presentadas, pues, como la pérdida de impurezas que generan el sabor amargo en el edulcorante (por ejemplo polifenoles) ocurrió proporcionalmente a la pérdida de rebaudiósido A y de esteviósido, todas presentaban aproximadamente la misma concentración de esteviósido y de impurezas.

En conclusión, los resultados obtenidos al analizar los rendimientos por operación para ambos esteviol glicósidos, demostraron que la operación más ineficiente fue la elución a través de las resinas de intercambio iónico. Por lo tanto, no es recomendable realizar más allá de una corrida por las resinas 2 y 3, pues estas generan ineficiencias en el proceso global de purificación.

Dentro de las mejoras que se pueden realizar al proceso de purificación, para aumentar sus rendimientos y aumentar la pureza del edulcorante, se encuentran:

- Realizar una cristalización del liofilizado con metanol. Esto puede generar una pureza del edulcorante entre 97% y 98% (Wallin, 2004). Para utilizar metanol se debe asegurar que la cantidad residual que quede en el edulcorante sea despreciable, de lo contrario es mejor no usarlo.
- Utilizar una resina aniónica fuerte en lugar de una resina aniónica débil, pues las resinas aniónicas fuertes presentan una mejor remoción de pigmentos. La desventaja de este tipo de resinas es que necesitan regenerarse de manera más constante que las resinas aniónicas débiles (Chabot y Beulieu, 2012; Payzant *et al.*, 1999).
- Realizar un estudio detallado del proceso de purificación con las resinas para así asegurar los mejores porcentajes de recuperación posibles.
- Utilizar camas mixtas de resinas aniónicas y catiónicas (Wallin, 2004).
- Conectar en serie varias columnas con las resinas que se vayan a utilizar (Kammerer *et al.*, 2011).

- Conectar en paralelo columnas con distintas camas de resina para obtener concentraciones mixtas de los eluidos de la columna (Kammerer *et al.*, 2011).
- Monitorear en línea el eluido que sale de cada resina con un detector ultravioleta, para así decir con mayor exactitud en qué momento se debe empezar a recolectar y en qué momento se debe detener la recolección.

5.3. Caracterización fisicoquímica de las hojas y el extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana*

Como la composición química de las hojas de *Stevia rebaudiana* presenta variaciones de acuerdo con el lugar donde se haya cultivado la planta (Gardana *et al.*, 2010; Kovylyaeva *et al.*, 2007), se realizó una caracterización fisicoquímica de las hojas de las plantas cultivadas en nuestro país, para comparar los resultados obtenidos con los reportados en la literatura y determinar si estos se encontraban dentro o fuera del rango reportado.

Para tal caracterización, se determinaron la cantidad de cenizas y de humedad presentes en las hojas de *Stevia rebaudiana*, así como la cantidad de proteínas y esteviol glicósidos de interés presentes en el extracto acuoso de las hojas. Los resultados obtenidos, junto con un resumen de los valores reportados por la literatura, se muestran en el Cuadro X. En el caso de las proteínas y los esteviol glicósidos, no se cuantificó su concentración en las hojas, debido a la complejidad de los protocolos necesarios para asegurar su completa extracción. En general, estos protocolos incluyen reactivos tóxicos, muy costosos y que no se tenían a disposición en esta investigación (Peterson, 1983).

Al comparar los valores de humedad de las hojas secas y molidas obtenidos experimentalmente contra los valores reportados en la literatura, se puede observar como la humedad estaba por encima del promedio de valores reportados, únicamente por un 0,81%, diferencia que no se consideró significativa pues la humedad obtenida se encuentra dentro de la preestablecida para la operación de secado de las hojas (INCAGRO, 2008).

Cuadro X. Comparación entre los resultados del análisis fisicoquímico de las hojas secas y el extracto acuosos de *Stevia rebaudiana* y los valores reportados por la literatura.

Componente	Concentraciones obtenidas experimentalmente en base seca ⁺ (%m/m)	Concentraciones en base seca reportadas por la literatura (%m/m) ^{****}									
		Abou-Arab <i>et al.</i> (2010)	Gardana <i>et al.</i> (2010)	Goyal <i>et al.</i> (2010)	Kaushik <i>et al.</i> (2010)	Kovylyaeva <i>et al.</i> (2007)	Mishra <i>et al.</i> (2010)	Rajab <i>et al.</i> (2009)	Savita <i>et al.</i> (2004)	Tadhani y Subhash (2006)	Promedio ^{***}
Humedad	7,8 ± 0,1	5,37	NR	4,65	7,7	NR	7	NR	7	NR	6,34
Proteínas⁺⁺	9,0 ± 0,9	11,4	NR	11,2	12	NR	10	NR	9,8	20,4	12,47
Cenizas	6,98 ± 0,07	7,41	NR	6,3	8,4	NR	11	NR	10,5	13,1	9,45
Estev.⁺⁺	11,6 ± 0,1	NR	5,8 ± 1,3	9,1	NR	4-20	NR	10-12	NR	NR	10,15
Reb. A⁺⁺	0,38 ± 0,01	NR	1,8 ± 1,2	3,8	NR	3	NR	NR	NR	NR	2,87

⁺Los valores son reportados como el promedio de determinaciones por triplicado y su incertidumbre es igual a $\pm\delta$. ⁺⁺Los valores obtenidos experimentalmente fueron calculados a partir del extracto acuoso elaborado con las hojas. ^{***} Para fines de cálculo del promedio, en el caso en el que se reporten intervalos o valores con incertidumbre asociada, se consideran ambos extremos del intervalo. ^{****}Adaptación de la información reportada por Lemus *et al.* (2012).

El contenido de cenizas en las hojas evaluadas, se encontró por debajo de la media del valor reportado por la literatura (y muy cerca del límite inferior de los valores reportados). Esto puede significar que las plantas cultivadas en territorio nacional están acumulando un menor contenido de minerales en sus hojas, en comparación con plantas de otros países debido a las condiciones de la tierra donde se cultivan las plantas (Gardana *et al.*, 2010).

Al comparar las concentraciones de proteínas, rebaudiósido A y esteviósido presentes en el extracto acuoso, contra las concentraciones reportadas por la literatura, se observó que las proteínas presentes en el extracto representaron el 72% de la concentración promedio reportada en la literatura. Por otro lado, la concentración de rebaudiósido A en el extracto representó el 13% de la concentración reportada en promedio por la literatura, mientras que el esteviósido en el extracto representó un 14% más de lo reportado. Las bajas concentraciones de proteína y rebaudiósido A, así como la alta concentración de esteviósido, pueden deberse básicamente a tres motivos:

- Factores ambientales como: tipo de suelo, clima y métodos de cultivo y cosecha promueven una menor síntesis de proteínas y rebaudiósido A, así como una mayor síntesis de esteviósido en las hojas de las plantas cultivadas en nuestro país, en comparación con las plantas cultivadas en otros países (Chabot y Beulieu, 2012).
- La variedad específica de las plantas cultivadas en el país es propensa a una alta síntesis de esteviósido y una baja síntesis de rebaudiósido A y proteínas (Yadav *et al.*, 2011).
- Las condiciones de extracción utilizadas, ya sea la proporción hojas:agua, la temperatura o el tipo de disolvente no propician la extracción de la mayor cantidad posible de rebaudiósido A y de proteínas. Las condiciones de extracción utilizadas fueron las mismas que en la sección 4.3.3.

Dentro de las mejoras que se pueden realizar en la metodología de extracción, para asegurar una cuantificación de todas las proteínas y los esteviol glicósidos presentes en las hojas, se encuentran:

- Un aumento en la temperatura de extracción: Se reporta la utilización de temperaturas superiores a 85°C o cercanas al punto de ebullición del agua (Bovanová *et al.*, 1998; Chabot y Beulieu, 2012; Kim *et al.*, 2011; Woelwer-Rieck *et al.*, 2010)
- Realizar extracciones sucesivas en lugar de una única extracción, ya sea con el mismo disolvente o con distintos disolventes (Chabot y Beulieu, 2012)
- Aumentar la cantidad de hojas en la proporción hojas:agua, pues se han realizado extracciones con un porcentaje hojas/disolvente desde un 7% hasta un 14%. Se ha obtenido el mayor porcentaje de recuperación al utilizar una proporción del 7% (Chabot y Beulieu, 2012)
- Efectuar la extracción con etanol, metanol o algún otro disolvente orgánico (como hexano o cloroformo) en lugar de agua, pues estos presentan selectividad sobre la extracción del rebaudiósido A (Prakash *et al.*, 2008).
- Realizar una extracción asistida por un tratamiento enzimático, con enzimas como celulasa y pectinasa y hemicelulasa que permitan el rompimiento de la pared celular y así faciliten la difusión del soluto (Puri *et al.*, 2012).
- Utilizar otros métodos de extracción, como por ejemplo extracción con agua caliente presurizada (PHWE por sus siglas en inglés), extracción con fluidos supercríticos o extracción asistida por microondas (MAE por sus siglas en inglés) (Teo *et al.*, 2009).

6. Conclusiones

- El tiempo de agitación evaluado (entre 1 y 6 horas) no generó diferencias significativas en la cantidad de esteviol glicósidos extraídos, pues desde la primera hora de extracción ya se había alcanzado el equilibrio.
- El tiempo de agitación, la proporción hojas:agua y la granulometría no tuvieron un efecto importante, a nivel práctico, en la cantidad extraída de rebaudiósido A ni de esteviósido, bajo las condiciones de extracción utilizadas,
- La temperatura no afectó la cantidad de esteviósido extraída, pero sí la cantidad de rebaudiósido A, que se favoreció a altas temperaturas (temperatura C).
- Cuanto mayor fue el número de corridas de purificación realizadas a través de las resinas de intercambio iónico, mayor fue la pérdida de rebaudiósido A y de esteviósido.
- Los panelistas no encontraron diferencias significativas en el sabor amargo ni en el dulce de los extractos con varias corridas de purificación porque la pérdida de esteviol glicósidos se dio en forma proporcional a la cantidad de extracto.
- Tanto la floculación como la elución a través de la resina 1 fueron operaciones altamente eficientes debido a su alto porcentaje de recuperación de rebaudiósido A.
- En la floculación se logró eliminar el contenido proteico del extracto acuoso. Por eso se consideró como una buena operación de purificación.
- Las resinas de intercambio iónico presentaron una mayor capacidad de adsorción de esteviol glicósidos que la calculada, por lo que se generaron ineficiencias en la recuperación de rebaudiósido A.

- La humedad de las hojas secas se encuentra dentro del rango reportado por la literatura.
- Las hojas presentan una concentración de cenizas inferior a la media de los valores reportados en la literatura.
- La concentración de proteínas en el extracto acuoso representó un 72% de concentración promedio reportada por la literatura para las hojas de la planta.
- El extracto acuoso de las hojas de las plantas cultivadas en el país presentó una concentración de esteviósido mayor a la concentración media reportada por la literatura (11,6% > 10,15%) para las hojas de la planta. Esto puede llegar a afectar el sabor residual amargo del edulcorante.
- La concentración de rebaudiósido A presente en el extracto acuoso representó un 13% de la concentración promedio reportada por la literatura para las hojas de la planta.

7. Recomendaciones

- Evaluar el efecto de la granulometría y la proporción hojas:agua sobre la extracción de los esteviol glicósidos en tiempos de agitación inferiores a una hora.
- Determinar si una vez concluido el proceso de extracción de las hojas estas aún contenían concentraciones significativas de los esteviol glicósidos, esto para diagnosticar la eficiencia del método de extracción.
- Evaluar proporciones hojas:agua más y menos concentradas que 1:15, para determinar su efecto sobre la extracción del rebaudiósido A.
- Evaluar el efecto de realizar extracciones sucesivas sobre la extracción del rebaudiósido A.
- Valorar la implementación de otros tipos de disolventes (como por ejemplo etanol o metanol) en el proceso de extracción, para así mejorar el rendimiento de la operación.
- Valorar la implementación de otro sistema de agitación que permita un mejor contacto entre las hojas y el disolvente.
- Realizar nuevamente el perfil de elución de los esteviol glicósidos a través de las resinas de intercambio iónico evaluadas para así mejorar los rendimientos de esta operación.
- Valorar distintos tipos de resinas y diferentes condiciones de elución para determinar si se puede aumentar la recuperación de rebaudiósido A en esta etapa de la purificación.
- Evaluar la efectividad de compuestos como el carbón activado, zeolitas, o celite sobre la eliminación de pigmentos en el extracto edulcorante.
- Efectuar un monitoreo en línea del eluido de cada resina para poder determinar con mayor exactitud el momento en que se debe empezar a

recolectar y el momento en el que se debe detener la recolección de eluido para así minimizar las pérdidas de rebaudiósido A.

- Ejecutar un estudio de factibilidad económica para determinar la prefactibilidad del proyecto.

8. Bibliografía

- ABEYLAN, V., GOCHUKYAN, V., MARKOSYAN, A., ADAMYAN, M. & ABELYAN, A. 2010. Extraction, separation and modification of sweet glycosides from the *Stevia rebaudiana* plant. United States Patent No 7,838,044 B2.
- ABOU-ARAB, A., ABOU-ARAB, A. & ABU-SALEM, M. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertonii plant. African Journal of Food Science 4(5): 269-281.
- ARIAS, C. Obtención del edulcorante usado en el producto Natuvia elaborado por LAICA. LAICA. Costa Rica. Comunicación personal el 19 de octubre del 2011.
- AVILLA, J. 2002. Lo esencial acerca del intercambio iónico. INTERNET www.agualatinoamerica.com/docs/pdf/5-6-02avilla.pdf. Consultado el 28 de julio del 2012.
- BERDANIER, C. 2008. Food Constituents. In Berdanier, C., Dwyer, J. & Feldman, E. eds. Handbook of Nutrition and Food. 2 ed. CRC Press, Florida. p. 33-35.
- BEVREVIEW. 2009. Coke, Pepsi introduce drinks with *Stevia*-based artificial sweetener. INTERNET <http://www.bevreview.com/2009/01/01/coke-pepsi-introduce-drinks-with-stevia-artificial-sweetener/>. Consultado el 8 de abril del 2012.
- BONDAREV, N., SUKHANOVA, M., RESHETNYAK, O. & NOSOV, A. 2003. Steviol glycosides content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. Biologia Plantarum 47(2): 261-264.
- BOVANOVA, L., BRANDŠTETEROVÁ, E. & BAXA, S. 1998. HPLC determination of steviosides in plant material. Z Lebensum Unters Forsch A 207: 352-355.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- BRENNAN, J. 2006. Food Processing Handbook. Wiley-VCH, Germany.

- BUCIĆ-KOJIĆ, A., PLANINIĆ, M., TOMAS, S., BILIĆ, M. & VELIĆ, D. 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81: 236-242.
- CACACE, J. & MAZZA, G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59(4): 379-389.
- CARDELLO, H., DA SILVA, M. & DAMASIO, M. 1999. Measure of relative sweetness of *Stevia* extract, aspartame, cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations. *Plants Foods for Human Nutrition* 54: 119-130.
- CASTELLÓ, E. 2006. Operaciones básicas: Manual de aula. Universidad Politécnica de Valencia.
- CENTRO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (CITA). 2009 a. Humedad. P-SA-MQ-002. Emisión 1. San José, Costa Rica.
- CENTRO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (CITA). 2009 b. Cenizas. P-SA-MQ-004. Emisión 1. San José, Costa Rica.
- CLOS, J., DUBOIS, G. & PRAKASH, I. 2008. Photostability of rebaudioside A and stevioside in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 8507-8513.
- COCA-COLA® FRANCE. 2011. Fanta Still®. INTERNET <http://www.coca-cola-france.fr/nos-boissons/boissons-coca-cola/fanta-still.html>. Consultado el 8 de abril del 2012.
- COCA-COLA® FRANCE. 2012. Sprite et Nestea: deux nouvelles recettes à base d'extrait de *Stevia* pour un goût unique et rafraîchissant, avec 30% de sucres en moins que la plupart des boissons rafraîchissantes. INTERNET <http://216.64.209.67/Site/Images/RenderFile.a.spx?dl=1&Id=1026>. Consultado el 8 de abril del 2012.
- COCA-COLA® GREAT BRITAIN. 2010. Introducing *Stevia* sweetener: A new sweetener from natural origins, to offer you more choices. INTERNET <http://www.coca-cola.co.uk/health/introducing-stevia-sweetener.html>. Consultado el 4 de abril del 2012.

- CODEX ALIMENTARIUS. 1995. Norma general del Codex para los aditivos alimentarios CODEX STAN 192-1995. INTERNET http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/docs/CXS_192s.pdf. Consultado el 16 de septiembre del 2012.
- CUSSLER, E. 1997. Diffusion: mass transfer in fluid systems. 2nd ed. Cambridge University, United Kingdom.
- CHABOT, S. & BEULIEU, M. 2012. Extraction method for providing an organic certifiable *Stevia rebaudiana* extract. WIPO Publication number WO 2012/006742 A1.
- CHATSUDTHIPONG, V. & MUANPRASAT, C. 2009. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics* 121(1): 41-54.
- CHEN, Z., WEI, X., LI, J. & DI, D. 2012. Preparative separation of Rebaudiana A from commercialized steviol glycosides by macroporous adsorption resins mixed bed. *Separation and Purification Technology* 89(0): 22-30.
- CHHAYA, SHARMA, C., MONDAL, S., MAJUMDAR, G. & DE, S. 2012. Clarification of *Stevia* extract by ultrafiltration: Selection criteria of the membrane and effects of operating conditions. *Food and Bioproducts Processing* 90(3): 525-532.
- CHIANG, C., EVANS, J., HAHN, J., HEYLEN, A., OHMS, A., PATIST, A., RHONEMUS, T., STRANGLER, J., TYLER, C. & VERCAUTEREN, R. 2011. Separation of rebaudioside A from *Stevia* glycosides using chromatography. United States Patent No US2011/0087011 A1.
- DACOME, A., DA SILVA, C., DA COSTA, C., FONTANA, J., ADELMANN, J. & DA COSTA. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry* 40(11): 3587-3594.
- DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA DE LA UNIVERSITAT DE VALENCIA. 2010. Fenómenos de transporte. INTERNET http://ocw.uv.es/ciencias/3-2/tema_4_fen_trans.pdf. Consultado el 20 de septiembre del 2012.

- DJENDOEL, D. 2001. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In Kinghorn, D. ed. *Stevia: the genus Stevia*. Taylor & Francis, London. p. 18-39.
- DOW. 2012. AMBERLITE™ XAD™ adsorbent resins for capture, desalting and decolorization. INTERNET <http://www.advancedbiosciences.com/products/amberliteXAD.html>. Consultado el 29 julio 2012.
- DR PEPPER SNAPPLE GROUP. 2009. All Sport and Dr. Pepper Snapple Group introduce the first sports drink naturally sweetened with *Stevia*. INTERNET <http://news.drpeppersnapple.com/press-release/product-news/all-sport-and-dr-pepper-snapple-group-introduce-first-sports-drink-natura>. Consultado el 17 de octubre del 2011.
- EFSA. 2010. Scientific opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. EFSA Journal 8(4): 1537.
- ESPIÑOZA, J., VARGAS, A., ROBLES, V., RODRÍGUEZ, G. & GARCÍA, M. 2007. Mathematical modeling of caffeine kinetic during solid-liquid extraction of coffee beans. Journal of Food Engineering 81: 72-78.
- ESQUIVEL, V. 2005. Dietas modificadas en carbohidratos: implicaciones fisiológicas. Revista Costarricense de Salud Pública 14: 1-5.
- FDA. 2009. Agency response letter GRAS notice No. GRN 000253. INTERNET <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm154989.htm>. Consultado el 17 de octubre del 2011.
- FDA. 2011a. Part 173: Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. INTERNET <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=173&showFR=1&subpartNode=21:3.0.1.1.4.1>. Consultado el 28 de julio del 2012.
- FDA. 2011b. What refined *Stevia* preparations have been evaluated by FDA to be used as a sweetener?. INTERNET <http://www.fda.gov/AboutFDA/Transparency/Basics/ucm214865.htm>. Consultado el 17 de octubre del 2001.

- FERRE, J. 2008. Zero calorie sweetener gets approval in Australia. AustralianFoodNews. INTERNET <http://www.ausfoodnews.com.au/2008/10/08/zero-calorie-sweetener-gets-approved-in-australia.html>. Consultado el 17 de octubre del 2011.
- FUNDACIÓN OPTI. 2011. La Comisión Europea aprueba el uso de *Stevia*. VT Sector Agroalimentario Boletín on-line 47.
- GALVIS, E. 2009. Evaluación de la utilización de *Stevia* en yogurt. Tesis Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Programa de Interfacultades de Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogotá.
- GARDANA, C., SCAGLIANTI, M. & SIMONETTI, P. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(9): 1463-1470.
- GE WATER & PROCESS TECHNOLOGIES. 2009. Understanding ion-exchange resins for water treatment systems. INTERNET https://knowledgecentral.gewater.com/kcpguest/.../TP10_50EN.pdf. Consultado el 28 de octubre del 2012.
- GIÃO, M., PEREIRA, C., FONSECA, S., PINTADO, M. & MALCATA, F. 2009. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. *Food Chemistry* 117(3): 412-416.
- GIOVANNETO, R. 1990. Method for the recovery of steviosides from plant raw material. United States Patent No 4,892,938.
- GIRALDO, C., MARÍN, L. & HABEYCH, N. 2005. Obtención de edulcorantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 36: especial.
- GIRALDO, G., CHAMORRO, N. & MEJÍA, C. 2010. Laboratorio de bioquímica: Una visión práctica. Universidad de Quindío, Colombia.

- GRANDISON, A. & LEWIS, M. 1996. Separation processes in the food and biotechnology industries: Principles and applications. Woodhead, Cambridge, England.
- GREGORY, J. 2005. Coagulation and flocculation. In Gregory, J. ed. Particles in water: Properties and processes. CRC Press, London.
- HELLFRITSCH, C., BROCKHOFF, A., STÄHLER, F., MEYERHOF, W. & HOFFMAN, T. 2012. Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 6782–6793.
- HIDALGO, A., HERRERA, R., LÓPEZ, V. & VELÁSQUEZ, G. 2009. El sector de la industria alimentaria de Costa Rica: una perspectiva desde la cadena de valor. Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- IBARZ, A. & BARBOSA, G. 2002. Adsorption and ionic exchange. In Barbosa, G. & Ibarz, A. eds. Unit operations in food engineering. CRC Press, London.
- IBRAHIM, N., EL-GENGAIHI, S., MOTAWA, H. & RIAD, S. 2006. Phytochemical and biological investigation of *Stevia rebaudiana* Bertoni; 1-labdane-type diterpene. *European Food Research and Technology* 224(4): 483-488.
- INCAGRO. 2008. Manual técnico de producción de *Stevia*. INTERNET http://www.incagro.gob.pe/apcafiles/e457b3346514303468089b655b420d50/Manual_T_cnico_de_Stevia.pdf. Consultado el 3 de marzo del 2012.
- INGREDIENTES Y PRODUCTOS FUNCIONALES (IPF). 2012. Green by 7 Up con *Stevia*-Argentina. INTERNET http://www.ipf.com.co/index.php?option=com_content&view=article&id=299%3Agreen-by-7up-con-stevia-argetnina&catid=1%3Alatest-news&Itemid=83&lang=es. Consultado el 8 de abril del 2012.
- JECFA. 2010. Compendium of food additive specifications. INTERNET <http://www.fao.org/docrep/013/i1782e/i1782e.pdf>. Consultado el 17 de octubre del 2011.

- JOKIĆ, S., VELIĆ, D., BILIĆ, M., BUCIĆ-KOJIĆ, A., PLANINIĆ, M. & TOMAS, S. 2010. Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Science* 28(3): 206-212.
- JONNALA, K., KIRAN, B., KAUL, V. & AHUJA, P. 2006. Process for production of steviosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni. United States Patent No 2006/0142555 A1.
- KAMMERER, J., CARLE, R. & KAMMERER, D. 2011. Adsorption and ion exchange: basic principles and their application in food processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 22-42.
- KAUSHIK, R., PRADEEP, N., VAMISH, V., GEETHA, M. & USHA, A. 2010. Nutrient composition of cultivated *Stevia* leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science and Technology* 47(1): 27-33.
- KENNELLY, E. 2001. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. In Kinghorn, D. ed. *The genus Stevia*. Taylor & Francis, London. p. 68-85.
- KHOLTOEV, F., FAIZULLAEVA, N., USUBBAEY, M. & KHAKIMOV, K. 2003. Selecting composition and developing technology of dry *Stevia* extract tablets. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 37(6): 321-324.
- KIM, I., YANG, M., LEE, O. & KANG, S. 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science and Technology* 44(5): 1328-1332.
- KIM, J., CHOI, Y. & CHOI, Y. 2001. Use of stevioside and cultivation of *Stevia rebaudiana* in Korea. In Douglas, A. ed. *Stevia: the genus Stevia*. Taylor & Francis, London. p. 196-202.
- KINGHORN, D. 2001. Overview of *Stevia*. In Kinghorn, D. ed. *Stevia: the genus Stevia*. Taylor & Francis, London. p. 1-17.

- KOLB, N., HERRERA, J., FERREYRA, D. & ULIANA, R. 2001. Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4538-4541.
- KOVYLYAEVA, G., BAKALEINIK, G., STROBYKINA, I., GUBSKAYA, V., SHARIPOVA, R., AL'FONSOV, V., KATAEV, V. & TOLSTIKOV, A. 2007. Glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds* 43(1): 81-85.
- KROYER, G. 2010. Stevioside and *Stevia*-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 5(2): 225-229.
- KRUGER, N. 2002. The Bradford method quantitation. In Walker, J. ed. *The protein protocols handbook*. Humana Press, New Jersey. p. 15-21.
- KUMAR, S. 1986. Method for recovery of stevioside. United States Patent No 4,599,403.
- LANXESS. 2012. Ion exchange resins in food applications. INTERNET http://www.ionexchange.com/imperia/md/content/ion/broschueren/food_en.pdf. Consultado el 28 de julio del 2012.
- LAWLESS, H. & HEYMAN, H. 2010. *Principles of sensory evaluation*. 2 ed. Springer, New York.
- LEMUS, R., VEGA, A., ZURA, L. & AH, K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* 132(3): 1121-1132.
- LIU, Y., DI, D., BAI, Q., LI, J., CHEN, Z., LOU, S. & YE, H. 2011. Preparative separation and purification of rebaudioside A from steviol glycosides using mixed-mode macroporous adsorption resins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(17): 9629-9636.
- MEILGAARD, M., CARR, B. & CIVILLE, G. 1999. *Sensory evaluation techniques*. 3 ed. CRC Press, Florida.

- MICHALIK, A., HOLLINSHEAD, J., JONES, L., FLEET, G., YU, C., HU, X., VAN WELL, R., HORNE, G., WILSON, F., KATO, A., JENKINSON, S. & NASH, R. 2010. Steviamine, a new indolizidine alkaloid from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry Letters* 3(3): 136-138.
- MISHRA, P., SINGH, R., KUMAR, U. & PRAKASH, V. 2010. *Stevia rebaudiana*– A magical sweetener. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 5: 62-74.
- MIZUTANI, K. & TANAKA, O. 2001. Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. In Douglas, A. ed. *Stevia: the genus Stevia*. Taylor & Francis, London. p. 179-175.
- MOORE, J., STANITSKI, C. & JURIS, P. 2009. *Principles of chemistry: The molecular science*. Cengage Learning, California.
- MOROZIN, D., RANGEL, F. & VIERA, C. 2005. Spectrophotometric determination of total proteins in blood plasma: A comparative study among dye-binding methods. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48(3): 385-388.
- O'BRIEN-NABORS, L. 2011. *Alternative Sweeteners*. 4 ed. Taylor & Francis, Florida.
- O'MAHONY, M. & ROUSSEAU, B. 2002. Discrimination testing: a few ideas, old and new. *Food Quality and Preference* 14: 157-164.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2012. *Estadísticas sanitarias mundiales 2012*. Suiza.
- PAYZANT, J., LAIDLER, J. & IPPOLITO, R. 1999. Method of extracting selected sweet glycosides from the *Stevia rebaudiana* plant. United States Patent No 5,962,678.
- PETERSON, G. 1983. Determination of total protein. *Methods in Enzymology* 91(12): 95-119.
- PIERI, V., BELANCIC, A., MORALES, S. & STUPPNER, H. 2011. Identification and quantification of major steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* purified extracts by ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(9): 4378-4384.

- PINELO, M., SINEIRO, J. & NÚÑEZ, M. 2006. Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering* 77: 57-63.
- PÓL, J., VARADOVA, E., KARASEK, P., ROTH, M., BENESOVA, K., KOTLARIKOVA, P. & CASLAVSKY, J. 2007. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388(8): 1847-1857.
- POPKIN, B. 2007. The world is fat. *Scientific American* 297: 88-95.
- PRAKASH, I., DUBOIS, G., CLOS, J., WILKENS, K. & FOSDICK, L. 2008. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food and Chemical Toxicology*. 46 Suppl 7: S75-82.
- PROMOTORA DEL COMERCIO EXTERIOR DE COSTA RICA (PROCOMER). 2012. Portal estadístico de comercio exterior. INTERNET <http://servicios.procomer.go.cr/estadisticas/inicio.aspx>. Consultado el 19 de julio del 2012.
- PURE VIA™. 2012. Our products. INTERNET <http://www.purevia.com/Purevia/Products2.aspx>. Consultado el 9 de enero del 2012.
- PURI, MUNISH., SHARMA, DEEPIKA., BARROW, COLIN J.. & TIWARY, A. K. 2012. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry* 132(3): 1113-1120.
- RAJAB, R., MOHANKUMAR, C., MURUGAN, K., HARISH, M. & MOHANAN, P. 2009. Purification and toxicity studies of stevioside from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Toxicology International* 16(1): 49-54.
- RANK, A. & MIDMORE, D. 2006. *Stevia* an intense natural sweetener: Laying the ground for a new rural industry. Rural Industries Research and Development Corporation. Australia.

- RENGARAJ, S., YEON, W., KIM, Y., JUNG, Y., HA, Y. & KIM, W. 2007. Adsorption characteristics of Cu(II) onto ion exchange resins 252H and 1500H: Kinetics, isotherms and error analysis. *Journal of Hazardous Materials* 143: 469-467.
- RODRÍGUEZ, I. 2010. Obesidad, hipertensión y diabetes aumentan entre los ticos. *La Nación*. Costa Rica. noviembre 24. INTERNET <http://www.nacion.com/2010-11-24/AldeaGlobal/UltimaHora/AldeaGlobal2601411.aspx>.
- RODRÍGUEZ, J. & SÁENZ, M. 2005. Obtención de un edulcorante natural proveniente de la *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Tesis Lic. en Ingeniería Agronómica. Universidad EARTH. Guácimo, Costa Rica.
- ROESSLER, E., PANGBORN, R., SIDEL, J. & STONE, H. 1978. Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, duo-trio and triangle tests. *Journal of Food Science* 43: 940-947.
- ROHM AND HAAS. 2000. AMBERLITE™ XAD™: Polymeric adsorbents. INTERNET http://www.advancedbiosciences.com/Bioprocessing_doc/english/AmberliteXAD_brochure.PDF. Consultado el 29 de julio del 2012.
- ROHM AND HAAS. 2008. Ion exchange for dummies: an introduction. INTERNET <http://www.lenntech.com/Data-sheets/Ion-Exchange-for-Dummies-RH.pdf>. Consultado el 29 de julio del 2012.
- ROUSSEAU, B., STROH, S. & O'MAHONY, M. 2002. Investigating more powerful discrimination test with consumers: effects of memory and response bias. *Food Quality and Preference* 13: 39-45.
- SALMINEN, S. & HALLIKAINEN, A. 2001. Sweeteners. In Branen, A., Davidson, P., Salminen, S. & Thorngate, J. eds. *Food Additives*. Marcel Dekker, New York.
- SANS® NATURAL DIET SODA. 2001. Frequently asked questions. INTERNET <http://www.sanssoda.com/#Faqs>. Consultado el 8 de abril del 2012.

- 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 & Functional Polymers* 50: 107-116.
- SIGMA ALDRICH. 2011. Ion exchange resins: classification and properties. INTERNET http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Aldrich/Instructions/ion_exchange_resins.Par.0001.File.tmp/ion_exchange_resins.pdf. Consultado el 29 de octubre del 2011.
- SILVA, F., BERGAMASCO, R., ANDRADE, C., PINHEIRO, N., FERNANDES, N., REIS, M., DE ARAÚJO, A. & LEMANSKI, S. 2007. Purification process of stevioside using zeolites and membranes. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 5(A40).
- SOTO, E. & DEL VAL, S. 2002. Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*. *Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos* 20: 5-9.
- STEVENS. 1999. Interaction effects in ANOVA. INTERNET <http://pages.uoregon.edu/stevensj/interaction.pdf>. Consultado el 23 de noviembre del 2012.
- STEVIA FIRST CORPORATION. 2012. *Stevia* Market. INTERNET <http://www.steviafirst.com/stevia/stevia-market>. Consultado el 1ero de agosto del 2012.
- TAN, P., TAN, C. & HO, W. 2011. Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of *Pegaga (Centella asiatica)*. *International Food Research Journal* 18: 557-562.
- TEO, C., TAN, S., HONG, J., SIN, C. & SHI, E. 2009. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Separation Science* 32: 613-622.
- TRISTÁN, A. 2011. Estudio de mercado tendencias del sector de alimentos en Europa Feria SIAL 2010. PROCOMER.
- WALLIN, H. 2004. Steviol Glycosides: Chemical and Technical Assessment. FAO. 63rd JECFA.

- WOELWER-RIECK, U., LANKES, C., WAWRZUN, A. & WÜST, M. 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology* 231(4): 581-588.
- WOLWER-RIECK, U. 2012. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(4): 886-895.
- XTC WORLD INNOVATION. 2011. The XTC trends tree. INTERNET <http://www.xtcworldinnovation.com/default.asp?id=19>. Consultado el 17 de octubre del 2011.
- YADAV, A., SINGH, S., DHYANI, D. & AHUJA, P. 2011. A review on the improvement of *Stevia* [*Stevia rebaudiana*(Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science* 91(1): 1-27.
- ZEVIA®. 2012. About Zevia®. INTERNET <http://www.zevia.com/about>. Consultado el 8 de abril del 2012.

9. Anexos

A.1. Curvas de cuantificación de proteínas y de esteviol glicósidos

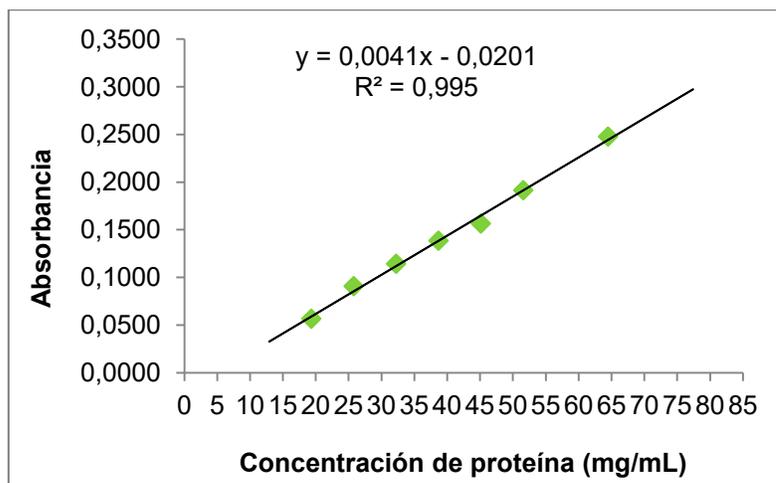


Figura 18. Curva de calibración para la cuantificación de proteína por el método de Bradford.

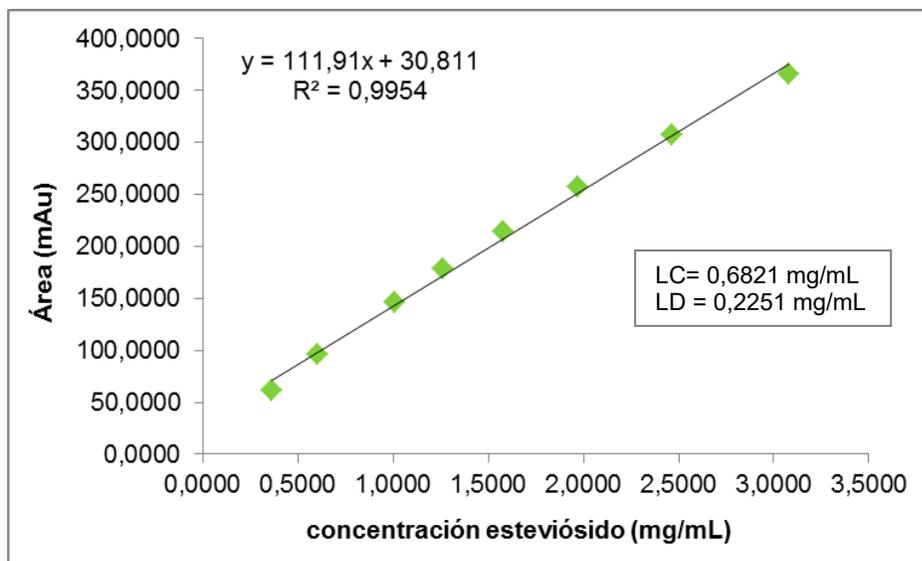


Figura 19. Curva de calibración para la cuantificación del estevióside por HPLC.

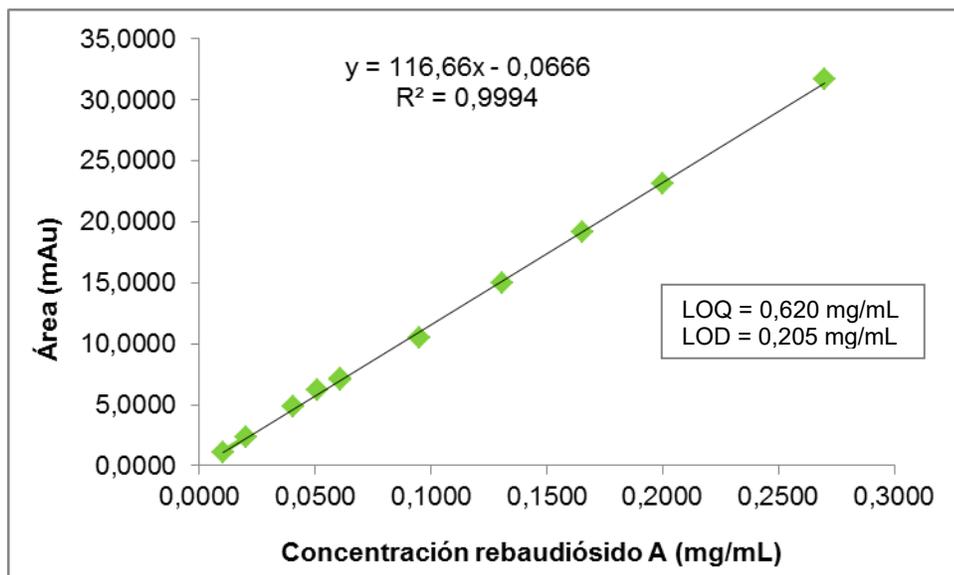


Figura 20. Curva de calibración para la cuantificación del rebaudiósido A por HPLC.

A.2. Evaluación del efecto de distintos parámetros de extracción sobre la concentración extraída de esteviol glicósidos

Cuadro XI. Variaciones en la extracción de los esteviol glicósidos al emplear diferentes tiempos de agitación y diferentes granulometrías de las hojas.

Granulometría (mesh)	Tiempo de agitación (h)	Esteviósido		Rebaudiósido A	
		Cn. promedio (%m/m)	Incertidumbre ($\pm\sigma$)	Cn. promedio (%m/m)	Incertidumbre ($\pm\sigma$)
30 mesh	0	0	-	0	-
	1	10,3	0,9	0,35	0,04
	2	12	2	0,46	0,06
	3	13	5	0,4	0,1
	4	12	2	0,42	0,05
	5	10	2	0,37	0,06
	6	9	2	0,35	0,07
60 mesh	0	0	-	0	-
	1	14	2	0,41	0,04
	2	13,1	0,7	0,40	0,03
	3	12	3	0,44	0,09
	4	13,9	0,4	0,41	0,06
	5	13,8	0,8	0,41	0,06
	6	14	1	0,40	0,04

*Los valores reportados son el promedio de determinaciones por triplicado de cada condición. **La incertidumbre se calculó como $\pm\sigma$ de los 3 valores de cada condición.

Cuadro XII. Variaciones en la concentraciones del rebaudiósido A al emplear diferentes proporciones de hojas:agua y diferentes granulometrías durante el proceso de extracción.

Granulometría (mesh)	Proporción hojas:agua (m:v)	Rebaudiósido A	
		Cn. promedio (%m/m)	Incertidumbre ($\pm\sigma$)
60	1:15	0,43	0,06
	1:35	0,37	0,03
	1:55	0,44	0,05
30	1:15	0,34	0,05
	1:35	0,42	0,07
	1:55	0,43	0,09

*Los valores reportados son el promedio de determinaciones por triplicado de cada condición. **La incertidumbre se calcula como $\pm\delta$ de los 3 valores de cada condición.

Cuadro XIII. Variaciones en las concentraciones de rebaudiósido A y del esteviósido al emplear diferentes proporciones de hojas:agua y diferentes tiempos de agitación durante el proceso de extracción.

Proporción hojas:agua (m:v)	Tiempo de agitación (h)	Esteviósido		Rebaudiósido A	
		Cn. promedio (%m/m)	Incertidumbre ($\pm\sigma$)	Cn. promedio (%m/m)	Incertidumbre ($\pm\sigma$)
1:15	0	0	-	0	-
	1	11,7	0,6	0,38	0,04
	2	11	2	0,40	0,01
	3	9	1	0,4	0,1
	4	12	2	0,44	0,05
	5	11	3	0,39	0,09
	6	11	4	0,35	0,08
1:35	0	0	-	0	-
	1	12	3	0,37	0,06
	2	13,8	0,7	0,45	0,07
	3	12	1	0,39	0,04
	4	13	2	0,40	0,06
	5	13	2	0,36	0,04
	6	13	2	0,39	0,05

Continuación del Cuadro XIII

Proporción hojas:agua (m:v)	Tiempo de agitación (h)	Esteviósido		Rebaudiósido A	
		Cn. promedio (%m/m)	Incertidumbre ($\pm\sigma$)	Cn. promedio (%m/m)	Incertidumbre ($\pm\sigma$)
1:55	0	0	-	0	-
	1	12	2	0,41	0,06
	2	13	2	0,45	0,04
	3	16	5	0,54	0,08
	4	13	1	0,41	0,05
	5	12	1	0,41	0,02
	6	11	2	0,38	0,06

*Los valores reportados son el promedio de determinaciones por triplicado de cada condición. **La incertidumbre se calcula como $\pm\sigma$ de los 3 valores de cada condición.

A.3. Evaluación del proceso de purificación con resinas de intercambio iónico y su efecto sobre la concentración de los esteviol glicósidos

- **Cálculo de la concentración de rebaudiósido A y esteviósido en el perfil de elución del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* por las resinas de intercambio**

A partir de los resultados obtenidos con la cuantificación por HPLC, se calculó la concentración presente en las muestras. Esto se hace según lo explicado en la sección 4.3.4.4. Una vez obtenida la concentración de ambos esteviol glicósidos en cada una de las muestras, se calculó la masa tanto de esteviósido como de rebaudiósido A, presente en el volumen total de la muestra. Esto se hace mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Masa reb. A} = \text{Cn reb. A} \times \text{volumen de extracto}$$

Para el caso del porcentaje de recuperación del rebaudiósido A en la operación de floculación se tendría:

$$\begin{aligned} &\text{mg reb. A en el extracto floculado y neutralizado} \\ &= 0,2059 \frac{\text{mg reb. A}}{\text{mL extracto}} \times 50 \text{ mL extracto} = \mathbf{10 \text{ mg reb. A}} \end{aligned}$$

Para poder determinar el porcentaje de recuperación, se determinó la masa de ambos esteviol glicósidos presente en el extracto antes y luego del proceso de elución por las resinas. En la Figura 8, se detalla qué es lo que entra y sale de cada una de las resinas. Para el caso del porcentaje de recuperación en la resina 1 se tendría:

$$\begin{aligned} \text{mg reb. A en el eluido de la resina 1} &= 0,0750 \frac{\text{mg reb. A}}{\text{mL extracto}} \times 130 \text{ mL extracto} \\ &= 9,74 \text{ mg reb. A} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{recuperación reb. A en la resina 1} \\ &= \left(\frac{\text{mg reb. A en el eluido de la resina 1}}{\text{mg reb. A en el extracto floculado y neutralizado}} \right) \times 100 \\ &= \frac{9,74 \text{ mg reb. A}}{10,30 \text{ mg reb. A}} \times 100 = 94,5\% \end{aligned}$$

Cuadro XIV. Variación en las concentraciones del rebaudiósido A y el esteviósido presente en los extractos antes y después del proceso de purificación con las resinas de intercambio.

Muestra	Volumen total del extracto eluido a través de las resinas (mL)	Área (mAu)		Concentración (mg/mL)		Masa (mg)		% recuperación (mg/mg)	
		Reb. A	Estev.	Reb. A	Estev.	Reb. A	Estev.	Reb. A	Estev.
Extracto floculado y neutralizado	50	7,2829	247,7882	0,2059	7,7554	10,2952	387,7709	-	-
Fracciones 70-200 eluidas de la resina 1	130	10,6672	343,3216	0,0750	2,7925	9,7438	363,0272	95	94
Fracciones 90-280 eluidas de las resinas 2 y 3	190	3,6323	116,6539	0,0262	0,7671	4,9690	145,7435	95	75

- **Cálculo de los rendimientos por operación y los rendimientos globales:**

Para obtener los rendimientos por operación y los rendimientos globales, fue necesario calcular primero la masa presente de cada esteviol glicósido en el volumen total de la muestra que se estuviera tratando. Esto se hizo multiplicando la concentración de cada esteviol glicósido obtenida mediante la cuantificación por HPLC por el volumen total de la muestra. Por ejemplo, en el caso del porcentaje de recuperación del rebaudiósido A en la operación de floculación se tendría:

$$\text{Masa reb. A} = C_n \text{ reb. A} \times \text{volumen de extracto}$$

$$\begin{aligned} \text{mg reb. A en el extracto floculado y neutralizado} &= 0,24 \frac{\text{mg reb. A}}{\text{mL extracto}} \times 381 \text{ mL extracto} \\ &= \mathbf{92 \text{ mg reb. A}} \end{aligned}$$

Este cálculo fue realizado para cada una de las operaciones listadas en el Cuadro XV y para el rebaudiósido A y el esteviósido. El rendimiento por operación se obtuvo a partir del siguiente cálculo:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento por operación} \left(\% \frac{\text{m}}{\text{m}} \right) \\ = \frac{\text{masa del esteviol glicósido en la operación evaluada}}{\text{masa del esteviol glicósido en la operación predecedora}} \times 100 \end{aligned}$$

Por ejemplo, en el caso del cálculo del rendimiento por operación del rebaudiósido A en la operación de elución por la resina 1, se tenía que:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento operación de elución por la resina 1} \left(\% \frac{\text{m}}{\text{m}} \right) \\ = \frac{\text{masa de reb. A en la muestra al ser eluída por la resina 1}}{\text{masa de reb. A en la muestra al ser floculada y neutralizada}} \times 100 \end{aligned}$$

$$\text{Rendimiento operación de elución por la resina 1} \left(\% \frac{\text{m}}{\text{m}} \right) = \frac{88,26 \text{ mg}}{91,22 \text{ mg}} \times 100 = \mathbf{91,68\%}$$

Este cálculo se realizó para cada una de las operaciones listadas en el Cuadro XV, y para el rebaudiósido A y el esteviósido. A partir de los resultados obtenidos, se obtuvo la Figura 16.

Para el cálculo del rendimiento global de cada operación, se comparó la masa de ambos esteviol glicósidos presente en las muestras después de cada operación de purificación con la masa presente en el extracto sin purificar:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento global de cada operación } \left(\% \frac{\text{m}}{\text{m}} \right) \\ = \frac{\text{masa del esteviol glicósido en la operación evaluada}}{\text{masa del esteviol glicósido en el extracto original}} \times 100 \end{aligned}$$

Por ejemplo, en el caso del rendimiento global de esteviósido en la segunda corrida de purificación se tendría:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento global del estev. en la segunda corrida de purificación } \left(\% \frac{\text{m}}{\text{m}} \right) \\ = \frac{\text{masa del estev. en la segunda corrida de purificación}}{\text{masa del estev. en el extracto original}} \times 100 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento global del estev. en la segunda corrida de purificación } \left(\% \frac{\text{m}}{\text{m}} \right) \\ = \frac{1590,99 \text{ mg}}{4362,55 \text{ mg}} \times 100 = \mathbf{36,4693\%} \end{aligned}$$

Este cálculo se realizó para cada una de las operaciones listadas en el Cuadro XVII, y para el rebaudiósido A y el esteviósido. A partir de los resultados obtenidos, se obtuvo la Figura 17.

- **Concentración de esteviol glicósidos en el liofilizado utilizado en la prueba sensorial de discriminación**

Para obtener el porcentaje de rebaudiósido A y de esteviósido presente en el liofilizado se realizó el siguiente cálculo:

$$\% \frac{\text{m}}{\text{m}} \text{ reb. A con 1 corrida de purificación} = \left(\frac{\text{Cn reb. A} \times \text{mL de disolución}}{\text{masa de liofilizado}} \right) \times 100$$

Los valores utilizados se muestran en el Cuadro XVI.

Cuadro XVI. Valores necesarios para calcular la concentración de los esteviol glicósidos en el liofilizado utilizado para las pruebas de discriminación.

Muestra	masa de liofilizado (mg)	mL de disolución	Cn. reb. A (mg/mL)	Cn. estev. (mg/mL)	% m/m de reb. A	% m/m de estev.
1 corrida de purificación	1379,0	1970	0,0233	0,4086	3,33	58,37
2 corridas de purificación	481,7	688	0,0225	0,4469	3,22	63,84
3 corridas de purificación	454,3	649	0,0204	0,3974	2,92	56,76
4 corridas de purificación	442,4	632	0,0218	0,4189	3,12	59,85
5 corridas de purificación	420,0	600	0,0226	0,3607	3,23	51,53

A.4. Valores obtenidos en la caracterización fisicoquímica de las hojas y el extracto acuoso de *Stevia rebaudiana*

Cuadro XVII. Determinación de la humedad presente en las hojas frescas de *Stevia rebaudiana*.

Réplica	Masa plato (mg)	Masa plato+muestra (mg)	Masa plato+muestra seca (mg)	% de humedad	Promedio de % de humedad
1	41340,52	41843,90	41454,35	77,39	77,9
2	46680,75	47190,80	46788,61	78,85	
3	49249,09	49763,90	49364,98	77,49	
δ				0,8	

Cuadro XVIII. Determinación de la humedad presente en las hojas secas y molidas de *Stevia rebaudiana*.

Réplica	Masa plato (g)	Masa plato+muestra (g)	Masa plato+muestra seca (g)	% de humedad	Promedio % de humedad
1	49,1611	54,1638	53,7802	7,6679	7,8
2	43,1440	48,2180	47,8257	7,7316	
3	37,9832	43,1380	42,7302	7,9111	
δ				0,1	

Cuadro XIX. Determinación de la concentración de cenizas presentes de las hojas secas y molidas de *Stevia rebaudiana*.

Réplica	Masa crisol (g)	Masa crisol+muestra (g)	masa crisol+cenizas (g)	% cenizas	promedio % cenizas
1	26,6259	31,6868	26,9766	6,9296	6,98
2	24,7106	29,7963	25,0694	7,0551	
3	24,6673	29,6764	25,0151	6,9434	
δ				0,07	

Cuadro XX. Cuantificación de las proteínas presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana* mediante el método de Bradford.

Réplica	masa de hojas secas empleada (g)	Volumen total de extracto (L)	Concentración de proteína (g/L)	Cn. de proteína en base seca (%m/m)	Promedio de la Cn. de proteínas
1	3,6666	0,05	6,8	9,3	9,0
2	3,6394		5,8	8,0	
3	3,6184		7,1	9,8	
δ				0,9	

Cuadro XXI. Cuantificación de los esteviol glicósidos presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana* mediante HPLC.

Réplica	Masa de hojas (g)	Volumen de extracto (L)	Cn. Reb.A (g/L)	Cn. Stev. (g/L)	Cn. de reb. A en base seca (%m/m)	Cn. de estev. en base seca (%m/m)
1	3,8653	0,05	0,2783	9,0743	0,36	11,7
2	3,8754		0,2943	9,0204	0,38	11,6
3	3,8645		0,2982	8,9125	0,39	11,5
Promedio					0,38	11,6
δ					0,01	0,1