



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas**

“Determinación de las condiciones óptimas en la extracción de glicósidos diterpenoides a partir de *Stevia rebaudiana* Bertoni en un digestor”

### **TESIS DE GRADO**

Previa a la obtención del Título de:

### **INGENIERO QUÍMICO**

Presentado por:

Kiana Annabel Añazco Camacho

Edinson Fernando Suárez Villón

Guayaquil - Ecuador

2015

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por haberme dado salud y fuerzas para culminar una de las etapas más apreciadas de mi vida, a mi padre quien me ha brindado todo el apoyo para poder finalizar con éxito mi carrera, y a mi madre por todo el amor incondicional y por ser una mujer tan luchadora, quien siempre me ha guiado por un buen camino, ella es sin duda mi ejemplo de vida. Mi familia es lo más valioso que Dios me ha dado, agradezco por todo el amor que me dan día a día y por enseñarme a luchar ante las adversidades de la vida.

A mi directora de tesis Dra. Patricia Manzano por orientarme en la elaboración del presente proyecto y a mi compañero de tesis por el temple y aprecio en el desarrollo de esta tesis.

Kiana

## **DEDICATORIA**

A Dios mi fiel amigo, a mis padres por su confianza y por su amor incondicional y a mi querido hermano.

Kiana

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios porque él lo representa todo. Por jamás abandonarme, por la sabiduría brindada a las personas que me ayudaron, y por su amor incondicional.

Edinson.

## **DEDICATORIA**

A Dios, a mis padres y directora de tesis.

Edinson.

# TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

---

**PRESIDENTE**

---

**DIRECTOR**

---

**VOCAL PRINCIPAL**

---

**VOCAL ALTERNO**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”.

---

Kiana Añezco Camacho

---

Edinson Suárez Villón

## RESUMEN

*Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta originaria de Paraguay productora de glicósidos de tipo diterpenoides, los cuales son considerados 300 veces más dulce que la sacarosa y su aporte energético es bajo, además de presentar muchas otras propiedades médicas. Debido a las ventajas que ofrece la *Stevia*, este proyecto se planteó con el propósito de optimizar el proceso de extracción de los compuestos dulces en un digestor empleando un diseño factorial experimental. Dentro de las operaciones unitarias aplicadas se encuentran: remoción de grasas y aceite del material vegetal, extracción sólido-líquido, precipitación con sales, clarificación por solventes, sedimentación y microfiltración. Para identificar y cuantificar los glicósidos en los diferentes procesos se realizaron análisis de azúcares indirectos (° Brix), espectroscópicos y cromatográficos (HPLC). A partir del análisis del diseño factorial se logró determinar los valores de los parámetros medidos que dan una respuesta óptima en la concentración de glicósidos y además, se evaluó el porcentaje de clarificación de los dos métodos de purificación descartando el menos eficiente.

**Palabras claves:** glicósidos, digestión, esteviósido, rebaudiósido A, °Brix.



## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	8
ÍNDICE GENERAL.....	9
ABREVIATURAS .....	16
SIMBOLOGÍA.....	18
ÍNDICE DE FIGURAS.....	19
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES.....	27
1.1. Antecedentes.....	27
1.2. Planteamiento del problema .....	31
1.3. Formulación del problema .....	34
1.4. Justificación .....	40
1.5. Hipótesis.....	43
1.6. Objetivos .....	43
1.6.1. Objetivo General.....	43
1.6.2. Objetivos específicos .....	43
1.7. Metodología .....	44

	10
1.7.1. Esquema de investigación .....	47
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO .....	49
2.1. Índice glucémico (IG) .....	49
2.2. Poder edulcorante .....	49
2.3. Ingesta diaria admisible de los edulcorantes .....	50
2.4. Edulcorantes.....	50
2.5. Clasificación de edulcorantes por su origen .....	51
2.5.1. Edulcorantes naturales .....	51
2.5.2. Edulcorantes artificiales.....	56
2.1. Glicósidos diterpenoides.....	60
2.6. Generalidades de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni .....	61
2.6.1. Nombre científico.....	61
2.6.2. Identificación taxonómica .....	61
2.6.3. Nombre común.....	62
2.6.4. Lugar de origen.....	63
2.6.5. Historia de la Stevia .....	63
2.6.6. Características químicas .....	63

2.6.7.	Constituyentes activos de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni .....	67
2.6.8.	Estabilidad .....	69
2.6.9.	Absorción .....	69
2.7.	Beneficios de la Stevia .....	69
2.8.	Efecto anti-hipoglucémico .....	71
2.9.	Esteviósido y carcinogenicidad .....	72
2.10.	Extracción .....	73
2.11.	Técnicas de extracción .....	73
2.11.1.	Digestión .....	75
2.11.1.1.	Extracción con solventes acuosos .....	75
2.12.	Técnicas de separación .....	75
2.12.1.	Filtración .....	75
2.12.1.1.	Filtración simple .....	76
2.12.1.2.	Filtración al vacío .....	76
2.12.1.3.	Micro-filtración .....	77
2.12.1.4.	Precipitación .....	77
2.12.1.5.	Precipitación con sales .....	77

	12
2.12.2. Floculación.....	78
2.12.3. Sedimentación por gravedad.....	78
2.12.4. Centrifugación .....	79
2.12.5. Cristalización .....	79
2.13. Métodos de identificación y cuantificación .....	79
2.13.1. Cromatografía .....	79
2.13.2. Técnicas cromatográficas .....	80
2.13.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC .....	80
2.13.3. Técnicas espectroscópicas.....	80
2.13.3.1. Espectroscopía UV-Visible .....	81
2.14. Diseño de experimentos y optimización.....	82
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA DEL PROYECTO .....	83
3.1. Preparación de muestras de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	83
3.1.1. Colección, secado y almacenado .....	83
3.1.2. Deshidratación.....	84
3.2. Molienda .....	84
3.3. Tamizado.....	85

3.4.	Selección de condiciones de operación.....	85
3.5.	Digestión.....	87
3.6.	Filtración.....	89
3.7.	Procesos de clarificación.....	90
3.7.1.	Precipitación con sales.....	90
3.7.2.	Clarificación con solvente.....	91
3.8.	Valoración colorimétrica.....	92
3.9.	Estándar esteviósido y rebaudiósido A.....	94
3.10.	Proceso de extracción y aislamiento de Esteviósido.....	94
3.10.1.	Determinación y cuantificación de glicósidos diterpenoides mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	96
3.11.	Análisis estadístico del diseño factorial- experimental.....	98
3.11.1.	Análisis de parámetros óptimos.....	98
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		99
4.1.	Deshidratación de hojas de Stevia.....	100
4.2.	Obtención de polvo de hojas de <i>Stevia</i> .....	100
4.2.1.	Proceso de tamizado.....	100
4.3.	Digestión.....	101

4.4.	Proceso de clarificación .....	104
4.4.1.	Precipitación con sales .....	104
4.4.2.	Clarificación con solventes .....	113
4.5.	Valoración colorimétrica .....	115
4.5.1.	Barrido espectroscópico .....	115
4.5.2.	Análisis espectroscópico de extractos tratados con sales .....	117
4.5.3.	Análisis espectroscópico de extractos tratados con solvente .....	120
4.6.	Extracción e aislamiento de esteviósido .....	122
4.7.	Cuantificación de esteviósido extraído .....	125
4.8.	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	126
4.8.1.	Identificación de los estándares de glicósidos diterpenoides .....	126
4.8.1.1.	Identificación de esteviósido aislado a partir de hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	127
4.1.1.1.	Ajuste de método de identificación de glicósidos.....	128
4.8.2.	Cuantificación de glicósidos diterpenoides .....	133
4.8.2.1.	Curva de calibración de esteviósido .....	133
4.9.	Análisis estadístico del diseño factorial- experimental .....	136
4.10.	Optimización de factores .....	142

4.11. Discusión.....	149
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	157
5.1. Conclusiones .....	157
5.2. Recomendaciones.....	159
GLOSARIO DE TÉRMINOS .....	161
ANEXOS .....	162
BIBLIOGRAFÍA .....	170

## ABREVIATURAS

<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>FDA</b>	Agencia de Alimentos y Medicamentos Food and Drug Administration
<b>GRAS</b>	Reconocido como seguro Generally Recognized as Safe
<b>JECFA</b>	Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios Joint FAO/WHO Expert Committee
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud (WHO)
<b>NNS</b>	Edulcorantes no nutritivos Non-nutritive sweeteners
<b>DOE</b>	Design of experiments Diseño de experimentos
<b>IDA</b>	Ingesta diaria admisible
<b>IG</b>	Índice glucémico



<b>NTP</b>	Programa Nacional de Toxicología National Toxicology Program
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución High Performance Liquid Chromatography
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>MS</b>	Espectrometría de masas Mass Spectrometry
<b>ELS</b>	Evaporativo de dispersión de luz Evaporative Light Scattering

## SIMBOLOGÍA

mg	Miligramo
G	Gramo
Kg	Kilogramo
$\mu$ l	Microlitros
ml	Mililitros
L	Litros
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
H	Hora
Rpm	Revoluciones por minuto
MetOH	Metanol
H <sub>2</sub> O	Agua
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio
Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de Calcio
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	Sulfato de Aluminio

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Exportaciones primarias como porcentaje del total de las ventas externas. ....	31
<b>Figura 1.2.</b> Productos naturales elaborados artesanalmente. ....	33
<b>Figura 1.3.</b> Esquema del proceso de obtención de glicósidos.....	48
<b>Figura 2.1.</b> Estructura química de la glucosa .....	54
<b>Figura 2.2.</b> Estructura química de la fructosa. ....	54
<b>Figura 2.3.</b> Estructura química de la tagatosa .....	54
<b>Figura 2.4.</b> Estructura química de la dextrosa .....	54
<b>Figura 2.5.</b> Estructura química de la sacarosa. ....	55
<b>Figura 2.6.</b> Estructura química de la lactosa .....	55
<b>Figura 2.7.</b> Estructura química de la maltosa .....	55
<b>Figura 2.8.</b> Estructura química de algunos azúcares-alcoholes .....	56
<b>Figura 2.9.</b> Estructura química del esteviósido y rebaudiósido A.....	56
<b>Figura 2.10.</b> Estructura química de la sacarina .....	59
<b>Figura 2.11.</b> Estructura química del aspartame .....	59
<b>Figura 2.12.</b> Estructura química del ciclamato .....	59
<b>Figura 2.13.</b> Estructura química del acesulfame-k.....	59
<b>Figura 2.14.</b> Estructura química de la sucralosa .....	60

<b>Figura 2.15.</b> Estructura química de la neohesperidina .....	60
<b>Figura 2.16.</b> <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni .....	61
<b>Figura 2.17.</b> Estructura química del esteviósido y los principales componentes encontrados en la hoja de Stevia. ....	64
<b>Figura 2.18.</b> Estructura de los principales glicósidos de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> . Glc, Xyl and Rha, representan respectivamente, glucosa, xilosa y ramnosa. En rebaudiósido A, B, C, D, E y F en el grupo R2 un resto de azúcar adicional es añadida al carbono 3 de la primera $\beta$ -Glc.....	66
<b>Figura 2.19.</b> Técnicas de extracción.....	74
<b>Figura 4.1.</b> Muestras de las 8 extracciones obtenidas en el digestor .....	101
<b>Figura 4.2.</b> Variación de pH en función de temperatura .....	103
<b>Figura 4.3.</b> Variación de grados Brix en función de temperatura .....	103
<b>Figura 4.4.</b> Clarificación con CaCl <sub>2</sub> . A) extracto crudo, B) evaluación de CaCl <sub>2</sub> C) extracto clarificado. ....	105
<b>Figura 4.5.</b> Evaluación cualitativa del extracto clarificado con sales .....	107
<b>Figura 4.6.</b> Variación de pH en la precipitación con diferentes concentraciones de Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> . ....	110
<b>Figura 4.7.</b> Variación de ° Brix de los extractos clarificados a diferentes concentraciones de Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .....	111

<b>Figura 4.8.</b> A) Preparación del extracto crudo, B) Adición de $\text{CaCl}_2$ , C) Coagulación/floculación del extracto de <i>Stevia</i> .....	112
<b>Figura 4.9.</b> Precipitación y sedimentación de sólidos en suspensión del extracto crudo.....	113
<b>Figura 4.10.</b> Tratamiento con hexano .....	114
<b>Figura 4.11.</b> Muestras clarificadas con solventes .....	114
<b>Figura 4.12.</b> A) Muestras centrifugadas, B) muestras clarificadas.....	115
<b>Figura 4.13.</b> Monitoreo espectroscópico progresivo de los extractos de <i>Stevia</i> (crudo y clarificado .....	117
<b>Figura 4.14.</b> Absorbancia medida a diferentes concentraciones de sulfato de aluminio.....	119
<b>Figura 4.15.</b> Resultado de absorbancia de los extractos crudos y clarificados	121
<b>Figura 4.16.</b> Filtración al vacío del extracto tratado con carbón activado .....	123
<b>Figura 4.17.</b> A) Roto evaporación de solvente, B) Extracto concentrado .....	124
<b>Figura 4.18.</b> A) Separación de impurezas por centrifugación. B) Cristales de esteviósido obtenidos. ....	125
<b>Figura 4.19.</b> Cromatograma del esteviósido aislado de las hojas de <i>Stevia</i> ....	127
<b>Figura 4.20.</b> Cromatograma del esteviósido obtenido con el método ajustado. ....	129
<b>Figura 4.21.</b> Cromatograma del estándar de rebaudiósido A .....	130

<b>Figura 4.22.</b> Cromatograma de una muestra clarificada con solventes .....	131
Figura 4.23. Identificación de compuestos por comparación espectral de estándares y muestra .....	132
<b>Figura 4.24.</b> Curva de calibración del esteviósido .....	135
<b>Figura 4.25.</b> Efectos significativos en la optimización de la extracción .....	138
<b>Figura 4.26.</b> Diagrama de Pareto para la interacción entre las variables A, B, C .....	139
<b>Figura 4.27.</b> Resultados de los efectos principales en función de la concentración de esteviósido.....	141
<b>Figura 4.28.</b> Interacción de los efectos principales: Tamaño de partícula y relación hoja/solvente .....	142
<b>Figura 4.29.</b> Variación de concentración de esteviósido según niveles de tamaño de partícula y relación hoja/solvente.....	143
<b>Figura 4.30.</b> Efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula y su nivel más bajo de relación hoja/solvente .....	145
<b>Figura 4.31.</b> Efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula y su nivel más alto de relación hoja/solvente .....	146
<b>Figura 4.32.</b> Respuesta óptima en función de los tres factores: Temperatura, tamaño de partícula y relación hoja/solvente.....	147

**Figura 4.33.** Segunda respuesta óptima en función de los tres factores:  
Temperatura, tamaño de partícula y relación hoja/solvente .....148

**Figura A.1. 1.** Preparación de las hojas de las hojas de *Stevia* A) Deshidratación  
B) Molienda C) Tamizaje D) Tamaño de partícula de 200  $\mu\text{m}$  D) Tamaño de  
partícula de 500  $\mu\text{m}$  .....162

**Figura A.2. 1.** Extracción de glicósidos diterpenoides y filtración progresiva: A)  
Digestión B) Control de temperatura C) Filtración con tela D) Filtro compuesto  
por gasa y papel filtro) E) Filtración del extracto crudo .....163

**Figura A.3. 1.** Clarificación del extracto crudo: A) Agregando  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$   
B) Dosificación de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  en los sedimentadores C) Precipitación de los  
flóculos .....164

**Figura A.4. 1.** Pruebas de extracciones realizadas en el laboratorio: A) Pesando  
las hojas trituradas B) Hojas de *Stevia* trituradas C) Digestión D) Filtración ....165

**Figura A.4. 2.** Clarificación por precipitación con sales: A) Extracto crudo B)  
Medición de pH C) Extracto al cual se le añadió  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  D) Extractos

con  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  E) Centrifugación a 14000 rpm F) Microtubos donde se observa la remoción de color a diferentes concentraciones de sulfato de aluminio G) Extracto clarificado H) Extracto crudo vs Extracto clarificado. .... 166

**Figura A.4. 3.** Clarificación con solventes: A) Pre-tratamiento con hexano B) Adición de metanol y posterior centrifugación C) Muestra Clarificada E) Extractos clarificados F) Centrífuga Thermo Scientific 1R ..... 167

**Figura A5. 1.** Obtención de esteviósido puro: A) Precipitación de impurezas con metanol B) Muestras centrifugadas C) Recuperación de solvente D) Cristales de Esteviósido. 168

**Figura A6. 1.** A) Viales con las muestras de extracto clarificado para analizar en el HPLC B) Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) ..... 169



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Clasificación taxonómica de la <i>Stevia</i> .....	62
<b>Tabla 2.2.</b> Porcentaje en peso de los principales glicósidos y otros constituyentes bioquímicos de <i>Stevia</i> .....	68
<b>Tabla 3.1.</b> Matriz de niveles máximos (+) y mínimos (-) de las variables del diseño experimental .....	86
<b>Tabla 3.2.</b> Matriz de experimentos de un diseño factorial completo $2^3$ .....	87
<b>Tabla 3.3.</b> Condiciones de trabajo del equipo digestor en el proceso de extracción de glicósidos diterpenoides .....	89
<b>Tabla 3.4.</b> Ubicación de las muestras EE, EC, EP, PS en los pocillos .....	93
<b>Tabla 4.1.</b> Parámetros evaluados en las muestras de extracto crudo .....	102
<b>Tabla 4.2.</b> Cantidades de $\text{CaCl}_2$ evaluadas en la clarificación. ....	104
<b>Tabla 4.3.</b> Cantidades de $\text{Al}_2 (\text{SO}_4)_3$ evaluadas en la clarificación del extracto .....	106
<b>Tabla 4.4.</b> Variación de pH en función de sales utilizadas en la clarificación del extracto a diferentes cantidades de $\text{Al}_2 (\text{SO}_4)_3$ .....	108
<b>Tabla 4.5.</b> Variación de grados Brix en función de sales utilizadas en la clarificación del extracto a diferentes cantidades de $\text{Al}_2 (\text{SO}_4)_3$ .....	109
<b>Tabla 4.6.</b> Barrido espectroscópico de la muestra 1 .....	116

<b>Tabla 4.7.</b> Valores de absorbancia de las muestras tratadas con sales .....	118
<b>Tabla 4.8.</b> Porcentaje de clarificación de los extractos tratados con sales .....	118
<b>Tabla 4.9.</b> Absorbancia de las muestras obtenidas en el digestor y de los extractos clarificados con solvente. ....	120
<b>Tabla 4.10.</b> Porcentaje de clarificación de los extractos tratados con solvente	122
<b>Tabla 4.11.</b> Tiempo de retención de estándares mediante el método modificado de Afandi y colaboradores. ....	133
<b>Tabla 4.12.</b> Área de estándares reportada por HPLC .....	134
<b>Tabla 4.13.</b> Concentraciones de esteviósido en las muestras .....	136
<b>Tabla 4.14.</b> Diseño factorial completa generada con la función estadística DOE .....	137
<b>Tabla 4.15.</b> Medias obtenidas y sus efectos simples .....	140
<b>Tabla 4.16.</b> Parámetros óptimos en la extracción de esteviósido.....	149

## CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

### 1.1. Antecedentes

Tradicionalmente en la industria se utiliza el azúcar como agente dulcificante, sin embargo cada vez hay más demanda por otros edulcorantes debido a los problemas de salud ocasionados por la ingesta excesiva (1), lo que contribuye al aumento de la densidad de energía de los alimentos, asociación con el aumento de peso, y su relación directa en la diabetes (2).

Las dietas altas en grasa y en altos niveles de sacarosa (50% glucosa y 50% fructosa), son culpables de la creciente obesidad y problemas de salud relacionados con la *Diabetes mellitus* tipo2, enfermedades

cardiovasculares, la hipertensión y ciertos tipos de cáncer (3). Como resultado de las diversas condiciones de salud negativas asociadas a la ingesta de azúcar, aparece una nueva alternativa; los edulcorantes no nutritivos.

En la última década el consumo de alimentos y bebidas que contienen estos edulcorantes no nutritivos ha aumentado dramáticamente.

El sustituir el azúcar por edulcorantes bajos en calorías puede ser una estrategia eficaz para el control de peso y para evitar distintos problemas de salud, sin embargo el uso de edulcorantes artificiales ha sido objeto de polémicas en lo que respecta a su seguridad a largo plazo o al uso excesivo (4). Desde su descubrimiento e introducción en el mercado, se ha producido un gran debate sobre las ventajas y desventajas de salud de los mismos.

La primera evidencia de problemas de salud relacionados con edulcorantes artificiales fue observada por la FDA antes de que se prohibiera un sustituto del azúcar de uso común conocido como el ciclamato en el año 1970, que fue considerado inapropiado para el

consumo por sus efectos cancerígenos evidenciados a través de muchos estudios con animales (5); debido a esto cada vez más personas tienen atracción hacia los recursos de fuentes naturales, como los llamados **edulcorantes naturales** que son una buena alternativa para sustituir la sacarosa (6).

Stevia, el nombre común para el extracto de esteviósido de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, ha ganado mucha atención ya que es natural, de sabor dulce y libre de calorías, que puede ser utilizado como un sustituto del azúcar o como una alternativa a los edulcorantes artificiales (7).

Se reporta que la *Stevia* aumenta la sensibilidad a la insulina en modelos de roedores (7), presenta efectos beneficiosos en la glucosa en sangre y mantiene los niveles de insulina en estudios de humanos (8) (9), lo que sugiere que este extracto puede tener un papel importante en la regulación de la ingesta de alimentos. Las personas diabéticas con hiperglucemia pueden utilizar los glicósidos de esteviol extraídos de las hojas de *Stevia* como un edulcorante alternativo, ya que regula el nivel de

glucosa en sangre mediante la estimulación de la secreción de insulina (10).

Este edulcorante natural no presentó efectos secundarios negativos (11), lo que la hace segura para el consumo humano. Recientemente fue aprobada para su uso como edulcorante por Joint Food and Agriculture Organization/ World Health Organization Expert Committee on Food Additives y por GRAS de la Administración de Alimentos y Drogas (12).

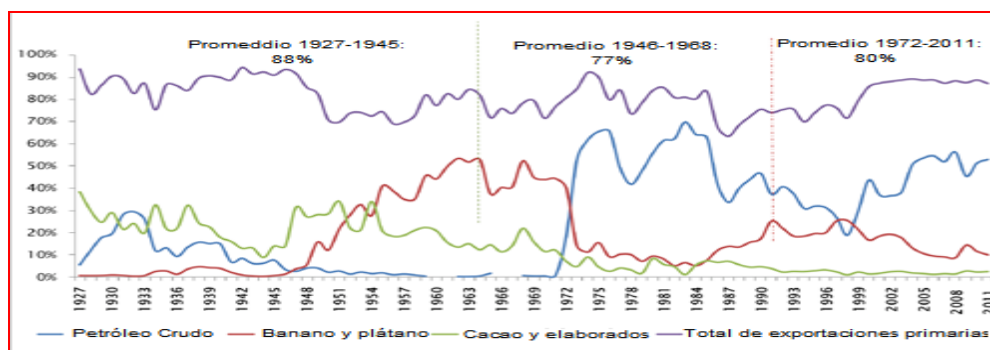
Por lo anterior descrito y ante la necesidad de establecer las condiciones óptimas en la extracción de glicósidos en un digestor, las cuales las referencias no lo han descrito se propone el presente tema de tesis.

No se han reportado estudios describiendo la extracción sin la utilización de solventes orgánicos, es por esto que la intención de este trabajo es desarrollar un proceso de extracción acuosa controlando variables como: temperatura, tamaño de partícula y relación hoja/solvente; con la finalidad de optimizar el proceso y mantener un buen estado de salud, potenciando la calidad de la dieta, en caso de utilizar el presente proceso en la elaboración de un producto.

## 1.2. Planteamiento del problema

La economía ecuatoriana se ha caracterizado por ser proveedora de materias primas en el mercado internacional y al mismo tiempo importadora de bienes y servicios de mayor valor agregado. Los constantes e imprevistos cambios en los precios internacionales de las materias primas, así como su creciente diferencia frente a los precios de los productos de mayor valor agregado y alta tecnología, han colocado a la economía ecuatoriana en una situación de intercambio desigual sujeta a los vaivenes del mercado mundial (13).

La Figura 1.1, muestra la magnitud de las exportaciones de materias primas en relación a los productos básicos que el Ecuador provee al mercado internacional.



**Figura 1.1.** Exportaciones primarias como porcentaje del total de las ventas externas.

**Fuente:** Senplades, 2012

Haciendo un análisis de la información mostrada en la Figura 1.1, se evidencia que en el Ecuador las materias primas han alcanzado un promedio del 82% en exportaciones hasta el 2011, esta actividad afecta al sector productivo debido a que la materia prima exportada no es aprovechada dentro de un sistema de producción nacional.

De igual forma al Ecuador han ingresado diversas especies de plantas para ser producidas en grandes cantidades debido a su valor en el mercado internacional, como es el caso de la Stevia rebaudiana Bertoni que es usada por la compañía COCA-COLA.<sup>1</sup>

En Ecuador existen importantes plantaciones de Stevia rebaudiana Bertoni, en provincias como: Carchi, Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas, Sucumbíos, Orellana, Santa Elena, Manabí, Loja, Zamora y Guayas con importante potencial de producción, el cual se encuentra mayormente destinada a la exportación (14).

Además de su potencial de uso, los cultivos tienen la ventaja de que en una hectárea se pueden sembrar hasta 80000 plantas de Stevia con

---

<sup>1</sup> M.G. (5 de noviembre de 2014). En *El uso de Stevia en refrescos de Coca Cola y Pepsi abre un debate alimentario*. Recuperado de: [http://noticias.lainformacion.com/salud/el-uso-de-stevia-en-refrescos-de-coca-cola-y-pepsi-abre-un-debate-alimentario\\_SYfiGGbNfG8Hm7WCDIZto5/](http://noticias.lainformacion.com/salud/el-uso-de-stevia-en-refrescos-de-coca-cola-y-pepsi-abre-un-debate-alimentario_SYfiGGbNfG8Hm7WCDIZto5/)



rendimiento de 1000 kilos en la primera cosecha y hasta 2000 kilos en las cosechas subsiguientes hasta tres cosechas al año. La Stevia tiene un periodo de desarrollo de 3 meses aproximadamente (15).

Dadas estas características se puede afirmar que la producción es buena en relación al peso producido por cosecha, pero la realidad es que de la producción generada, el 95% está destinada a exportación como materia prima, mientras que el 5% restante se destina a la comercialización de: hojas de Stevia deshidratada, ejemplares con fines reproductivos y productos naturales elaborados artesanalmente en presentaciones como: cajas de infusiones, miel, yogur, etc. (Figura 1.2.)



**Figura 1.2.** Productos naturales elaborados artesanalmente.  
**Fuente:** Stevia del Ecuador

La exportación de materia prima y la falta de productos elaborados de presentaciones nacionales, se deben principalmente a dos factores: la falta de tecnología en el Ecuador y la carencia de técnicas de extracción de compuestos a nivel industrial. Con un déficit de estas técnicas y tecnologías se dificulta elaborar un producto de mayor valor agregado, es por esto que se considera como principal necesidad la determinación de condiciones óptimas dentro del proceso de extracción de glicósidos diterpenoides, aportando de esta manera al cambio de la matriz productiva e impulsando la industria química y alimenticia.

### **1.3. Formulación del problema**

*Stevia rebaudiana* Bertoni originaria de Paraguay, es uno de los 950 géneros de plantas pertenecientes a la familia de las Asteráceas. La planta fue redescubierta por Bertoni en 1887, y ha sido utilizada extensivamente por los indios guaraníes por más de 1500 años (16). La *Stevia* tiene una larga historia de uso medicinal en Paraguay y Brasil como edulcorante, y si bien muchas de las aplicaciones terapéuticas de la *Stevia* son anecdóticas, es considerada por su trascendencia generacional dentro del área medicinal. Actualmente se conocen más de 150 especies de *Stevia*, pero la de Bertoni es la única con propiedades

edulcorantes importantes. Se representa que las hojas contienen aproximadamente 4-15% de esteviósido, que son 150-300 veces más dulce que el azúcar (17).

*S. rebaudiana* reporta actividades biológicas como antimicrobiano (18) , anti-fúngico (19), hepato-protector (20), hipoglucémico (extracto acuoso) (21), antitumoral (18), anti-rotavirus (22), anti-VIH (23), anti- hipertensión (24) (25), y actividad antiviral (26). Otras aplicaciones populares de *Stevia* y el esteviósido (principalmente en América Latina y el Oriente) incluyen las siguientes actividades: psicotónica y anti-estrés, además facilita la digestión y las funciones gastrointestinales; regula los niveles de glucosa en la sangre (bgl); nutre el hígado, el páncreas y el bazo; ayuda al cuerpo a mantener una sensación de vitalidad y bienestar. Muchas personas han informado de que el consumo de *Stevia* té contribuyeron a reducir sus ansias de tabaco y bebidas alcohólicas (27). Los estudios de *Stevia* y el esteviósido han demostrado inhibir el crecimiento y la reproducción de algunas bacterias que son responsables de la caries dental (27) (28).

Además se han descrito estudios sobre los efectos comparativos de las hojas y el esteviósido sobre la glucemia y la gluconeogénesis hepática (29). Otros estudios de este agente para el tratamiento de la diabetes parecen garantizados. La acción hipoglucemiante se centra en la presencia del esteviósido, que es una molécula polar, que puede ser extraída completamente, ya sea con metanol o con agua, mientras que los disolventes no polares y polares como medio- n -hexano, benceno, dicloruro de metileno, acetato de etilo tiene menor afinidad hacia la extracción de esteviósido polar (metanol y agua) los extractos que contienen el esteviósido se han estudiado bien para la acción hipoglucemiante, mientras que los extractos de polaridad mediana y baja aún no han sido investigados (30).

Por lo que *Stevia rebaudiana* Bertoni, constituye en la actualidad una alternativa prometedora, en el rango de edulcorantes naturales, más aun cuando los endulzantes sintéticos están seriamente cuestionados por los efectos de su consumo a corto y largo plazo (30). Esta planta produce una serie de glicósidos diterpenoides los cuales tienen un poder endulzante considerablemente mayor que la glucosa; además, son bajos en calorías y no son tóxicos, ni mutagénicos (31).

La Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos aprobó en 2008 el uso de los glicósidos diterpenoides como edulcorantes naturales no calóricos en alimentos y bebidas (32), dando al cultivo una gran expectativa, no solamente en el mercado de los edulcorantes, sino también en la agricultura, ganadería, farmacéutica y cosmetología.

Debido a las propiedades endulzantes de la *Stevia*, se estima que la demanda de hojas secas podría llegar a ser de 202,500 toneladas al año, lo que lleva a buscar nuevas alternativas de producción (33).

La planta se propaga principalmente por semillas que resultan de la polinización cruzada. Esta forma de reproducción implica recombinación genética y, por lo tanto, alta heterogeneidad en cuanto al crecimiento de las plantas y la producción de esteviósidos (34). Se ha recurrido a la reproducción asexual mediante esquejes, que son tallos o cogollos que se separan de una planta para introducirlo en la tierra con la finalidad de que nazca otra nueva; sin embargo, con esta forma de reproducción se obtiene bajo número de individuos por planta (35). Una alternativa es el cultivo de tejidos (micro propagación) que ofrece la posibilidad de obtener gran cantidad de plantas de un genotipo seleccionado, más uniformes en

cuanto a su crecimiento y producción de esteviósidos. Así mismo, permite tener mayor control sobre la sanidad del material facilitando su transporte de un país a otro (36).

El interés en el sector productivo para el desarrollo de algún producto de valor agregado radica en la existencia de tecnología, para así dejar de ser exportadores primarios.

El presente trabajo se centra en encontrar los parámetros más importantes que influyen directamente en la extracción de los glicósidos diterpenoides presentes en la *Stevia rebaudiana* Bertoni, encontrando las condiciones más favorables de temperatura, tamaño de partícula, y relación hoja/solvente, donde se determinará las condiciones óptimas de su extracción.

Si consideramos que la *Stevia* posee aproximadamente un 15% de glicósidos de tipo diterpenoides dentro de los cuales están de manera mayoritaria el esteviósido y rebaudiósido A, cuyas propiedades hacen que la *Stevia rebaudiana* sea de 200 a 300 veces más dulce que la sacarosa, por lo que encontrar dichos parámetros en la optimización del proceso de

extracción son de gran ayuda y gran importancia para aprovechar la mayor cantidad de endulzantes presentes en la *Stevia*.

La búsqueda de los parámetros óptimos de extracción de glicósidos diterpenoides presentes en la *Stevia rebaudiana* y su producción a escala mediante un digestor en la presente tesis, permitirá la posterior aplicación en el campo industrial productivo, logrando así aumentar el interés en el sector agrícola para que la producción de *Stevia* no sólo esté destinada a la comercialización de materia prima, sino también a la elaboración de productos terminados con mayor valor agregado que puedan ser incluidos en una dieta saludable de los ecuatorianos, con esto se busca aportar al desarrollo tecnológico del país e impulsar el cambio de la matriz productiva, como en muchas otras disciplinas.

Entonces debido a la carencia de tecnología y la necesidad de productos terminados surge este proyecto de investigación a escala, como una herramienta que permita la toma de decisiones y la optimización del proceso en la extracción de glicósidos diterpenoides presentes en la *Stevia*, puesto que se trata de dar respuesta a una serie de preguntas antes de dar paso a la ejecución del proyecto, tales como: ¿Qué

metodología se va a utilizar para realizar la extracción?, ¿Qué técnica de análisis se va a utilizar para la cuantificación de los compuestos de interés? y ¿Cuáles son las condiciones óptimas a las que debe operar el digestor para la extracción de glicósidos diterpenoides?, son cuestionamientos que esperamos responder con la ejecución del presente proyecto.

#### **1.4. Justificación**

Actualmente la demanda de edulcorantes naturales ha aumentado considerablemente en la industria alimenticia, este aumento se debe a la búsqueda de alternativas que logren reemplazar a los edulcorantes sintéticos tales como el aspartame, ciclamato, acesulfame k, entre otros; productos que cada vez son más cuestionados por presentar efectos tóxicos e incluso cancerígenos, efectos que no se evidencian en los productos naturales (6).

Hoy en día se buscan los productos naturales como una alternativa de alimentación sana, y para ello el estudio de las hojas de *Stevia* es significativo, debido a que esta planta es usada como un edulcorante natural no calórico, el cual no se metaboliza en el cuerpo humano



permitiendo así ser consumido por las personas diabéticas, personas obesas o aquellas que quieren mantener un peso adecuado (6). El mayor contenido de glicósidos se encuentra en las hojas con aproximadamente un 15% cuyos beneficios principales de estos glicósidos supera los ofrecidos por la sacarosa y edulcorantes sintéticos (37).

La especie cultivada en nuestro país tiene un dulzor del 78% mayor en comparación con las especies que se cultivan en Bolivia y en Brasil, las cuales solo alcanzan un 40%; esto hace que las hojas de *Stevia* producidas en el Ecuador se vuelvan codiciadas en el mercado internacional. Según Xavier Arellano, gerente de Aplus Traders (firma de comercio estadounidense), en el Ecuador existen alrededor de 50 productores de hojas de *Stevia*, cuya principal actividad es destinada sólo a la exportación como consecuencia de la falta de tecnología (38).

Otro factor influyente es la necesidad que tienen los productores de implementar una planta procesadora de *Stevia*, con el objetivo de elaborar productos terminados; entonces debido a estas situaciones surge la necesidad de investigar las mejores metodologías y sus respectivas técnicas para la extracción de los compuestos de interés.

En vista a esta problemática se propone optimizar el proceso de extracción de glicósidos diterpenoides de *Stevia rebaudiana* Bertoni descritos por Giraldo C. y col. 2005, pasando de escala laboratorio a su empleo en un digestor, elaborando un diseño experimental factorial con la finalidad de establecer los parámetros y condiciones aplicables a escala industrial como un aporte al desarrollo tecnológico del país, esperando así describir la metodología óptima de extracción mediante el acondicionamiento de un digestor y su posterior análisis de cuantificación de esteviósidos a manera de escalado.

Es importante fundamentar nuestra investigación en la necesidad de convertir un país primario-exportador a uno que prevalezca la producción eficiente y de mayor valor agregado (13).

Es así como proponemos este proyecto de investigación como una contribución al cambio de la matriz productiva, basándonos en la integración de conocimiento y tecnología; lo cual posibilite la toma de decisiones acertadas en cuestiones de optimización de procesos, cuya incorporación permita la ampliación de la oferta de productos ecuatorianos y reduzca la dependencia del país.

## **1.5. Hipótesis**

- El tamaño de partícula, la relación hoja/solvente y la temperatura influirán en la extracción óptima de glicósidos diterpenoides a partir de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni en un digestor.
- La optimización del proceso de extracción de glicósidos diterpenoides influyen en la elaboración de nuevos productos con valor agregado enfocados a la mejora del sector productivo.

## **1.6. Objetivos**

### **1.6.1. Objetivo General**

- Optimizar el proceso de extracción de glicósidos diterpenoides a partir de *Stevia rebaudiana* Bertoni empleando un digestor.

### **1.6.2. Objetivos específicos**

1. Establecer un diseño experimental-factorial para determinar las condiciones de operación del digestor.
2. Aplicar un proceso de precipitación con sales y solventes en el aislamiento de glicósidos para la remoción de pigmentos en los extractos crudos.

3. Realizar un análisis espectroscópico UV-VIS para determinar el porcentaje de clarificación de los extractos tratados con sales y con solvente.
4. Purificar el esteviósido a partir de *Stevia rebaudiana* Bertoni para la elaboración de una curva estándar y cuantificación mediante HPLC.
5. Determinar los parámetros óptimos de operación del digestor mediante técnicas estadísticas.

### 1.7. Metodología

La metodología para la ejecución del presente proyecto se efectuará en tres fases: preparación y adecuación de la muestra, extracción sólido-líquido y por último estudio y delimitación de metodología.

#### **Fase I: PREPARACIÓN Y ADECUACIÓN DE LA MUESTRA.**

El trabajo se inicia con la recolección de hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni* (durante la mañana para evitar el estrés de la planta) en los campos productores de la provincia de Santa Elena con coordenadas: Latitud: -2.2333, Longitud: -80.85 para su posterior selección y secado, tanto natural como forzado. El material deshidratado fue sometido a una reducción del tamaño de su partícula mediante un molino eléctrico de

tornillo cuyo medio de trituración es por fricción de piedras para su posterior tamizado.

La adecuación de la muestra (proceso anterior) facilitará la realización de análisis cualitativos de grupos químicos y análisis cuantitativos para la caracterización posterior de la muestra en caso de ser necesario. Luego se realizó la definición de variables a optimizar en la extracción de glicósidos diterpenoides presentes en las hojas *Stevia rebaudiana* Bertoni, considerando dos niveles para cada variable, como se indica: temperatura (50 y 60 °C), tamaño de partícula (250 y 500  $\mu\text{m}$ ) y relación hoja/solvente (1/10 y 1/13 Kg/L) (37).

Con las variables y sus niveles definidos, se desarrolló el diseño experimental con 8 evaluaciones totales, evaluaciones experimentales estudiadas directamente en el digestor.

## **Fase II: PROCESO DE DIGESTIÓN**

En esta fase se realizó la extracción de glicósidos diterpenoides mediante el proceso de digestión (extracción sólido-líquido), el cual es un procedimiento muy utilizado en la separación de principios activos de un

material vegetal mediante el uso de disolventes selectivos; efectuado a temperaturas de 50 a 60 °C.

La extracción se llevó a cabo mediante un digestor el cual se operó a 8 diferentes condiciones de: Temperatura (50 y 60 °C), tamaño de partícula (250 y 500  $\mu\text{m}$ ) y relación hoja/solvente (1/10 y 1/13 Kg/L), el solvente que se utilizó en este caso fue el agua, además, se mantuvo una agitación constante durante todo el proceso de digestión para ayudar a la cinética del proceso.

Una vez realizada la extracción, una parte del extracto pasa al laboratorio de análisis para el estudio de glicósidos extraídos mediante análisis cromatográfico y otra parte pasa al aislamiento y purificación (clarificación) de los glicósidos presentes en el extracto.

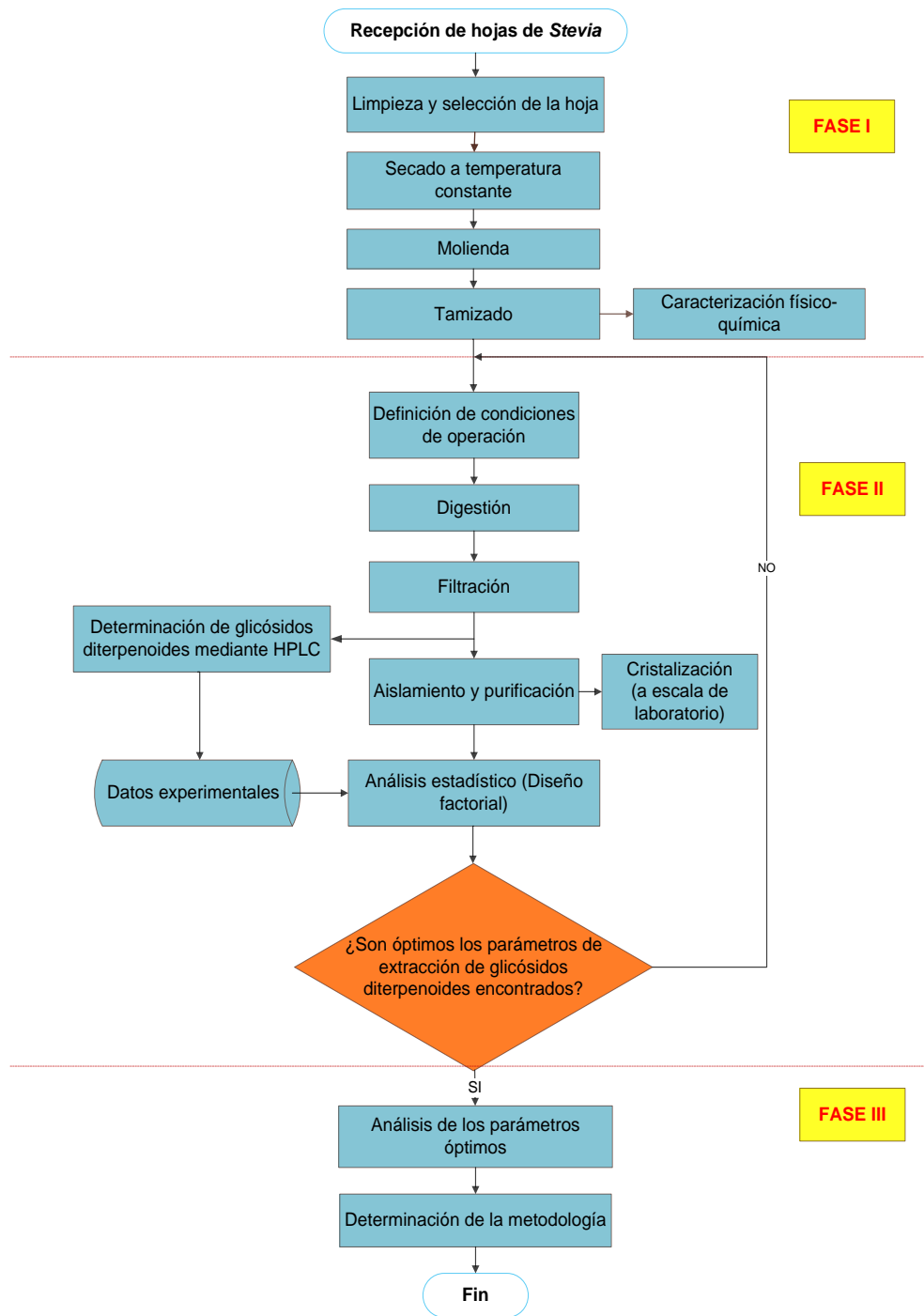
La determinación de glicósidos se desarrolló mediante análisis de cromatografía líquida de alta resolución HPLC (por sus siglas en inglés), cuyos resultados se emplearon en el análisis estadístico Diseño de Experimentos (DOE) mediante el programa Minitab 2015, para la determinación de condiciones óptimas de operación.

La cristalización se realizó a una parte del extracto clarificado a nivel de laboratorio para dejar en evidencia la separación de los compuestos de interés.

### **Fase III: ESTUDIO Y DELIMITACIÓN DE METODOLOGÍA.**

Esta última fase corresponde al estudio de los resultados obtenidos y los criterios de selección óptimos provenientes de análisis estadísticos, lo cual permitirá estructurar la metodología en la extracción de glicósidos diterpenoides presentes en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

#### **1.7.1. Esquema de investigación**



**Figura 1.3.** Esquema del proceso de obtención de glicósidos

**Elaborado por:** Autores, 2014



## **CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Índice glucémico (IG)**

El IG mide la capacidad que un alimento tiene de elevar el contenido de azúcar en sangre después de la comida, con respecto a una referencia estándar que es la glucosa pura (39). Ensayos clínicos en diabéticos reportan que las dietas con un IG bajo reducen las concentraciones de glucosa en sangre y la secreción de insulina (39).

### **2.2. Poder edulcorante**

El poder edulcorante (PE) se define como los gramos de sacarosa que hay que disolver en agua para obtener un líquido de igual sabor que la disolución de 1 gramo de edulcorante en el mismo volumen (40).

### 2.3. Ingesta diaria admisible de los edulcorantes

Se entiende como ingesta diaria admisible (IDA) la cantidad de aditivo alimentario que puede consumirse en la dieta diariamente durante toda la vida sin riesgos para la salud (41).

### 2.4. Edulcorantes

Los edulcorantes son aditivos que confieren sabor dulce a los alimentos. El término edulcorante equivale a *endulzante* (42). Algunos de ellos son extractos naturales mientras que otros son sintéticos, este último se denomina edulcorantes artificiales (39).

Los edulcorantes se pueden clasificar de diferentes formas (43):

- Por su origen: Naturales o Artificiales
- Por su estructura: Hidratos de carbono, Alcoholes polihídricos, glucósidos, proteínas y otros
- Por su valor nutritivo: Nutritivos y No nutritivos
- Por su valor calórico: Dietéticos y No dietéticos

Para efectos del presente estudio se detallará la clasificación **por su origen**.

## **2.5. Clasificación de edulcorantes por su origen**

### **2.5.1. Edulcorantes naturales**

Los edulcorantes naturales son extraídos de una materia prima y también de algunas plantas (46), se utilizan en la industria de bebidas, alimentos, productos dentales y de higiene por su sabor agradable (47).

Dentro de los edulcorantes naturales el más conocido es la sacarosa o azúcar la cual está constituida por una molécula de fructosa y otra de glucosa, unidas por un enlace glucosídico (41). Proporciona excelentes características de dulzor por lo que imparte un sabor apetecible para los consumidores a pesar de ser calórica (47).

Los endulzantes que superan a la sacarosa en poder endulzante son varios entre los cuales está la miel producida por las abejas que también es rica en fructosa y glucosa pero posee un poder endulzante es dos veces mayor que el azúcar de caña (4).

La glucosa está presente en la mayoría de las frutas y en muchos vegetales (41) y posee un poder edulcorante del 60% (base azúcar) (6),

mientras que la fructosa es el azúcar con mayor poder edulcorante y es abundante en frutas, además existen polímeros de fructosa tanto naturales como artificiales pero estos compuestos no contribuyen al dulzor de los alimentos de forma significativa (41).

Existen edulcorantes naturales como los que se encuentran en la leche cuyos principales azúcares son la lactosa y tagatosa, la primera es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa cuya solubilidad en el agua es baja y con un dulzor de 40% respecto a la sacarosa mientras que la tagatosa produce una menor respuesta glucémica (41).

Otro endulzante constituido por glucosa, y enlace glucosídico es la maltosa, un azúcar reductor cuyo dulzor es 50% comparado con el de la sacarosa (41).

Existen también endulzantes obtenidos por depolimerización completa del almidón de maíz como la dextrosa que es un monosacárido con un poder edulcorante del 60% al 70% en base azúcar (6). Edulcorantes derivados de sacáridos como los alcoholes de azúcar se consideran de igual manera entre los naturales y éstos se clasifican como

*monosacáridos y disacáridos hidrogenados, entre los cuales están sorbitol, manitol, xilitol y: isomalta, maltitol, y lactitol (49).*

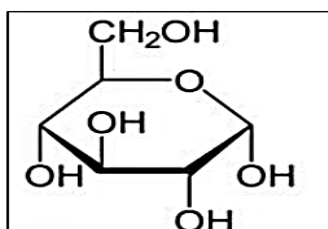
Un edulcorante muy utilizado es el jarabe de maíz de alta fructuosa que se obtiene por la isomerización de la dextrosa y tiene un poder edulcorante de 1 además sinergiza el poder edulcorante de la sacarosa y de otros edulcorantes no nutritivos pero su consumo puede producir lesiones hepáticas e incrementos del ácido úrico.

Otros edulcorantes son la taumatina y la glicirricina. La taumatina representa a un conjunto de proteínas (polipéptidos) extraídas de la *Thaumatococcus daniellii Benth* y es considerada la sustancia más dulce del planeta (1.600 veces más que una solución de sacarosa al 10%)(4), y la glicirricina que es obtenida de la especie regaliz *Glycyrrhiza glabra*, con un poder endulzante es 60 veces mayor que el de la sacarosa (4).

Finalmente tenemos los glicósidos de esteviol los cuales son extraídos de la *Stevia rebaudiana* Bertoni conocida como yerba dulce o 'ka-á-he-é' cuyos componentes dulces más abundantes son el esteviósido y el rebaudiósido A. Las hojas tienen índice glucémico de cero y son de 15-30

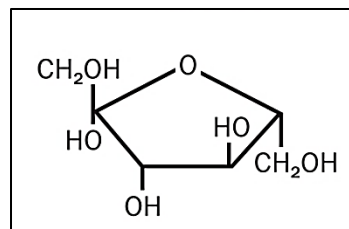
veces más dulce que el azúcar mientras que el esteviósido en forma pura es 300 veces más dulce que una solución al 0,4% de sacarosa.

## ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS EDULCORANTES NATURALES



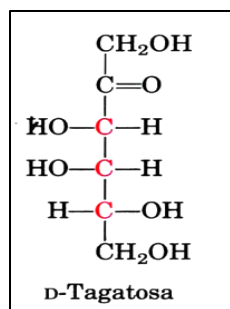
**Figura 2.1.** Estructura química de la glucosa

**Fuente:** Sánchez, 2014



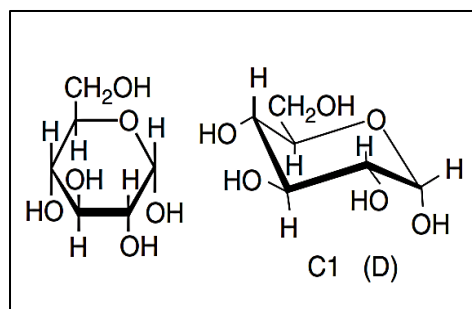
**Figura 2.2.** Estructura química de la fructosa.

**Fuente:** Badui, 2006



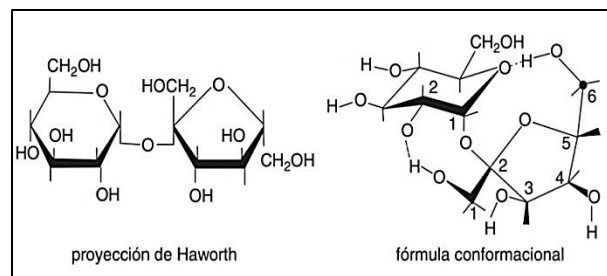
**Figura 2.3.** Estructura química de la tagatosa

**Fuente:** Dolores, (s.f.).



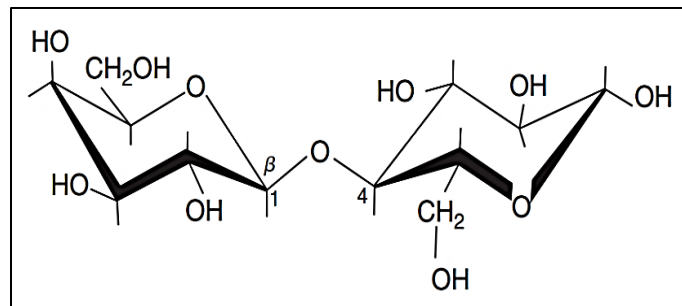
**Figura 2.4.** Estructura química de la dextrosa

**Fuente:** Badui, 2006.



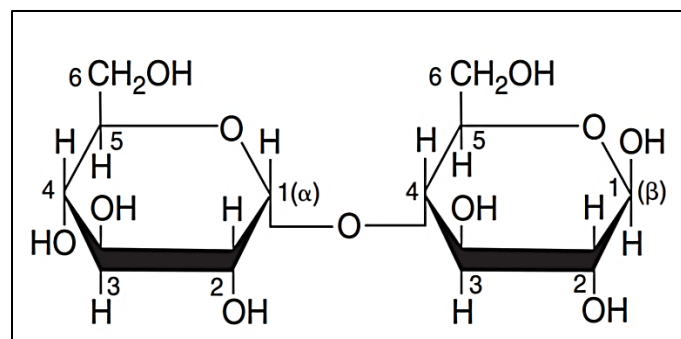
**Figura 2.5.** Estructura química de la sacarosa.

**Fuente:** Badui, 2006



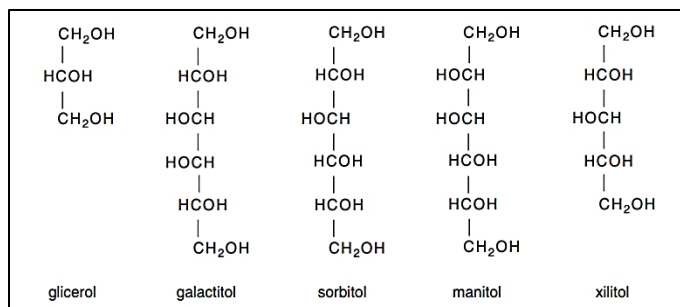
**Figura 2.6.** Estructura química de la lactosa

**Fuente:** Badui, 2006



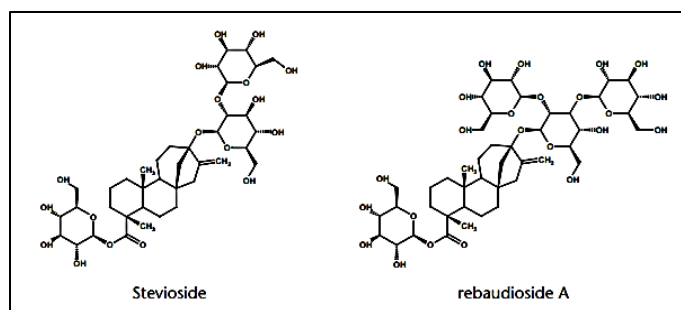
**Figura 2.7.** Estructura química de la maltosa

**Fuente:** Badui, 2006



**Figura 2.8.** Estructura química de algunos azúcares-alcoholes

**Fuente:** Badui, 2006



**Figura 2.9.** Estructura química del esteviósido y rebaudiósido A

**Fuente:** Bostel, 2009

### 2.5.2. Edulcorantes artificiales

Los edulcorantes artificiales son sustancias que no aportan calorías al ingerirlos y poseen un grado de dulzura superior al de la sacarosa; la mayoría de edulcorantes artificiales tienen efectos secundarios sin



embargo se utilizan ampliamente en la fabricación de alimentos de dieta. (47).

Un edulcorante muy conocido es la sacarina, éste es de 200 a 700 veces más dulce que el azúcar pero tiene un sabor final metálico ligeramente desagradable, su índice glucémico es de cero y la IDA es 5 mg/Kg de peso corporal. La sacarina ha sido investigada extensivamente para determinar su potencial carcinógeno, es así que estudios reportaron cáncer de vejiga en ratas dada las altas dosis de sacarina. A pesar de los antecedentes de este edulcorante la gente continúa consumiendo alimentos que contengan edulcorantes no nutritivos en un esfuerzo para bajar de peso (49).

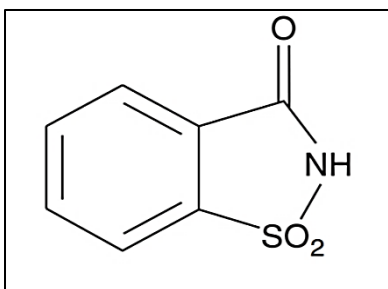
Un edulcorante producido a partir de los aminoácidos: ácido aspártico y fenilalanina es el aspartame el cual proporciona 4 kcal/g y es 200 veces más dulce que la sacarosa con una IDA de 50 mg/Kg de peso corporal. El aspartame es metabolizado a *fenilalanina, ácido aspártico y metanol en el tracto gastrointestinal* lo cual producen efectos como mareos, dolores de cabeza, problemas gastrointestinales y los cambios de humor (54).

El consumo de aspartame provoca enfermedades como el Alzheimer, trastornos de déficit de atención, defectos de nacimiento, cáncer, diabetes y lupus, es uno de los edulcorantes artificiales más controversiales y ampliamente utilizado hoy en día (49).

El ciclamato de sodio es el segundo edulcorante artificial más antiguo en uso hoy en día. Es el menos potente de este grupo, sólo 40 veces más dulce que el azúcar y posee un IG de cero además de no aportar calorías (41).

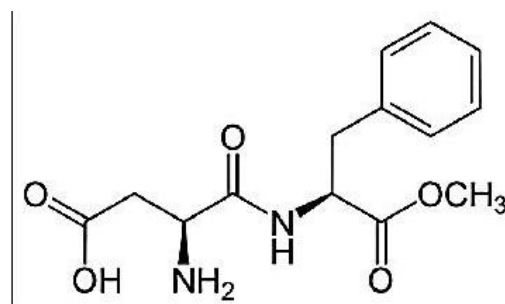
El acesulfame-K es aproximadamente 200 veces más dulce que el azúcar la IDA es de 15 mg/Kg de peso corporal. Uno de los subproductos de desglose en el cuerpo es la acetoacetamida, que es tóxico en dosis altas (49).

## ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS EDULCORANTES ARTIFICIALES



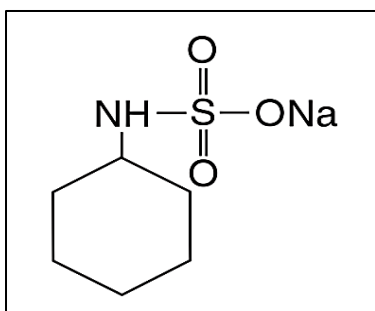
**Figura 2.10.** Estructura química de la sacarina

**Fuente:** Badui, 2006



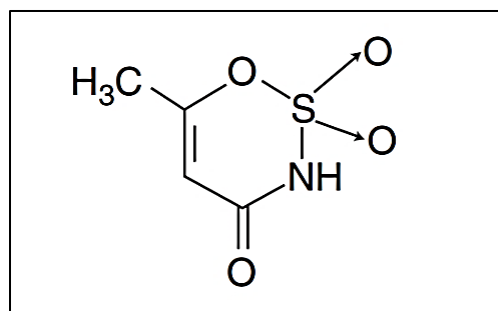
**Figura 2.11.** Estructura química del aspartame

**Fuente:** Badui, 2006



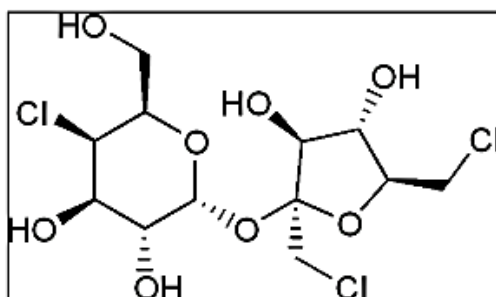
**Figura 2.12.** Estructura química del ciclamato

**Fuente:** Badui, 2006



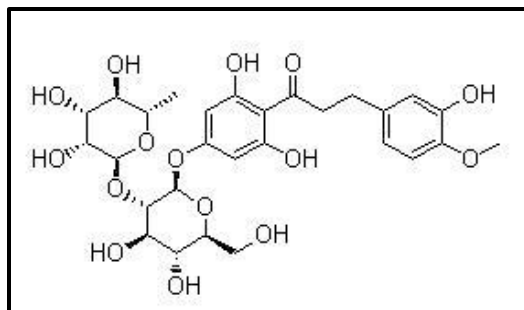
**Figura 2.13.** Estructura química del acesulfame-k

**Fuente:** Badui, 2006



**Figura 2.14.** Estructura química de la sucralosa

**Fuente:** Badui, 2006



**Figura 2.15.** Estructura química de la neohesperidina

**Fuente:** Xian Greenherb

Entre otros edulcorantes artificiales tenemos la sucralosa el cual es 600 veces más dulce que el azúcar y no tiene regusto desagradable, está hecho mediante la sustitución selectiva de cloro por grupos hidroxilo sobre un núcleo de sacarosa (49). También se destaca al neotamo el cual es un dipéptido derivado del aspartame con poder edulcorante 8.000 veces mayor que el azúcar (41). Y finalmente la neoesperidina dihidrocalcona el cual es de 250 a 1.800 más dulce y persistente que la sacarosa, sin embargo no está aprobada por FDA pero sí en Europa (41).

## 2.1. Glicósidos diterpenoides

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula

de azúcar se condensa con otra que tiene un grupo hidroxilo (54). Estos compuestos se encuentran principalmente en las plantas (55).

## 2.6. Generalidades de la *Stevia rebaudiana* Bertoni

### 2.6.1. Nombre científico

*Stevia rebaudiana* Bertoni (56).

### 2.6.2. Identificación taxonómica

La *Stevia* es una planta herbácea perenne (véase Figura 2.16), perteneciente a la familia de las Asteráceas (Compuestas). *S. rebaudiana* es una de los 230 miembros del género de *Stevia* y una de las dos únicas que producen los glicósidos de esteviol dulces (56).



**Figura 2.16.** *Stevia rebaudiana* Bertoni

**Fuente:** Lemus, 2011

En la Tabla 2.1, se muestra la identificación taxonómica de la *Stevia*.

**Tabla 2.1.** Clasificación taxonómica de la *Stevia*

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Asterales
<b>Familia</b>	Asteráceae
<b>Subfamilia</b>	Asteroideae
<b>Género</b>	<i>Stevia</i>
<b>Especie</b>	<i>S. rebaudiana</i>
<b>Nombre binomial</b>	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni

**Fuente:** Cortés, 2012

### 2.6.3. Nombre común

Las tribus guaraníes de Paraguay usaron diferentes especies de *Stevia rebaudiana*, ellos la llamaron: ka'a he'e (en guaraní) que significa hierba dulce. También ha adoptado diferentes nombres según las regiones donde se cultiva, entre ellas se pueden citar: *Stevia*, hierba dulce, yerba de miel y honey leaf (58).

#### **2.6.4. Lugar de origen**

*Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta originaria de Paraguay y Brasil. Esta planta fue usada ancestralmente por sus aborígenes, como edulcorante y para fines medicinales (59).

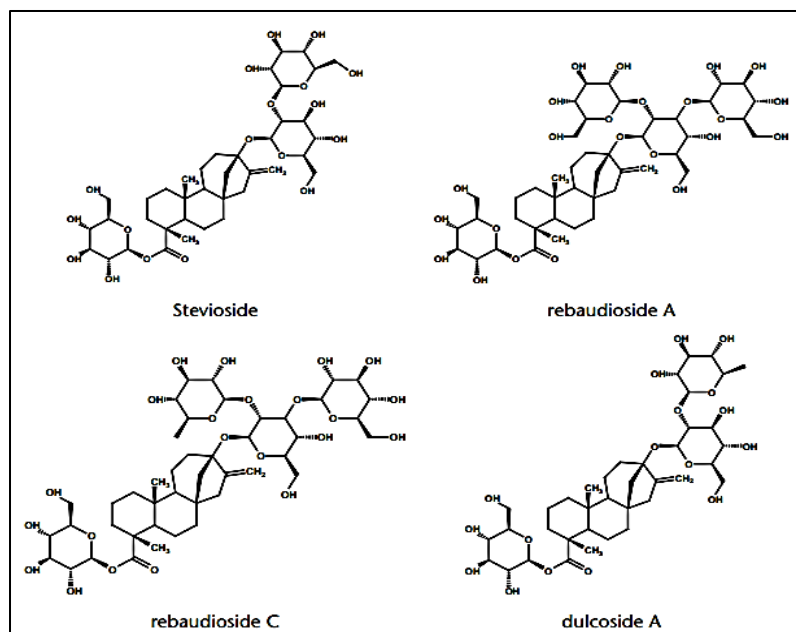
#### **2.6.5. Historia de la Stevia**

Las hojas de *Stevia* fueron utilizadas por los pueblos indígenas de Paraguay y Brasil desde antes de la historia registrada. En 1887, el botánico suizo Moisés Santiago Bertoni fue el primero que la documentó, detallando su sabor dulce. En 1900 el químico paraguayo Ovidio Rebaudi, logró aislar dos principios activos: uno dulce y otro amargo y más tarde, en 1931, químicos franceses extrajeron el esteviósido, el principal componente dulce en forma de un compuesto cristalino blanco extremadamente dulce (59).

#### **2.6.6. Características químicas**

En 1931, dos químicos franceses (Bridel y Lavielle) aislaron los glicósidos, los cuales son los metabolitos secundarios responsables del sabor dulce de la *Stevia* (60).

Los glicósidos se encuentran principalmente en las hojas de la planta de *Stevia* y constituyen el 15% del contenido, este valor depende de la variedad (37). Las hojas contienen alrededor de diez glicósidos diterpenoides, los cuales son: esteviósido, rebaudiósido (A, B, C, D, E, F), isoesteviol, esteviolbiósido y dulcósido A (61), además de estos compuestos, se reportó que el extracto de *Stevia* contiene flavonoides, esterebinas de A-H, triterpenos, aceites volátiles, pigmentos, pegamentos y componentes inorgánicos (62).



**Figura 2.17.** Estructura química del esteviósido y los principales componentes encontrados en la hoja de *Stevia*.

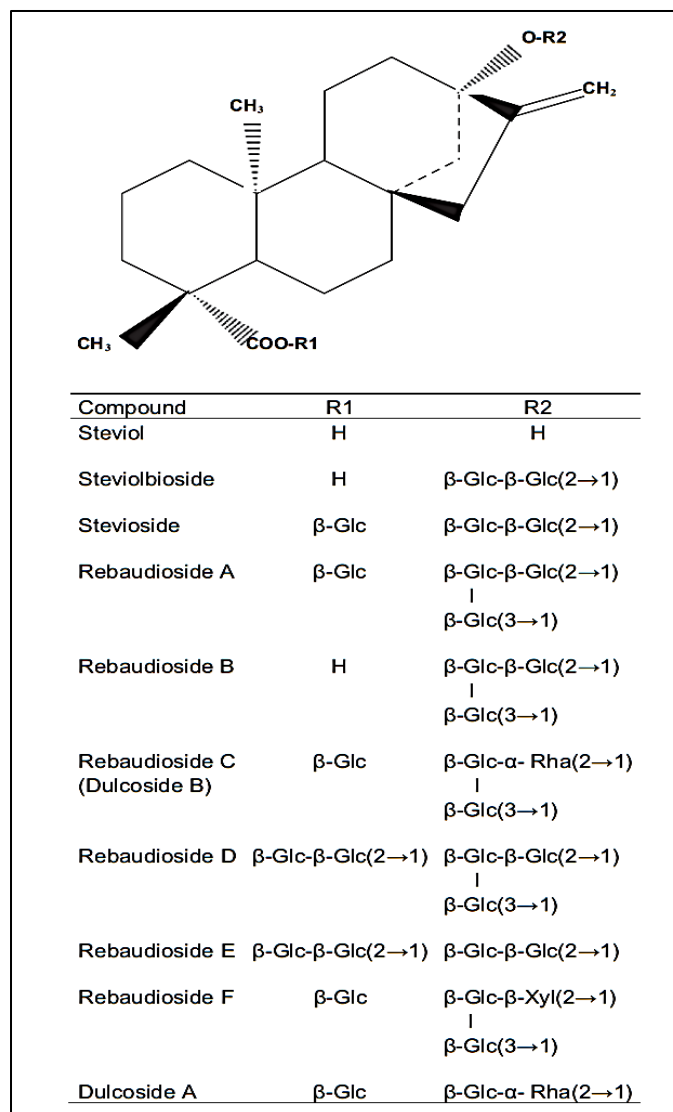
**Fuente:** Borstel, 2009



Todos los glicósidos de diterpeno aislados de las hojas *S. rebaudiana* tienen el mismo esqueleto de esteviol (Figura 2.18) y difieren principalmente en el contenido de residuos de hidratos de carbono (R1 y R2), mono-, di-, y trisacáridos que contienen glucosa y/o ramnosa en las posiciones C13 y C19. La dulzura de los rebaudiósidos incrementa con el aumento de cantidad de unidades de glucosa. Sin embargo, su contenido en la planta disminuye al mismo tiempo (55). (Ver Tabla 2.2)

El dulzor comparado con el azúcar de cada glicósido es: rebaudiósido A (250-450 veces); rebaudiósido B (300-350 veces); rebaudiósido C (50 a 120 veces); rebaudiósido D (250-450 veces); rebaudiósido E (150-300 veces); dulcósido A (50-120 veces); y esteviolbíosido (100-125 veces) (50).

El esteviósido es el más abundante en la hoja de Stevia, es 300 veces más dulce que el azúcar (63) y presenta un ligero resabio amargo en altas concentraciones (46). El rebaudiósido A es el glicósido de esteviol de mejor sabor y es menos amargo (64), la diferencia radica en la presencia de una glucosa (65).



**Figura 2.18.** Estructura de los principales glicósidos de las hojas de *Stevia rebaudiana*. Glc, Xyl and Rha, representan respectivamente, glucosa, xilosa y ramnosa. En rebaudiósido A, B, C, D, E y F en el grupo R2 un resto de azúcar adicional es añadida al carbono 3 de la primera  $\beta$ -Glc.

**Fuente:** Geuns, 2003

### 2.6.7. Constituyentes activos de *Stevia rebaudiana* Bertoni

El esteviósido tiene un peso molecular de 804,80 y fórmula química:  $C_{38}H_{60}O_{18}$ , es un glicósido comprendido por tres moléculas de glucosa unidas a una aglicona, el esqueleto de esteviol. El esteviol es el esqueleto común de la *Stevia*, glicósidos que han sido analizados por cromatografía líquida acoplada con UV, MS y detección ELS (55).

Otros minerales, proteínas, grasas, carbohidratos y contenido de cenizas han sido también estimados como muestra la Tabla 2.2, además se pueden observar los resultados de parámetros similares de un estudio realizado en Quito por Razo.

Las hojas de *Stevia* contienen varios nutrientes naturales que son importantes en el área médica, incluyendo la vitamina B3 (Niacina) y minerales como el cromo, magnesio, manganeso, potasio, selenio y zinc, los cuales son beneficiosos para la salud humana. Mediante un estudio fitoquímico se encontró que los taninos están presentes en más altas concentraciones seguido de alcaloides, glicósidos, saponinas, esteroides, triterpenos, antraquinonas y otros (66).

**Tabla 2.2.** Porcentaje en peso de los principales glicósidos y otros constituyentes bioquímicos de *Stevia*

Componente	Valor (mg/ 100g de hoja seca)	Valor (mg/ 100g de hoja seca)
	Según Yadav	Según Razo
Esteviósido	4-14%	-
Rebaudiósido A	2-4%	-
Rebaudiósido C	1-2%	-
Dulcósido A	0.4%-0.7%	-
Rebaudiósido B, D, E, F; Esteviolbiósido	>0.4%	-
Carbohidratos	35.2	56,33
Proteínas	12.0-20.42	12,09
Lípidos	2.7-4.34	1,81
Cenizas	13.12	6,11

**Fuente:** Yadav, 2012 y Razo, 2011

### **2.6.8. Estabilidad**

Se reporta que el esteviósido es muy estable hasta 120 °C. En soluciones acuosas, el esteviósido es estable en un rango de pH 2-10 bajo tratamientos con temperatura hasta 80°C, en condiciones acidas (pH 1) hubo una significativa disminución en la concentración de esteviósido (68). La descomposición total del esteviósido se observó después de la incubación a una temperatura de 80°C durante 2 horas (55).

### **2.6.9. Absorción**

La absorción y los estudios del metabolismo revelaron que la absorbancia de glicósidos de esteviol es extremadamente baja. Las enzimas del tracto digestivo no son capaces de degradar glicósidos de esteviol en esteviol, tampoco lo es el jugo gástrico (62).

## **2.7. Beneficios de la *Stevia***

La *Stevia* contiene una cantidad sustancial de nutrientes importantes y está cargada de minerales necesarios para proteger el cuerpo y para regular, y mantener varios procesos metabólicos (69). Los minerales que son beneficiosos para la salud humana como el potasio, calcio, magnesio, Zinc y hierro están en abundancia en las hojas de *Stevia* (70). El Zinc

puede actuar como un antioxidante no enzimático y prevenir el daño oxidativo en las células. La principal función del hierro es la de transportar oxígeno a diferentes órganos del cuerpo y la falta de este mineral conduce **a la anemia**. En las hojas de *Stevia* se evidencia una alta cantidad de hierro, el cual es útil para mantener el nivel de hemoglobina normal en el cuerpo (70) además se determinó que el contenido de ácido fólico, vitamina C y la vitamina B-2 en los extractos de hojas fueron significativamente altos (68).

Los glicósidos de esteviol poseen valiosas propiedades biológicas, el consumo regular de estos compuestos disminuye el contenido de azúcar y el colesterol en la sangre (71), mejora la regeneración celular y la coagulación de la sangre, suprime el crecimiento neoplásico y fortalece los vasos sanguíneos (72).

La *Stevia* es un potente diurético, lo que hace que pueda ser utilizada en pacientes con hipertensión arterial (41), no aporta calorías al ser metabolizado, es antiácido, cardiotónico, no produce caries al no ser fermentado por las bacterias orales, y se distingue de los edulcorantes artificiales por no tener sabor metálico y no ser cancerígeno (73).

Además, la *Stevia* y el esteviósido se han utilizado en el tratamiento de cáncer (74).

La seguridad y las bondades de los edulcorantes de *Stevia* en el metabolismo animal se han demostrado (62), así como sus efectos positivos en la salud del hombre, en las que se reportan propiedades anti-rotavirus (22), mejoramiento de la hipertensión (75), tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, al estimular la secreción de insulina actuando sobre las células b del páncreas (74).

## **2.8. Efecto anti-hipoglucémico**

Algunos síndromes metabólicos como la diabetes, la cual es causada debido a las anormalidades de la insulina, disfunción de las células pancreáticas y un exceso de glucosa, son los problemas de salud más destacados en el mundo. Los extractos de *Stevia* han sido usados para el tratamiento de la diabetes en América del Sur. Un estudio documentado por Susuki y col. (1977) confirmó el efecto hiperglucémico del esteviósido cuando 0.5 g de un % de esteviósido y 10 g % de un fino producto de las hojas de *Stevia* en igualdad de dietas alta en carbohidratos y alta en grasas, mostraron una reducción significativa del

nivel de azúcar en sangre a las 4 subsiguientes semanas del tratamiento en ratas (59).

## **2.9. Esteviósido y carcinogenicidad**

Los estudios de genotoxicidad mostraron que los glicósidos de esteviol no indujeron mutaciones de genes de las bacterias. Los glicósidos de esteviol no indujeron mutaciones en genes de células mamíferas in vitro (76).

Debido al resultado positivo de las dos pruebas de genotoxicidad a concentraciones relativamente altas, el esteviol libre también fue testado en diferentes modelos de animales. No hubo señales de defectos nocivos. Por ello, la conclusión general es que el uso de glicósidos de esteviol como edulcorante es seguro. En los modelos de animales se demostró que grandes dosis de glicósidos de esteviol inhiben la formación de tumores (76); y que en los estudios de toxicidad crónica y carcinogenicidad con glicósidos de esteviol y esteviol libre, usando diferentes modelos de animales, no se detectaron efectos nocivos (76).



Estudios toxicológicos han demostrado que los metabolitos secundarios presentes en la *Stevia* no tienen efectos teratogénicos, mutagénicos o carcinogénicos y no se observaron reacciones alérgicas después de consumir el edulcorante (70).

### 2.10. Extracción

La extracción es una operación de separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, utilizando uno o varios disolventes, donde siempre se obtienen por lo menos dos componentes<sup>2</sup>:

- La solución extraída en su disolvente y
- Su residuo

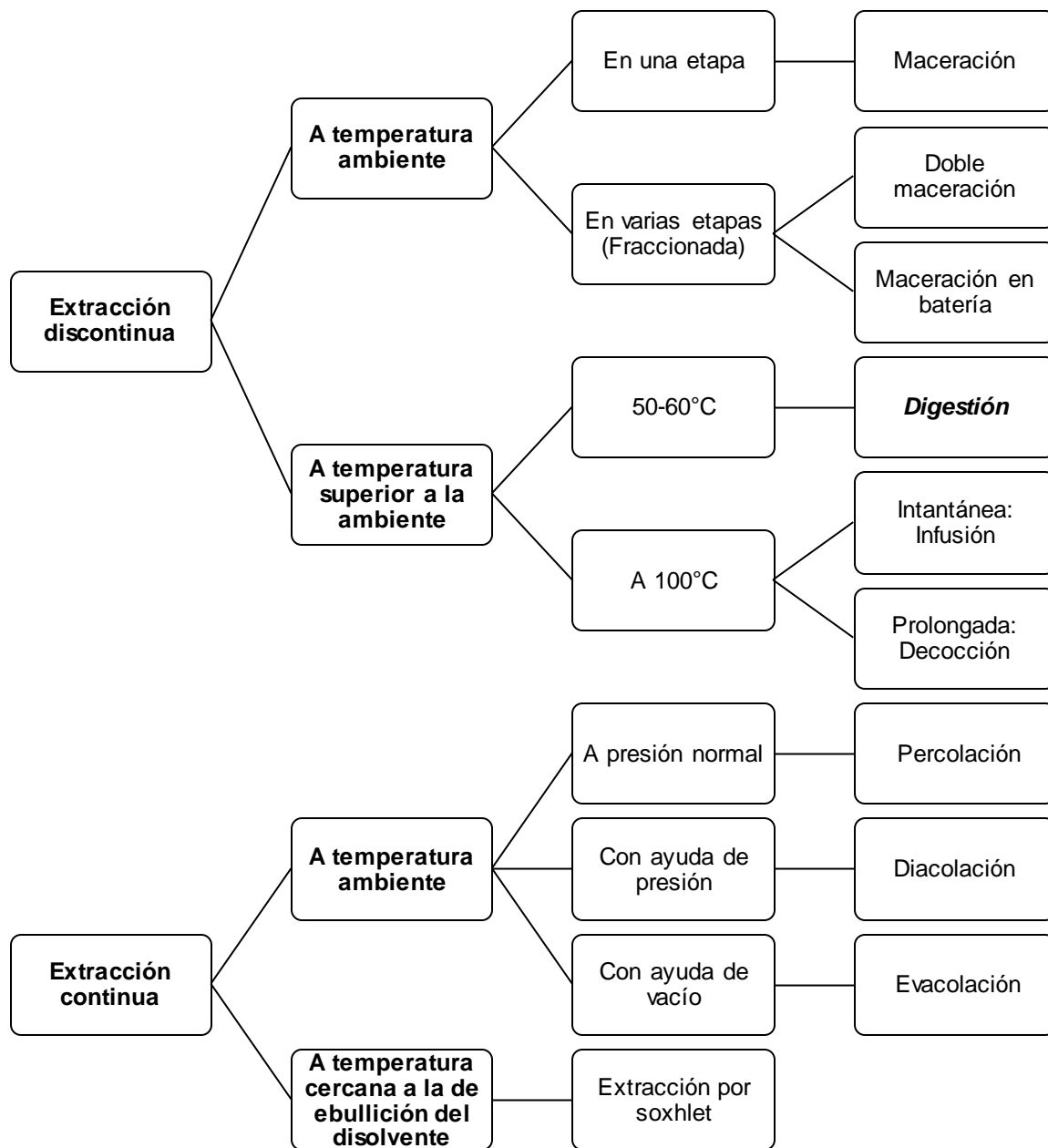
### 2.11. Técnicas de extracción

Existen diferentes técnicas de extracción para la separación de principios activos de un material vegetal descritas en las figura 2.19.

Para el presente proyecto se empleó la *técnica de extracción por digestión*.

---

<sup>2</sup> Disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tecnofarma/wp-content/uploads/2013/02/Extracci%C3%B3n.pdf>



**Figura 2.19.** Técnicas de extracción

Elaborado por: Autores, 2015

### **2.11.1. Digestión**

La digestión es un procedimiento similar a la maceración, pero efectuado con ayuda del calor, a temperaturas de 50 a 60 °C (77), se emplea para aquellos principios activos que son poco solubles en frío y cuando el solvente a ebullición disuelve o altera otras sustancias no deseadas en la extracción, además esta temperatura previene el ataque microbiano<sup>3</sup>.

#### **2.11.1.1. Extracción con solventes acuosos**

Los glicósidos diterpenoides presentan alta solubilidad en agua, es por esto que se la utiliza para la obtención de los principios activos de la hoja, esto permite que cumpla con las especificaciones requeridas para su comercialización (78).

### **2.12. Técnicas de separación**

#### **2.12.1. Filtración**

Filtración es la separación de partículas sólidas a partir de un fluido haciendo pasar el mismo a través de un medio filtrante sobre el que se depositan los sólidos. Las filtraciones industriales van

---

<sup>3</sup> Disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tecnofarma/wp-content/uploads/2013/02/Extracci%C3%B3n.pdf>

desde un sencillo colado hasta separaciones altamente complejas (79).

El extracto obtenido pasa por un proceso de filtración donde se retienen las partículas en suspensión (78).

#### **2.12.1.1. Filtración simple**

La filtración simple por gravedad se realiza utilizando un embudo cónico en el cual se introduce un papel filtro preparado con pliegues, de modo que al pasar el líquido de la disolución a través de él, quedará retenida en el papel la parte sólida, pasando limpia la parte líquida<sup>4</sup>.

#### **2.12.1.2. Filtración al vacío**

Es el método más rápido y permite la filtración de aquellas suspensiones en las que la fuerza de gravedad no es suficiente para el proceso. En los filtros de vacío el líquido es succionado por medio de un sistema de vacío a través de un medio filtrante sobre el que se deposita el fluido con las partículas sólidas (79).

---

<sup>4</sup> Disponible en: <http://quimica.laguia2000.com/general/filtracion>

### **2.12.1.3. Micro-filtración**

Es una tecnología confiable y eficiente para la remoción de sólidos. Las membranas usadas para la microfiltración tienen un tamaño de poro de 0.1-10  $\mu\text{m}$ . Por tener una porosidad tan pequeña, estos filtros tienen la ventaja de retener bacterias<sup>5</sup>.

### **2.12.1.4. Precipitación**

La precipitación es una técnica de separación en el que se forman rápidamente cristales pequeños o amorfos por adición de un reactivo que da lugar a un compuesto poco soluble. Por sus características intrínsecas los precipitados pueden ser de tres tipos: cristalinos, coagulados y gelatinosos. Los precipitados coagulados están formados por partículas coloidales que se aglomeran formando agregados de mayor tamaño ya filtrables (80).

### **2.12.1.5. Precipitación con sales**

Algunas sustancias que se añaden a una solución, hacen que los compuestos deseados precipiten. En un tanque sedimentador se separan los componentes endulzantes del resto de la mezcla. El uso de sustancias como la cal, carbonato de calcio u otras sales básicas

---

<sup>5</sup> Disponible en: <http://aquara.com.pe/productos/microfiltracion>

de calcio provocan la precipitación de los algunos pigmentos y componentes no endulzantes en el fondo del tanque (78).

### **2.12.2. Floculación**

Las soluciones constan de partículas con cargas eléctricas, positivas o negativas, y debido a la repulsión de cargas iguales, las partículas tienden a dispersarse. Si se añade un electrolito, los iones que se forman en la disolución neutralizan las cargas de las partículas, que pueden entonces aglomerarse y formar flóculos de mayor tamaño (79).

### **2.12.3. Sedimentación por gravedad**

Las partículas más pesadas que el fluido en el que están suspendidas pueden separarse de un líquido en un gran tanque de sedimentación, donde la velocidad del fluido es baja y las partículas tienen tiempo suficiente para sedimentar (79).

#### **2.12.4. Centrifugación**

En las separaciones por centrifugación, las partículas se separan del fluido a causa de las fuerzas centrífugas que actúan sobre las partículas de tamaños y densidades diferentes (81).

#### **2.12.5. Cristalización**

La cristalización es una operación de separación y se utiliza para obtener materiales en forma de cristales uniformes y atractivos de buena pureza. La formación de cristales consiste en la separación de un soluto de una disolución o de una fase fundida (79).

### **2.13. Métodos de identificación y cuantificación**

#### **2.13.1. Cromatografía**

La cromatografía puede definirse como una técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida (80).

### **2.13.2. Técnicas cromatográficas**

Según la forma de llevar a cabo la separación cromatográfica, es decir, según el dispositivo utilizado para conseguir el contacto entre la fase móvil y la estacionaria, cabe distinguir dos grandes tipos de técnicas de cromatográficas (80):

- a) **Cromatografía en columna**
- b) **Cromatografía plana**

#### **2.13.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC**

La cromatografía líquida en columna es una variedad de la cromatografía en la que la fase móvil es líquida y pasa a través de la fase estacionaria, sólida o líquida retenida en un relleno cilíndrico. La moderna cromatografía en columna se desarrolla en los denominados cromatógrafos de líquidos que proporcionan información sobre la composición de la materia al tener un detector continuo integrado (80).

### **2.13.3. Técnicas espectroscópicas**

Las principales técnicas espectroscópicas que se utilizan son la espectroscopía de absorción molecular para la determinación de sustratos y enzimas, la espectroscopía atómica para la medida de



la concentración de metales, la espectroscopía de fluorescencia y la espectroscopía de luminiscencia para la medida de diversos compuestos químicos y actividades enzimáticas, y la espectroscopía de dispersión para determinar fundamentalmente proteínas específicas<sup>6</sup>.

#### **2.13.3.1. Espectroscopía UV-Visible**

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-Visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica). En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones ultravioleta (UV cercano, de 195-400nm) y el visible (400-780 nm) (82).

---

<sup>6</sup> Disponible en: <http://tecnicospecialistalaboratorio.blogspot.com/2013/08/tecnicas-espectroscopicas.html>

#### 2.14. Diseño de experimentos y optimización

El diseño de experimentos (DOE) es una técnica estadística cuyo objetivo es averiguar si los determinados factores, que son las variables independientes; influyen en nuestra variable de interés, aquella que se desea mejorar mediante el diseño experimental<sup>7</sup>.

Los diseños factoriales son fundamentales ya que permiten mejorar un proceso. Existen varios casos del diseño factorial, uno de los más importantes es el diseño factorial completo  $2^k$  en los que se trabaja con  $k$  factores, y a cada uno de ellos se les asigna dos niveles, estos suelen denotarse como nivel alto (+) y nivel bajo (-). Cuando se han identificado los diferentes factores e interacciones que afectan a los resultados de un experimento, se requieren métodos separados para determinar la combinación de los niveles del factor que proporcionarán la respuesta óptima. La distancia entre los pares de medidas de estos niveles se determinan con el método del Cociente de Oro o Razón aurea.

El proceso de búsqueda de estos niveles óptimos del factor se conoce como **optimización**, por este motivo se determinan primero los factores y las interacciones que afectan de manera importante a la respuesta (83).

---

<sup>7</sup> Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/523/245>

## **CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA DEL PROYECTO**

### **3.1. Preparación de muestras de *Stevia rebaudiana***

#### **3.1.1. Colección, secado y almacenado**

Las muestras de *Stevia rebaudiana* Bertoni fueron colectadas de los campos productores de Stevia ubicados en la provincia de Santa Elena.

Un ejemplar de *Stevia rebaudiana* fue enviada al herbario QCA de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Escuela de Ciencias Biológicas, para su identificación taxonómica, codificado como CIBE038.

Las hojas de *Stevia rebaudiana* fueron seleccionadas como material vegetal removiendo las partes sin interés como ramas, raíces, hojas de color café y amarillas.

### **3.1.2. Deshidratación**

Las muestras de *Stevia* fueron deshidratadas por exposición directa a la luz solar en un rango de temperatura de 20 a 35°C por 48 horas. Las muestras deshidratadas fueron almacenadas en un tambor de papel Kraft de alta resistencia con tapa de cartón y aro con palanca de cierre hermético, para evitar que las muestras deshidratadas adquieran nuevamente humedad.

### **3.2. Molienda**

El molinado del material deshidratado se realizó en un molino eléctrico de tornillo por fricción de piedras. El material triturado se almacenó en un recipiente hermético de papel Kraft para evitar que la muestra adquiera humedad del ambiente.

### 3.3. Tamizado

La reducción del tamaño de partícula se estableció en 500 y 250  $\mu\text{m}$  empleando tamices mecánicos Fisher Scientific Company provenientes de U.S.A.

### 3.4. Selección de condiciones de operación

Para obtener las condiciones de operación se realizó un diseño factorial experimental en la herramienta estadística **Diseño de Experimentos** (DOE) utilizando el programa Minitab 2015.

Se empleó el diseño factorial completo  $2^k$  en los que se trabaja con  $k$  factores conocidos como variables independientes, para nuestro estudio nos centraremos en un experimento con 3 factores: A, B, C. Esto significa que hay  $2 \times 2 \times 2 = 8$  combinaciones posibles de niveles de factores. La temperatura, el tamaño de partícula y la relación hoja/solvente fueron los parámetros o *factores cuantitativos* seleccionados para el presente estudio.

Una vez identificados los diferentes factores que afectan los resultados de nuestro experimento, se utilizó el método del Cociente de Oro o Razón

aurea con la finalidad de obtener los niveles “altos” y “bajos” de cada factor. Los factores escogidos con sus respectivos niveles se muestran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Matriz de niveles máximos (+) y mínimos (-) de las variables del diseño experimental

Factores	Convención	Nivel (-)	Nivel (+)
Temperatura (°C)	A	50	60
Tamaño de partícula (µm)	B	250	500
Relación hoja/solvente (Kg/L)	C	1/10	1/13

**Elaborado por:** Autores, 2014

Para conocer el efecto de un factor sobre la variable respuesta es suficiente hacerlo variar sobre dos niveles, y además esta variación se debe realizar para cada posible combinación, esto revelará si el efecto depende de qué valor tomen los otros factores. Todas las combinaciones se aprecian en el diseño factorial completo  $2^3$  de la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Matriz de experimentos de un diseño factorial completo  $2^3$ 

Combinación	A	B	C	Respuesta
<b>1</b>	-	-	-	y1
<b>a</b>	+	-	-	y2
<b>b</b>	-	+	-	y3
<b>c</b>	-	-	+	y4
<b>bc</b>	-	+	+	y5
<b>ac</b>	+	-	+	y6
<b>ab</b>	+	+	-	y7
<b>abc</b>	+	+	+	y8

*Nota: Un signo (+) indica que el factor está en el nivel alto y un signo (-) que está en un nivel bajo.*

**Elaborado por:** Autores, 2014

### 3.5. Digestión

El proceso de digestión se llevó a cabo dentro de los laboratorios de Bioproductos del CIBE – ESPOL. La extracción se realizó en un digestor cuyas características se describen a continuación:

Equipo con agitación central, tapa combada y sistema de grapa, en acero inoxidable, que trabaja con un tamaño de 40 litros, y 30 litros de capacidad de proceso. Presión máxima 40 psi, visor, manómetro y termómetro, termostato con resistencia eléctrica inoxidable; eje agitador inoxidable con motor y base, válvula para el drenaje (84).

La digestión se realizó mediante procesos batch, por un tiempo de 1 hora y 30 minutos con agitación constante. El solvente utilizado para las extracciones fue agua, mientras que la temperatura de operación fue mantenida en un mínimo de 50°C y un máximo de 60°C debido a que la digestión es una extracción a temperaturas mayores a la ambiente comprendida entre 50 °C a 60°C. Al emplear el diseño factorial completo  $2^3$  se obtuvieron las 8 combinaciones posibles mostradas en la Tabla 3.3.



**Tabla 3.3.** Condiciones de trabajo del equipo digestor en el proceso de extracción de glicósidos diterpenoides

Extracción	Temperatura (°C)	Tamaño de partícula (µm)	Relación hoja/Solvente (Kg/L)
1	50	250	1:10
2	60	250	1:10
3	50	500	1:10
4	50	250	1:13
5	50	500	1:13
6	60	250	1:13
7	60	500	1:10
8	60	500	1:13

**Elaborado por:** Autores, 2014

### 3.6. Filtración

Todos los extractos acuosos obtenidos de los 8 procesos batch se filtraron simultánea en un filtro de tela (40 µm) y por un filtro compuesto de gasa y papel whatman N° 1.

Posterior a esto, todas las muestras fueron sometidas a un proceso de filtración más rigurosa, en dos fases:

- En la primera fase los extractos fueron pasados a través de filtros whatman N°1.
- En la segunda fase se efectuó una filtración con filtros de tamaños 0,45 y 0,22  $\mu\text{m}$ .

### **3.7. Procesos de clarificación**

Todos los extractos fueron clarificados por el método de potabilización de aguas usando sales y modificando el método descrito por Catalina Giraldo y col., 2005.

#### **3.7.1. Precipitación con sales**

Cantidades de 6 a 15 mg de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) se añadieron a muestras del extracto crudo para la evaluación de la dosis óptima en la remoción de pigmentos.

Las muestras de extractos crudos se llevaron a pH básico con la adición de hidróxido de calcio y mezcladas con 6 proporciones diferentes de una solución de sulfato de aluminio al 50%, durante 5 minutos. Finalmente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos en una microcentrífuga

JOUAN A14 y al sobrenadante se le realizó un monitoreo espectroscópico para la cuantificación colorimétrica (85).

Una vez ajustado el método de precipitación con sales en el laboratorio, se realizó el cálculo de las cantidades necesarias para tratar los extractos acuosos que se obtuvieron en el digestor, para el tratamiento de clarificación los extractos fueron llevados al laboratorio de microbiología del Departamento de Ciencias Químicas y ambientales de la ESPOL.

### **3.7.2. Clarificación con solvente**

Para clarificar los extractos obtenidos de las 8 experimentaciones a diferentes condiciones se adoptó el método de purificación con metanol descrito por Inamake M.R. y col., 2010, como se describe:

Para la remoción de trazas de grasa y aceite cada una de las muestras de los extractos acuosos fueron pre-tratados con 50ml de Hexano al 99.9% y dejados en maceración durante 24 h. La fase acuosa fue tratada con ácido tricarbólico para bajar el pH a 4 y posteriormente llevada a pH básico con la adición de hidróxido de calcio.

En la neutralización del extracto acuoso se utilizó ácido cítrico, para su posterior tratamiento de maceración con hexano. Una segunda maceración fue practicada con hexano como solvente durante 4 horas y la separación de fases se la llevó a cabo en un embudo de decantación. La fase acuosa se dejó en reposo por 1 hora en una Sorbona para volatilizar los residuos del solvente.

Metanol grado HPLC fue empleado para precipitar pigmentos y compuestos no deseados, y posterior purificación del compuesto por cristalización, se utilizó 50 ml de MetOH por cada 10 ml de extracto en cada limpieza hasta obtener soluciones sin precipitado.

Finalmente, se centrifugó las muestras tratadas en una centrifuga Thermo Scientific Multifuge X1R a 5000 rpm durante 20 minutos a 20°C. El sobrenadante se sometió a un monitoreo espectroscópico para la valoración colorimétrica.

### **3.8. Valoración colorimétrica**

La valoración colorimétrica fue realizada mediante un monitoreo espectroscópico progresivo del extracto de Stevia en un

espectrofotómetro BIOTEK Synergy HT. El estándar de esteviósido (EE), las muestras del extracto crudo (EC), del extracto purificado (EP) y las muestras de ensayo con las que se evaluó la cantidad óptima de sulfato de aluminio mediante el proceso de clarificación por precipitación con sales (PS), se colocaron en una placa de 96 pocillos como se muestra en la Tabla 3.4. y se midió la absorbancia a longitudes de onda de: 400, 421, 442, 450, 500, 550, 600 y 645 nm

**Tabla 3.4.** Ubicación de las muestras EE, EC, EP, PS en los pocillos

	1	2	3	4
A	Blanco	M4 (EP)	M8 (EC)	7 (PS)
B	M1 (EC)	M5 (EC)	M8 (EP)	8 (PS)
C	M1 (EP)	M5 (EP)	1 (PS)	8000 PPM (EE)
D	M2 (EC)	M6 (EC)	2 (PS)	
E	M2 (EP)	M6 (EP)	3 (PS)	
F	M3 (EC)	M7 (EC)	4 (PS)	
G	M3 (EP)	-	5 (PS)	
H	M4 (EC)	M7(EP)	6(PS)	

**Elaborado por:** Autores, 2015.

### **3.9. Estándar esteviósido y rebaudiósido A**

El estándar de rebaudiósido A utilizado fue el de la casa comercial Wako Pure Chemical.

El estándar de esteviósido fue aislado de las hojas de *Stevia rebaudiana* e identificado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según la metodología descrita por Inamake, 2010. Los reactivos utilizados fueron de la marca Merck.

### **3.10. Proceso de extracción y aislamiento de Esteviósido**

Una muestra de *Stevia rebaudiana* Bertoni pulverizada fue utilizada para la extracción del esteviósido, el mismo que luego se utilizó como nuestro estándar.

Una cantidad de 50 gramos de *Stevia* pulverizada fue sometida a un tratamiento progresivo para la remoción de grasas y aceites, utilizando solventes no polares en función de la serie eulotrópica, tomando de referencia la Serie de Snyder (Protocolo CIBE).

La primera etapa del tratamiento de desengrase se realizó por maceración con 50 ml de hexano durante 24 horas, en la segunda etapa se utilizó 50 ml de cloroformo con un tiempo de maceración de 2 horas.

El material libre de grasas y aceites fue filtrado y secado en una estufa a una temperatura de 55°C durante 1 hora. El polvo pre-tratado y seco se sometió a extracción por reflujo con 100 ml de agua durante 20 minutos, luego fue filtrado y enfriado a temperatura ambiente, luego se le realizó una variación de pH llevándolo a pH 4 y luego a pH 8 con adición de ácido tricarbóxico e hidróxido de calcio respectivamente, para luego ser neutralizado con ácido cítrico.

El extracto acuoso neutralizado fue tratado nuevamente con el solvente no polar de mayor serie eulotrópica (hexano) por 2 horas en maceración, para la separación de las fases orgánica y acuosa se utilizó un embudo de decantación de 500ml.

La fase acuosa se llevó a reflujo con carbón activado por un tiempo de 20 minutos para luego ser filtrado al vacío con filtros millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Finalmente, metanol fue utilizado para precipitar pigmentos y compuestos no deseados, el esteviósido presente en el extracto fue concentrado en un roto-evaporador y cristalizado a una temperatura de 50°C.

### **3.10.1. Determinación y cuantificación de glicósidos diterpenoides mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

El análisis de HPLC fue llevado a cabo usando una columna Jupiter 5u C18 300A (25 cm x 4.6 mm D.I., 5 µm), Serie No 452124-1. La temperatura de la columna se mantuvo en 28 °C y la detección UV/VIS fue ajustada en 200 y 210 nm respectivamente. La fase móvil fue acetonitrilo/agua, ambos grado HPLC en una relación 80:20 ajustado el pH a 3 con ácido fosfórico al 85% grado reactivo.

Los estándares de glicósidos (esteviósido y rebaudiósido A) y las muestras empleadas fueron filtradas a través filtros millipore de 0,22 µm. El volumen de inyección fue establecido en 10 µL a una velocidad de flujo 1ml/min, mediante elución con gradiente lineal.



Los estándares de esteviósido (aislado y purificado) y rebaudiósido A CAS #: 58543-16-1, fueron preparados de una solución madre de 9000ppm para el esteviósido y de 5000 ppm para el rebaudiósido A, diluidas hasta 4000ppm y 500 ppm respectivamente.

La columna del HPLC fue estabilizada, por bombeo de la fase móvil acetonitrilo/agua. Los cromatogramas de identificación de los estándares de glicósidos fueron establecidos en un tiempo de 25 minutos, se tomó de referencia el método descrito por Afandi A. y col., 2013. Los cromatogramas de cuantificación tanto de estándares como de las muestras se establecieron en un tiempo de 10.5 minutos, según protocolo CIBE. Los cromatogramas de cada muestra fueron comparados con los estándares en su tiempo de retención para encontrar los glicósidos presentes. El área de los picos obtenidos fue calculada automáticamente mediante el software instalado en el HPLC.

### **3.11. Análisis estadístico del diseño factorial- experimental**

Para el análisis de los resultados obtenidos del diseño factorial experimental se utilizó el programa Minitab 2015, en la evaluación de los efectos de los factores individuales (Temperatura, tamaño de partícula y relación hoja/solvente), la interacción entre dos y tres factores.

#### **3.11.1. Análisis de parámetros óptimos**

Para la selección de la combinación de los niveles que proporcionaron las respuestas óptimas se tuvo en cuenta tres cualidades, según Miller J., 2002:

1. El método de optimización produjo un conjunto de condiciones experimentales que proporcionaron la respuesta máxima.
2. El método de optimización produjo al menos una respuesta que sea próxima al óptimo.
3. La optimización se realizó con el número más pequeño posible de etapas experimentales de ensayo.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El propósito del presente trabajo consistió en determinar las condiciones óptimas en el proceso de extracción de glicósidos diterpenoides a partir de *Stevia rebaudiana*, con fines de establecer un procedimiento de extracción libre de solventes orgánicos y aplicable a escala industrial.

Para las extracciones de los principios edulcorantes de la *Stevia* se utilizó un digestor de acero inoxidable con un tamaño de 40 litros, en el cual fueron controlados los dos niveles de cada variable a evaluar. Las variables seleccionadas con sus respectivos niveles fueron Temperatura: 50 y 60°C, Tamaño de partícula: 250 y 500µm, Relación hoja/solvente: 1/10 y 1/13 Kg/L.

En este capítulo se detallan, mediante gráficos y figuras los resultados obtenidos en el tratamiento de las hojas de *Stevia* y las extracciones de sus principios edulcorantes, con el fin de optimizar el proceso mediante análisis estadístico.

#### **4.1. Deshidratación de hojas de *Stevia***

Se removió un 8.78% de la humedad contenida en las hojas de *Stevia rebaudiana* mediante exposición directa a la luz solar durante 24 H, con la finalidad de facilitar el proceso de molienda.

#### **4.2. Obtención de polvo de hojas de *Stevia***

##### **4.2.1. Proceso de tamizaje**

Para el proceso de tamizaje se obtuvieron 8Kg de polvo de *Stevia*, de los cuales 4kg fueron de un tamaño de partícula de 250 $\mu$ m y 4kg de 500 $\mu$ m, se redujo el tamaño de partícula con la finalidad de favorecer la extracción mediante un mayor contacto entre el material vegetal y el solvente en el proceso de digestión.

### 4.3. Digestión

Se tomó 50 ml de cada una de las 8 extracciones realizadas en el digestor y se las utilizó como muestra patrón para ser clarificados a escala laboratorio y analizadas por cromatografía líquida de alta resolución.



**Figura 4.1.** Muestras de las 8 extracciones obtenidas en el digestor

**Elaborado por:** Autores, 2015

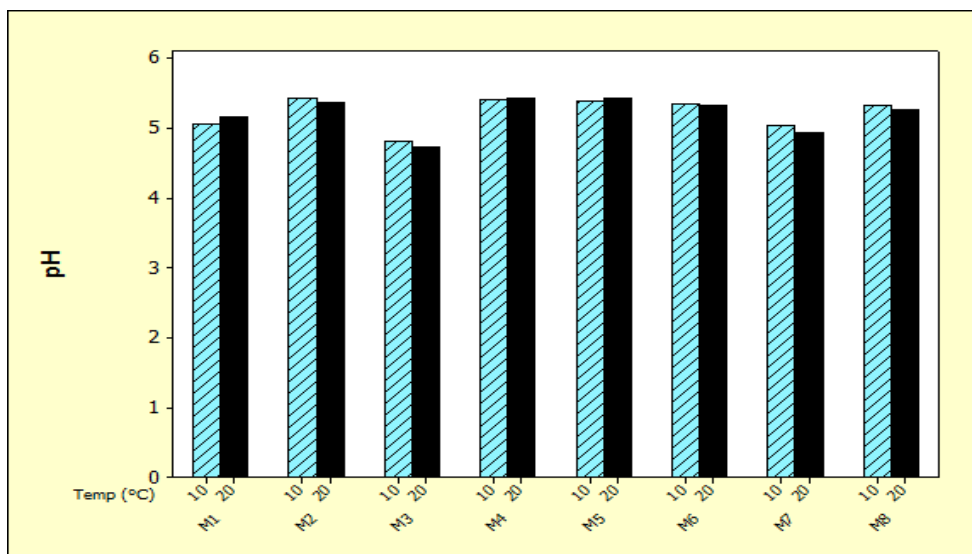
En la Tabla 4.1 se presentan los parámetros evaluados en los extractos obtenidos en el digestor con sus respectivos códigos.

**Tabla 4.1.** Parámetros evaluados en las muestras de extracto crudo

Muestra	pH (10°C)	pH (20°C)	°BRIX (10°C)	°BRIX (20°C)
<b>M1</b>	5,07	5,17	4,8	4,9
<b>M2</b>	5,44	5,36	5	5
<b>M3</b>	4,82	4,73	5	4,95
<b>M4</b>	5,4	5,43	4,6	4,2
<b>M5</b>	5,39	5,42	4	3,5
<b>M6</b>	5,34	5,33	3,8	3,95
<b>M7</b>	5,03	4,93	4	4,05
<b>M8</b>	5,33	5,27	4,2	4,1

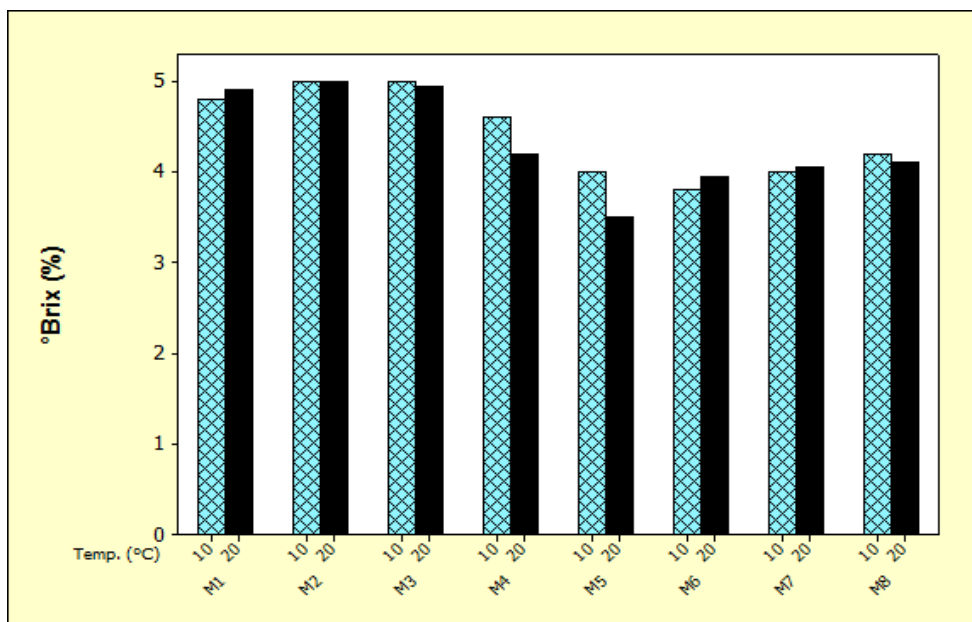
**Elaborado por:** Autores, 2015

En las Figuras 4.3 y 4.4, se muestran los resultados de comparación de los grados Brix y los pH medidos a 10 y 20 °C, evidenciando que no existe un cambio de estos parámetros en función de la temperatura.



**Figura 4.2.** Variación de pH en función de temperatura

Elaborado por: Autores, 2015



**Figura 4.3.** Variación de grados Brix en función de temperatura

Elaborado por: Autores, 2015

#### 4.4. Proceso de clarificación

##### 4.4.1. Precipitación con sales

En la Tabla 4.2 se presentan las cantidades de cloruro de calcio utilizadas en la determinación cualitativa de clarificación, en la cual se determinó que el mejor tratamiento para su clarificación fue la mezcla contenida en 20 ml de extracto crudo con 15 mg de CaCl<sub>2</sub>.

**Tabla 4.2.** Cantidades de CaCl<sub>2</sub> evaluadas en la clarificación.

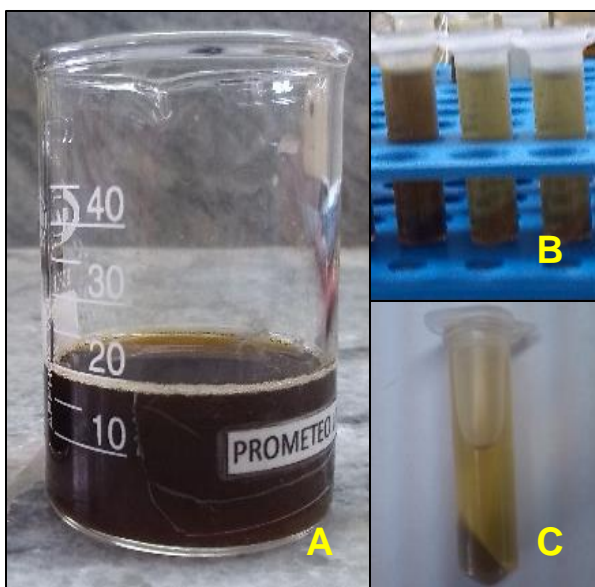
Volumen de extracto (ml)	Cloruro de calcio CaCl <sub>2</sub> (mg)
20	6
20	10
20	15

**Elaborado por:** Autores, 2015

Este resultado fue corroborado posteriormente mediante análisis espectroscópico. Esta evaluación cualitativa indicó que la dosis de mayor remoción de color fue de 0.75 mg CaCl<sub>2</sub>/ml extracto, lo cual fue 92,5% menor a la cantidad reportada por Giraldo y sus colaboradores, 2005, la cual fue de 10 mg CaCl<sub>2</sub>/ml extracto.



Además, se reporta que la cantidad de cloruro de calcio adicionada al extracto no afecta los grados Brix, pues este se mantuvo en 6.



**Figura 4.4.** Clarificación con  $\text{CaCl}_2$ . A) extracto crudo, B) evaluación de  $\text{CaCl}_2$  C) extracto clarificado.

**Elaborado por:** Autores, 2015

Luego de conocer la dosis de cloruro de calcio necesaria para la clarificación inicial del extracto crudo se procedió a basificar la muestra con hidróxido de calcio y evaluar de igual forma la cantidad adecuada de sulfato de aluminio necesaria para potenciar la clarificación.

En la Tabla 4.3 se muestra las cantidades de sulfato de aluminio agregadas en igual volumen de extracto acuoso para la determinación cualitativa y cuantitativa de clarificación, en la misma se pueden observar los valores de absorbancia medidos a 450nm obtenidos al finalizar el tratamiento.

**Tabla 4.3.** Cantidades de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  evaluadas en la clarificación del extracto

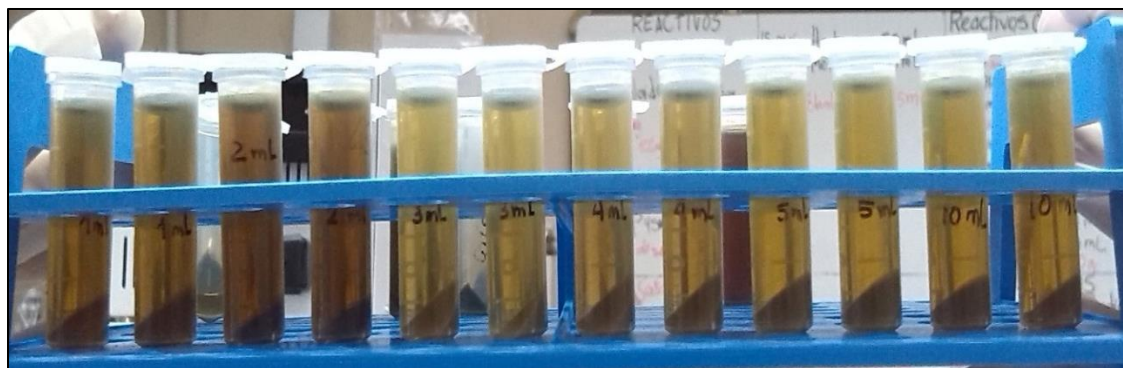
Extracto (ml)	Sulfato de aluminio $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ al 50% (ml)	Absorbancia a 450 nm
20	0,1	2,682
20	0,2	3,871
20	0,3	2,487
20	<b>0,4</b>	<b>0,560</b>
20	0,5	2,366
20	1	2,976

**Elaborado por:** Autores, 2015

La mejor clarificación y remoción de pigmentos se dio al agregar 0,4 ml de sulfato de aluminio al extracto, el cual reporta una disminución en el

valor de absorbancia de 3,529 (absorbancia inicial del extracto crudo) a 0,560.

La adición de hidróxido de calcio a los extractos acuosos ayudó a la remoción de color, pero afectó a la concentración de los glicósidos en el extracto (37). Las cantidades de 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1 ml de sulfato de aluminio  $Al_2(SO_4)_3$  agregadas al extracto no tuvieron una reducción notable en la intensidad de color con respecto al extracto tratado con 0.4 ml de  $Al_2(SO_4)_3$ . En la Figura 4.5 se observa la variación de la intensidad de color cuando se añadieron las cantidades de sulfato de aluminio al extracto.



**Figura 4.5.** Evaluación cualitativa del extracto clarificado con sales

**Elaborado por:** Autores, 2015

Con los resultados previos obtenidos del análisis espectroscópico se escogió el extracto al cual se le añadió 0.4ml de sulfato de aluminio por presentar la mejor remoción de pigmentos.

La Tabla 4.4 muestra los resultados de los diferentes extractos antes y después del tratamiento con sales en función del pH. Se puede evidenciar una disminución del pH a mayores cantidades de sulfato de aluminio.

**Tabla 4.4.** Variación de pH en función de sales utilizadas en la clarificación del extracto a diferentes cantidades de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

Muestra (ml)	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (ml)	Ph			
		Inicial E.C	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ estable	Final $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$
20	0,1	5,43	8,08	6,37	6,45
20	0,2	5,43	8,08	6,99	6,87
20	0,3	5,43	8,08	3,90	3,87
20	<b>0,4</b>	<b>5,43</b>	<b>8,08</b>	<b>4,19</b>	<b>4,93</b>
20	0,5	5,43	8,08	3,48	3,40
20	10	5,43	8,08	3,35	3,33

**Elaborado por:** Autores, 2015

La Tabla 4.5 muestra los resultados de los diferentes extractos antes y después del tratamiento con sales en función de los grados Brix, se puede observar la disminución de los grados Brix al realizar el tratamiento con las sales.

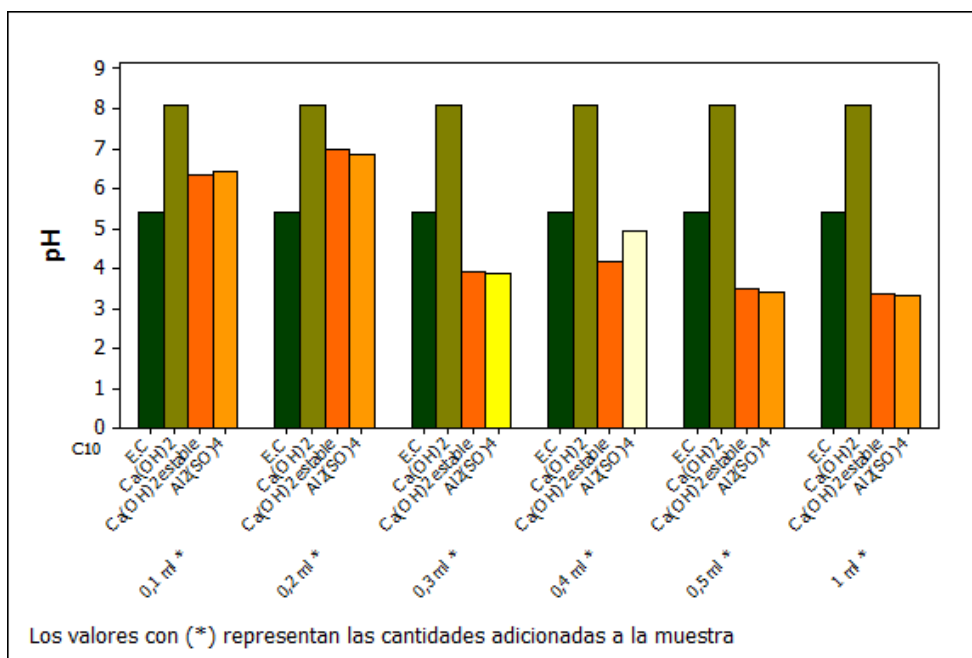
**Tabla 4.5.** Variación de grados Brix en función de sales utilizadas en la clarificación del extracto a diferentes cantidades de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

Muestra (ml)	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (ml)	° Brix			
		Inicial E.C	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ estable	Final $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$
20	0,1	6	5,2	5	4,1
20	0,2	6	5,2	5	4,8
20	0,3	6	5,2	4,8	4,2
20	<b>0,4</b>	<b>6</b>	<b>5,2</b>	<b>4,6</b>	<b>4,5</b>
20	0,5	6	5,2	5	5
20	10	6	5,2	6	5,5

**Elaborado por:** Autores, 2015

El resultado obtenido de la precipitación con sales de calcio y aluminio en función de pH y grados Brix se presentan mediante diagrama de barras en las Figuras 4.6 y 4.7, se observa la variación de pH al agregar las sales de cloruro

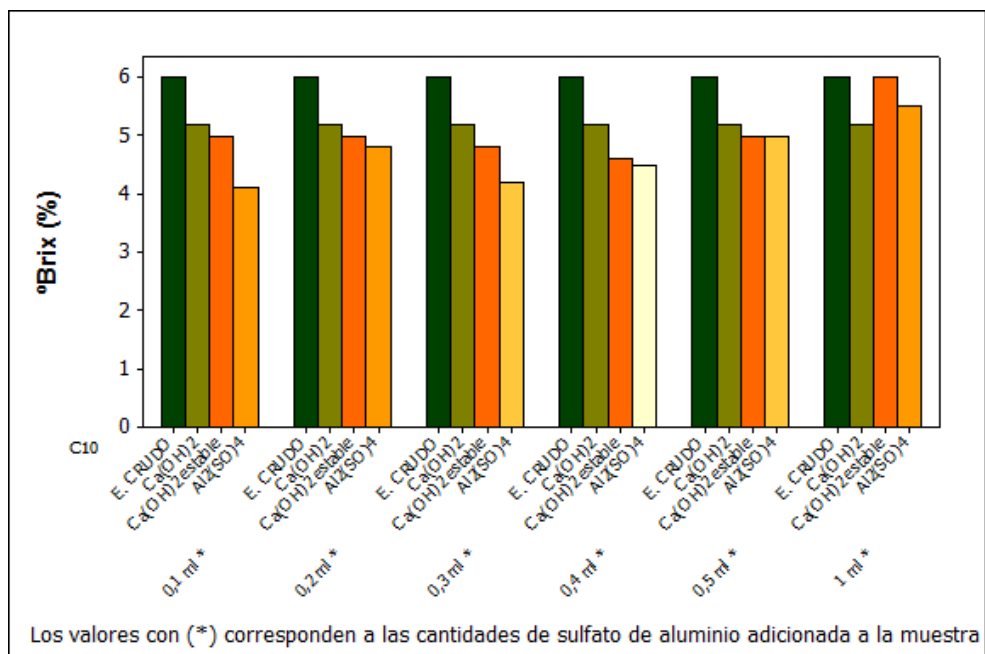
de calcio y sulfato de aluminio observó que la mejor remoción de color se da con la adición de cantidades de sulfato de aluminio de 0.3 y 0.4 ml.



**Figura 4.6.** Variación de pH en la precipitación con diferentes concentraciones de  $Al_2(SO_4)_3$ .

**Elaborado por:** Autores, 2015

El resultado del análisis cuantitativo ratifica estas cantidades con porcentajes de pérdida de glicósidos entre 2 y 13 %, siendo la dosis óptima 0,02 ml de  $Al_2(SO_4)_3$ /ml de extracto crudo con un 2,17% de reducción de glicósidos.



**Figura 4.7.** Variación de ° Brix de los extractos clarificados a diferentes concentraciones de  $Al_2(SO_4)_3$ .

**Elaborado por:** Autores, 2015

Las cantidades 0.75 mg  $CaCl_2$  y 0,02ml  $Al_2(SO_4)_3$  ambas por mililitro de extracto crudo fueron utilizadas para la clarificación del extracto total obtenidas de las 8 corridas en el digestor.

La Figura 4.8 muestra el proceso de precipitación con sales realizado al extracto acuoso de *Stevia rebaudiana*. Dosis de  $CaCl_2$  fueron añadidas al extracto acuoso previo tratamiento de coagulación/floculación. El  $Ca(OH)_2$  en

proporciones medidas fue agregado al extracto hasta llevarlo a pH 8 para su posterior tratamiento con sulfato de aluminio.

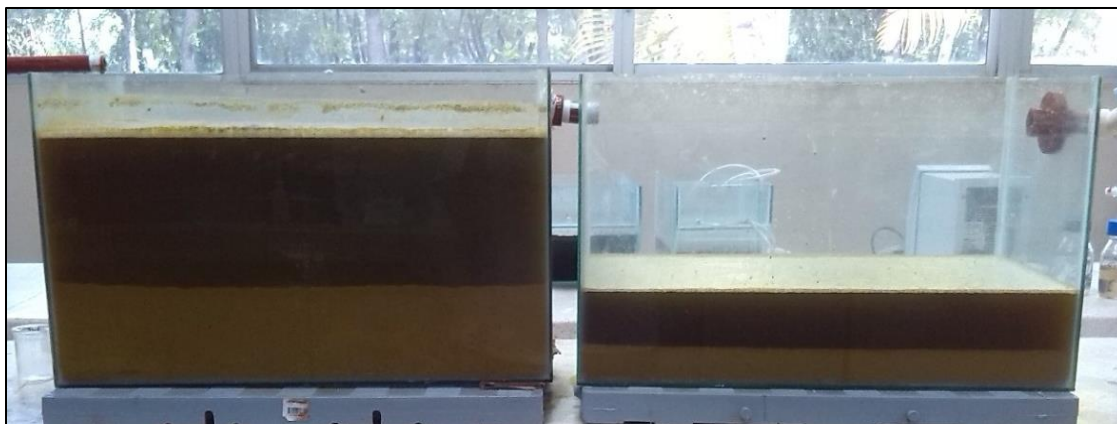


**Figura 4.8.** A) Preparación del extracto crudo, B) Adición de  $\text{CaCl}_2$ , C) Coagulación/floculación del extracto de *Stevia*

**Elaborado por:** Autores, 2015

Luego de 24 horas los sólidos en suspensión se encontraron en el fondo de los sedimentadores primario y secundario en forma de lodos como se observa en la Figura 4.9. El extracto fue separado y almacenado.





**Figura 4.9.** Precipitación y sedimentación de sólidos en suspensión del extracto crudo.

**Elaborado por:** Autores, 2015

#### **4.4.2. Clarificación con solventes**

Se adoptó como guía el método de “extracción e aislamiento de glicósidos en la planta de *Stevia*” descrito por Inamake y colaboradores, 2010, que consiste en utilizar metanol para la clarificación del extracto crudo.

Para la remoción de trazas de grasa y aceite las muestras de los extractos acuosos fueron pre-tratados con 50ml de hexano cada uno y dejados en maceración durante 24 h como se observa en Figura 4.10.



**Figura 4.10.** Tratamiento con hexano

**Elaborado por:** Autores, 2015

En la Figura 4.11, se observan las muestras clarificadas con solvente, las mismas fueron sometidas a un análisis espectroscópico.



**Figura 4.11.** Muestras clarificadas con solventes

**Elaborado por:** Autores, 2015

En la Figura 4.12 se puede observar una de las muestras clarificadas luego de la última limpieza con metanol y su posterior centrifugación. El metanol se recuperó por roto-evaporación.



**Figura 4.12.** A) Muestras centrifugadas, B) muestras clarificadas.

**Elaborado por:** Autores, 2015.

#### **4.5. Valoración colorimétrica**

La valoración colorimétrica se realizó con la finalidad de conocer el porcentaje de clarificación tanto en el método de precipitación con sales como en el método con solventes.

##### **4.5.1. Barrido espectroscópico**

Las muestras clarificadas por el método de precipitación con sales y por solventes se las sometió a un barrido espectroscópico al igual que al extracto crudo, con la finalidad de conocer a qué longitud de onda mayormente se detectan las moléculas presentes en los extractos.

En la Tabla 4.6, se muestran los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda de una muestra escogida aleatoriamente (Muestra 1), en dónde se obtendrá el valor de  $\lambda$  al que el compuesto presenta la mayor absorbancia, se evidencia que el mayor valor de absorbancia correspondiente al extracto crudo se lee a 450 nm, esto indica la presencia de pigmentos como clorofila y carotenoides en el mismo.

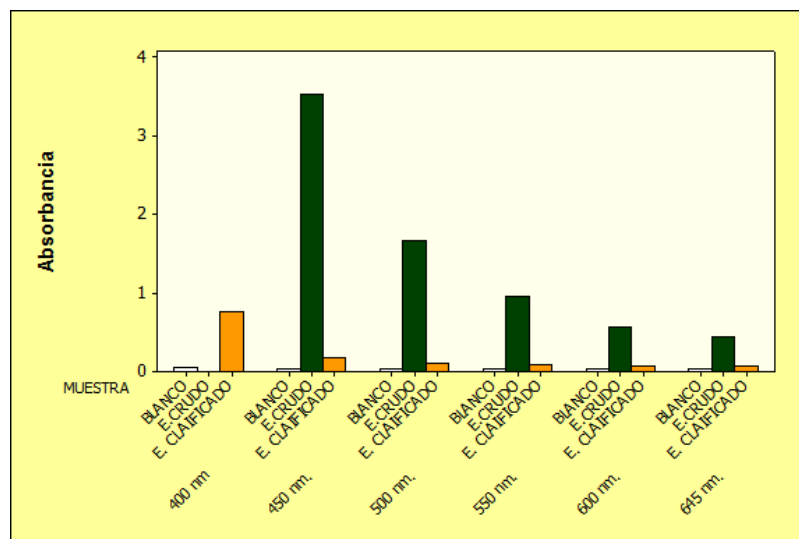
**Tabla 4.6.** Barrido espectroscópico de la muestra 1

	450 nm	500 nm	550 nm	600 nm	645 nm
<b>BLANCO</b>	<b>0,044</b>	0,038	0,038	0,037	0,036
<b>E.C</b>	<b>3,529</b>	1,670	0,966	0,576	0,440
<b>E.P</b>	<b>0,183</b>	0,113	0,087	0,079	0,079

**Elaborado por:** Autores, 2015

La exploración completa del rango de longitudes de onda fue una herramienta precisa para seguir el curso de la remoción de compuestos no deseados en el extracto. En la Figura 4.13, se muestra el monitoreo espectroscópico progresivo del extracto acuoso de *Stevia* y del extracto clarificado, en donde se observa la disminución de los valores de

absorbancia en los extractos clarificados por precipitación con sales (EP) con respecto al extracto crudo (EC).



**Figura 4.13.** Monitoreo espectroscópico progresivo de los extractos de Stevia (crudo y clarificado)

**Elaborado por:** Autores, 2015

#### 4.5.2. Análisis espectroscópico de extractos tratados con sales

Para la clarificación del extracto de Stevia se llevó a cabo un análisis de absorbancia, los resultados de los extractos tratados con diferentes cantidades de sulfato de aluminio se muestran en la Tabla 4.7, los mismos fueron medidos a 450 nm.

**Tabla 4.7.** Valores de absorbancia de las muestras tratadas con sales

MUESTRA	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml	0,5 ml	1 ml
<b>BLANCO</b>	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044
<b>E. CRUDO</b>	3,529	3,529	3,529	3,529	3,529	3,529
<b>E. CLARIFICADO</b>	2,682	3,871	2,487	0,560	2,366	2,976

**Elaborado por:** Autores, 2015

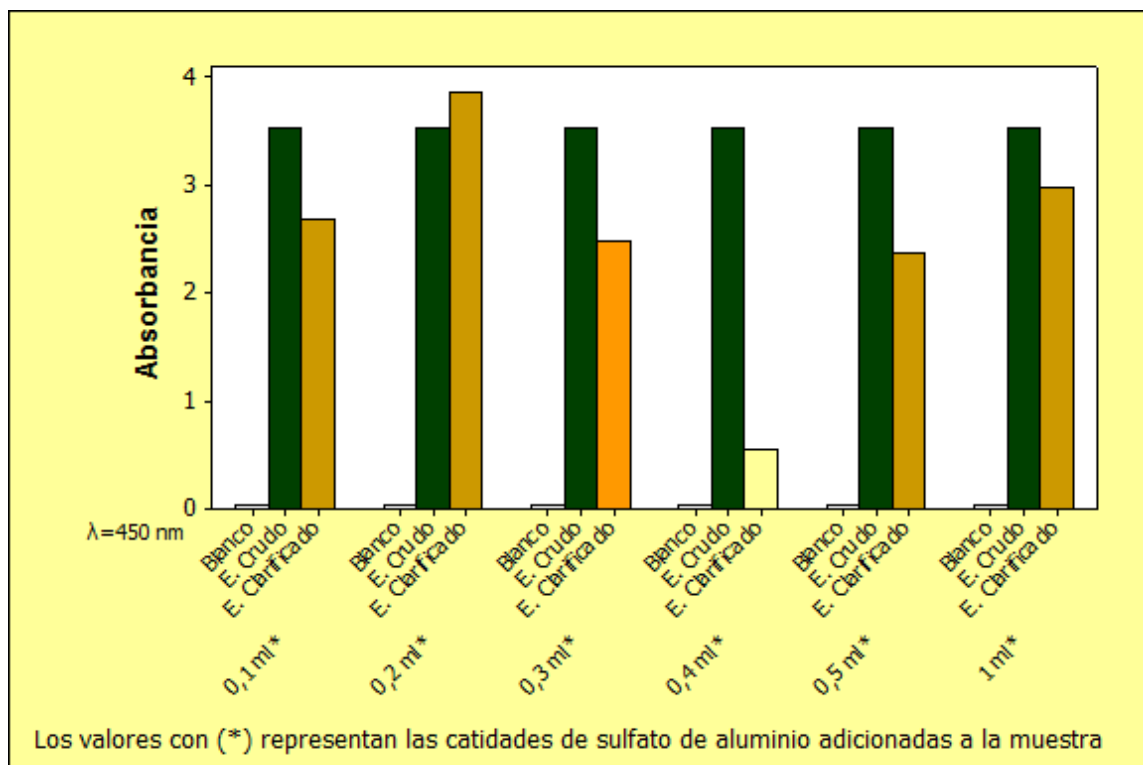
De los resultados mostrados en la Tabla 4.8, se puede notar que el tratamiento con 0,4 ml de sulfato de aluminio removi6 un 84,13% de pigmentos presentes en el extracto crudo, con esto se corrobora la disminuci6n de la intensidad de color observada en el extracto clarificado.

**Tabla 4.8.** Porcentaje de clarificaci6n de los extractos tratados con sales

Cantidad de $Al_2(SO_4)_3$ a6nada	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml	0,5 ml	1,0 ml
<b>% Clarificaci6n</b>	24,00	-	29,53	<b>84,13</b>	32,96	15,67

**Elaborado por:** Autores, 2015

En la Figura 4.14, se muestra que la mejor clarificación se dio en el extracto cuyo contenido de la solución de sulfato de aluminio fue de 0,4 ml, evidenciando la mayor disminución de la absorbancia con respecto a la absorbancia inicial del extracto crudo.



**Figura 4.14.** Absorbancia medida a diferentes concentraciones de sulfato de aluminio.

Elaborado por: Autores, 2015

### 4.5.3. Análisis espectroscópico de extractos tratados con solvente

En la Tabla 4.9, se muestran los resultados de absorbancia de las 8 muestras obtenidas en el digestor y posteriormente clarificadas con solvente, medidas a 450 nm; en dónde se evidencia una disminución de los valores de absorbancia con respecto al extracto crudo.

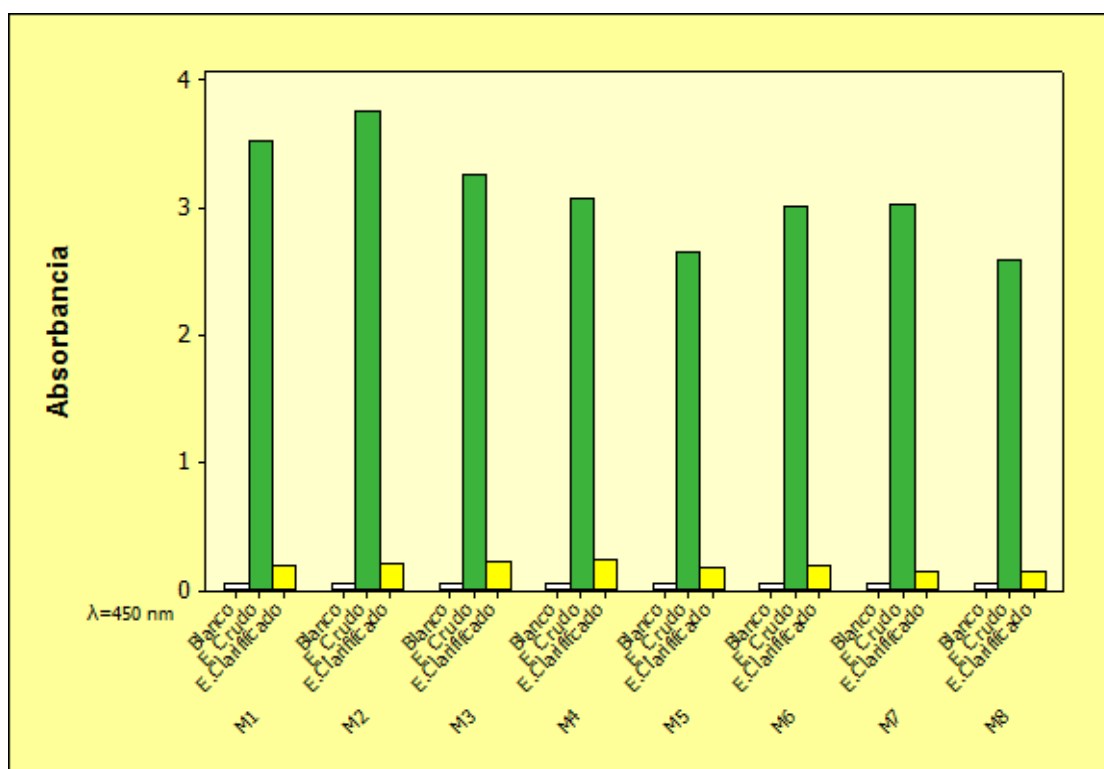
**Tabla 4.9.** Absorbancia de las muestras obtenidas en el digestor y de los extractos clarificados con solvente.

Medido a 450 nm	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
<b>Blanco</b>	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044
<b>E. Crudo</b>	3,529	3,768	3,266	3,078	2,658	3,009	3,024	2,588
<b>E. Clarificado</b>	0,183	0,199	0,225	0,230	0,172	0,191	0,137	0,143

**Elaborado por:** Autores, 2015



En el diagrama de barras de la Figura 4.15, se corrobora la disminución de la intensidad de color del extracto con la disminución de la absorbancia. El extracto crudo presenta un color verde oscuro y sus valores de absorbancia son superiores a 2,588; mientras que el extracto clarificado tratado con solvente presenta un color amarillo y valores de absorbancia menores a 0,230.



**Figura 4.15.** Resultado de absorbancia de los extractos crudos y clarificados

**Elaborado por:** Autores, 2015

En los resultados mostrados en la Tabla 4.10, se puede evidenciar que el tratamiento con solventes removi3 entre 92,53% a 95,47% de color en los extractos.

**Tabla 4.10.** Porcentaje de clarificaci3n de los extractos tratados con solvente

Muestras	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
% Clarificaci3n	94,81	94,72	93,11	92,53	93,53	93,65	95,47	94,47

**Elaborado por:** Autores, 2015

La clarificaci3n del extracto se analiz3 mediante espectrofotometr3a UV-Visible, en el tratamiento con sales se removi3 un 84% de pigmentos presentes en el extracto crudo, mientras que el tratamiento con solventes removi3 alrededor de un 94% de color en los extractos

#### 4.6. Extracci3n e aislamiento de estevi3sido

Una cantidad de 50 gramos de *Stevia rebaudiana* pulverizada fue utilizada para la extracci3n y aislamiento del estevi3sido con la finalidad de su posterior utilizaci3n como est3ndar. Un pre tratamiento de desengrase realizado a la muestra de *Stevia* con 50 ml de Hexano y

posteriormente con 50 ml de Cloroformo, para su posterior extracción con agua a reflujo por 20 minutos para extraer el esteviósido

El extracto acuoso obtenido se filtró y acidificó con ácido cítrico hasta un pH de 4, posterior a eso se cambió el pH a 8 con la adición de hidróxido de calcio para finalmente neutralizar el extracto con el ácido, esto con el propósito de potenciar la purificación del esteviósido presente en la solución. El extracto tratado se lo llevó a reflujo con 2 gramos de carbón activado pulverizado, para una clarificación primaria eliminando ciertos compuestos sin interés como la clorofila.

La separación del sólido se realizó por filtración al vacío con millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  como se muestra en la Figura 4.16.



**Figura 4.16.** Filtración al vacío del extracto tratado con carbón activado

**Elaborado por:** Autores, 2015

En la Figura 4.17 se observa el extracto concentrado en roto-evaporador, previo a su clarificación con metanol.



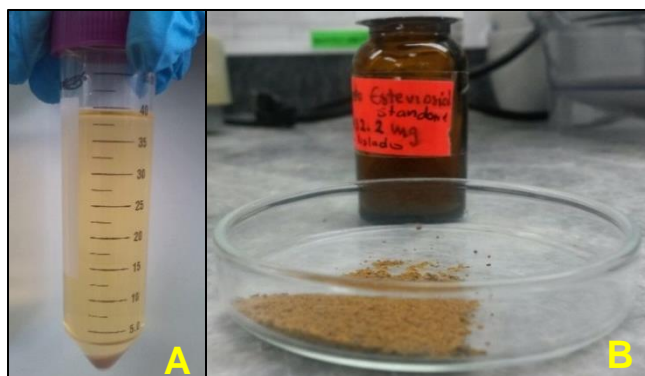
**Figura 4.17.** A) Roto evaporación de solvente, B) Extracto concentrado

**Elaborado por:** Autores, 2015

A la solución rica en esteviósido se le agregó metanol grado HPLC con el objeto de promover la precipitación de compuestos en solución que interfieren en la pureza del esteviósido. Para acelerar el proceso de precipitación de impurezas se calentó la solución a una temperatura de 70°C y posterior a eso se bajó a 4°C, este cambio de temperatura hace que precipiten las impurezas con mayor rapidez.

Después de 3 lavadas con MetOH la solución rica en esteviósido se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 20°C. Para la obtención de cristales de esteviósido la solución se concentró en un roto-evaporador y se

evaporó el solvente en un plato de calentamiento a 50°C hasta la presencia de cristales (Figura 4.18).



**Figura 4.18.** A) Separación de impurezas por centrifugación. B) Cristales de esteviosido obtenidos.

**Elaborado por:** Autores, 2015

#### 4.7. Cuantificación de esteviosido extraído

Para la obtención del rendimiento de esteviosido el peso de la muestra de hojas secas de Stevia fue de 50 g y después de aplicar el procedimiento de aislamiento se obtuvo 1,7322 g de esteviosido, con esto el rendimiento de esteviosido fue de 3,46 %.

$$\% \text{esteviosido} = \frac{\text{peso de esteviosido aislado}}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

$$\% \text{esteviosido} = \frac{1,73220 \text{ g esteviosido aislado}}{50,0141 \text{ g hojas stevia}} * 100$$

%estevisido = 3,46% Rendimiento

#### **4.8. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

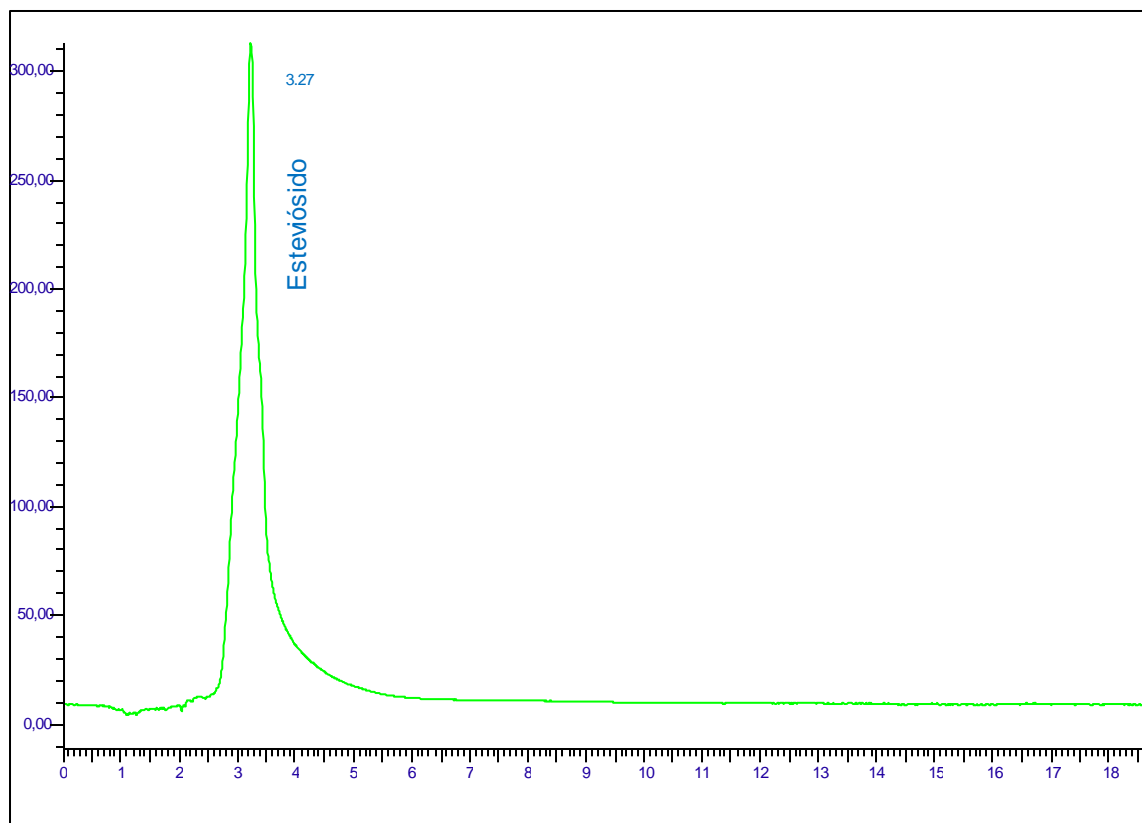
La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) por ser un método de separación muy sensible y precisa, fue usada para la estimación del contenido de glicósidos diterpenoides en las muestras (64).

##### **4.8.1. Identificación de los estándares de glicósidos diterpenoides**

La identificación y cuantificación de glicósidos diterpenoides contenidos en los extractos fueron hechas por comparación del tiempo de retención y el área del pico de la muestra con la del estándar (64).

#### 4.8.1.1. Identificación de esteviósido aislado a partir de hojas de *Stevia rebaudiana*.

La Figura 4.19, muestra el cromatograma reportado por el equipo HPLC en donde se identificó un solo pico en el minuto 3,27; utilizando el análisis cromatográfico se comprobó que los cristales aislados son esteviósidos, pues éste glicósido tiene un tiempo de retención de 3,3 min según AFANDI, 2013.



**Figura 4.19.** Cromatograma del esteviósido aislado de las hojas de *Stevia*

**Elaborado por:** Autores, 2015

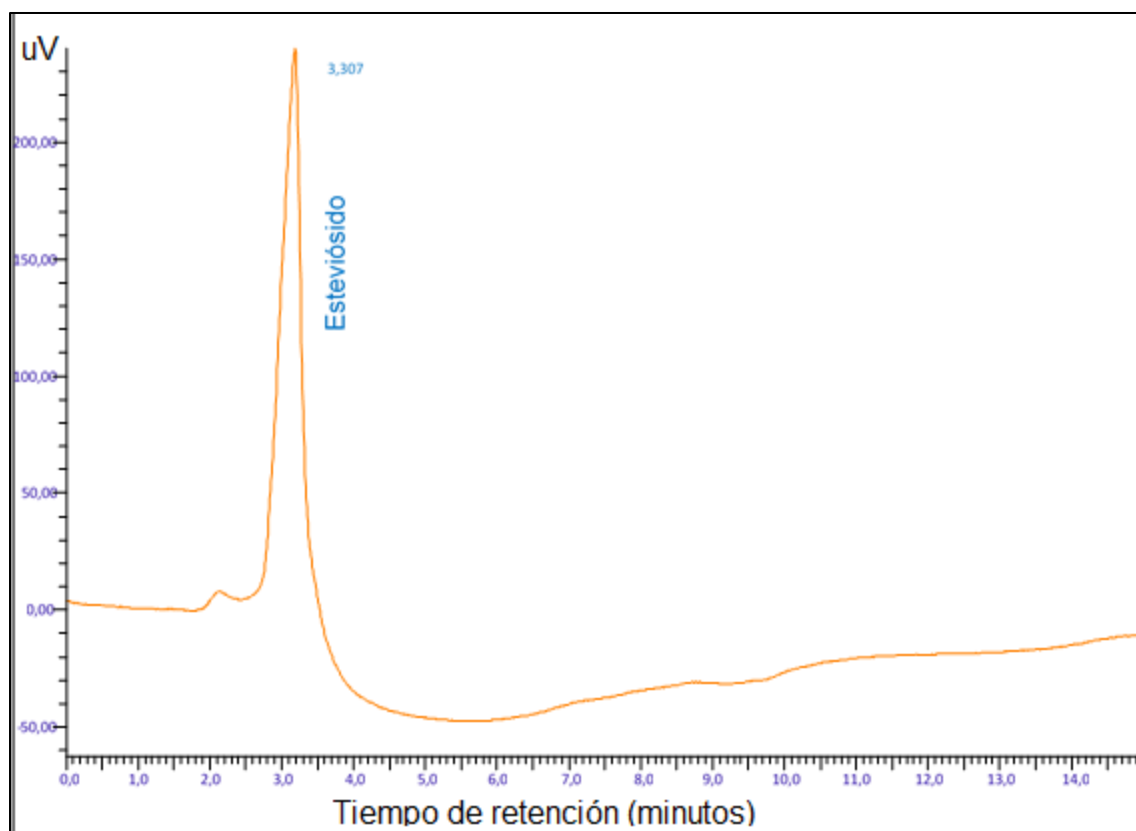
#### 4.1.1.1. Ajuste de método de identificación de glicósidos.

Para la identificación y cuantificación de los glicósidos extraídos de las hojas de *Stevia rebaudiana* fue necesario cambiar el gradiente de elución isocrática de AFANDI, 2013 por un gradiente lineal, el cual refleja cromatogramas con picos bien resueltos y homogéneamente distribuidos (80).

El gradiente lineal fue establecido con las siguientes fases móviles; Una solución de acetonitrilo/agua, ambos grado HPLC en una relación 80:20 ajustado el pH a 3 con ácido fosfórico al 85% grado reactivo y agua grado HPLC al 100%. El gradiente va de 0 a 100% acetonitrilo:agua (80:20) con un tiempo ajustado de corrida de 15 minutos para estándares y posteriormente cambiado a 10,5 minutos (80).

Para el método modificado de AFANDI se observó una mejor precisión en la identificación de esteviósido, pues este tuvo un tiempo de retención 3,307 (Figura 4.20) con un porcentaje de error de 1,31% en contraste con los resultados reportados por AFANDI y colaboradores.

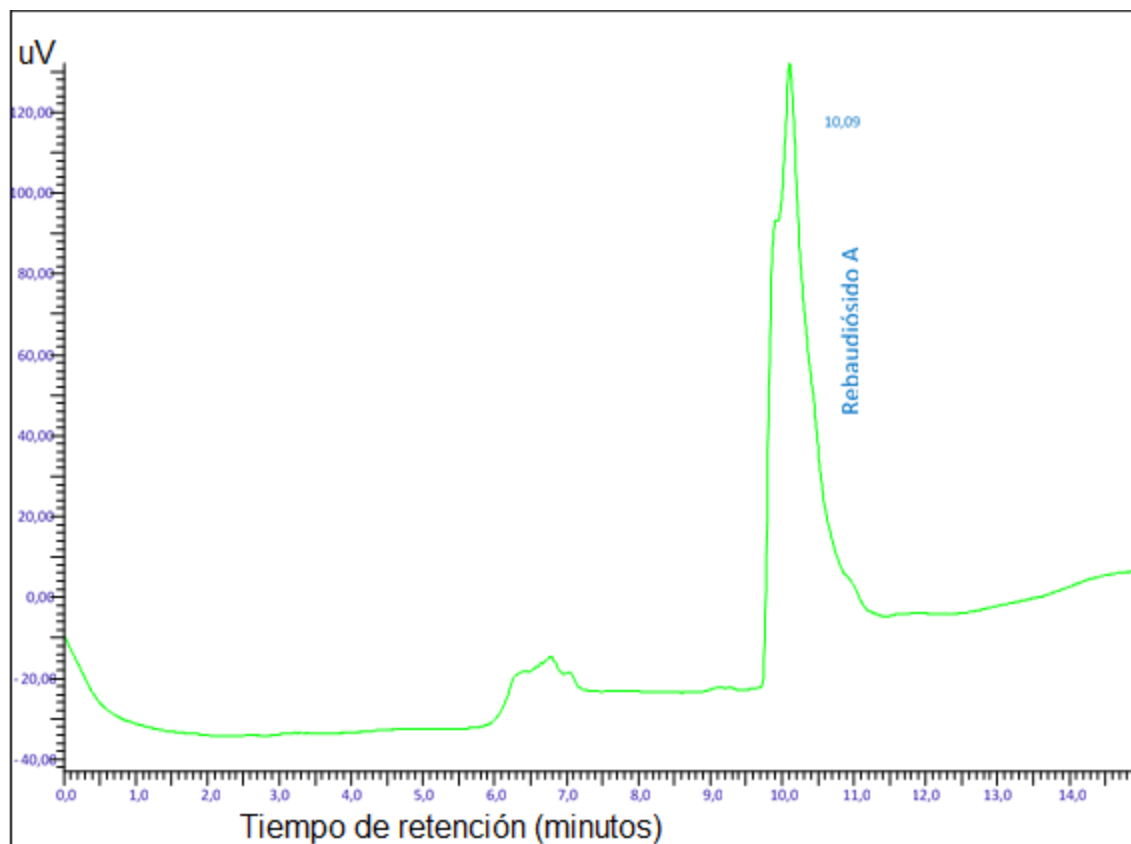




**Figura 4.20.** Cromatograma del estevióside obtenido con el método ajustado.

**Elaborado por:** Autores, 2015

El estándar de Rebaudiósido A fue de Wako pure Chemical Industries, Ltd. Japan, con CAS #: 58543-16-1 el cual fue identificado bajo las mismas condiciones que el estevióside dando como resultado un tiempo de retención de 10,09 minutos con gradiente de elución lineal como se muestra en la Figura 4.21.

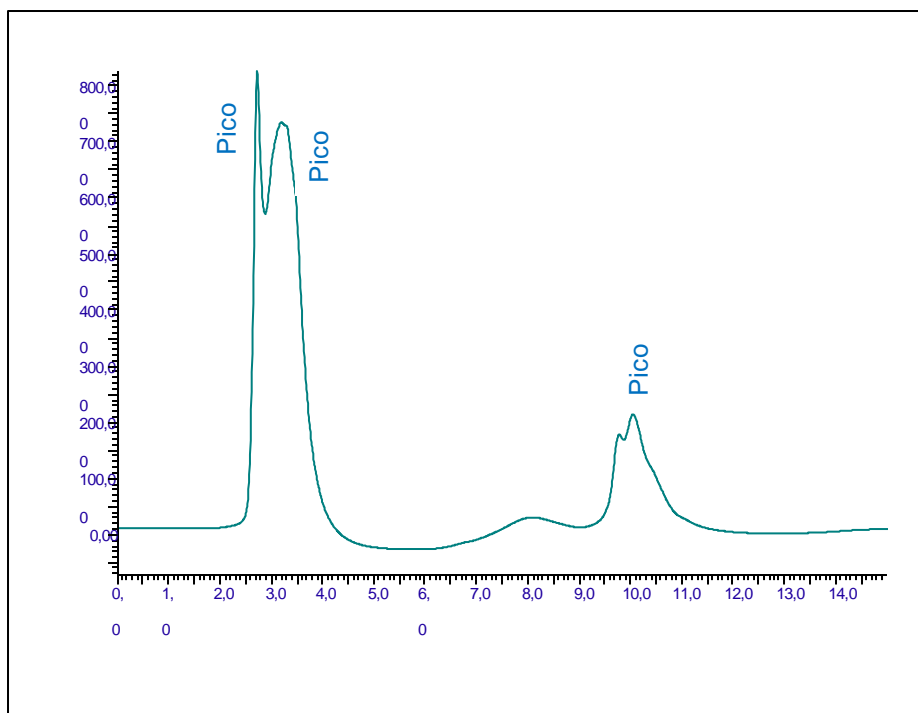


**Figura 4.21.** Cromatograma del estándar de rebaudiosido A

**Elaborado por:** Autores, 2015

Una vez ajustado el método en el HPLC e identificados los glicósidos de interés (esteviosido y rebaudiosido A), se procedió a una evaluación por comparación espectral de una muestra de extracto de *Stevia* lavada para conocer la presencia o ausencia de los glicósidos.

La muestra analizada dio como resultado un cromatograma en el cual aparecieron tres picos (Figura 4.22). Los picos 2 y 3 cercanos al tiempo de retención de los estándares mientras que el primer pico se detectó antes.

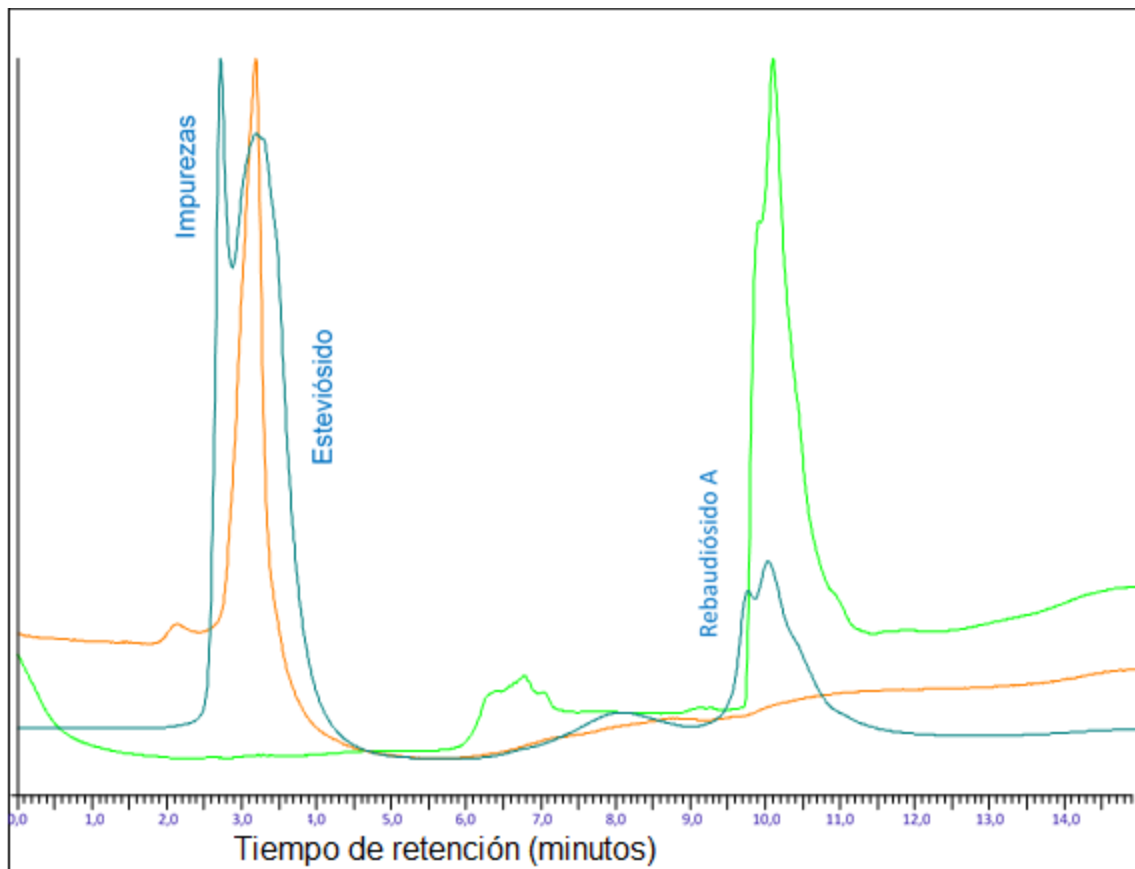


**Figura 4.22.** Cromatograma de una muestra clarificada con solventes

**Elaborado por:** Autores, 2015

Para la identificación de glicósidos presente en la muestra se hizo una sobre posición de los cromatogramas de los estándares y la muestra tomada mediante el software Total Navigator instalado en el equipo de HPLC, dando como resultado que los picos 2 y 3 corresponden a los glicósidos: esteviósido y

rebaudiósido A respectivamente, mientras que el pico 1 se lo consideró como impureza debido al tratamiento aplicado en el proceso de lavado (Figura 4.23).



**Figura 4.23.** Identificación de compuestos por comparación espectral de estándares y muestra

**Elaborado por:** Autores, 2015

En la Tabla 4.11 se muestran los tiempos de retención de los estándares reportados por el equipo HPLC en comparación con el valor reportado por Afandi, 2013.

**Tabla 4.11.** Tiempo de retención de estándares mediante el método modificado de Afandi y colaboradores.

<b>Glucósido de <i>Stevia rebaudiana</i></b>	<b>Tiempo de retención (propio)</b>	<b>Tiempo de retención según Afandi (2013)</b>
<b>Estándar de esteviósido</b>	3,307	3,3
<b>Estándar de rebaudiósido A</b>	10,09	-

**Elaborado por:** Autores, 2015

#### **4.8.2. Cuantificación de glicósidos diterpenoides**

##### **4.8.2.1. Curva de calibración de esteviósido**

Para la realización de la curva de calibración del esteviósido se preparó una solución madre de 5000ppm, de las cuales se hicieron disoluciones progresivas de 4000, 3000, 2000 y 1000 ppm.

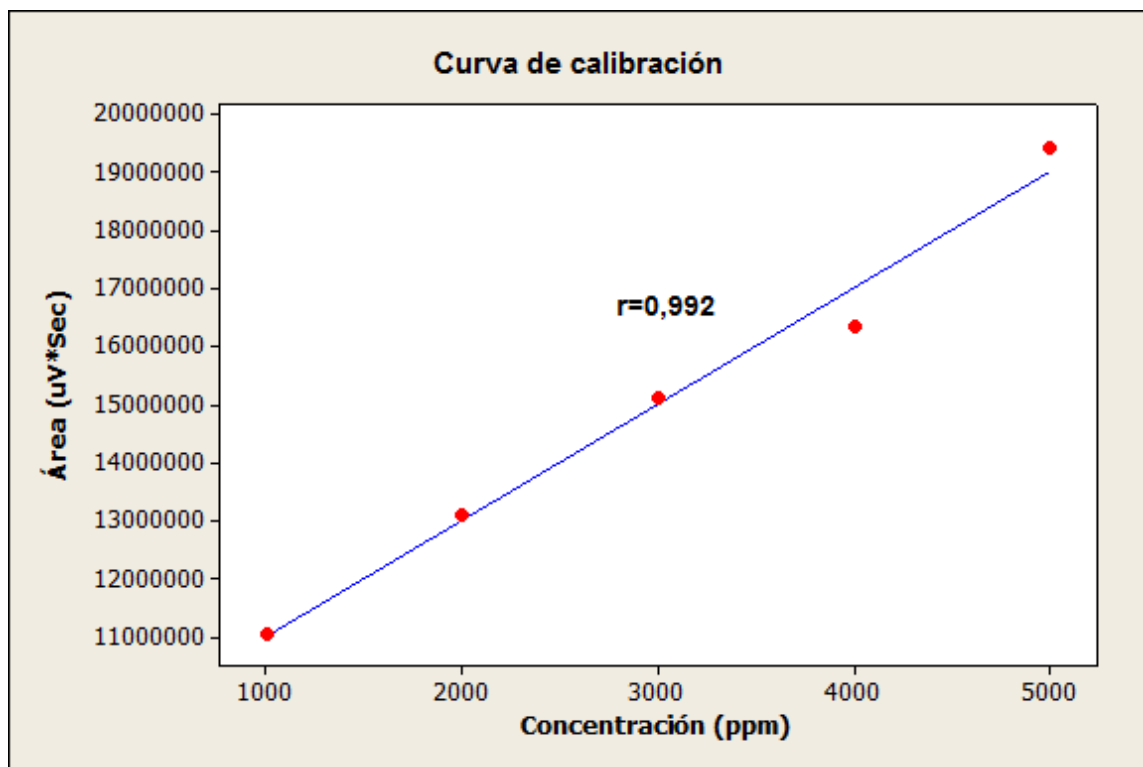
Las 5 soluciones estándares fueron filtradas a través de filtros millipore de 0,22 $\mu$ m, puestas en viales de 2ml y analizadas mediante HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.12.

**Tabla 4.12.** Área de estándares reportada por HPLC

<b>CONCENTRACIONES (ppm)</b>	<b>Área (uV*Sec)</b>
<b>1000</b>	11040600,65
<b>2000</b>	13081278,67
<b>3000</b>	15121897,32
<b>4000</b>	16349202,44
<b>5000</b>	19407649,33

**Elaborado por:** Autores, 2015

En la Figura 4.24 se muestra la curva de calibración del esteviósido graficada a partir de los datos obtenidos del análisis cromatográfico en el HPLC. El comportamiento lineal de los datos se comprobó con el coeficiente de correlación de Pearson de 0,992.



**Figura 4.24.** Curva de calibración del estevósido

**Elaborado por:** Autores, 2015

Las muestras obtenidas de las corridas en el digestor fueron analizadas por HPLC. Los resultados del análisis cromatográfico y la cuantificación del contenido de estevósido mediante la curva de calibración se muestran en la Tabla 4.13.

**Tabla 4.13.** Concentraciones de esteviósido en las muestras

Muestra	Área (uV*Sec)	Concentración (ppm)
<b>M1</b>	12522411,44	1726,164579
<b>M2</b>	15741347,21	3303,610313
<b>M3</b>	11834056,66	1388,834977
<b>M4</b>	12521802,34	1725,866088
<b>M5</b>	12479484,72	1705,128256
<b>M6</b>	13517717,76	2213,916378
<b>M7</b>	11091389,99	1024,889733
<b>M8</b>	15701969,75	3284,313315

**Elaborado por:** Autores, 2015

#### **4.9. Análisis estadístico del diseño factorial- experimental**

Se utilizó la función estadística Diseño De Experimentos (DOE por sus siglas en inglés) del programa Minitab 2015 para generar el Diseño Factorial completo

-Experimental de 2 niveles con 3 factores. En la Tabla 4.12, se muestra el diseño experimental utilizado junto con el resultado de la concentración de esteviósido obtenido de la curva de calibración.



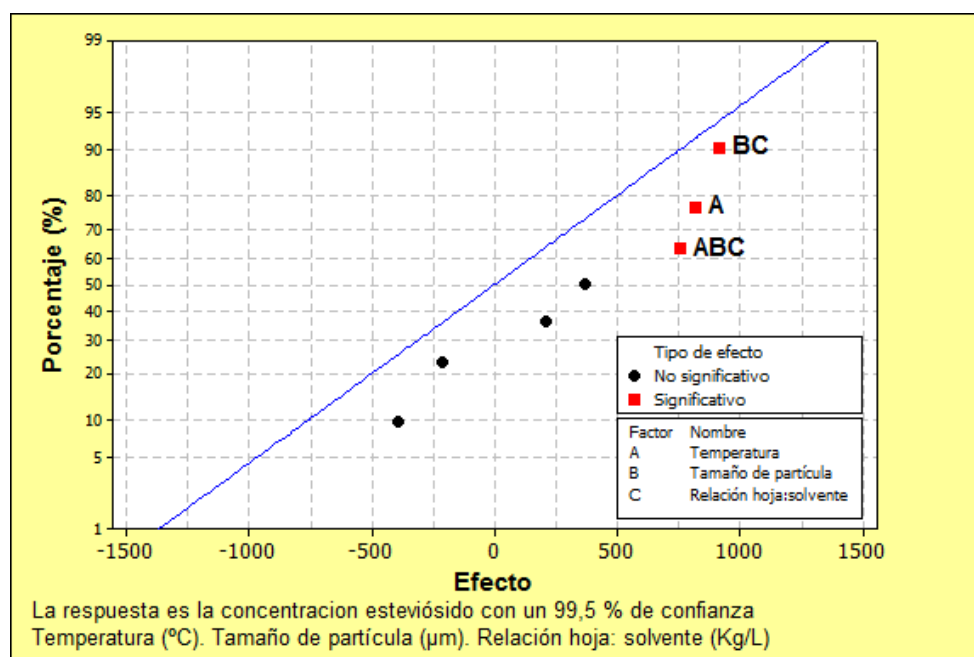
**Tabla 4.14.** Diseño factorial completa generada con la función estadística DOE

Orden Est	Orden Corrida	Temperatura °C	Tamaño de partícula $\mu\text{m}$	Relación hoja:solvente Kg/L	Concentración esteviósido ppm
<b>M2</b>	1	60	250	1:10	3303,61
<b>M5</b>	2	50	500	1:13	1705,13
<b>M7</b>	3	60	500	1:10	1024,89
<b>M3</b>	4	50	500	1:10	1388,83
<b>M1</b>	5	50	250	1:10	1726,16
<b>M8</b>	6	60	500	1:13	3284,31
<b>M6</b>	7	60	250	1:13	2213,92
<b>M4</b>	8	50	250	1:13	1725,87

**Elaborado por:** Autores, 2015

El análisis estadístico de optimización se realizó en base a la concentración de esteviósido contenidas en las muestras, calculadas a partir de la curva de calibración graficada con los datos obtenidos del análisis cromatográfico.

En la Figura 4.25 se muestra la gráfica normal de efectos obtenida mediante el análisis del diseño factorial completo en DOE, gráfica en la cual se identificaron 3 tipos de efectos significativos, la combinación BC es el efecto tamaño de partícula: relación hoja solvente, el efecto A referente a la temperatura y el efecto ABC la combinación de los tres factores.



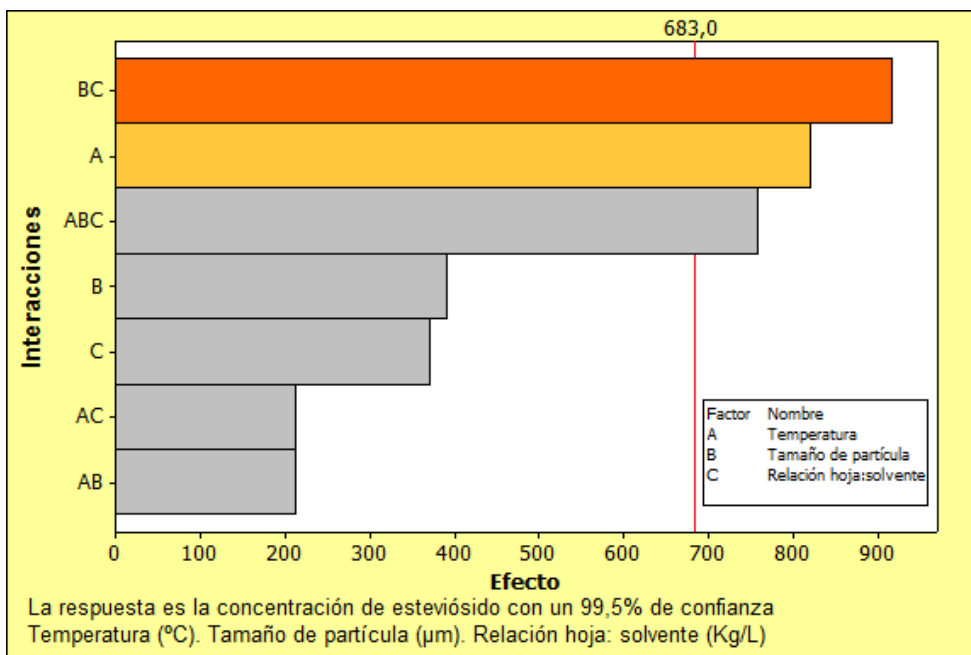
**Figura 4.25.** Efectos significativos en la optimización de la extracción

**Elaborado por:** Autores, 2015

El diagrama de Pareto (Figura 4.26) indicó que el término BC correspondiente a los factores de Tamaño de partícula y Relación hoja: solvente, tuvieron el efecto de mayor relevancia en la concentración de esteviósido extraído.

La temperatura no se descartó dentro de los efectos que influyeron en la concentración de esteviósido pues fue el segundo factor de relevancia, sin embargo no fue evaluado en los análisis de interacciones.

El término ABC a pesar de ser uno de los efectos significativos y contener los 3 factores de diseño, Temperatura, Tamaño de partícula y Relación hoja: solvente; fue descartado debido a que en el presente proyecto se busca la combinación de factores de mayor relevancia en la concentración de glicósidos extraídos.



**Figura 4.26.** Diagrama de Pareto para la interacción entre las variables A, B, C

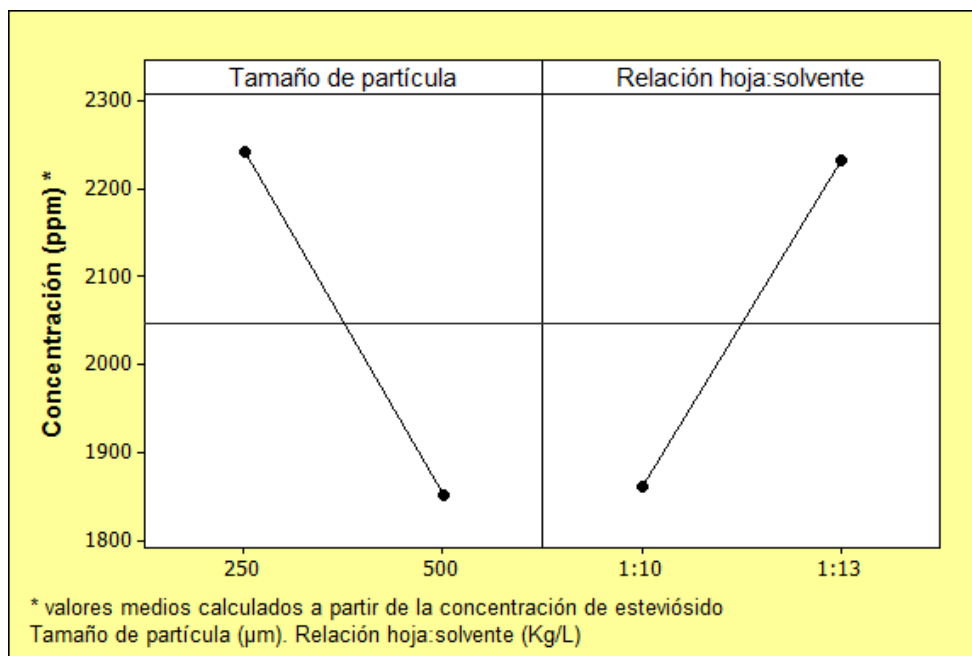
**Elaborado por:** Autores, 2015

La función estadística DOE analizó el término de mayor relevancia en la concentración de estevósido reportado en el diagrama de Pareto. Los resultados de los efectos principales en función de la concentración de estevósido se observan en la Figura 4.27. El tamaño de partícula presentó un efecto negativo en función de sus niveles analizados, debido a que la concentración de estevósido disminuye al cambiar el nivel del factor, a diferencia del factor relación hoja: solvente que presentó un efecto positivo en la concentración de estevósido extraído. Los resultados de las medias obtenidas y sus efectos simples se muestran en la Tabla 4.15.

**Tabla 4.15.** Medias obtenidas y sus efectos simples

<b>Promedio</b>	<b>Tamaño de partícula</b>	<b>Relación hoja: solvente</b>
<b>Efecto alto</b>	1852,14	2234,44
<b>Efecto bajo</b>	2244,50	1859,32
<b>Efecto</b>	392,36	375,12

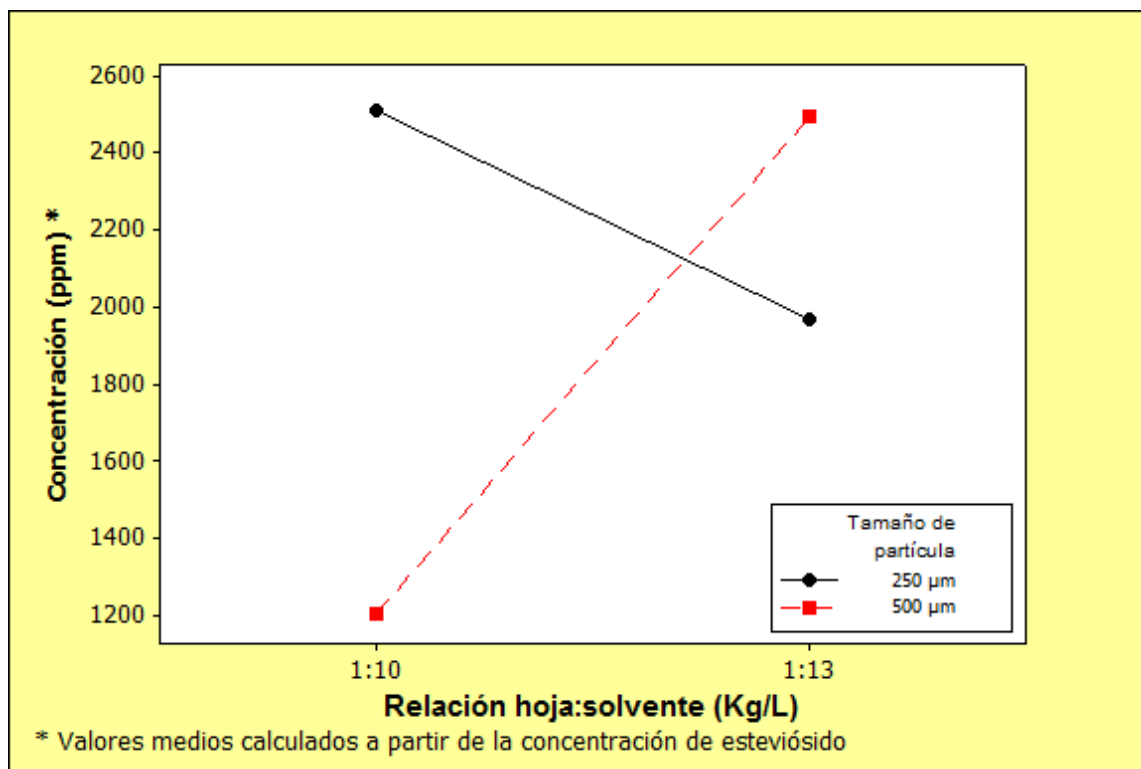
**Elaborado por:** Autores, 2015



**Figura 4.27.** Resultados de los efectos principales en función de la concentración de esteviósido.

**Elaborado por:** Autores, 2015

El análisis de interacción del término de mayor relevancia BC demostró que el comportamiento de la interacción entre el factor tamaño de partícula y relación hoja: solvente fue inverso. De esta manera para reportar la concentración de esteviósido en función del “tamaño de partícula” es necesario establecer el nivel del factor “relación hoja: solvente”, Figura 4.28.



**Figura 4.28.** Interacción de los efectos principales: Tamaño de partícula y relación hoja/solvente

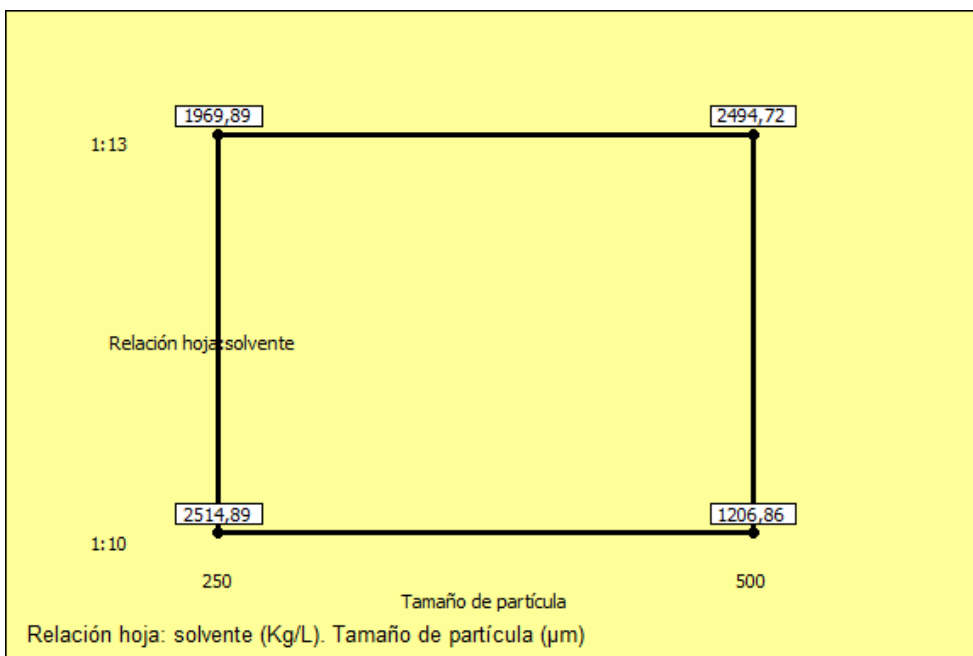
**Elaborado por:** Autores, 2015

#### 4.10. Optimización de factores

Para determinar las condiciones óptimas de extracción de glicósidos diterpenoides se cuantificó mediante análisis estadístico los factores más significativos y que presentaron una interacción inversa.

En la Figura 4.29, se presentan los resultados de la concentración de esteviósido en función de sus factores significantes: Relación Hoja/solvente y Tamaño de partícula.

La combinación óptima de extracción se evidencia en los valores de 250 $\mu$ m de tamaño de partícula y 1/10 Kg/L de relación hoja: solvente con una concentración máxima de 2514,89 ppm de esteviósido como



**Figura 4.29.** Variación de concentración de esteviósido según niveles de tamaño de partícula y relación hoja/solvente

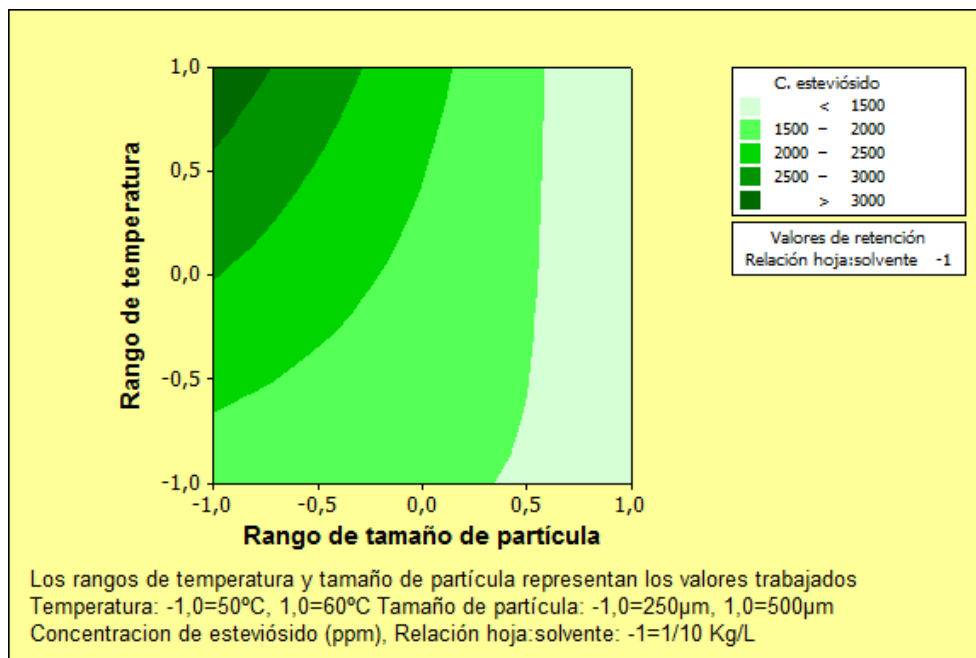
**Elaborado por:** Autores, 2015

Con las condiciones anteriormente descritas se procedió a analizar el segundo factor de significancia para conocer el efecto que tiene en función de los parámetros obtenidos, si el efecto influye en la concentración de esteviósido extraído y el rango en el que estaría si se llegase a tomar dentro de los factores relevantes.

La Figura 4.30 muestra la gráfica de contorno de temperatura frente a los factores óptimos encontrados. Se evidenció que al nivel alto de temperatura y manteniendo el tamaño de partícula en  $250\mu\text{m}$ , la relación hoja/ solvente en 1/10 Kg/L, existe un incremento en la concentración de esteviósido.

Se consideró la temperatura como un factor de relevancia debido a que reportó una concentración de esteviósido mayor a los 3000 ppm en contraste con lo reportado al considerar los factores de tamaño de partícula y relación hoja: solvente.

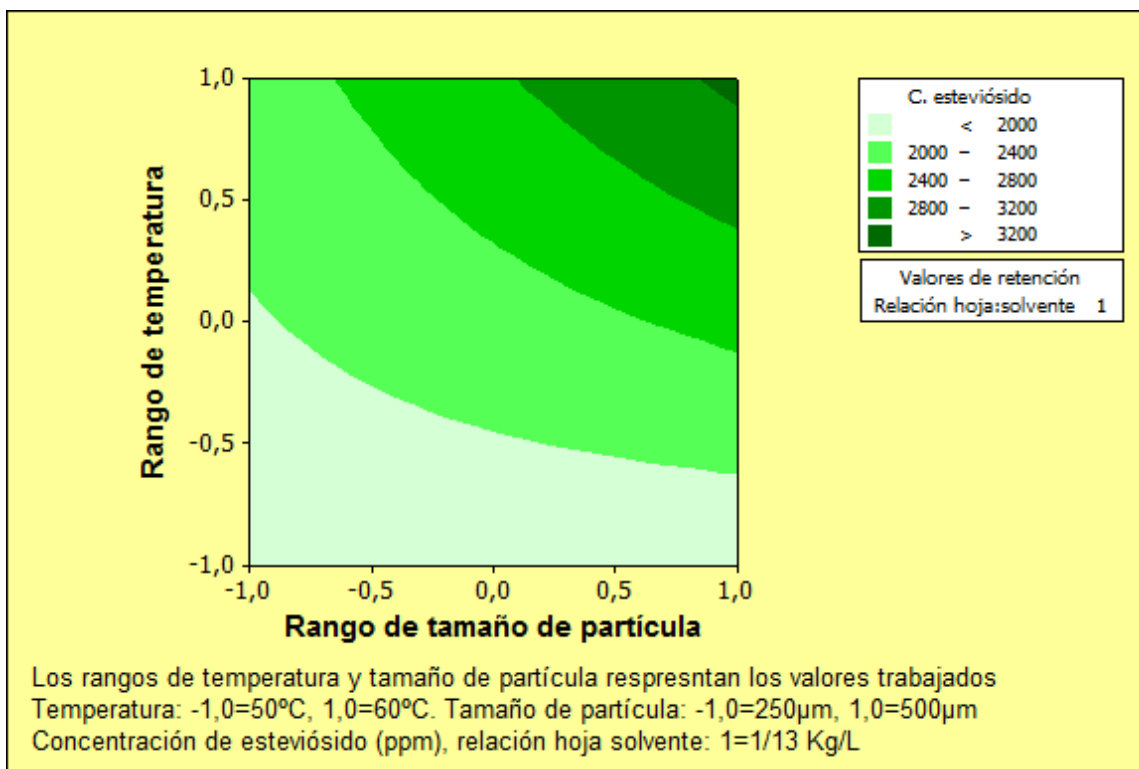




**Figura 4.30.** Efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula y su nivel más bajo de relación hoja/solvente

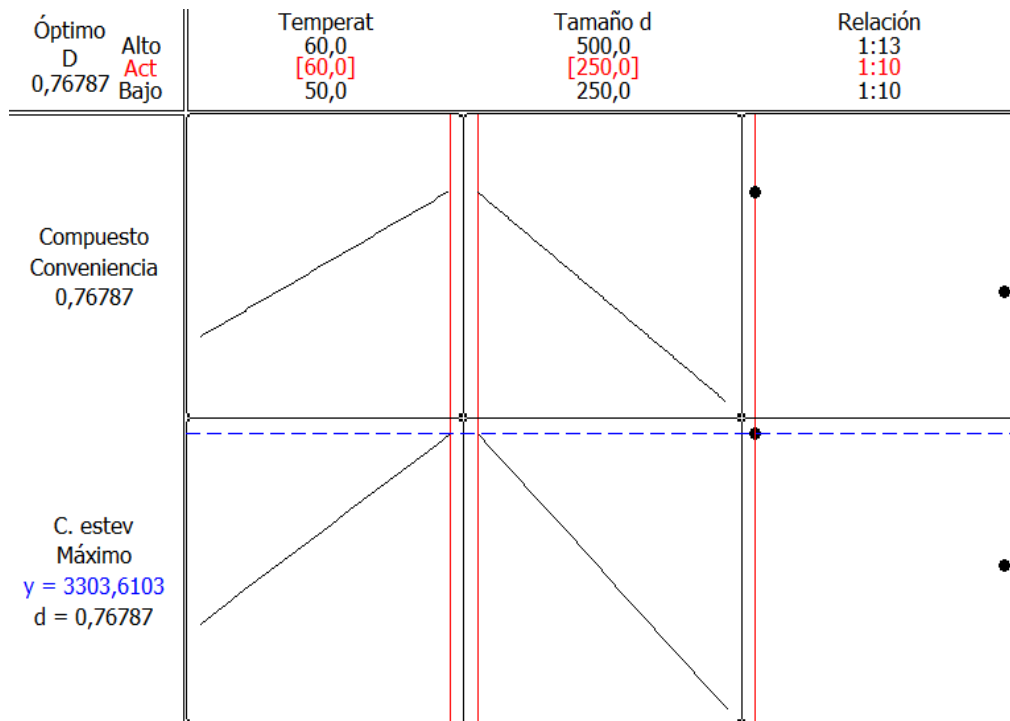
**Elaborado por:** Autores, 2015

Los resultados obtenidos fueron validados mediante el optimizador de respuesta de la función estadística DOE, resultado que se muestra en la Figura 4.31, donde se observa que la temperatura alcanzó un resultado máximo de 3303,61 ppm de esteviósido extraído.



**Figura 4.31.** Efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula y su nivel más alto de relación hoja/solvente

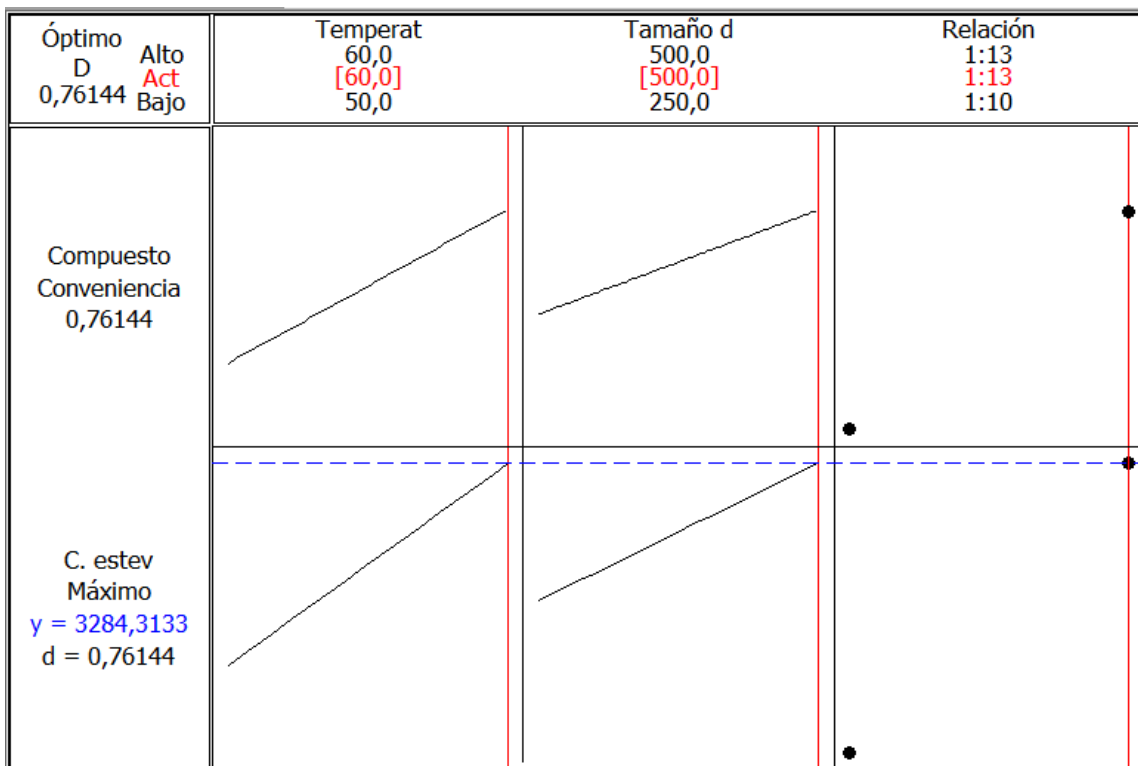
**Elaborado por:** Autores, 2015



**Nota:** Las unidades de temperatura °C, tamaño de partícula en  $\mu\text{m}$  y la relación hoja solvente en Kg/L.

**Figura 4.32.** Respuesta óptima en función de los tres factores: Temperatura, tamaño de partícula y relación hoja/solvente

**Elaborado por:** Autores, 2015



Temperatura (°C). Tamaño de partícula (µm). Relación hoja:solvente (Kg/L).  
Concentración de esteviósido (ppm).

**Figura 4.33.** Segunda respuesta óptima en función de los tres factores:

Temperatura, tamaño de partícula y relación hoja/solvente

**Elaborado por:** Autores, 2015

Los parámetros óptimos de extracción de esteviósido como glicósidos, obtenidos mediante diseño factorial completo con un 76,79% de conveniencia se muestran en la Tabla 4.16.

**Tabla 4.16.** Parámetros óptimos en la extracción de esteviósido

	Temperatura	Tamaño de partícula	Relación Hoja:solvente	Concentración Esteviósido
VALORES	°C	µm	Kg/L	ppm
<b>Óptimos</b>	60	250	1:10	3303,61
<b>Cercanos</b>	60	250	1:13	3284,31

**Elaborado por:** Autores, 2015

#### 4.11. Discusión

El presente trabajo consistió en generar conocimiento tecnológico de innovación para que pueda ser tomado como referente con miras hacia la industrialización. De esta manera se evaluó los mejores parámetros en la extracción de glicósidos diterpenoides de la *Stevia* con la finalidad de determinar la respuesta óptima en función de la cantidad de compuesto de interés, para esto se realizó un proceso sistemático que a continuación se discute del porqué de su importancia en el presente trabajo.

La deshidratación de las hojas de *Stevia* en el presente proyecto fue de gran importancia debido a que en condiciones de bajo contenido de humedad las propiedades de los glicósidos se mantienen, sin embargo

sería de gran interés evaluar la estabilidad de los glicósidos en hojas verdes no deshidratadas directamente en la extracción de sus principios edulcorantes.

Si no existiera una diferencia significativa del contenido edulcorante entre las hojas deshidratadas y no deshidratadas se evitaría el proceso de secado de las hojas de *Stevia* disminuyendo gastos y tiempo, es decir de la recolección podría pasar a la extracción.

El proceso de trituración del material vegetal fue importante puesto que redujo la densidad aparente de las muestra, lo cual implica un menor espacio de almacenamiento además de mejorar el contacto de la muestra con el solvente y mejorar la cinética de digestión.

Se eligió la extracción de los principios edulcorantes mediante la digestión debido a que esta se maneja en rangos de temperatura mayores a la temperatura ambiente y menores o iguales a 60 °C, según reporta Afandi (2013), a partir de temperaturas mayores a 60°C puede ocurrir la oxidación de glicósidos y la presencia de compuestos no deseados los cuáles potencian el sabor amargo del esteviósido.

El cloruro de calcio se utilizó para la remoción de color en el extracto acuoso debido a que esta NO influye en la cantidad de glicósidos (Giraldo, 2005). La determinación de la mejor cantidad de sal en la remoción de color se estableció en 0.75 mg  $\text{CaCl}_2$ /ml extracto, lo cual resultó ser un 92,5% menor a la cantidad de sal reportada por Giraldo, sin embargo esto posiblemente se debe al tiempo de digestión que se utilizó, pues según Afandi (2013), a partir de 1,5 horas de contacto hoja-solvente se extraen compuesto no deseados como pigmentos.

La medición del pH en el proceso de clarificación mediante hidróxido de calcio y sulfato de aluminio influye en la concentración de glicósidos lo cual es confirmado por Giraldo y sus colaboradores (2005) debido a que al precipitar las sales parte de los glicósidos también precipitan.

De igual forma la medición de grados Brix ayudó a determinar que la dosis óptima de clarificación por precipitación con sales es 0,4 ml de sulfato de aluminio.

Los resultados del barrido espectroscópico mostraron que la mejor longitud de onda al que se detecta tanto el extracto crudo como sus

demás extractos tratados fue de 450 nm. El análisis de los valores de absorbancia de las muestras medidas a esa longitud de onda, revelaron los porcentajes de clarificación de cada tratamiento.

La dosis óptima utilizada en la precipitación con sales tuvo un 84,13% de clarificación con una reducción del 2,17% de glicósidos, esto fue debido a la variación de pH mediante el uso de hidróxido de calcio ya que este, según Giraldo (2005), reduce la cantidad de glicósidos en solución haciendo precipitar junto con otras impurezas.

La clarificación con solventes en contraste con el método de clarificación con sales, tuvo mejores resultados. Las muestras de los 8 extractos tuvieron porcentajes de clarificación desde 92,53 hasta 95,47%, estos resultados son comparables con lo reportado por Adari (2012), el cual utilizó ultrafiltración para la clarificación del extracto, alcanzando a remover del 80-90% de pigmentos.

La cromatografía líquida de alta resolución fue una técnica utilizada por ser muy precisa y bastante sensible en el análisis de muestras acuosas (80), debido a esto se pudo identificar el compuesto aislado de interés.



Se ajustó el método de Afandi (2013) debido a que en las condiciones de operación no identificó los dos compuestos de interés, esteviósido y rebaudiósido A, sin embargo al aplicarle un gradiente lineal la separación de compuestos fue notable, esto se debe a que en gradiente con elución lineal combina de manera progresiva los solventes utilizados para la cromatografía dando así una mejor resolución en los cromatogramas obtenidos.

En el presente proyecto se identifica tanto esteviósido como rebaudiósido A presente en las muestras de extractos clarificados dejando evidencia la extracción de estos glicósidos, sin embargo no se reporta el rebaudiósido A de manera cuantitativa debido a que en las muestras de los extractos las impurezas interfirieron de gran manera en la cuantificación del mismo.

El diseño experimental generado por la función DOE fue de forma aleatoria, lo cual hizo que las respuestas obtenidas tengan un mejor análisis estadístico.

Se encontraron 3 tipos de efectos que fueron significativos en la extracción de glicósidos diterpenoides mediante digestión. La combinación del tamaño de partícula con la relación hoja solvente, la temperatura y la combinación de los tres factores evaluados. Esta significancia de los tipos de efectos se discutieron mediante un diagrama de Pareto el cual mostró que el efecto tamaño de partícula - relación hoja solvente fue la de mayor relevancia, por lo cual estos dos parámetros estudiados definirían una respuesta óptima, sin embargo el segundo efecto fue la temperatura, la cual no se descartó puesto que hay un reporte de Giraldo (2005), que afirman que si tiene influencia en una extracción acuosa.

La gráfica de efectos principales tales como tamaño de partícula y relación hoja/solvente, mostró un efecto negativo en la concentración de esteviósido al cambiar los niveles estudiados del tamaño de partícula, mientras que el efecto de la relación hoja solvente dio un efecto positivo, esto puede ser debido a que los efectos influyen directamente en la superficie de contacto, en la extracción y en la solubilidad de los glicósidos, en el solvente, de manera que los glicósidos pueden llegar a saturar la solución.

Al evaluar la interacción de los dos principales efectos se mostró que la interacción fue inversa lo cual indica claramente una dependencia de un factor con otro y esto repercute directamente en la concentración de estevósido extraído como lo presentó inicialmente el diagrama de Pareto.

La optimización del proceso de extracción de estevósido evaluando 2 niveles de 3 factores proporcionó un conjunto de posibles combinaciones, siendo la combinación de relación hoja solvente de 1:10 y con tamaño de partícula de 250 micras aquella que proporcionó la mayor concentración de estevósido extraído (2514,89 ppm), sin embargo, la combinación de relación hoja solvente de 1:13 y tamaño de partícula de 500 micras proporcionó la respuesta cercana al óptimo 2494,72 ppm.

A pesar de los parámetros óptimos obtenidos mediante un análisis del diseño factorial previo, se evaluó la influencia de la temperatura sobre los parámetros óptimos establecidos mediante un análisis de contorno, dando como resultado un interesante valor de su influencia, el cual fue mayor a 3000 ppm.

Con los resultados óptimos y la influencia significativa de la temperatura se utilizó el optimizador de respuesta para determinar de manera definitiva el conjunto de condiciones que proporcionan la respuesta máxima de concentración de esteviósido.

## **CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1. Conclusiones**

El proceso de secado es importante ya que permite utilizar menos cantidad de solvente para obtener la mayor concentración de esteviósido en el proceso de extracción.

Los extractos crudos obtenidos de las 8 corridas en el digestor no mostraron un cambio significativo en la concentración de glicósidos y pH con respecto a la temperatura de almacenamiento.

En el tratamiento de precipitación con sales se evidencia una alta remoción de pigmentos utilizando cloruro de calcio, hidróxido de calcio y una solución de sulfato de aluminio.

En la determinación del porcentaje de clarificación se utilizó espectrofotometría UV-VIS, la misma que presenta una disminución clara en los valores de absorbancia de los extractos clarificados, los extractos tratados con metanol presentaron un 10% de mayor remoción de pigmentos a diferencia de los extractos tratados con sales, por lo que se puede concluir que el mejor auxiliar alimentario para esta etapa del proceso es el metanol.

El cromatograma obtenido del esteviósido aislado mediante el tratamiento de purificación con metanol, no presentó otros picos, además del correspondiente al esteviósido cuyo tiempo de retención fue al minuto 3,30, lo que indica que el método de purificación empleando metanol fue el adecuado.

Se realizó la determinación de los parámetros óptimos como temperatura, tamaño de partícula y relación hoja solvente y se encontró que es posible

obtener una mayor concentración de esteviósidos (3303,61 ppm) empleando condiciones de proceso de: Temperatura de 60 °C, tamaño de partícula de 250 µm y relación hoja/solvente 1/10 Kg/L.

Se diseñó un experimento factorial 2<sup>3</sup>, estableciendo como variables independientes el tamaño de partícula, la temperatura y la relación hoja/solvente, con la finalidad de asegurar que en el proceso de extracción nos dio una señal de respuesta máxima; en nuestro caso la se obtuvo la mayor concentración de glicósidos.

## **5.2. Recomendaciones**

Se recomienda que el proceso de molienda y tamizaje se realice en equipos cerrados debido al gran desprendimiento de material particulado.

Continuar con la extracción y optimización en las etapas 2 y 3 del proceso descrito en el presente trabajo, siguiendo el modelo de Afandi (2013), el cual indica que en la tercera extracción la muestra de *Stevia* se agota completamente.

Es recomendable medir las trazas de metanol después de realizar el método de clarificación con solventes.

Optimizar el proceso de clarificación aplicando tecnología de ultrafiltración y nanofiltración y además, evaluar el porcentaje de clarificación obtenido con las tecnologías antes descritas frente a los métodos de clarificación tanto por precipitación con sales como con solventes.



## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Elución isocrática:** composición constante de la fase móvil.

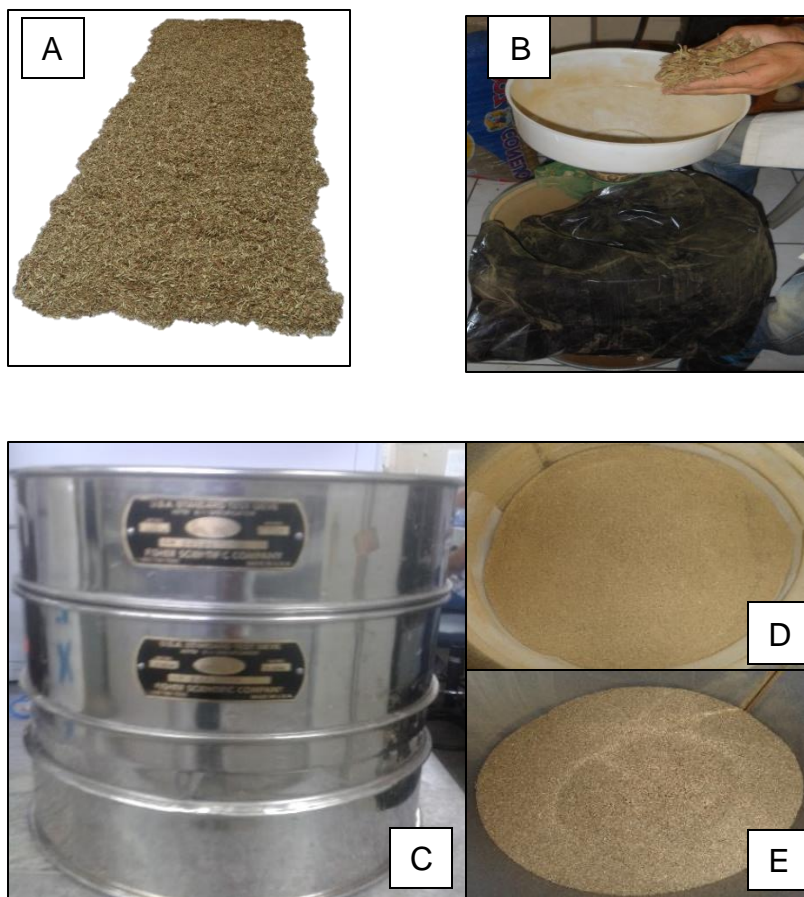
**Elución con gradiente lineal:** los distintos analitos son eluidos con incremento de la composición de la fase móvil en la fase orgánica.

**Extracción por reflujo:** extracción continua a temperaturas cercanas a la temperatura de ebullición del disolvente realizada generalmente en un equipo soxhlet.

**Serie eluotrópica:** es un listado de varios compuestos ordenados según su poder de elución para un adsorbente dado. Tales **series** son útiles para determinar los disolventes necesarios en la cromatografía de una mezcla de compuestos químicos.

## ANEXOS

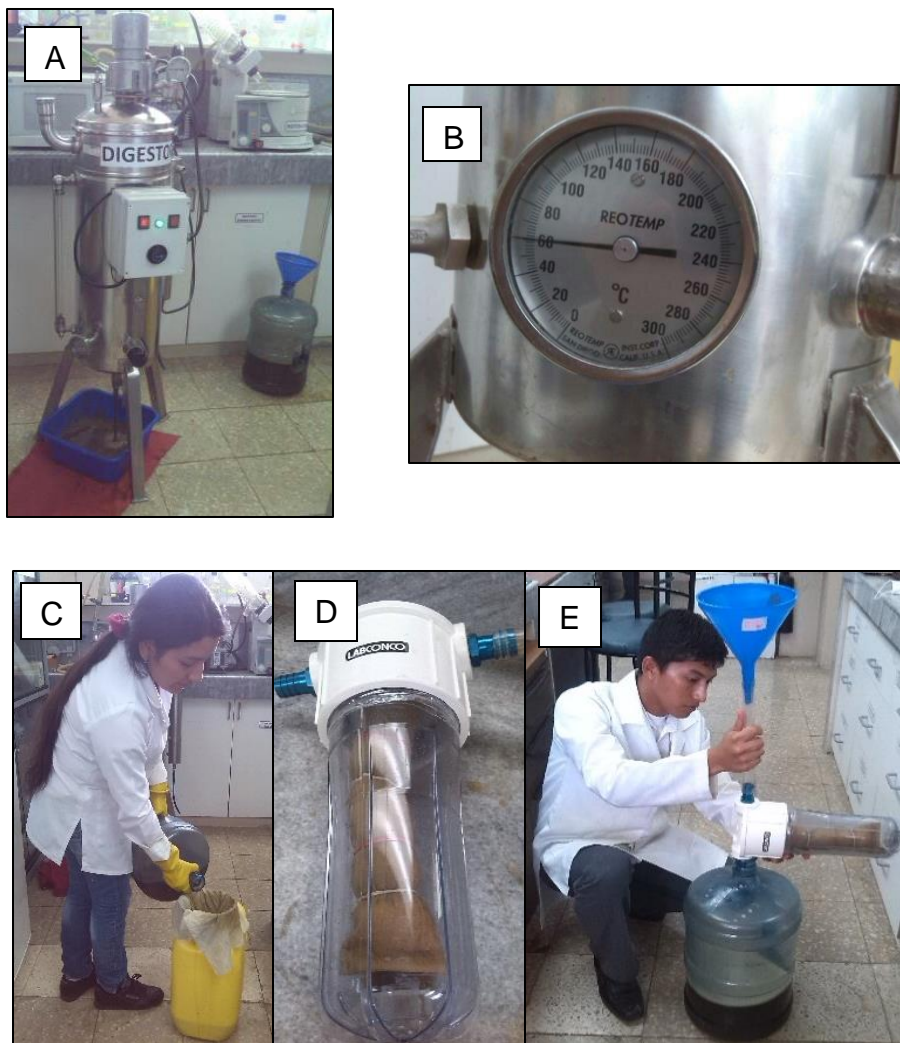
### ANEXO I - Preparación de las hojas de *Stevia*



**Figura A.1. 1.** Preparación de las hojas de las hojas de *Stevia* A) Deshidratación  
B) Molienda C) Tamices utilizados D) Tamaño de partícula de 200  $\mu\text{m}$   
Tamaño de partícula de 500  $\mu\text{m}$   
**Elaborado por:** Autores, 2015

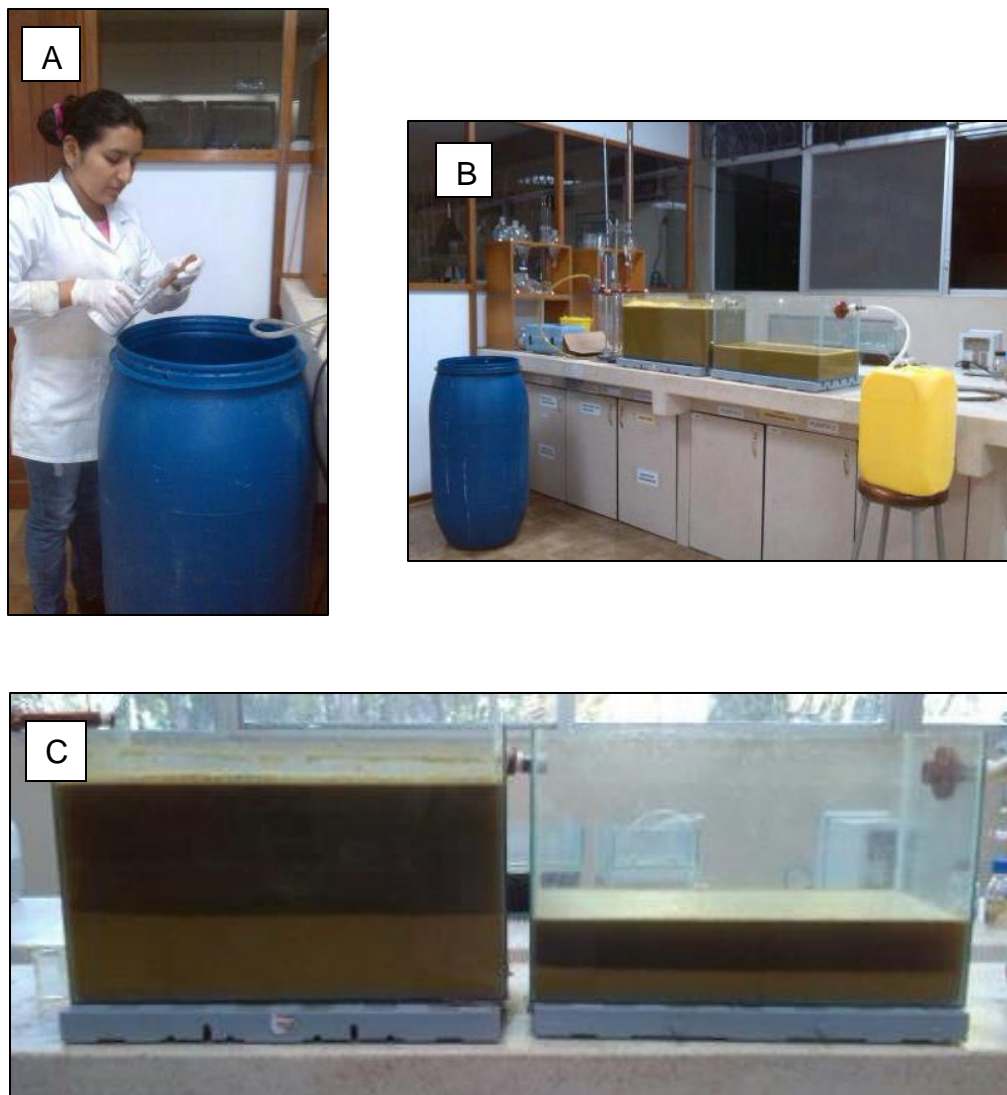
## ANEXO II – Proceso de extracción de glicósidos diterpenoides

### diterpenoides



**Figura A.2. 1.** Extracción de glicósidos diterpenoides y filtración progresiva: A) Digestión B) Control de temperatura C) Filtración con tela D) Filtro compuesto por gasa y papel filtro) E) Filtración del extracto crudo  
**Elaborado por:** Autores, 2015

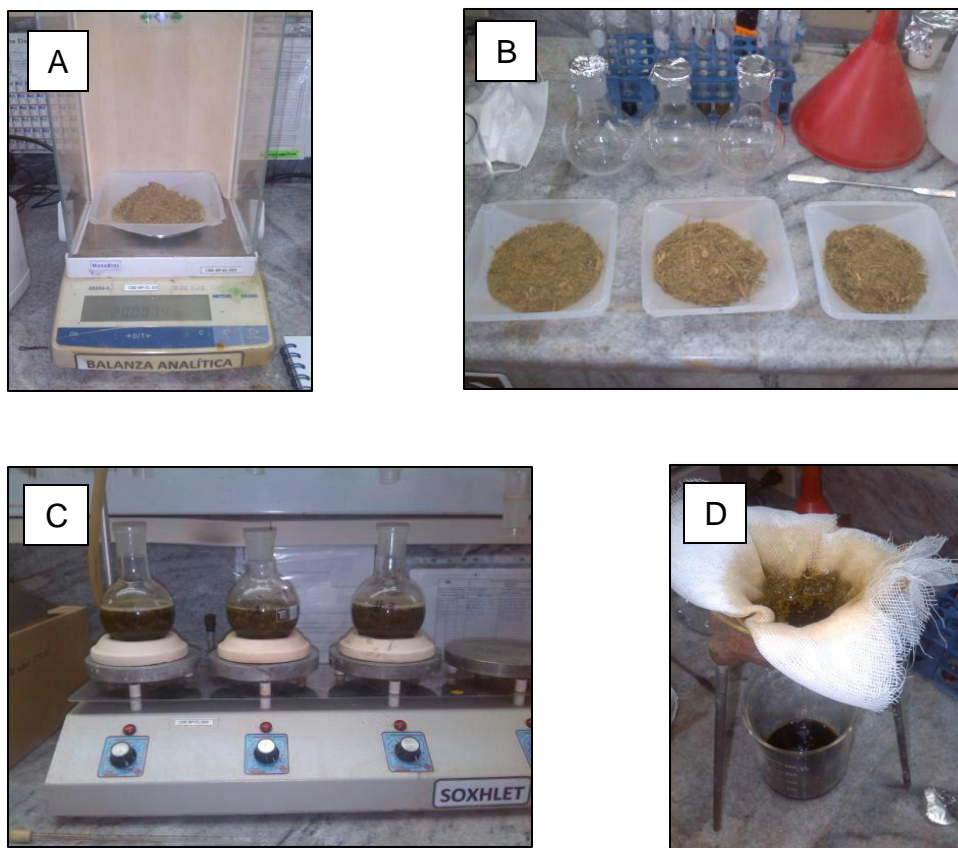
## ANEXO III – Clarificación por precipitación con sales



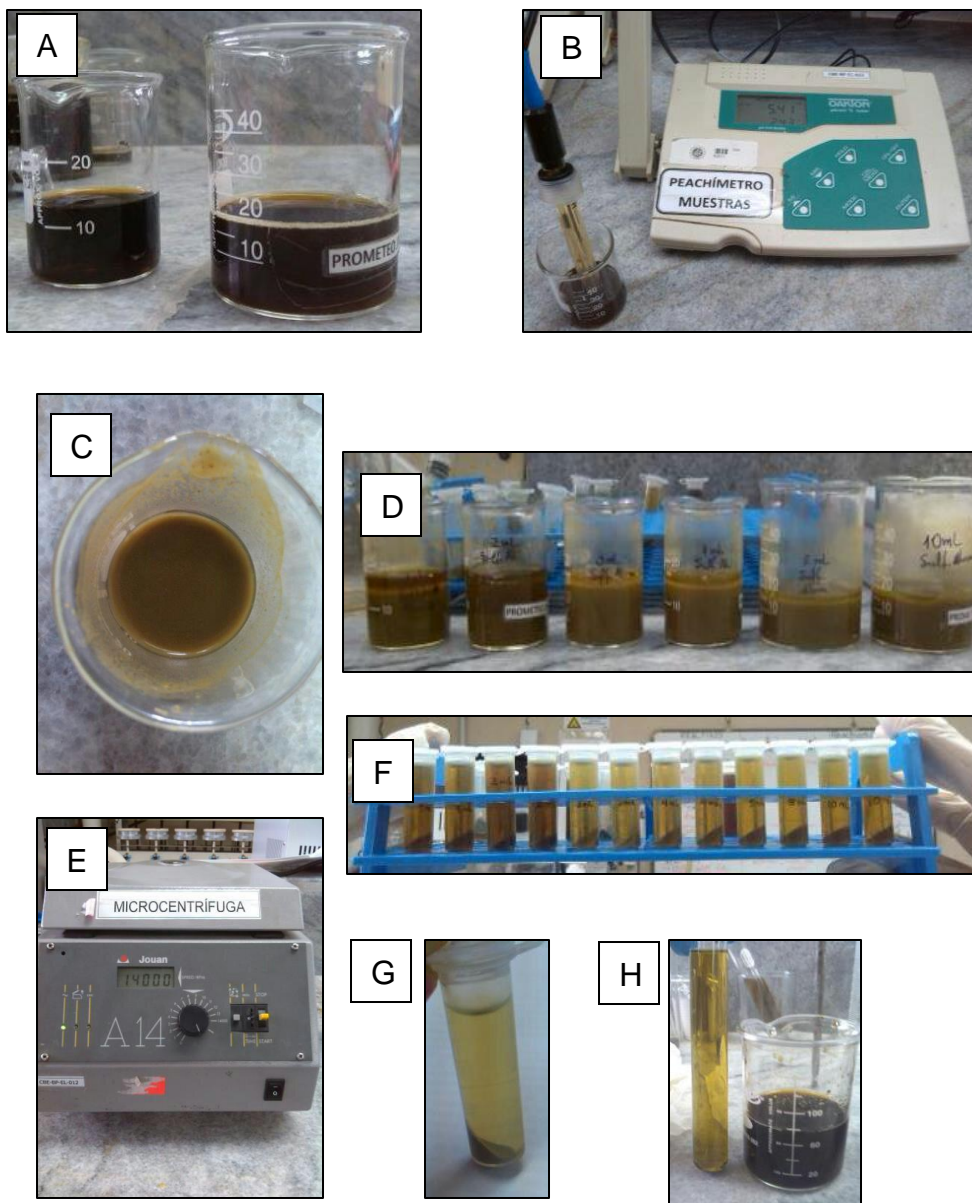
**Figura A.3. 1.** Clarificación del extracto crudo: A) Agregando  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$   
B) Dosificación de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  en los sedimentadores C) Precipitación de los flóculos

**Elaborado por:** Autores, 2015

## ANEXO IV - Proceso de purificación a nivel de laboratorio

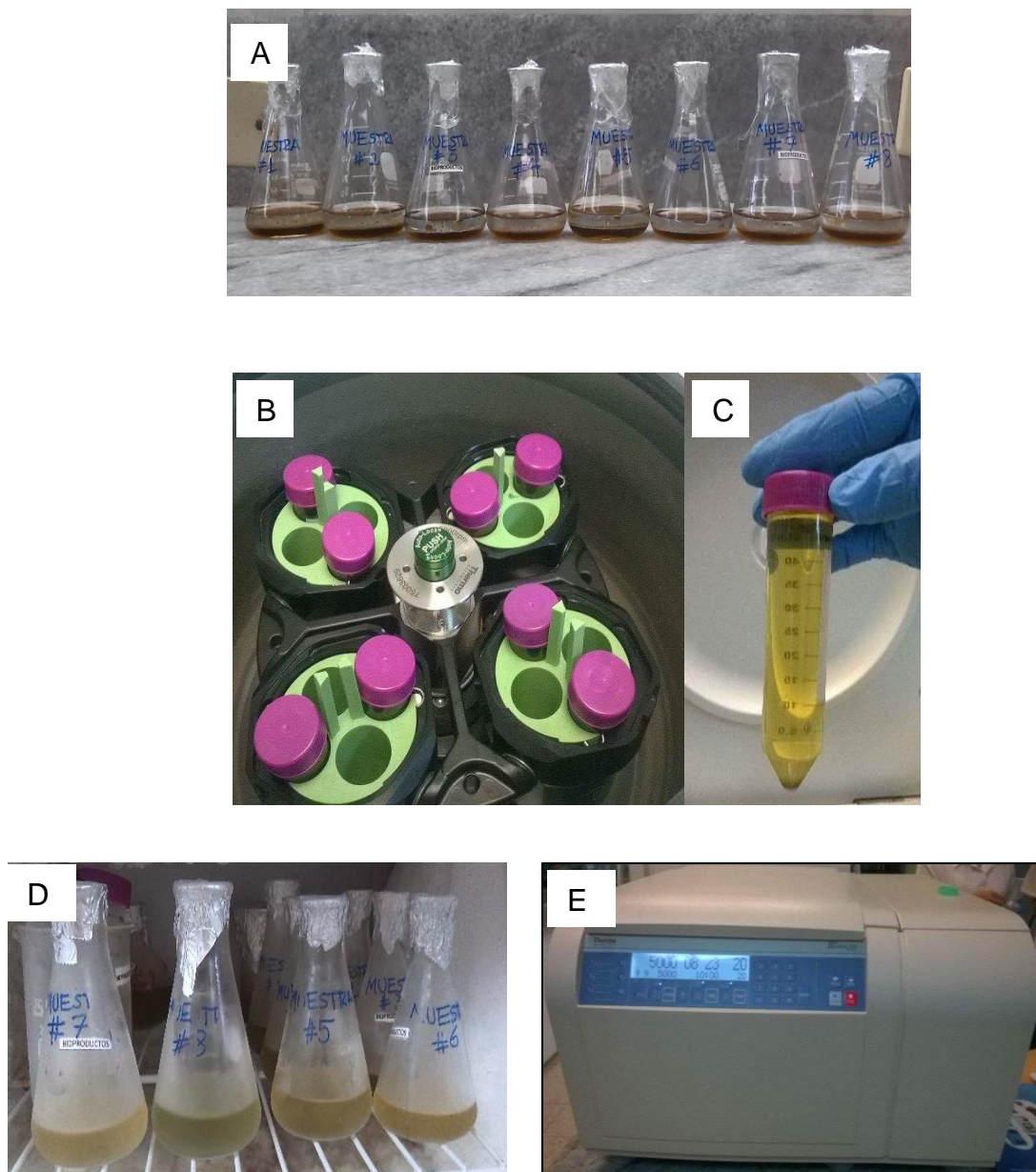


**Figura A.4. 1.** Pruebas de extracciones realizadas en el laboratorio: A) Pesando las hojas trituradas B) Hojas de Stevia trituradas C) Digestión D) Filtración  
**Elaborado por:** Autores, 2015



**Figura A.4. 2.** Clarificación por precipitación con sales: A) Extracto crudo B) Medición de pH C) Extracto al cual se le añadió  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  D) Extractos con  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  E) Centrifugación a 14000 rpm F) Microtubos donde se observa la remoción de color a diferentes concentraciones de sulfato de aluminio G) Extracto clarificado H) Extracto crudo vs Extracto clarificado.

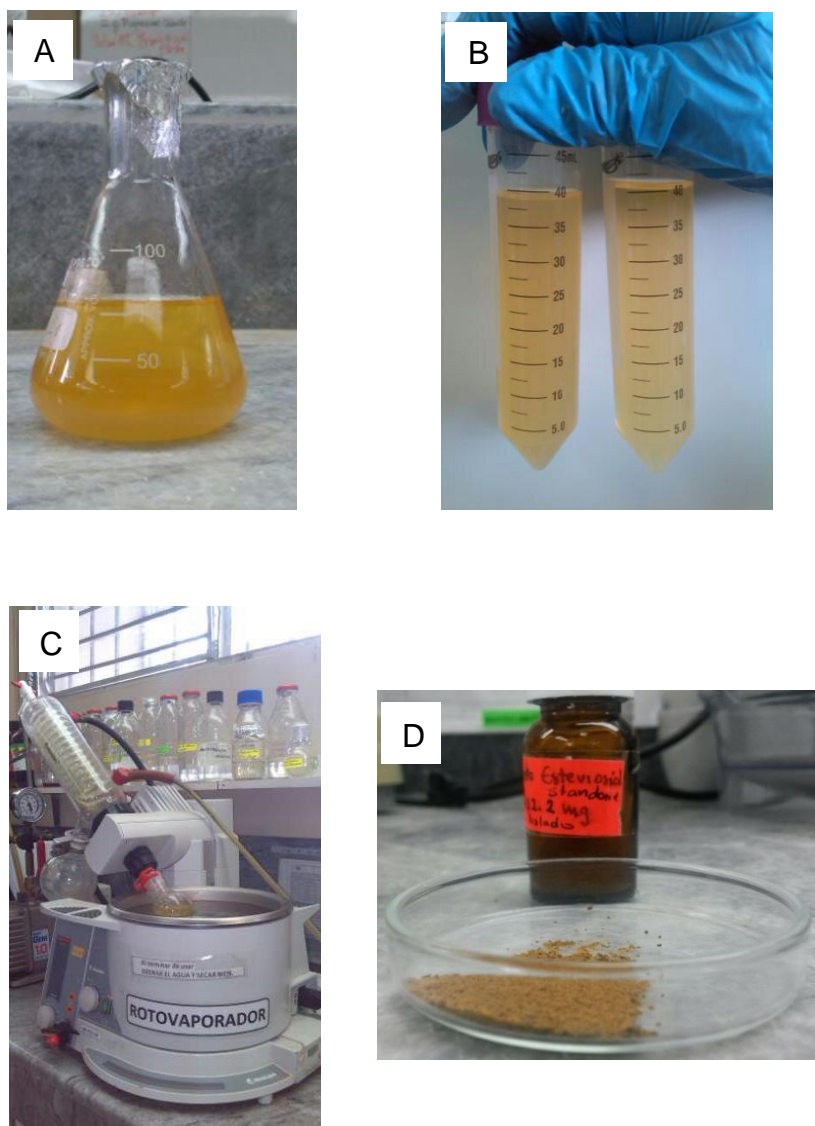
**Elaborado por:** Autores, 2015



**Figura A.4. 3.** Clarificación con solventes: A) Pre-tratamiento con hexano B) Adición de metanol y posterior centrifugación C) Muestra Clarificada E) Extractos clarificados F) Centrifuga Thermo Scientific 1R

**Elaborado por:** Autores, 2015

## ANEXO V - Obtención de estevióside purificado

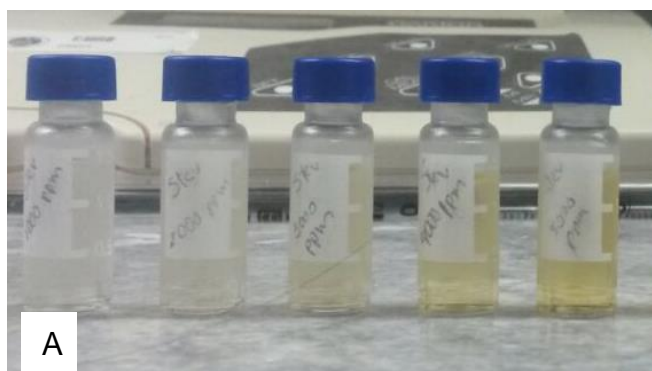


**Figura A5. 1.** Obtención de estevióside puro: A) Precipitación de impurezas con metanol B) Muestras centrifugadas C) Recuperación de solvente D) Cristales de Estevióside.

**Elaborado por:** Autores, 2015



## ANEXO VI - Cuantificación de estevósido en los extractos



**Figura A6. 1.** A) Viales con las muestras de extracto clarificado para analizar en el HPLC B) Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

**Elaborado por:** Autores, 2015

## BIBLIOGRAFÍA

1. Leung , A., & Foster , S. (1996). *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
2. Lavill, e. M., & Nazare, J. (2009). *Diabetes, insulin resistance and sugars. Obesity research*. (Vol. 10).
3. Mendendez de la Granda, M., & Sinclair, A. (2009). *Fatty acids and obesity* (Vol. 15). Curr Pharm Des.
4. Alonso, J. (2010). *Edulcorantes naturales. Natural sweeteners*. Buenos Aires, Argentina: La Granja.

5. Patra, F., Tomar, S., & Arora, S. (2009). *Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria*. (Vol. 74). J Food Sci.
6. Rojas, S., Alfonso , H., Alfonso , R., López, C., Barrera, N., & Osorio, C. (2007). *Stevia. El dulce sabor de tu vida*. Bogota community college.
7. Chang, J. C., Wu, M. C., Liu, I. M., & Cheng, J. T. (2005). *Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats*. (Vol. 37). Hormone and Metabolic Research.
8. Curi, R., Alvarez, M., Bazotte, R. B., Botion, L. M., Godoy , J. L., & Bracht, A. (1986). *Effect of Stevia rebaudiana on glucose tolerance in normal adult humans* (Vol. 19). Brazilian Journal of Medical and Biological Research.
9. Gregersen, S., Jeppesen , P. B., Holst, J. J., & Hermansen , K. (2004). *Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects* (Vol. 53). Metabolism.
10. Chatsudthipong, V., & Muanprasat, T. (2009). *Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness*. Pharmacology & therapeutics.
11. Barriocanal, L., Palacios , M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J., & Jimenez, N. (2008). Apparent lack of pharmacological effect of steviol

glycosides used as sweeteners in humans, a pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in type 1 and type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51, 37-41.

12. Additives, J. F. (2005). *Evaluation of certain food additives*.
13. Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo, S. (2012). *Revolución productiva a través del conocimiento y el talento humano* (Primera ed.). Quito, Ecuador: Ediecuatorial.
14. Landázuri, P., & Tigreiro, J. (2009). *Stevia rebaudiana Bertoni, una planta medicinal* (Primera ed.). Sangolquí, Ecuador: Bol. Téc.
15. Farinango, L. (2013). *Estudio de factibilidad para la creación de una empresa de producción y comercialización de Stevia en la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura*. Ibarra, Ecuador.
16. Stevia del Ecuador. (s.f.). *Stevida. Endulza tu vida con stevia*. Recuperado el 2 de agosto de 2014, de <http://www.steviadelecuador.com/>
17. Mowry, D. B. (1992). *Life with Stevia: How Sweet It Is!* Recuperado el 27 de Agosto de 2014, de Health Freedom Resources: <http://healthfree.com/stevlife.html>
18. Midmore, D. J., & Rango, A. H. (2002). *A new rural industry - Stevia - to replace imported chemical sweeteners*.

19. Satishkumar , J., Sarvanan, M. M., & Seethalakshmi, I. (2008). *In-vitro antimicrobial and antitumor activities of Stevia rebaudiana (Asteraceae) extracts of leaves*. Trop J Pharm.
20. Silva, P. A., Oliveira, D. F., Prado, N. R., Carvalho, D. A., & Carvalho, G. A. (2008). *Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de plantas contra Colletotrichum gloeosporioides (Vol. 32)*. Ciencia y Agrotecnología.
21. Mohan, K., & Robert , J. (2009). *Hepatoprotective effects of Stevia rebaudiana Bertoni leaf extract in CCL4 induced liver damage in albino rats*. (Vol. 3). Med Sci Arom Plant Biotechnology.
22. Oviedo , C. A., Fronciani , G., Moreno, R., & Maas , L. (1970). *Stevia rebaudiana hypoglycemic action (Vol. 209)*. Excerpta.
23. Takahashi, K., Matsuda , M., Ohashi, K., Taniguchi, K., Nakagomi, O., Abe, Y., & et al. (2001). *Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana (Vol. 49)*. Antiviral Research.
24. Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, S., & Shigeta, S. (1998). *In-vitro anti-HIV activity of extract of Stevia rebaudiana (Vol. 37)*. Antiviral Research.
25. Chan, P., Xu, D. Y., Liu, J. C., Tomlinson, B., Huang, W. P., & Cheng, J. T. (1998). *The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats (Vol. 63)*. Life Sci.

26. Lee, C. N., Wong, K. L., Liu, J. C., Chen, Y. J., & Chan, P. (2001). *Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension* (Vol. 67). *Planta Med.*
27. Kedik, S. A., Yartsev, I. E., & Stanishevskaya, I. E. (2009). *Antiviral activity of dry extract of Stevia*. *Pharm Chem.*
28. Sharma, V., & Chattopadya. (s.f.). *Stevia: perspectives as a natural sweetener that emerges*.
29. Ferreira, E. B., de Assis Rocha Neves, F., da Costa, M. A., do Prado, W. A., de Araújo Funari Ferri, L., & Bazotte, R. B. (2006). *Comparative effects of Stevia rebaudiana leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis*. *Planta Med.*
30. Chen, T. H., Chen, S. C., Chan, P., Chun, Y. L., Yang, H. Y., & Cheng, J. T. (2005). *Mechanism of hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of Stevia rebaudiana* (Vol. 71). *Planta Med.*
31. Marín, W. (2004). *Sondeo de mercado de la estevia*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
32. Matsui, M., Matsui, Y., Kawasaki, Y., Oda, T., Noguchi, Y., Kitawa, M., & et al. (1996). *Evaluation of the genotoxicity of steviosido and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays*. *Mutagenesis*.

33. Jiménez, T., Cabrera, G., Álvarez, E., & Gómez, F. (2010). *Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de Stevia rebaudiana Bertoni (kaâ heê) cultivada comercialmente. Estudio preliminar*. Caacupé, Paraguay: Memoria del Instituto de Investigación Ciencias de la Salud.
34. Madan, S., Sayyed, A., Singh, G. N., Kanchan, K., Kumar, Y., Singh, R., & et al. (2010). *Stevia rebaudiana (Bert) Bertoni. A review* (Vol. 3). Indian J. Nat. Prod. Resour.
35. Ferreira, C., & Handro, W. (1988). *Micropropagation of Stevia rebaudiana through leaf explants from adult plants* (Vol. 2). Plant Medic.
36. Sirvaram, L., & Mukundam, U. (2003). *In vitro culture studies on Stevia rebaudiana* (Vol. 39). In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.
37. Orozco, C. (2004). *Situación actual de la Biotecnología en Guatemala*. Consejo Nacional de Áreas Protegidas.
38. Giraldo, C., Marín, L., & Habeych, D. (2005). Obtención de Edulcorantes de Stevia Rebaudiana Bertoni. 36, 1-6.
39. Araujo, A. (2014). La Stevia ecuatoriana llega a EE.UU. *Revista Líderes*.
40. Plaza, J., Martínez, O., & Gil, A. (s.f.). *Libro Blanco del Azúcar*. Madrid: Editores Médicos S.A.

41. Pérez, Y. (2011). *Definición y Clasificación de Edulcorantes*. Recuperado el 3 de Febrero de 2015, de <http://educacionquimica.wordpress.com/2011/06/13/la-quimica-delosalimentos-definicion-y-clasificacion-de-edulcorantes>
42. Chan, P., Linson, B., Chen, Y., Liu, J., Hsieh, M., & Cheng, J. (2000). *A double blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension* (Vol. 50). *British Journal of Clinical Pharmacology*.
43. Méndez, F., & Saravia, R. (2012). *Extracción de un edulcorante natural no calórico a escala de laboratorio a partir de "Stevia rebaudiana Bertoni". Y su aplicación en la industria de alimentos*. San Salvador.
44. Valdés, S., & Ruiz, M. (2009). *Edulcorante en alimentos: aplicaciones y normativas*. Recuperado el 23 de Noviembre de 2014, de Énfasis Alimentación Online: <http://www.alimentacion.enfasis.com/notas/13134-edulcorantes-alimentos-aplicaciones-y-normativas>
45. Sánchez, M. (2014). *Edulcorantes: Utilización y aprovechamiento en diferentes procesos de la industria alimentaria*. 5-88.
46. Abelyan, V., Markosyan, A., & Abelyan, L. (2014). *Procedimiento para preparar rebausióside D de pureza elevada*. 2-6.



47. Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos* (Cuarta ed.). México: Pearson Educación.
48. Shankar, P., Ahuja, S., & Sriram, K. (2013). Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Elsevier Inc.*, 29, 2-6.
49. Dolores, M. (s.f.). *Bioquímica estructural y metabólica*. Recuperado el 3 de febrero de 2015, de <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/bioquimica-estructural-y-metabolica/materiales-de-clase/Tema%206.%20Glucidos.pdf>
50. Borstel, R. (2009). Separation of steviol glycosides.
51. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics. (2012). Use of nutritive and nonnutritive sweeteners. 112, 739-58.
52. Whitehouse, C., Boullata, J., & McCauley, L. (2008). The potential toxicity of artificial sweeteners. 56, 251-9.
53. Xian Greenherb Biotech Co., Ltd. . (s.f.). *Alibaba.com*. Recuperado el 2 de Febrero de 2015, de <http://spanish.alibaba.com/products/neohesperidin-dihydrochalcone-nhdc--512929432.html>
54. Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119-145.
55. Lemus, R., Vega, A., Zura, L., & Kong, A. (2011). Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener. A comprehensive

- review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Elsevier*, 132, 1121-1132.
56. Madan, S., Ahmad, S., Singh, G., Kohli, K., Kumar, Y., & Singh, R. (2010). *Stevia rebaudiana* Bertoni - A review. 1, 1-20.
57. Cortés, J. (2012). Análisis de crecimiento del cultivo de *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) con proyección agroindustrial en el Valle del Cauca. *Tesis de grado*, 32-33. Santiago de Cali.
58. Razo, E. (2011). *Diseño de una planta piloto para la industrialización de Stevia en la comunidad Cueva de Los Monos, cantón Sacha, provincia de Orellana*. Proyecto de grado, Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito.
59. Ahmed, B., Hossain, M., Islam, R., Kumar, A., & Mandal, A. (2011). A review on natural sweetener plant - *Stevia* having medicinal and commercial importance. 1-18.
60. Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S., & Rai, G. (2013). Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(46), 3343-3353.
61. Ceunen, S., & Geuns, J. (2013). Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *Journal of Natural Products*, 76, 1201-1228.
62. Geuns, J. (2003). Stevioside. *Phytochemistry*. 64, 913-921.

63. Bridel, M., & Lavielle, R. (1931). Sur le principe sucre des feuilles de Kaa-he-e. 1123-1125.
64. Afandi, A., Sarijan, S., & Kumar, R. (2013). Optimization of rebaudioside A extraction from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) and quantification by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science.*, 1(1), 62-70.
65. Jarma , A., Combatt, E., & Cleves, J. (2010). Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. 28(2), 199-208.
66. Kumari, M., & Chandra , S. (2014). A sweet medicinal herb *Stevia rebaudiana*: Perspectives in therapeutics. 1(1), 1-10.
67. Yadav, A., Singh, S., Dhyan , D., & Ahuja, P. (2012). A review on the improvement of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal Plant Sci.*, 91, 1-27.
68. Jain, P., Kachhwaha, S., & Kothari, S. (2014). Biotechnology and metabolic engineering of *Stevia rebaudiana* (BERT.) Bertoni: Perspective and possibilities. *International Journal of life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 3(3), 1-15.
69. Mondaca, R., V-Galvez, A., Z-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high potency natural sweetener: A

comprehensive review on the biochemical and functional aspects. *Food Chem*, 132, 1121-1132.

70. Abou-Arab, A., & Abu-Salem, M. (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners stevioside produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 4, 269-281.
71. Atteh, J., Onagbesan, O., Tona, K., Decuyper, E., Geuns, J., & Buyse, J. (2008). Evaluation of supplementary *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: Effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92, 640-649.
72. Barriocanal, L. A., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J. T., & et al. (2008). *Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics* (Vol. 51). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.
73. Tadhani, M., & Endo, T. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J. Food Compos. Anal.*, 20, 323-329.
74. Jeppesen, P., Gregersen, S., Poulsen, R., & Hermansen, K. (2000). Stevioside acts directly on pancreatic  $\beta$  cells to secrete insulin: actions

- independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> - channel activity. *Metabolism*, 149(2), 208-214.
75. Hsieh, M., & Goodman, H. (2005). The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Phys*, 138(2), 641-653.
76. Geuns, M. (2010). *Estevia y Glucósidos de Esteviol. Propiedades, técnicas, usos, exposición, toxicología, efectos farmacológicos.* 7-12.
77. ESPOL, C. (2012). *Productos naturales de interés agrícola y farmacológico.* Guayaquil, Guayas, Ecuador.
78. Macía, E., & Monesterolo, V. (s.f.). *Evaluación de los procesos de extracción y purificación de los compuestos endulzantes de la hoja de Stevia rebaudiana.* Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María, Córdoba.
79. McCabe, W., Smith, J., & Harriott, P. (1998). *Química, Operaciones Unitarias en Ingeniería* (Cuarta ed.). Madrid, España: McGraw-Hill.
80. Varcárcel, M., & Gómez, A. (1994). *Técnicas Analíticas de Separación.* Barcelona, España: Editorial Reverté S.A.
81. Geankoplis, C. (1998). *Procesos de transporte y operaciones unitarias* (Tercera ed.). México: Compañía Editorial Continental S.A de C.V.

82. Abril, N., Bárcena, A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Túnez, I. (2011). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. 1-3.
83. Miller, J., & Miller, J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica* (Cuarta ed.). (I. Capella, Ed.) Madrid, España: Pearson Education, S.A.
84. Manzano, P. (2010). AUTO SOSTENIBILIDAD ENERGÉTICA EN ZONAS RURALES DE LA COSTA ECUATORIANA: CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DE LA ESPECIE *Ricinus Communis* sp. (higuerilla) para la producción de biodiesel. Guayaquil, Ecuador.
85. Dacome, S., Cleuza, C., da Costa, C., Fontana, J., Adelman, J., & da Costa, S. (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, 3587-3594.
86. Roth, J., Qiang, X., Marban, S. L., Redelt, H., & Lowell, B. C. (2004). *The obesity pandemic. Where have we been and where are we going?*

87. Cohen, A. M., Teitelbaum, A., Balogh, M., & Groen, J. J. (1966). *Effect of interchanging bread and sucrose as main source of carbohydrate in a low fat diet on the glucose tolerance curve of healthy volunteer subjects*. 19.
88. Anton, S., Martin, C., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W., Geiselman, P., & Williamson, D. (2010). *Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels*.
89. Gearhardt, Ashley, N., Carlos, M., DiLeone, Ralph, J., Brownell, & et al. (2011). *Can food be addictive? Public health and policy implications*.
90. Benton, D. (2010). *The plausibility of sugar addiction and its role in obesity and eating disorders*. Clinical Nutrition.
91. Gil, A., & Ramírez, M. (2001). *Azúcares y derivados*. (J. Aranceta, Ed.) Guías alimentarias para la población española.
92. Llanos, G. (2006). Producción y comercialización de Stevia rebaudiana Bertoni. 1-73.
93. Soto, & Del Val. (2002). Extracción de los principios edulcorantes de la Stevia rebaudiana. 20, 56-65.
94. Gutierrez, A. (2002). Coordinación Jugos, Miel, Azucarados y Productos Derivados. 1-12.
95. Romo, J. (2006). Análisis de un proceso de adaptación de Stevia rebaudiana Bertoni (de origen paraguaya) en seis abonos orgánicos para

fomentar su cultivo y mejorar rendimientos en la parroquia de Sevilla cantón Cascales. 1-37.

96. García, J., Casado, G., & García, J. (2013). Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutrición Hospitalaria*, 17-21.
97. Shankar, P., Ahuja, S., & Sriram, K. (2013). Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Elsevier*, 29, 2-6.
98. Badui, S., Mendoza, N., & Pedroza, R. (s.f.). *Hablemos Claro*. Recuperado el 3 de Febrero de 2015, de <http://www.hablemosclaro.org/ingrepedia/extracto-luo-han-guo.aspx#.VTAA1dyG-So>