

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA



TESIS

**Determinación de las condiciones de extracción y purificación de
rebaudiósido A de hojas de *Stevia rebaudiana***

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

QUE PRESENTA:
IBT. ERIK MOLINERO ORTIZ

Asesor de tesis
D.I. MA. GUADALUPE GARNICA ROMO
Co asesor
D.C. CARLOS RUBÉN SOSA AGUIRRE

Morelia, Michoacán, México.

Octubre de 2021

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO II.....	8
2. ANTECEDENTES	8
2.1. <i>Stevia rebaudiana</i>	8
2.1.1. Glucósidos de esteviol.....	9
2.2. Glucosiltransferasas.....	12
2.2.1. UDP-glucosiltransferasas	13
2.3. Síntesis	13
2.4. Transformación enzimática en productos de <i>Stevia</i>	15
2.5. Rebaudiósido A.....	15
2.6. Biosíntesis de rebaudiósido D y M.....	16
2.7. Extracción y purificación de glucósidos de esteviol	18
2.7.1 Proceso de extracción.....	19
2.7.2. Procesos de clarificación.....	20
2.7.3. Proceso de purificación de glucósidos de esteviol.....	21
2.7.4. Proceso de concentración de glucósidos de esteviol.....	22
2.8. Proceso de secado de glucósidos de esteviol	22
2.9. Purificación de rebaudiósido A	23
2.10. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).....	24
CAPÍTULO III.....	25

3. JUSTIFICACIÓN	25
CAPÍTULO IV.....	26
4. HIPÓTESIS.....	26
CAPITULO V.....	27
5. OBJETIVO GENERAL	27
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
CAPÍTULO VI.....	28
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	28
CAPÍTULO VII.....	29
7. MATERIALES Y MÉTODOS	29
7.1. Materia prima, materiales y reactivos.....	29
7.2. Extracción en agua caliente	29
7.3. Extracción por ultrasonido.....	29
7.4. Floculación y barrido de pH	30
7.5. Clarificación.....	30
7.6. Concentración y purificación de glucósidos de esteviol por adsorción.....	31
7.7. Purificación por cromatografía de intercambio iónico	31
7.8. Concentración	32
7.9. Secado	32
7.10. Cristalización de rebaudiósido A	32
7.11. Análisis de glucósidos de esteviol por técnica HPLC	33
7.12. Curvas de calibración de rebaudiósido A y esteviósido	33
CAPITULO VIII.....	35
8. RESULTADOS	35

8.1. Curvas de calibración en HPLC para la cuantificación de Reb A y esteviósido	35
8.2. Extracción y purificación de glucósidos de esteviol	37
8.2.1. Extracción en agua caliente.....	37
8.2.2. Extracción por ultrasonido	38
8.3. Floculación y barrido de pH	40
8.4. Clarificación.....	41
8.5. Concentración de glucósidos de esteviol por adsorción en resina macroporosa	42
8.6. Purificación por cromatografía de intercambio iónico	44
8.7. Secado	45
8.8. Cristalización de rebaudiósido A.....	46
8.8.1. Prueba de saturación a 15 % sólidos.....	47
8.8.1.1. Primer extracto de <i>Stevia</i>	48
8.8.1.2. Segundo extracto de <i>Stevia</i>	49
8.8.2. Prueba de saturación a 56 % sólidos.....	50
8.8.2.1. Primer extracto de <i>Stevia</i>	51
8.8.2.2. Segundo extracto de <i>Stevia</i>	52
8.9. Análisis estadístico.....	54
8.9.1. Análisis de rendimiento de rebaudiósido A	55
8.9.2. Análisis de pureza de rebaudiósido A.....	66
CAPÍTULO IX.....	74
9. DISCUSIÓN.....	74
CAPÍTULO X.....	79
10. CONCLUSIÓN	79
CAPÍTULO XI.....	80
11. RECOMENDACIONES	80

CAPÍTULO XII.....	81
12. REFERENCIAS.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

Tabla 1: Tabla de Edulcorantes.....	5
-------------------------------------	---

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

Tabla 2: Principales glucósidos de esteviol encontrados en hojas de <i>Stevia</i> ...	11
---	----

CAPÍTULO VIII

RESULTADOS

Tabla 3: Curva de calibración para la cuantificación de rebaudiósido A en el proceso de extracción y purificación de rebaudiósido A.....	35
--	----

Tabla 4: Curva de calibración para la cuantificación de esteviósido en el proceso de extracción y purificación de rebaudiósido A.....	36
---	----

Tabla 5: Contenido de glucósidos de esteviol en etapa de extracción con calor	38
---	----

Tabla 6: Glucósidos de esteviol en extracción por ultrasonido.....	39
--	----

Tabla 7: Comparativo de resultados obtenidos entre los métodos de extracción con agua caliente y el asistido por ultrasonido.....	40
---	----

Tabla 8: Contenido de glucósidos de esteviol en el proceso de extracción a pH optimo	41
--	----

Tabla 9: Comparativo en el desempeño del sistema de intercambio iónico utilizando jugo pasado, o no, por el proceso de adsorción	45
--	----

Tabla 10: Rendimientos globales de proceso en la obtención de TGS.....	46
--	----

Tabla 11: Rebaudiósido A en los extractos de <i>Stevia</i>.....	46
Tabla 12: Resultados en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 15 % de sólidos con el primer extracto de <i>Stevia</i>	48
Tabla 13: Resultados en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 15 % de sólidos con el segundo extracto de <i>Stevia</i>.....	49
Tabla 14: Resultados en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 56 % de sólidos con el primer extracto de <i>Stevia</i>	51
Tabla 15: Resultados en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 56 % de sólidos con el segundo extracto de <i>Stevia</i>.....	52
Tabla 16: Resumen de resultados en pruebas de cristalización de rebaudiósido A de los extractos de <i>Stevia</i>.....	54
Tabla 17: Datos experimentales en pruebas de cristalización	55
Tabla 18: Prueba de Shapiro Wilk en análisis de normalidad para el rendimiento en los tratamientos de cristalización.....	56
Tabla 19: Resumen de ajuste en análisis anova en los tratamientos de cristalización.....	57
Tabla 20: Análisis de varianza para análisis anova en los tratamientos de cristalización.....	57
Tabla 21: Comparación para todos los pares utilizando Tukey-Kramer HSD en los tratamientos de cristalización	58
Tabla 22: Comparación de medias en análisis anova en los tratamientos de cristalización.....	58
Tabla 23: Resumen de ajuste en análisis anova para las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización.....	59
Tabla 24: Análisis de varianza en mezclas etanol: agua para análisis anova en los tratamientos de cristalización.....	60

Tabla 25: Límites de confianza en mezclas etanol: agua para análisis anova en los tratamientos de cristalización.....	60
Tabla 26: Comparación de medias en análisis de mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización.....	61
Tabla 27: Resumen de ajuste en análisis anova para el porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización.....	62
Tabla 28: Análisis de varianza en el porcentaje de sólidos para análisis anova en los tratamientos de cristalización.....	62
Tabla 29: Límites de confianza en el porcentaje de sólidos para análisis anova en los tratamientos de cristalización.....	63
Tabla 30: Comparación de medias en análisis del porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización.....	63
Tabla 31: Resumen de ajuste en análisis anova para los extractos de <i>Stevia</i> en los tratamientos de cristalización.....	64
Tabla 32: Análisis de varianza en los extractos de <i>Stevia</i> para análisis anova en los tratamientos de cristalización.....	65
Tabla 33: Límites de confianza en los extractos de <i>Stevia</i> para análisis anova en los tratamientos de cristalización.....	65
Tabla 34: Comparación de medias en análisis de los extractos de <i>Stevia</i> en los tratamientos de cristalización.....	66
Tabla 35: Prueba de Shapiro Wilk en análisis de normalidad para el grado de pureza en los tratamientos de cristalización.....	67
Tabla 36: Sumas de rango en prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis en tratamientos de cristalización.....	68
Tabla 37: Prueba de χ^2 cuadrada en tratamientos de cristalización.....	68
Tabla 38: Sumas de rango en prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis para las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización.....	69

Tabla 39: Prueba de 2 muestras para las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización	69
Tabla 40: Prueba de ji cuadrada para las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización	70
Tabla 41: Sumas de rango en prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis para el porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización	71
Tabla 42: Prueba de 2 muestras para el porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización	71
Tabla 43: Prueba de ji cuadrada para el porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización	71
Tabla 44: Sumas de rango en prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis para los extractos de <i>Stevia</i> en los tratamientos de cristalización	72
Tabla 45: Prueba de 2 muestras para los extractos de <i>Stevia</i> en los tratamientos de cristalización	72
Tabla 46: Prueba de ji cuadrada para los extractos de <i>Stevia</i> en los tratamientos de cristalización	73

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

Figura 1: Cultivo de <i>Stevia</i>	8
Figura 2: Estructura del esteviol	11
Figura 3: Ruta biosintética de glucósidos de esteviol	14
Figura 4: Representación tridimensional de la UDP-Glucosil transferasa 76G1	15
Figura 5: Rebaudiósido A	16
Figura 6: Rebaudiósido D	17
Figura 7: Rebaudiósido M.....	18
Figura 8: Diagrama de flujo para la extracción y purificación de TSG y Reb A.	19

CAPÍTULO VIII

RESULTADOS

Figura 9: Curva de calibración para la cuantificación de rebaudiósido A en el proceso de extracción y purificación de rebaudiósido A	36
Figura 10: Curva de calibración para cuantificación de esteviósido en el proceso de extracción y purificación de rebaudiósido A.....	37
Figura 11: Extracto de hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	38
Figura 12: Relación entre la potencia y la extracción de los TGS	39
Figura 13: Floculación de sólidos suspendidos en extracto de <i>Stevia</i> a pH 10	40
Figura 14: Transmitancia de la luz a través de tierra de diatomeas en suspensión	42
Figura 15: Curva de adsorción de glucósidos de esteviol	43

Figura 16: Coloración de las soluciones de alimentación al sistema de intercambio iónico	44
Figura 17: Cromatograma de segundo extracto de <i>Stevia</i>	47
Figura 18: Muestras en etapa inicial de cristalización de rebaudiósido A en prueba de saturación a 15 % de sólidos	47
Figura 19: Cromatograma en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 15 % de sólidos con el primer extracto de <i>Stevia</i>	49
Figura 20: Cromatograma en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 15 % de sólidos con el segundo extracto de <i>Stevia</i>.	50
Figura 21: Cristales de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 15 % de sólidos.....	50
Figura 22: Muestras en etapa inicial de cristalización de rebaudiósido A en prueba de saturación a 56 % de sólidos	51
Figura 23: Cromatograma en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 56 % de sólidos con el primer extracto de <i>Stevia</i>	52
Figura 24: Cromatograma en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 56 % de sólidos con el segundo extracto de <i>Stevia</i>.	53
Figura 25: Cristales de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 56 % de sólidos.....	53
Figura 26: Rendimiento de rebaudiósido A en análisis anova en los tratamientos de cristalización	56
Figura 27: Rendimiento de rebaudiósido A en análisis anova para las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización.....	59
Figura 28: Rendimiento de rebaudiósido A en análisis anova para el porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización	61
Figura 29: Rendimiento de rebaudiósido A en análisis anova para los extractos de <i>Stevia</i> en los tratamientos de cristalización	64

Figura 30: Pureza de rebaudiósido A en análisis de Wilcoxon para los tratamientos de cristalización	67
Figura 31: Pureza de rebaudiósido A para las mezclas etanol: agua en análisis de Wilcoxon en los tratamientos de cristalización.....	69
Figura 32: Pureza de rebaudiósido A para el porcentaje de sólidos en análisis de Wilcoxon en los tratamientos de cristalización.....	70
Figura 33: Pureza de rebaudiósido A para los extractos de <i>Stevia</i> en análisis de Wilcoxon en los tratamientos de cristalización.....	72

RESUMEN

Rebaudiósido A es uno de los principales productos de la planta *Stevia rebaudiana* y es uno de los llamados glucósidos de esteviol más abundantes en la planta, con un sabor más dulce y poco resabio amargo, el cual es utilizado como edulcorante no calórico natural en industria alimentaria. En el presente trabajo se realizó la cristalización de rebaudiósido A a partir de extractos de hojas de *Stevia rebaudiana*, con la intención de entender mejor el comportamiento de este glucósido en el proceso de cristalización en cuanto a factores como: solvente de dilución y cristalización, saturación de sólidos en la solución y concentración de rebaudiósido A en los extractos, esto con el propósito de diseñar metodologías que permitan obtener rebaudiósido A de alta pureza, que pueda ser utilizado como uno de los sustratos principales, en metodologías de síntesis de rebaudiósidos más complejos, como lo son, los rebaudiósidos D y M, capaces de dar mayor dulzor y menor resabio amargo, además de poder ser utilizado como edulcorante no calórico de calidad y resabio amargo reducido. Los resultados obtenidos mostraron que el rebaudiósido A cristaliza mejor en concentraciones de disolvente etanol: agua entre el 60 - 70 % de etanol, la saturación de la solución favorece la cristalización, entre el 50 - 60 % de sólidos y entre mayor la cantidad de rebaudiósido A en los extractos mayor el rendimiento en la cristalización. En cuanto a la pureza en los cristalizados, se obtuvieron cristalizados entre el 75 – 95 % de pureza de rebaudiósido A con rendimientos entre el 19 - 97 % de rebaudiósido A. Por otra parte, se diseñaron las etapas para la obtención de extractos puros de glucósidos de esteviol a partir de hojas de *Stevia rebaudiana* tales como extracción y purificación de glucósidos de esteviol.

Palabras clave: rebaudiósido D, rebaudiósido M, glucósidos de esteviol, edulcorante, resabio amargo.

ABSTRACT

Rebaudioside A is one of the main products of the *Stevia rebaudiana* plant and is one of the so-called steviol glycosides more abundant in the plant, with a sweeter taste and little bitter aftertaste, which is used as a natural non-caloric sweetener in food industry. In the present work, the crystallization of rebaudioside A was carried out from extracts of *Stevia rebaudiana* leaves, with the intention of better understand the behavior of this glucoside in the crystallization process in terms of factors such as: dilution solvent and crystallization, saturation of solids in the solution and concentration of rebaudioside A in the extracts, this with the purpose of designing methodologies that allow obtain rebaudioside A of high purity, which can be used as one of the main substrates, in methodologies of synthesis of rebaudiosides more complex, such as rebaudiosides D and M, capable of giving greater sweetness and less bitter aftertaste, as well as being able to be used as a quality non-caloric sweetener and reduced bitter aftertaste. As results it was possible to obtain that rebaudioside A crystallizes better in concentrations of ethanol: water solvent between 60 – 70 % ethanol, the saturation of the solution favors crystallization, between 50 – 60 % solids and the greater the amount of rebaudioside A in the extracts, the higher the yield in crystallization. Regarding the purity of the crystallized, crystallized between 75 – 95 % purity of rebaudioside A were obtained with yields between 19 – 97 % of rebaudioside A. On the other hand, the steps were designed to obtain pure extracts of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves such as extraction and purification of steviol glycosides.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Todos los animales, incluidos los humanos, necesitan comer para sobrevivir. Se sabe que no es posible comer cualquier cosa por ejemplo se puede comer madera o tierra, pero estas cosas realmente no califican como comida porque no nos dan ningún tipo de nutrición. Entonces la manera por la cual los animales distinguen a los alimentos o comida, es a través del gusto (Singla y Jaitak, 2016). El gusto se divide en 5 grandes grupos y cada uno de ellos genera una señal que le dice algo al consumidor del propio alimento para que podamos decidir si se debe o no comer. Los 5 grupos básicos son:

- Dulzura, este sabor se asocia a la presencia de azúcar la cual le da al cuerpo energía rápida y carbohidratos que reponen las reservas de energía en nuestros cuerpos.
- Salado, este sabor se asocia con la regulación de la homeostasis de iones y agua en el cuerpo. De tal manera los productos muy salados o con alta concentración de sal tienden a dar respuestas de rechazo en el cuerpo.
- Agrio, el gusto agrio ayuda a detectar la presencia de ácidos en los alimentos, ayudando a evaluar si el alimento es bueno o malo para comer, la madurez de frutas o el grado de fermentación de un alimento.
- Amargo, este sabor se asocia como un fuerte marcador de toxinas que naturalmente tienden a ser rechazadas por el consumidor para protegernos de sus efectos nocivos. Sin embargo, en pequeñas cantidades el consumidor aprende a distinguir algún efecto positivo en el cuerpo derivado de dichos productos como es el caso de la cafeína.
- Umami, este sabor se asocia al gusto por la proteína que se encuentra en abundancia en alimentos como carne, huevos, leche, entre otros.

Así, la dulzura se genera en alimentos a través de la presencia de azúcares los cuales pueden ser propios del alimento como es el caso de las frutas o pueden ser adicionados de manera externa como es el caso de bebidas. Esto por interacción con células receptoras del gusto y elementos de señalización, todos estos ubicados en la

cavidad oral, así como papilas gustativas presentes en la lengua. El receptor de sabor dulce pertenece a la clase C en la familia de receptores acoplados a proteínas G (C-GPCR). La recepción del sabor dulce comienza con la activación del receptor heterogéneo, compuesto por una combinación de proteínas hTAS1R2 y hTAS1R3. En contraste con la singular detección basada en receptores de sabor dulce, receptores de sabor amargo pertenecen a la familia de receptores frizzled del receptor acoplado a la proteína G. La transducción del sabor amargo en humanos está mediada por 25 receptores de la familia del gen hTAS2R que es agrupado en cromosomas 5p15, 7q31 y 12p13. Las hTAS2R tienen entre 290 y 333 aminoácidos de largo, tienen siete hélices transmembrana (TM1-TM7), una terminal amino corta extracelular y una terminal carboxilo intracelular. 25 receptores hTAS2R4 están involucrados en la activación de sabor amargo para estevósido y rebaudiósido A (Singla y Jaitak, 2016). Pero, el mecanismo molecular / estructural detrás de la amargura aún se desconoce.

El hecho de que el azúcar sea la fuente de energía más disponible para el cuerpo humano, hace que éste sea incorporado en diversas formulaciones de productos de alimentos en todo el mundo. Sin embargo, la industria alimenticia no sólo ha utilizado a diversos azúcares como edulcorantes, sino que ha desarrollado otros tipos de edulcorantes de tal manera que podemos encasillarlos en 2 grandes grupos como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Tabla de Edulcorantes

Calóricos				NO Calóricos	
Naturales		Artificiales		Naturales	Artificiales
Azúcares	Edulcorantes Naturales Calóricos	Azúcares modificados	Alcoholes del azúcar	Edulcorantes Naturales sin Calorías	Edulcorantes Artificiales
Sacarosa	Miel	Jarabe de alta fructosa de maíz	Sorbitol	Stevia	Aspartame
Glucosa	Jarabe de maple	Caramelo	Xilitol	Taumatina	Sucralosa
Dextrosa	Azúcar de Palma	Azúcar invertido	Manitol	Pentadina	Sacarina
Fructosa	Jarabe de agave		Eritritol	Monelina	Neotamo
Lactosa	Jarabe de sorgo		Maltitol	Brazzeína	Acesulfame k
Maltosa			Isomaltulosa		Ciclamato
Galactosa			Lactitol		Neohesperidina DC
Trehalosa			Glicerol		Alitamo
Tagatosa					Advantamo
Sucromalt					

Dentro de la industria alimenticia el dulzor es de vital importancia en gran parte de los productos que ésta genera. En la actualidad, el mercado está experimentando una relación con los endulzantes de amor y odio. Amor porque es precisamente el dulzor el sabor que hace al consumidor que en general agrade un producto, y odio porque en la actualidad se asocia el dulzor a riesgos a la salud del consumidor debido a posibles trastornos en el metabolismo de dichos azúcares, como diabetes, y otras enfermedades de igual importancia como lo son la hipertensión, enfermedades

cardiovasculares entre otras (Savita *et al.*, 2004). Por ejemplo, un número creciente de consumidores hoy día desean reducir la ingesta de azúcar y están buscando alternativas de edulcorantes que tomen su lugar. De acuerdo a la encuesta de alimentos y salud realizada en 2019 por la Fundación del Consejo Internacional de Información de Alimentos (IFIC, por sus siglas en inglés), más de 3 de cuatro consumidores hoy día dicen que están tomando medidas para limitar o evadir los azúcares en sus dietas.

Más aún, existen un buen número de países, entre los cuales se encuentra México, que han modificado sus legislaciones para advertir al consumidor de alimentos del contenido calórico de los mismos, así como del aporte de azúcares y grasas presentes en el mismo. En México dicha legislación se encuentra plasmada en la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010. No es sorpresa, que lo anterior este teniendo efecto en las ventas de marcas y desarrollo de productos, con un número significativo de consumidores que están pendientes de eliminar ciertos alimentos de sus dietas para reducir el consumo de azúcar. Con ambos, azúcar y edulcorantes artificiales, sufriendo de una pobre percepción del mercado, esto deja a los desarrolladores de productos con muy pocas opciones. Sin embargo, los edulcorantes naturales son vistos como una opción más favorable, y se están convirtiendo en una opción viable.

En respuesta a la problemática previamente descrita, los productores de alimentos abrazaron al inicio a la *Stevia* como una alternativa para la reducción de azúcar en sus productos, principalmente bebidas como jugos, aguas saborizadas y sodas. Los extractos de hoja de *Stevia* se han vuelto tan populares en esta categoría, que alrededor de una de cada cuatro bebidas a nivel global hoy día contienen edulcorantes basados en *Stevia*. Sin embargo, la incorporación de *Stevia* en alimentos no ha sido sencilla principalmente por la presencia de un resabio amargo en el producto que obliga a la incorporación de agentes modificantes y enmascarantes de dicho sabor para su aplicación (Dornblaser, 2017). Hoy día, se han llevado a cabo desarrollos con los extractos de *Stevia* para reducir el resabio amargo presente en dichos productos, llevando a la producción de 2 glucósidos de esteviol, que presentan alto poder edulcorante sin presencia de amargor. Estas moléculas se les conocen como

Rebaudiósido D y Rebaudiósido M (Cargill, 2019). Dichas moléculas se sintetizan a partir de uno de los rebaudiósidos más abundantes dentro de la planta de *Stevia rebaudiana*, que es el rebaudiósido A. Así, el presente trabajo sienta las bases para la obtención del rebaudiósido A, a partir de hojas de *S. rebaudiana*, con la finalidad de ser utilizado en trabajos futuros como materia prima para la transformación de dicho rebaudiósido a las moléculas de bajo amargor que son los rebaudiósidos D y M.

En base a la información existente de que los glucósidos de esteviol no pueden ser metabolizados por el ser humano y que únicamente se metaboliza el esteviol, una vez liberado en nuestro sistema digestivo por efecto de la flora intestinal. Los niveles de consumo de glucósidos de esteviol son calculados usando al esteviol como referencia. Para el resto de glucósidos de esteviol se considera el mismo valor transformando a equivalentes de esteviol. Bajo esta consideración el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha definido como valor de ingesta diaria aceptada (IDA) la cantidad de 4 mg por kg de masa corporal (GRAS ASSOCIATES, LLC, 2016).

CAPÍTULO II

2. ANTECEDENTES

2.1. *Stevia rebaudiana*

Stevia rebaudiana es un arbusto originario del valle de Amambay, el cual está conformado por los países de Paraguay, Brasil y Argentina. *Stevia* es comúnmente conocida por todo el mundo y pertenece a uno de los 154 géneros de la familia *Asteraceae* (Martins *et al.*, 2016). Es un arbusto perenne de hasta 30 cm de alto con hojas sésiles de 3 a 4 cm de largo en forma de espátula o hoja alargada con bordes acerrados, la superficie adaxial es ligeramente glandular, las ramas son frágiles y las raíces son de tipo rizoma, ligeramente ramificadas. Las flores son compuestas, rodeadas de cascos epicálites color vino, pentámeras y fruto seco (Martins *et al.*, 2017).



Figura 1: Cultivo de *Stevia* (Ramírez *et al.*, 2011)

De acuerdo a la información contenida en el paquete tecnológico Estevia (*Stevia rebaudiana*) establecimiento y mantenimiento publicado en el 2011 por SAGARPA, la

planta de *S. rebaudiana* se adapta muy fácil a cualquier región tropical y subtropical que presente condiciones ideales, cuando se desarrolla en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 1200 m de altura, sin embargo el rango de altura sobre el nivel del mar óptimo en el cual se adapta y desarrolla la *Stevia* está entre los 0 a los 600 m sobre el nivel del mar. La *Stevia* es una especie originaria de zonas subtropicales, semi húmeda con temperaturas extremas de -6 a 43 °C, con promedio de 24 °C, no obstante, se reporta que prospera muy bien entre los 24 y 28 °C. La humedad relativa para dicho cultivo debe ser menor del 85 %. El suelo ideal para este cultivo es arenoso-arcilloso, franco y franco-arenoso, con regular proporción de humus. Se adapta bien a suelos con buen drenaje, más no así en lugares con exceso de humedad. En cuanto a la luminosidad requerida por la planta, los fotoperiodos aumentan la longitud de los entrenudos, el área foliar y el peso seco, y aceleran la aparición de hojas. La materia seca se reduce a la mitad con foto periodos de días cortos. El fotoperiodo crítico para el desarrollo de la *Stevia* es de 13 horas, pero existe una gran variabilidad genética entre ecotipos. Así, la planta de *Stevia* presenta ciclos de floración que oscilan entre los 45 y 60 días dependiendo de condiciones de precipitación, temperatura y luminosidad. El rendimiento en el cultivo de esta planta varía en función de la edad de la misma, encontrando rendimientos en el primer año que van desde los 1200 kg por hectárea de hoja seca, pasando a 1500 y 2000 kg en el segundo año, y a partir del tercer año se pueden hacer cosechas de 3000 a 4000 kg de hoja seca. El cultivo debe renovarse cada 5 años (Figura 1).

2.1.1. Glucósidos de esteviol

Las hojas de *Stevia* contienen más de 35 glucósidos de esteviol (Olsson, *et al.*, 2016) aunque los más conocidos son 8: esteviósido, rebaudiósidos: A, B, C, D, E y dulcósidos A y C (Martins *et al.*, 2016). Estos compuestos son formados por reemplazo del átomo de hidrógeno en el grupo carboxilo, el cual es sustituido por glucosa, xilosa o ramnosa (Aranda *et al.*, 2015). El dulzor característico de la planta esta atribuido al esteviósido y rebaudiósido A, los cuales representan entre el 5 % y 10 % de los componentes dulces (Martins *et al.*, 2016).

Los glucósidos de esteviol no son absorbidos en el tracto gastrointestinal, quedando disponibles para bacilos del grupo bacteroides, bacterias componentes de la microbiota intestinal las cuales metabolizan las glucosas, después el esteviol es liberado y absorbido por la vena porta para ser transformado en glucurónido de esteviol en el hígado y eliminado por la orina (Salvador *et al.*, 2014).

El esteviósido es 250 a 300 veces más dulce que la sacarosa, pero con un resabio amargo, mientras que el rebaudiósido A es 300 a 450 veces más dulce que la sacarosa (Aranda *et al.*, 2015). La suma de los glucósidos totales puede llegar a alcanzar niveles de hasta un 15 % dependiendo de factores como la especie, condiciones de crecimiento y técnicas agrícolas. La relación de estos compuestos es muy variable aun que se han definido rangos en base a resultados encontrados en plantas silvestres. Estos rangos son: esteviósido (5 - 10 %), rebaudiósido A (2 - 5 %), rebaudiósido C (1 %), dulcósido A (0.5 %), rebaudiósidos D, E, y F (0.02 %) y esteviolbiósido (0.1 %), todos estos porcentajes reportados en peso y base seca. Estos compuestos son encontrados principalmente en hojas, seguidos de flores, tallos, semillas y raíces (Ceunen y Geuns, 2013).

Los penta y hexa glucósidos, rebaudiósido D (Reb D) y rebaudiósido M (Reb M) poseen un dulzor 350 veces mayor al de la sacarosa y los resabios amargos más bajos. Esto ya que el dulzor percibido de estos glucósidos se correlaciona de forma positiva con el número de glucosas presentes en la molécula, por ejemplo, la sustitución de una β -1,2 glucosa por una α -1,2 ramnosa reduce drásticamente el dulzor. Estos rebaudiósidos se encuentran en concentraciones muy pequeñas (< 0.5 %) (Olsson, *et al.*, 2016).

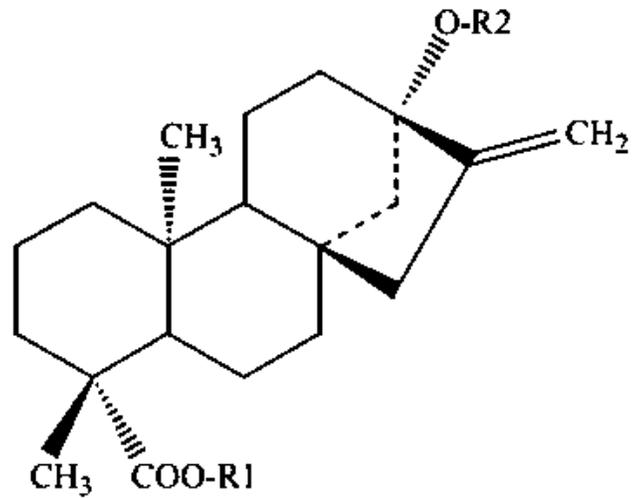


Figura 2: Estructura del esteviol (Kai, 2015)

Tabla 2: Principales glucósidos de esteviol encontrados en hojas de *Stevia* (Kai, 2015)

Nombre del compuesto	R1	R2
Esteviol	H	H
Esteviolbiónido	H	β -Glc- β -Glc(2→1)
Esteviósido	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1)
Rubusósido	β -Glc	β -Glc
Rebaudiósido A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
Rebaudiósido B	H	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
Rebaudiósido C (dulcósido B)	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2→1) β -Glc(3→1)

Rebaudiósido D	β -Glc- β -Glc(2→1)	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
Rebaudiósido E	β -Glc- β -Glc(2→1)	β -Glc- β -Glc(2→1)
Rebaudiósido F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2→1) β -Glc(3→1)
Dulcósido A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2→1)
Rebaudiósido M	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)

En *S. rebaudiana* los glucósidos de esteviol comparten caminos con giberelinas. El ácido caurenico, metabolito intermediario en la biosíntesis de ácido giberélico, es hidroxilado a la forma de esteviol, el cual es secuencialmente glucosilado por un tipo de enzimas llamadas UDP-glucosiltransferasas produciendo glucósidos de esteviol (Li *et al.*, 2016).

2.2. Glucosiltransferasas

Las glucosiltransferasas son un gran grupo de enzimas implicadas en la síntesis de múltiples productos como oligosacáridos, polisacáridos y glucoconjugados. Esto hace que sean un grupo enzimático muy heterogéneo en cuanto a sus funciones, sin embargo, todas cumplen con una única característica, la transferencia de un residuo de azúcar desde un donador hacia un aceptor, formando enlaces glucosídicos. Dichas enzimas se encuentran en muchos organismos tanto eucariotas como procariontas, y generalmente tienen alta especificidad tanto como por el donador, como por el receptor de la molécula. Existen tres tipos de glucosiltransferasas las cuales son categorizadas en base al tipo de residuo glucídico que transfieren: Hexosiltransferasas,

Pentosiltransferasas, Enzimas que transfieren restos distintos a hexosas y pentosas (Bautista, 2010).

2.2.1. UDP-glucosiltransferasas

Las glucosiltransferasas en plantas son un grupo muy divergente de enzimas que transfieren azúcares de un donador activo a una molécula aceptora. La transferencia de azúcares activos como UDP-glucosa a otras moléculas, ayuda a detoxificar, solubilizar y estabilizar metabolitos, además de ser frecuentemente el camino final hacia productos secundarios. Estas enzimas pueden utilizar cierta variabilidad de sustratos, aunque se han vistos casos de UDP-glucosiltransferasas con actividad muy específica (Richman, *et al.*, 2005).

2.3. Síntesis

Los dos puntos de unión para la glucosilación son los grupos oxigenados del esteviol. El grupo carboxílico C-19 y el grupo hidroxilo C-13. La variabilidad cantidad y posición de estos azúcares da origen a la gama de productos que se pueden encontrar en las hojas de *Stevia* (Gutiérrez, 2015). Ambos grupos pueden ser glucosilados. Dando origen a esteviol monósido (C-13), esteviol biosido (C-13), rubusósido (C-13, C19). Además, la glucosilación de 13-o-glucosa produce tri y tetra glucósidos (esteviósido y rebaudiósido A respectivamente).

La síntesis comienza con el esteviol, el C-13 (hidroxilo) es glucosilado dando paso a esteviol monósido, después una glucosa es agregada en el carbono C-2 del esteviol monósido en el sitio 13-o-glucosa transformándose a esteviol biosido. Se cree los siguientes pasos son, la glucosilación del grupo carboxilo del esteviol biosido en la posición C-4 dando paso al esteviósido, terminando con la glucosilación C-3 del sitio 13-o-glucosa del esteviósido para formar rebaudiósido A. Otra minoría de glucósidos puede ser formada por la adición de ramnosa y xilosa, estas moléculas son generadas

a partir del esteviol monósido. Cabe mencionar que estas reacciones se llevan a cabo en el aparato de Golgi (Richman, *et al.*, 2005).

En *Stevia* la glucosilación es catalizada por la acción de cuatro UDP-glucosiltransferasas (UGT). Partiendo del esteviol como molécula central. Las cuales utilizan uridina 5´difosfoglucosa (UDP-glucosa) como la especie donadora de glucosa. Estas enzimas en plantas constituyen un tipo muy variado que realiza transglucosilaciones de UDP-glucosa al esteviol (Mao *et al.*, 2017).

UGT85C2 glucosila el esteviol en el carbono C-13 (grupo hidroxilo). UGT74G1 glucosila el C-19 (grupo carboxilo). UGT91D2 y UGT76G1 catalizan la glucosilación de glucosas ligándolas a los grupos funcionales C-13 y C-19 con uniones 1,2-β-D y 1,3-β-D respectivamente (Olsson, *et al.*, 2016; Figura 4).

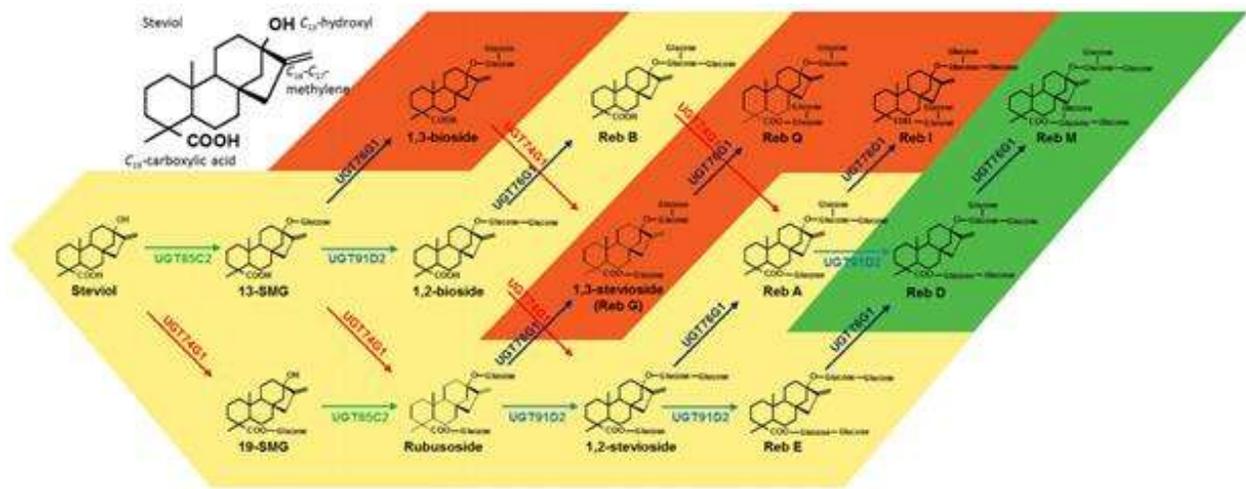


Figura 3: Ruta biosintética de glucósidos de esteviol (Olsson, *et al.*, 2016)

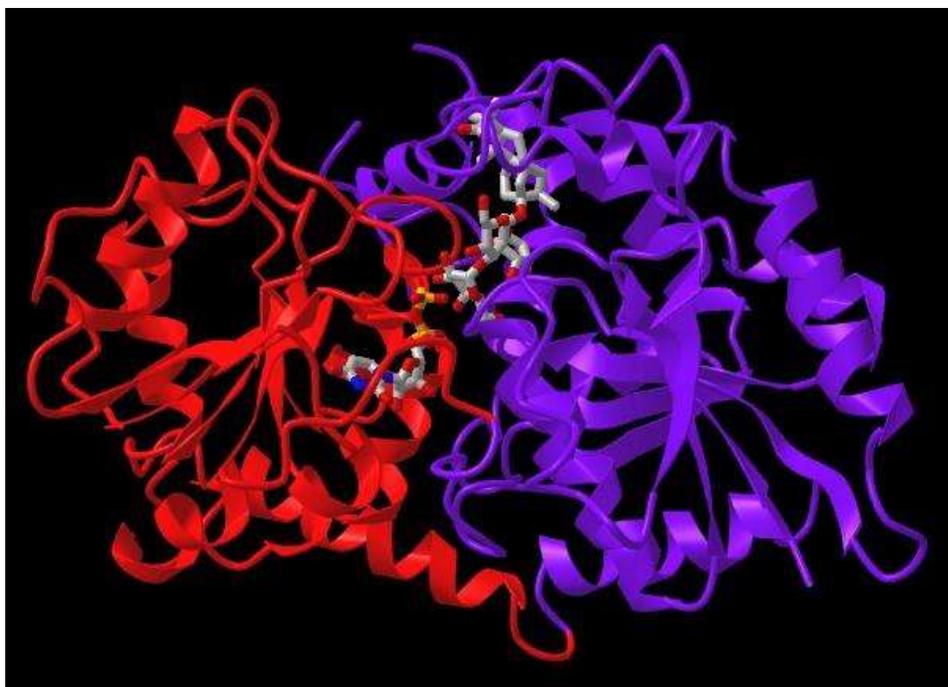


Figura 4: Representación tridimensional de la UDP-Glucosil transferasa 76G1 (Lee *et al.*, 2019). Los dominios 1 y 2 de la proteína se representan en morado y rojo respectivamente, y se muestran las moléculas de uridin-5'-difosfato y ácido (8 alfa, 9 beta, 10 alfa, 13 alfa)-13-{{alfa-L-alopiranosil-(1→2)-[beta-D-manopiranosil-(1→3)]-beta-D-alopiranosil}oxi}kauren-18-oico

2.4. Transformación enzimática en productos de *Stevia*

La glucosilación enzimática de esteviósido fue una de las primeras técnicas usadas para mejorar los productos de *Stevia*. Por ejemplo, se han usado métodos con enzimas como ciclodextrin glucanotransferasas para la generación de rebaudiósido A (Li *et al.*, 2013). Así como alfa amilasas de algunos microorganismos (Ye, *et al.*, 2013).

2.5. Rebaudiósido A

El rebaudiósido A es uno de los principales compuestos sintetizados en la planta, además de ser uno de los principales edulcorantes naturales comercializados de esta.

Este glucósido es usado actualmente como un aditivo en varios alimentos y bebidas. Su estructura química difiere principalmente en el número, tipo y conexión de los azúcares (Rodenburg, *et al.*, 2016). Siendo diferente al esteviósido por poseer una unidad extra de glucosa en el grupo R₂ (C-13) del esteviol (De Oliveira *et al.*, 2007).

Este compuesto al igual que el esteviol es 250-300 veces más dulce que la sacarosa y presenta cierto resabio amargo persistente (Olsson, *et al.*, 2016).

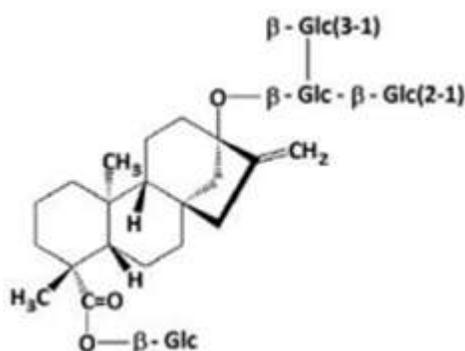


Figura 5: Rebaudiósido A (Martono *et al.*, s.f.)

2.6. Biosíntesis de rebaudiósido D y M

Los penta y hexa glucósidos rebaudiósidos D y M poseen un dulzor mayor a 350 veces en comparación con la sacarosa además de tener menor resabio amargo. Esto al ser comparados con rebaudiósido B y rebaudiósido A. Ambos compuestos son encontrados en muy bajas concentraciones en hojas de *Stevia* con un rango (0.4 - 0.5) % en base seca (Olsson, *et al.*, 2016). El rebaudiósido M está presente de forma natural en preparaciones típicas de glucósidos de esteviol con concentraciones entre (0.02 - 0.2 %) en extractos con un grado mayor al 95 % de glucósidos de esteviol (Kai, 2015).

La síntesis de rebaudiósidos D y M se ha llevado a cabo a nivel de investigación en cuanto a enzimas capaces de crear estos nuevos metabolitos de manera sintética. Las

enzimas utilizadas para estos propósitos han sido del tipo UDP-glucosiltransferasas. Esto por ser el mecanismo natural dentro de las plantas (Mao *et al.*, 2017).

Los estudios realizados han generado información sobre especificidad hacia los sustratos, variantes de estas encimas, además de herramientas de ingeniería genética capaces de clonar secuencias nucleotídicas que dan origen a dichas proteínas (Olsson, *et al.*, 2016).

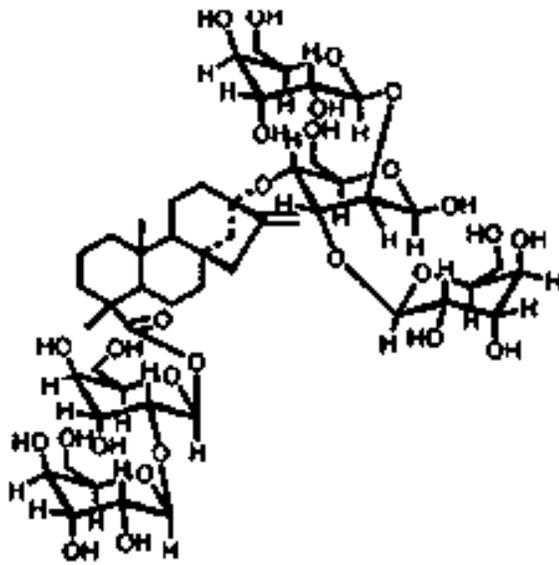


Figura 6: Rebaudiósido D (Ramírez *et al.*, 2011)

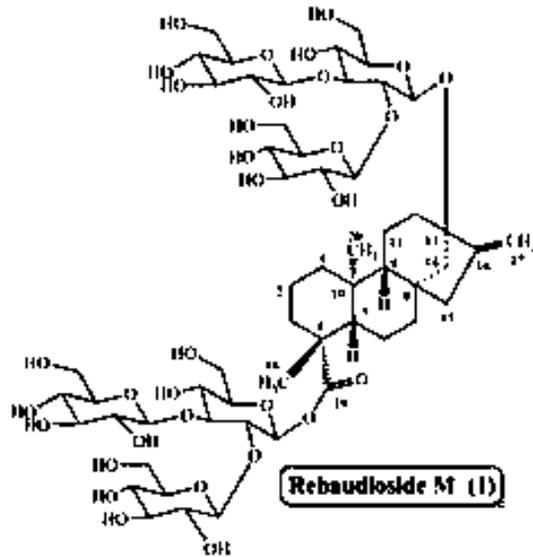


Figura 7: Rebaudiósido M (Kai, 2015)

2.7. Extracción y purificación de glucósidos de esteviol

Gracias a las características de los glucósidos de *S. rebaudiana* se han desarrollado procesos de extracción a nivel industrial para obtener los componentes activos de las hojas de *Stevia* en base seca. La razón de usar hojas es debido a que en estas se encuentra la mayor concentración de glucósidos, siendo la raíz el único órgano que no las posee (Ramírez *et al.*, 2011).

A pesar de que las hojas de *S. rebaudiana* han sido utilizadas desde épocas muy antiguas como edulcorantes naturales, la purificación de los glucósidos de esteviol, así como del rebaudiósido A, no son procesos sencillos. Desde la década de los 80's hasta la actualidad, se han desarrollado diversos procesos para extraer los glucósidos de esteviol (US 7,838,044; US 2019 / 0169220; Martono *et al.*, 2020). En la Figura 8 se resumen dichos procesos, los cuales comprenden una primera etapa de extracción de dichos glucósidos de la planta hacia un solvente. Dichas soluciones posteriormente son clarificadas para proceder al proceso de purificación de los glucósidos totales de esteviol. Los TSG, son ahora concentrados y finalmente deshidratados para la obtención de los tsg en polvo. Es en este momento en el cual se utilizan los TSG's

obtenidos para llevar a cabo un proceso de purificación del Reb A, y así obtener el principal producto que es vendido de *Stevia* en la actualidad, sin embargo, es posible utilizar dicho compuesto como precursor en la síntesis de rebaudiósidos de mayor valor agregado como son el Reb D y Reb M (US 9,012,626; US 2016 / 0298159; Matheus y Picone, 2019).

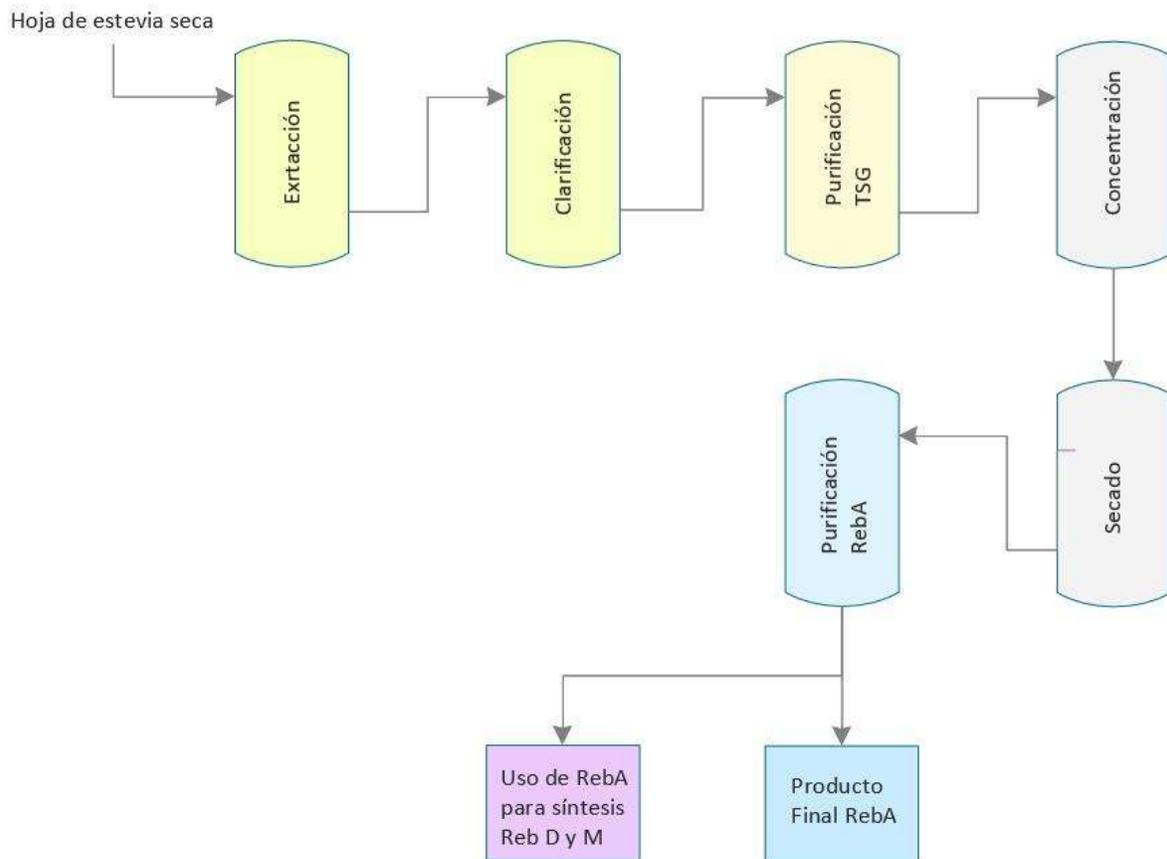


Figura 8: Diagrama de flujo para la extracción y purificación de TSG y Reb A

2.7.1 Proceso de extracción

El proceso de extracción de los glucósidos de esteviol de las hojas de *Stevia* se basa en el principio de difusión sólido líquido, en el cual las moléculas viajan del interior de las células de la hoja a un solvente. Un gran número de técnicas de extracción han

sido usadas para la extracción de los glucósidos de esteviol, pero aún la extracción con solventes es el método más aplicado para dicho proceso (Puri *et al.*, 2012) también se han llevado a cabo diversos desarrollos que aumentan la velocidad de extracción utilizando solventes, en los cuales se han utilizado técnicas como la de extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción asistida por enzimas, y extracción por fluido supercrítico (Barba *et al.*, 2015; Khoddami *et al.*, 2013; Krishnaswamy *et al.*, 2013; Miron *et al.*, 2013; Piasecka *et al.*, 2014; Puri *et al.*, 2012; Zlabur, *et al.*, 2015). A pesar de que en todas las opciones antes mencionadas existe un juego entre los tiempos de difusión, los cuales van desde un minuto hasta 30 minutos, y la temperatura de difusión la cual aumenta la velocidad del proceso y que puede ir desde temperatura ambiente hasta los 90 °C, el uso de una extracción asistida por ultrasonido trae ventajas importantes ya que permite trabajar a temperaturas mucho más bajas que los demás procesos, así como tiempos de exposición más reducidos lo cual redundaría en costos de operación mucho más competitivos (Zlabur, *et al.*, 2015).

2.7.2. Procesos de clarificación

El proceso de clarificación es un proceso en el cual se remueven todos los sólidos suspendidos en la solución a través de un proceso de separación sólido líquido. El principal proceso utilizado es el de filtración en donde se pueden utilizar diversos coadyuvantes a la filtración como lo son tierra de diatomeas, celulosa, carbón activado entre otros (US 7,838,044). De igual manera, el proceso de clarificación puede ser asistido mediante la adición de diversos floculantes de tipo aniónico, que cuando son adicionados a concentraciones entre 10 y 100 PPM, permitan la coagulación de algunos compuestos en solución como pueden ser proteínas e incluso clorofila, ayudando de esta manera al proceso de purificación de los TGS (Piciz, 2010).

2.7.3. Proceso de purificación de glucósidos de esteviol

Los procesos de purificación de los glucósidos de esteviol involucran el uso de técnicas convencionales y modernas de separación (Jentzer *et al.*, 2015). Dentro de dichas técnicas podemos encontrar sistemas de extracción líquido-líquido, sistemas de cromatografía de intercambio iónico, sistemas de ultra filtración, sistemas de nanofiltración, cristalización, y destilación fraccionada. A pesar de los innegables avances que existen en los procesos de purificación antes mencionados, los retos para el escalamiento de dichas operaciones son inmensos, lo cual hace difícil el poder utilizar estas tecnologías a escala industrial. Existe una vasta experiencia en nuestro grupo de investigación en el uso de sistemas de cromatografía de intercambio iónico que han sido implementados con mucho éxito tanto a nivel laboratorio como a nivel industrial particularmente en la industria del jarabe de agave por lo que el uso de sistemas de intercambio iónico se posiciona como una alternativa interesante gracias al costo de operación, pero sobre todo a la escalabilidad de dicha operación (MX 273569). Los sistemas de ultra y nanofiltración presentan una alternativa interesante ya que generan productos con niveles de pureza superiores al 95 %, sin embargo, tienen el inconveniente de la escalabilidad del proceso ya que los fluxes obtenidos durante los procesos particularmente de nanofiltración son bajos provocando que la superficie de filtración requerida a nivel industrial sea muy alta y en consecuencia que los equipos de filtración sean muy grandes (Formigoni, *et al.*, 2018). El proceso de cristalización que es considerado como un sistema de purificación, se emplea de manera exclusiva con el Reb A, por lo que se discutirá con mayor amplitud más adelante.

Recientemente, se han llevado a cabo trabajos en los cuales se utilizan matrices de adsorción macroporosas no polares para la remoción de impurezas de diversos licores madres entre los cuales se encuentran los licores de *Stevia* (Liu *et al.*, 2019). A pesar de que esta tecnología no ha sido implementada en ninguna de las plantas productoras de *Stevia* en México, se presenta como una alternativa interesante para incorporar como operación en el proceso de producción de glucósidos de esteviol, ya que presenta un par de ventajas competitivas interesantes como lo son el poder concentrar

los glucósidos de esteviol presentes en el licor madre disminuyendo así los tiempos de residencia en el proceso de evaporación y reducir la concentración de impurezas como son la clorofila y otros compuestos presentes en el licor madre lo cual reducen y aumentan la capacidad de purificación del tren de desmineralización o intercambio iónico contemplado en los procesos de producción de *Stevia*. De acuerdo a los trabajos realizados por Liu *et al.* (2019), el porcentaje de recuperación de glucósidos de esteviol puede ser del 90 % con un contenido de impurezas menor al 5 %.

2.7.4. Proceso de concentración de glucósidos de esteviol

Los procesos de concentración de glucósidos de esteviol se engloban en 2 grandes operaciones, la primera que es el uso de sistemas de evaporación de baja temperatura para la concentración de los jugos ricos en glucósidos de esteviol, en donde las temperaturas de evaporación se encuentran entre los 70 y los 40 °C con tiempos de residencia muy reducidos y donde se utiliza de manera primordial evaporadores de capa descendente (MX 273569). La segunda, es el uso de sistemas de adsorción, en los cuales los glucósidos de esteviol son retenidos al interior de los poros de las resinas de adsorción para ser posteriormente eluidos mediante el uso de soluciones etanólicas, donde el volumen de elusión es muy inferior al volumen inicial de la solución (Kent, 1995). Una de las condicionantes en el uso de la adsorción es que la concentración de la solución etanol debe de ser superior al 60 % para que las moléculas del glucósido de esteviol sean desorbidas, lo que supone un sistema de recuperación de etanol río abajo en el proceso de purificación.

2.8. Proceso de secado de glucósidos de esteviol

El proceso de secado de glucósidos de esteviol se lleva a cabo en sistemas de secado por aspersión donde son en general estructuras amorfas de los glucósidos de esteviol y donde se trabaja a condiciones normalmente de 140 °C a la entrada del aire de secado y 90 °C a la salida del aire de secado (Chranioti *et al.*, 2015). Dependiendo de la concentración inicial con la que se alimenta al secador, es posible manipular la

densidad del polvo de glucósidos de esteviol, así como es posible adicionar diversos agentes que facilitan el secado como lo son la maltodextrina y óxido de silicio a la solución para aumentar los rendimientos y velocidades de secado del proceso, así como mejorar la vida de anaquel del producto.

2.9. Purificación de rebaudiósido A

Existen diversos procesos para la purificación del Reb A a partir de los glucósidos de esteviol totales, entre los cuales podemos destacar 2 tipos de operaciones que se han llevado a cabo de manera exitosa. La primera es el uso de los sistemas de nano filtración en donde a través de la diferencia en los pesos moleculares de las diversas moléculas que conforman los glucósidos de esteviol, es posible separar la fracción enriquecida por el Reb A. Sin embargo, esta técnica genera muchos retos para poder alcanzar niveles de pureza superiores al 95 % y es por esta razón que dichos sistemas son poco socorridos como la única operación para la purificación del rebaudiósido A. La segunda es el uso de sistemas de cristalización aprovechando el bajo contenido de humedad que tiene el polvo secado previamente en el secador por aspersion, lo cual permite la suspensión de dicho material en altas concentraciones de solvente que promueve la cristalización del Reb A. Estos procesos han sido ampliamente descritos por Abelyan y colaboradores en la Patente US 7,838,044 donde se suspenden el polvo de glucósidos de esteviol en soluciones concentradas de etanol y se deja en agitación la solución para la formación de cristales de Reb A, alcanzando purezas mayores al 86 %. Se han optimizado los procesos de cristalización utilizando un sistema de solventes que utilizan etanol, metanol, acetato de etilo, y diversas mezclas entre estos lo cual genera la obtención de cristales de Reb A con purezas superiores al 99 %, pero los rendimientos obtenidos fueron menores al 45 % (US 9012626). Así, vemos como con el uso de solventes se pueden cristalizar las moléculas de Reb A presentes en los TGS con rendimientos que van del 45 % al 80 % y con purezas que van del 85 % al 99 %, siendo este último el parámetro más importante ya que las moléculas de Reb A que no logran cristalizarse pueden ser reutilizadas en el proceso. En todos los casos

los cristales generados deben de ser secados de manera preferente en hornos de secado al vacío para la completa remoción del solvente utilizado.

Finalmente, los cristales de Reb A con purezas superiores al 90 % pueden ser utilizados como precursores en un proceso de síntesis enzimática para la formación de moléculas de alto valor agregado para la industria alimenticia como son el Reb D y Reb M (US 2016 / 0298159). Estos glucósidos son importantes ya que presentan un alto poder edulcorante, por encima de 300 veces el poder edulcorante de la sacarosa, pero carecen del resabio amargo que tienen tanto el Reb A, como los glucósidos de esteviol totales.

2.10. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

La Cromatografía líquida de alto rendimiento (high performance liquid chromatography) es una más de las técnicas de separación cromatográficas con el particular caso de ser llevada en fase líquida. La cual se lleva a cabo entre dos componentes principales (fases). La fase móvil, es considerada como el líquido que fluye a través del sistema funcionando como vehículo en el que es transportada la muestra. Esta fluye a través de columnas en las que esta empaquetada la fase estacionaria (sólida). La fase estacionaria es la encargada de interactuar con la muestra, permitiendo así que los diferentes compuestos se separen (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007). Para el caso de detección de las moléculas separadas en la cromatografía se utilizan dispositivos ópticos como detectores UV vis.

CAPÍTULO III

3. JUSTIFICACIÓN

En México como en muchos países del mundo los problemas de salud derivados de desórdenes en el metabolismo de glucosa afectan a amplios sectores de la población. Por esto, se ha decidido que una de las estrategias para atacar este problema es la reducción de calorías en la dieta de los consumidores. Una de las dificultades encontradas ante dicha estrategia es la de generar productos de sabor dulce, elaborados con edulcorantes naturales de bajo o nulo poder calórico, candidatos dentro de éstos son los glucósidos de esteviol de *Stevia rebaudiana*, ya que tienen un alto poder edulcorante, sin aportar calorías.

El edulcorante conocido como estevia es una mezcla compleja de glucósidos de esteviol con propiedades organolépticas donde destacan principalmente, el poder edulcorante de dichas moléculas, así como el resabio amargo que éstas dejan. Moléculas como rebaudiósidos A, D y M, son de las más importantes ya que la primera presenta poco resabio amargo, pero se expresa en gran cantidad en planta, y las dos últimas presentan un resabio amargo muy marginal y un gran poder edulcorante, pero con baja expresión en la planta.

Es importante mencionar que el rebaudiósido A es el precursor de los otros rebaudiósidos D y M, por lo que la extracción y purificación de dicha molécula se presenta como un primer paso para la síntesis enzimática *in vitro* de las moléculas de rebaudiósidos D y M. De ahí la importancia del presente proyecto en el diseñar y establecer una metodología que permita la obtención de moléculas de rebaudiósido A, preferentemente en forma de cristales, utilizando operaciones unitarias que puedan implementarse de manera favorable a escala industrial, que garantice niveles elevados de pureza, y que permitan a futuro, la transformación enzimática a rebaudiósidos D y M, como edulcorantes sin resabio amargo.

CAPÍTULO IV

4. HIPÓTESIS

La implementación de un sistema de extracción de glucósidos de esteviol asistida por ultrasonido, así como la implementación de un sistema de adsorción para la concentración y purificación de glucósidos de esteviol, en el proceso de obtención de rebaudiósido A de hojas de *Stevia rebaudiana* con una pureza superior al 85 %, genera una mejora en el consumo energético global del proceso, al disminuir la demanda energética en los procesos de extracción y de evaporación.

CAPITULO V

5. OBJETIVO GENERAL

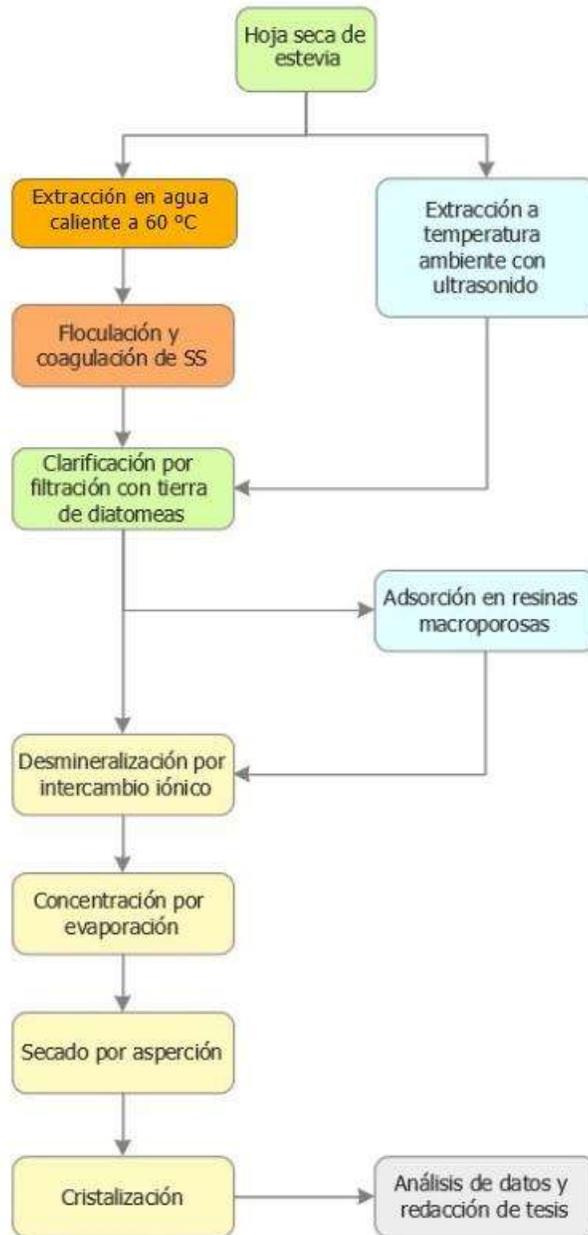
Diseñar un proceso de extracción y purificación de rebaudiósido A a partir de hojas de *Stevia rebaudiana*, cuya pureza sea mayor o igual al 85 %, que reduzca el consumo energético.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar un sistema de extracción sólido-líquido de glucósidos de esteviol de hojas de *Stevia rebaudiana* que utilice un sistema de ultrasonido para asistir la extracción de los glucósidos de esteviol de la hoja de *Stevia rebaudiana* y reduzca la temperatura de extracción.
2. Definir las condiciones de purificación de glucósidos de esteviol de *Stevia rebaudiana* utilizando un sistema de cromatografía de adsorción acoplado a un sistema cromatográfico de intercambio iónico.
3. Cristalizar rebaudiósido A en un grado de pureza igual o mayor al 85 % a partir de extractos de glucósidos de esteviol de *Stevia rebaudiana*, utilizando etanol como único solvente.
4. Cuantificar el contenido de rebaudiósido A en los extractos y cristalizados de *Stevia rebaudiana*.

CAPÍTULO VI

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



CAPÍTULO VII

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Materia prima, materiales y reactivos

Hoja seca y pulverizada de *Stevia rebaudiana* se obtuvo de la empresa Edulag SA de CV (México). Los estándares de Rebaudiósido A, y esteviósido, fueron procedentes de Jin He Sweet (China), cuyas concentraciones eran de 54.26 % de rebaudiósido A y 45.74 % de esteviósido. Todas las resinas de intercambio iónico Lewatit S2328, Lewatit S4328 y Lewatit S6268, así como la resina de adsorción Lewatit S7968 se obtuvieron de la empresa Lanxess Inc (EUA). El HCl que se utilizó fue grado industrial a un 35 % de pureza de Abastecedora Pochteca SA de CV (México) y el NaOH utilizado fue en solución al 50 %, grado industrial de Abastecedora Pochteca SA de CV (México). Se utilizó etanol de caña de azúcar al 96 % de Destiladora Uruapan SA de CV (México). Todos los demás reactivos utilizados fueron grado reactivo, procedentes de Sigma-Aldrich (EUA).

7.2. Extracción en agua caliente

La extracción convencional se realizó bajo el método modificado de González *et al.* (2015) en el cual 10 g de hoja de *Stevia* en base seca fueron sometidos a un proceso de extracción térmica en relación 1: 10 p / p planta / agua, por 30 min a 60 °C 3 veces, con el fin de agotar el contenido de glucósidos en la planta, y obteniendo un volumen final de 300 ml.

7.3. Extracción por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido se llevó a cabo con un sistema que consiste de un transductor que convierte la señal eléctrica en ondas ultrasónicas y una sonda de un diámetro de 1". Con salida de energía nominal máxima del sistema de 2 kW a una frecuencia de 24 kHz (UIP2000hdT, Hielscher Company, Teltow, Alemania). 10 g de

hoja de *Stevia* en base seca se suspendieron en 100 ml de agua. La sonda se introdujo en la solución y se le aplicó una energía de 1.4 kW por 30 segundos.

7.4. Floculación y barrido de pH

La metodología para la floculación se realizó como una variante del método descrito por (Martono *et al.*, s.f.). En donde el extracto total fue mezclado con alumbre ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) a una relación del 0.2 % p / v. Posteriormente fue alcalinizado con hidróxido de calcio o cal química $Ca(OH)_2$ y floculado con floculante aniónico a una concentración de 15 PPM. Una vez sedimentado el extracto total fue filtrado con ayuda de un sistema de vacío, papel filtro estándar y Celite como medio filtrante. El barrido de pH se realizó a valores de pH de 7, 8, 9,10, y pH inicial del extracto, a fin de determinar un punto óptimo en la floculación. Para las pruebas de pH se utilizaron 100 mililitros del extracto obtenido en la etapa de extracción en agua caliente (600 ml), para cada prueba de pH.

Una vez realizado el análisis de pH, extracto de *Stevia* fue generado nuevamente bajo las condiciones mencionadas en el proceso de extracción (78 g *Stevia* / 780 g agua desionizada), posteriormente fue dividido en tres partes a fin de replicar el proceso de floculación bajo las condiciones de pH óptimo encontrado. Las tres muestras fueron manejadas como réplicas y tratadas de forma independiente.

7.5. Clarificación

El proceso de clarificación se llevó a cabo en un matraz Kitasato y utilizando papel filtro Whatman del número 5 de 4" de diámetro. Para llevar a cabo la filtración se adicionaron 2 g de tierra de diatomeas tipo estándar de la marca Celite, y 2 g de tierra de diatomeas tipo Hyflo de la marca Celite, por cada lote de 100 ml. La suspensión se dejó en agitación por al menos 1 minuto para posteriormente aplicarse directamente sobre el papel filtro y aplicando un vacío al interior del matraz Kitasato para aumentar la velocidad de filtración. Para verificar la filtración se verificó que la solución no

presentará turbidez midiendo la misma en un espectro de absorción UV-visible a una longitud de onda de 660 nm, utilizando una celda de 50 mm. Como cero se utilizó 1 ml de jugo, filtrado a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μ m la curva de calibración se llevó a cabo con Celite Hyflo de 0 a 20 mg / ml.

7.6. Concentración y purificación de glucósidos de esteviol por adsorción

La concentración se realizó por un proceso de adsorción con un volumen de cama de 1500 ml de resina de adsorción macroporosa (Lewatit S7968), a una velocidad lineal de flujo de 3.25 m / h. Los glucósidos de esteviol fueron recuperados usando una solución de etanol al 70 %, donde se midió la capacidad de retención de la resina (Ye, *et al.*, 2014). Para ello se estandarizo previamente el proceso con una solución de glucósidos de esteviol a una concentración de 0.5 °Bx en agua, y dicha solución se utilizó para estudiar la capacidad de retención de la columna. Una vez terminada la desorción, el etanol fue retirado por una etapa de evaporación en rotavapor a 85 °C, 80 rpm con sistema de vacío.

7.7. Purificación por cromatografía de intercambio iónico

El proceso de intercambio iónico se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en el proceso de depuración de jarabe de agave (MX 273569). Se utilizaron 3 tipos de resinas de intercambio iónico, donde para el primer paso se utilizó 0.5 L de una resina catiónica fuerte macroporosa H⁺, Lewatit S2328, 0.5 L de resina aniónica débil macroporosa OH⁻, Lewatit S4328, y 0.5 L de resina aniónica fuerte macroporosa OH⁻, Lewatit S6268. Las 3 resinas se acondicionaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando ácido clorhídrico al 4.5 % para la resina catiónica y hidróxido de sodio al 5 % para ambas resinas aniónicas. La velocidad de flujo que se empleó fue de 2VC / h para todas las resinas.

7.8. Concentración

El jugo clarificado y purificado fue concentrado en un rotavapor a 85 °C y a una presión de vacío de 24 inHg la concentración se llevó a cabo hasta alcanzar una concentración de al menos 15 °Bx.

Se compararon los tiempos de evaporación del proceso cuando se usó la resina de adsorción, y se consideró igualmente el tiempo requerido para la remoción de etanol.

7.9. Secado

El extracto fue secado por aspersión en un spray dryer de laboratorio el cual fue operado bajo las siguientes condiciones: temperatura del aire de entrada 140 °C, temperatura del aire de salida 90 °C, presión del aire 5 bar, aspersion 90 %, y caudal de aire comprimido 500 L / h (Chranioti *et al.*, 2015).

7.10. Cristalización de rebaudiósido A

El método de cristalización desarrollado es una adecuación de los métodos descritos por (Martono *et al.*, s.f; Celaya *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2017).

La prueba de cristalización fue un ensayo en la cual se trabajó con 2 condiciones de proceso diferentes, a fin de observar el comportamiento de rebaudiósido A en la cristalización. Las condiciones fueron las siguientes:

- 2 g de glucósidos de esteviol de los extractos de *Stevia rebaudiana* se disolvieron en una mezcla 85: 15 etanol: agua (11.2 g). La mezcla se calentó a 70 °C con el fin de lograr disolver por completo el total de glucósidos. Posteriormente, la solución fue enfriada hasta alcanzar temperatura ambiente, para adicionar etanol anhidro (21.16 g). La solución se dejó en reposo hasta la formación de cristales. Ya cristalizado el rebaudiósido A, este fue filtrado y lavado con 8 ml de etanol 96°. Una vez filtrados los cristales fueron secados a temperatura ambiente.

- 2 g de glucósidos de esteviol de los extractos de *Stevia rebaudiana* se disolvieron en una mezcla 65: 35 etanol: agua (1.56 g). La mezcla se calentó a 70 °C con el fin de lograr disolver por completo el total de glucósidos. Posteriormente, la solución fue enfriada hasta alcanzar temperatura ambiente, para adicionar etanol anhidro (20.23 g). La solución se dejó en reposo hasta la formación de cristales. Ya cristalizado el rebaudiósido A, este fue filtrado y lavado con 8 ml de etanol 96°. Una vez filtrado los cristales fueron secados a temperatura ambiente.

Cada prueba fue realizada por triplicado generándose 12 muestras de las cuales seis fueron para cada tratamiento y de las mismas, tres para cada extracto de *Stevia*.

7.11. Análisis de glucósidos de esteviol por técnica HPLC

El análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento fue mantenido como una variante al método establecido por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2010). Con un sistema flexar Perkin Elmer HPLC. El método cromatográfico fue mantenido en columna C18 Perkin Elmer Brownlee (250 x 4.6 mm), tamaño de partícula de 5 µm sin control de temperatura, la cuantificación se realizó por absorbancia a una longitud de onda de 210 nm en detector Perkin Elmer UV/vis, intervalo de lecturas de 1 valor por segundo. La fase móvil fue 32: 68 (acetonitrilo: agua). La velocidad de flujo fue de 0.6 ml por minuto y el volumen de inyección fue de 20 µl, el análisis se llevó a cabo con el software CROmuLAN v 0.91. Acetonitrilo y agua se filtraron con filtro de 0.45 µm en membranas de nitrocelulosa.

7.12. Curvas de calibración de rebaudiósido A y esteviósido

Las curvas de calibración se construyeron con una solución estándar de esteviósido y rebaudiósido A la cual tenía una concentración de 54.26 % de rebaudiósido A. La solución estándar fue preparada al 10 % (p /p) con 0.1 g de la mezcla de esteviósido

y rebaudiósido A y llevada hasta 1 g con agua. A partir de esta solución se realizaron diluciones para generar una curva de 5 puntos, las diluciones de la mezcla de esteviósido y rebaudiósido A fueron: 5 mg/mL, 3.3 mg/mL, 2.5 mg/mL, 2 mg/mL y 1.6 mg/mL. Las diluciones fueron filtradas a 0.45 μ m en membranas de nitrocelulosa. El tamaño de muestra analizada fue de 20 μ l. Los datos obtenidos en el análisis fueron utilizados para generar las curvas correspondientes en Microsoft Excel. Todas las muestras analizadas en el HPLC fueron analizadas por triplicado y se reportan como un promedio.

CAPITULO VIII

8. RESULTADOS

8.1. Curvas de calibración en HPLC para la cuantificación de Reb A y esteviósido

Se calibró el sistema de cuantificación de Reb A y esteviósido por HPLC, para lo cual se realizó una curva de calibración con estándares de dichas moléculas como se describe en la sección de Materiales y métodos.

Tabla 3: Curva de calibración para la cuantificación de rebaudiósido A en el proceso de extracción y purificación de rebaudiósido A

Curva de calibración para cuantificación de rebaudiósido A			
Miligramos	Área	Pendiente	328691.771
0.0188	6930.1811	Ordenada al origen	-63.8668739
0.0213	6852.5902	R ²	0.94021007
0.0293	7946.8040		
0.0316	10796.4411		
0.0482	16158.0723		

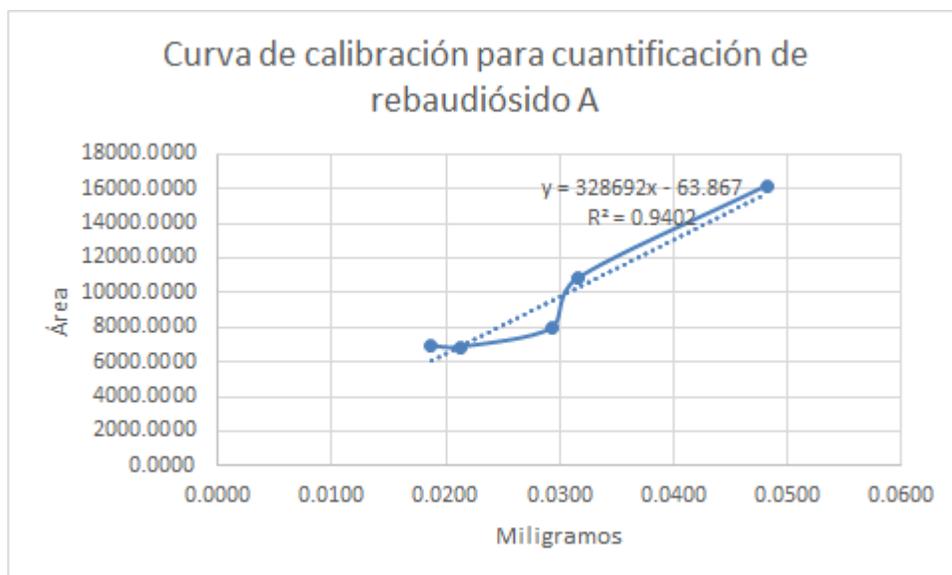


Figura 9: Curva de calibración para la cuantificación de rebaudiósido A en el proceso de extracción y purificación de rebaudiósido A

Tabla 4: Curva de calibración para la cuantificación de esteviósido en el proceso de extracción y purificación de rebaudiósido A

Curva de calibración para cuantificación de esteviósido			
Miligramos	Área	Pendiente	324511.018
0.0146	5390.7510	Ordenada al origen	305.467688
0.0187	6023.5125	R ²	0.99714923
0.0207	7048.4316		
0.0351	11582.1384		
0.0515	17210.5700		

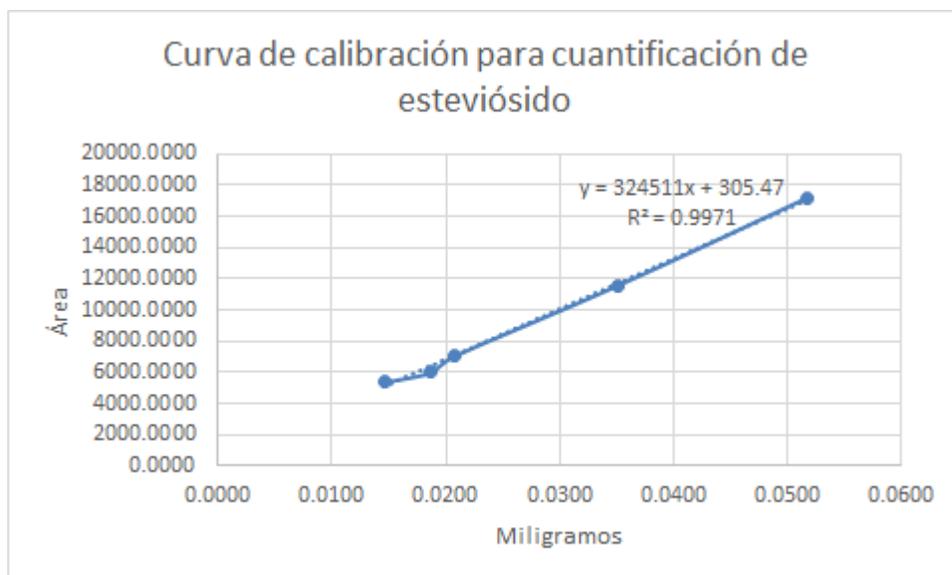


Figura 10: Curva de calibración para cuantificación de esteviósido en el proceso de extracción y purificación de rebaudiósido A

8.2. Extracción y purificación de glucósidos de esteviol

8.2.1. Extracción en agua caliente

En el proceso de extracción se obtuvo un volumen final de 530 ml el cual fue aforado a 600 ml con agua desionizada la cual se utilizó para el enjuague del equipo en la extracción. Este proceso se repitió.



Figura 11: Extracto de hojas de *Stevia rebaudiana*

Durante el proceso de extracción se obtuvieron 2.3 g de TGS en solución, lo que representa una recuperación en peso del 11.5 % de la masa de hoja utilizada mediante el método de extracción en agua caliente.

Tabla 5: Contenido de glucósidos de esteviol en etapa de extracción con calor

Glucósidos de esteviol en extracción térmica		
Muestra	Área	Gramos
Rebaudiósido A	4198.5618	1.1671
Esteviósido	4422.3832	1.1418
Glucósidos de esteviol		2.3089

8.2.2. Extracción por ultrasonido

Durante el proceso de extracción asistida por ultrasonido, se llevó a cabo un barrido de energía para determinar el óptimo en la extracción (Figura 12).

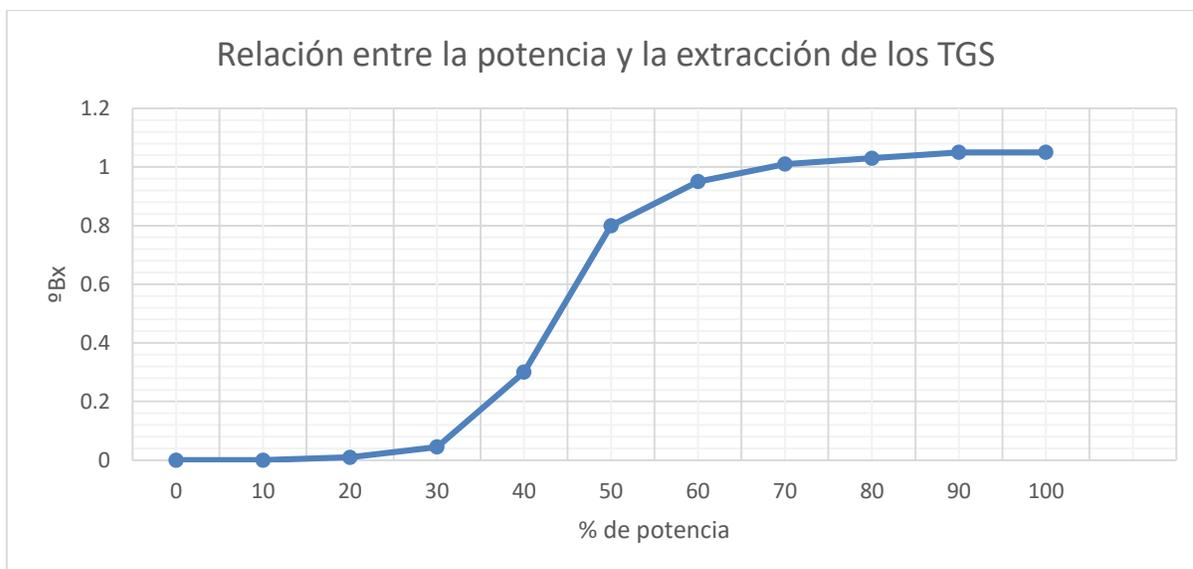


Figura 12: Relación entre la potencia y la extracción de los TGS

Se decidió utilizar una potencia al 70 % del total del equipo lo cual equivale a 1.4 kW. de potencia en el tiempo determinado en la sección de metodología.

Por el método de ultrasonido se obtuvo una masa de glucósidos de esteviol totales de 1.21 g de 10 g de hoja de *Stevia* utilizada, lo que equivale a una recuperación en peso del 12.1 % de la biomasa utilizada.

Tabla 6: Glucósidos de esteviol en extracción por ultrasonido

Glucósidos de esteviol en extracción por sonicación		
Muestra	Área	Gramos
Rebaudiósido A	2157.5618	0.6083
Esteviósido	2478.3832	0.6026
Glucósidos de esteviol		1.2109

Tabla 7: Comparativo de resultados obtenidos entre los métodos de extracción con agua caliente y el asistido por ultrasonido

	Volumen de agua por 10 g de muestra (ml)	Temperatura (°C)	Tiempo empleado (min)	Cociente de TGS entre Biomasa
Extracción con agua caliente	300	60	90	0.115
Extracción asistida por ultrasonido	100	20	0.5	0.121

El proceso de extracción se repitió cuantas veces fue necesario conservando las proporciones mencionadas de biomasa y agua para incrementar los volúmenes de jugo de *Stevia* rico en glucósidos de esteviól.

8.3. Floculación y barrido de pH

Las pruebas en el barrido de pH mostraron una mejor precipitación de sólidos suspendidos a un pH de 10.



Figura 13: Floculación de sólidos suspendidos en extracto de *Stevia* a pH 10

El volumen total de la muestra generada posterior al barrido de pH fue de 2330 ml la distribución en 3 unidades experimentales fue de 776.6 ml y el valor de pH de 7.2. Los

extractos generados fueron analizados por HPLC para cuantificar y caracterizar el contenido de glucósidos de esteviol.

El contenido de glucósidos se reporta a continuación:

Tabla 8: Contenido de glucósidos de esteviol en el proceso de extracción a pH óptimo

Glucósidos de esteviol en proceso de extracción	
Muestra	Gramos
Rebaudiósido A	0.9994
Esteviósido	0.9762
Glucósidos de esteviol	1.9757

Dato reportado como un promedio de tres unidades experimentales.

Las tres muestras fueron sometidas a proceso de alcalinización y floculación obteniendo extractos con reducción de sólidos suspendidos, estos fueron recuperados de forma independiente y aforados con agua desionizada la cual sirvió como enjuague del sistema de filtración. El volumen final en las tres muestras fue de 777 ml.

8.4. Clarificación

Para poder cuantificar la calidad del proceso de clarificación se llevó a cabo una curva de calibración utilizando tierra de diatomeas en una concentración de 0 a 2 g en 100 ml (Figura 14).

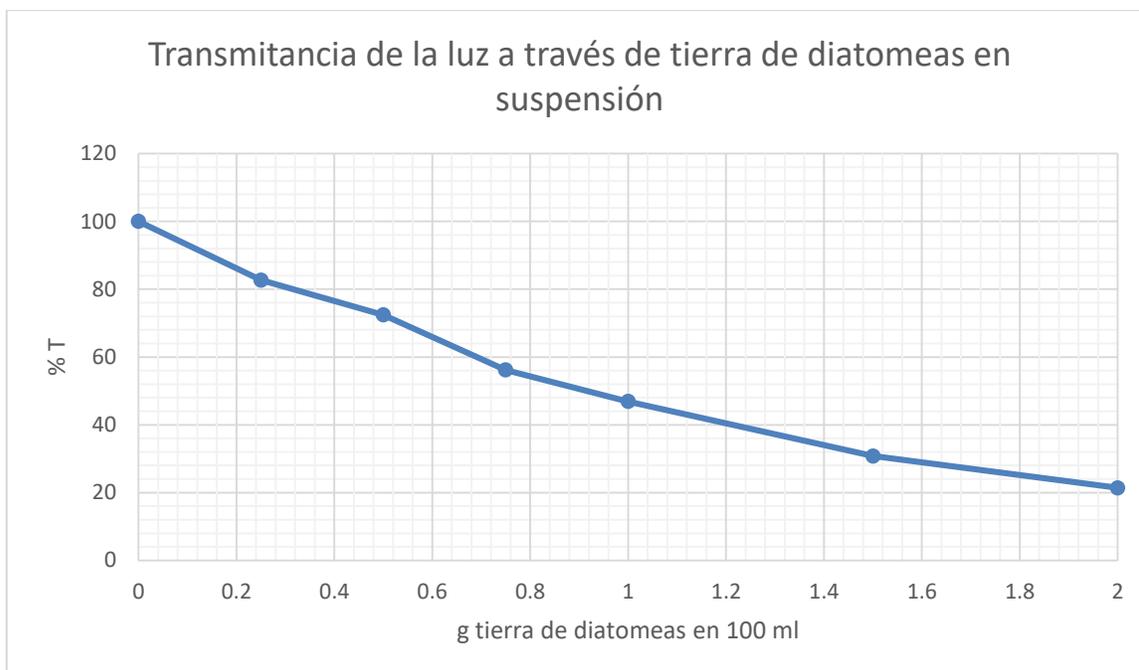


Figura 14: Transmitancia de la luz a través de tierra de diatomeas en suspensión

Todas las soluciones filtradas dieron un valor del 100 % de transmitancia después de filtradas. El color no interfiere en la lectura.

8.5. Concentración de glucósidos de esteviol por adsorción en resina macroporosa

Se trabajó la columna durante el proceso de adsorción de forma de contraflujo, es decir que la inyección del jugo con los glucósidos de esteviol se inyectó de manera ascendente para provocar que la adsorción se llevará a cabo de manera primordial en la parte inferior de la columna. Para llevar a cabo los estudios de saturación de la columna se prepararon 100 L de jugo filtrado extraído por el método de ultrasonido con una concentración de 1.18 °Bx y cuya concentración se ajustó a 0.5 °Bx con agua. El proceso se llevó a cabo a un flujo de 4 VC / h como se muestra en la Figura 15.

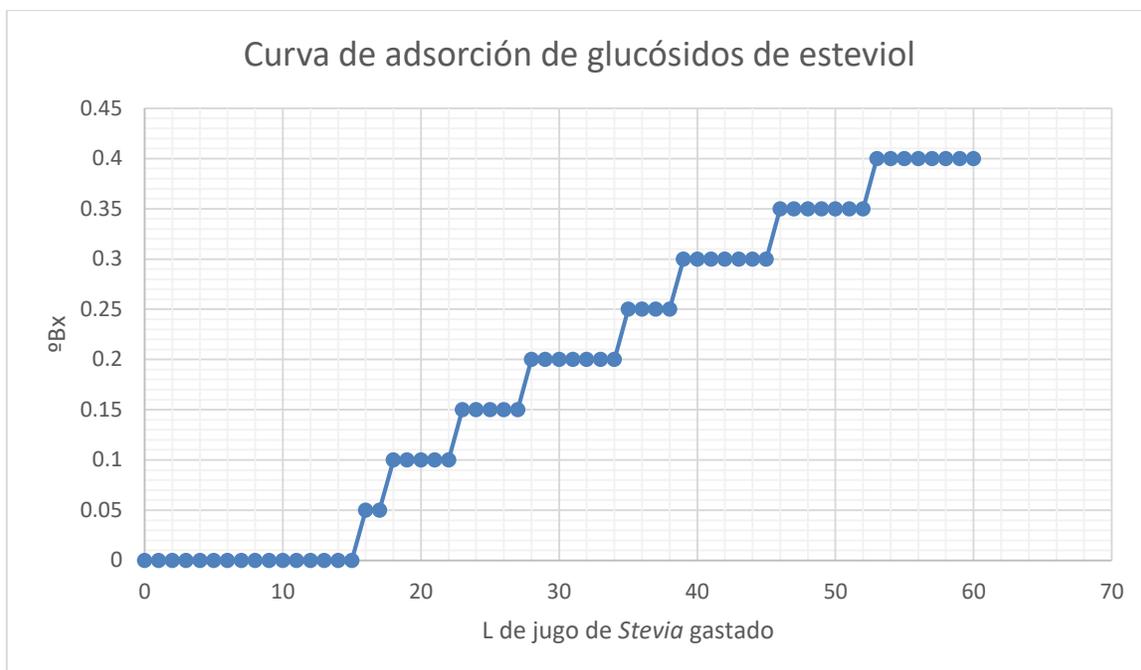


Figura 15: Curva de adsorção de glucósidos de esteviol

Considerando que el volumen de resina utilizada fue de 1.5 L, con los resultados obtenidos se concluye que la resina es capaz de procesar al menos 10 volúmenes de cama reteniendo el 100 % de los glucósidos de esteviol presentes en la solución a la concentración antes mencionada.

Para la prueba se pasaron 15 L de jugo de *Stevia* clarificado por la columna de adsorción al flujo antes descrito. Durante el proceso de adsorción el efluente de la columna contenía una alta concentración de clorofila y otros compuestos que fueron desechados. La columna se lavó con agua desmineralizada para remover la mayor cantidad posible de clorofilas y demás compuestos que no se adsorbieron a la resina.

La desorción de los glucósidos de esteviol contenidos 15 L, de jugo se llevó a cabo con 4.5 L de etanol al 70 %, y dicho etanol fue removido por evaporación hasta alcanzar un volumen final de 2 L de jugo de *Stevia*, y la concentración de la solución fue de 3.75 °Bx.

8.6. Purificación por cromatografía de intercambio iónico

La purificación se llevó a cabo utilizando un tren de resinas de intercambio iónico, que consta de un primer paso a través de una resina catiónica fuerte posteriormente una resina aniónica débil y finalmente una resina aniónica fuerte. El flujo utilizado fue de 2 VC / h, y se fue midiendo el pH en cada una de las columnas para verificar el punto de saturación de estas de acuerdo al jugo alimentado. Otra variable a observar es la reducción de color que debe de suceder durante el proceso, ya que cuando la resina empieza a saturarse el color o la intensidad del mismo comienza a aumentar (Figura 16).

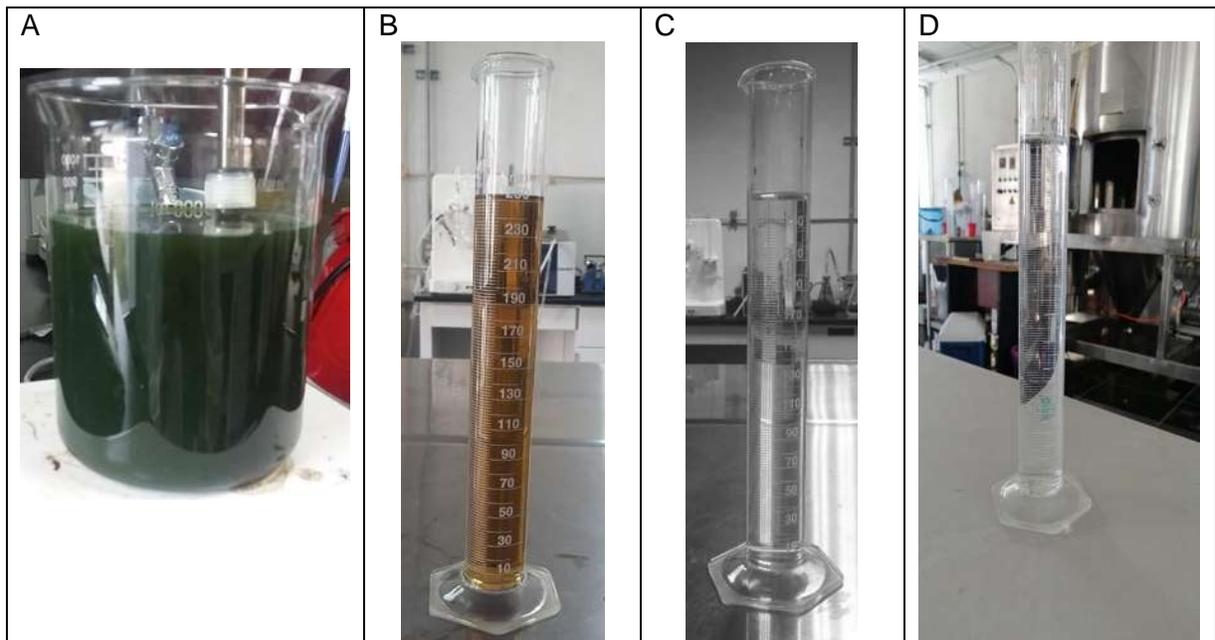


Figura 16: Coloración de las soluciones de alimentación al sistema de intercambio iónico. A, Solución clarificada que alimenta a la resina catiónica; B, Efluente de la resina de intercambio catiónico; C, Efluente de la resina de intercambio aniónico débil; D, Efluente de la resina de intercambio aniónico fuerte

Para el caso de los jugos que se desmineralizaron sin haber pasado por la resina de adsorción, la concentración final a la salida de la columna de intercambio aniónico fuerte fue del 0.2 °Bx, mientras que la concentración final de los jugos que se concentraron a través de la columna de adsorción fue de 2.7 °Bx (Tabla 9).

Otra diferencia importante en la operación del proceso de desmineralización fue que el jugo que no se concentró a través de las columnas de adsorción, presentó una saturación después de pasar 3.7 volúmenes de cama a través de la resina, mientras que el jugo que si paso por la columna de adsorción pudo procesar 10 volúmenes de cama de resina para alcanzar la saturación (Tabla 9).

Tabla 9: Comparativo en el desempeño del sistema de intercambio iónico utilizando jugo pasado, o no, por el proceso de adsorción

	Gasto volumétrico para saturación del sistema (L)	Concentración al término del proceso (°Bx)
Jugo clarificado SIN pasar por columna de adsorción	5.55	0.2
Jugo clarificado pasado por columna de adsorción	2	2.7

8.7. Secado

Para el secado se concentraron los jugos clarificados hasta alcanzar una concentración de 15 °Bx en rotavapor a una temperatura de 85 °C. y con presión de 24 inHg de vacío. En la Tabla 10 se muestran los montos recuperados por lote, así como los rendimientos globales del proceso en la obtención de TGS.

Tabla 10: Rendimientos globales de proceso en la obtención de TGS

	Hoja seca (g)	TGS inicial (% p)	TGS inicial (g)	TGS final (g)	Rendimiento %
Extracción en agua caliente	555	11.4	63.27	47.87	75.66
Extracción asistida por ultrasonido	635	11.8	74.93	64.55	86.15

8.8. Cristalización de rebaudiósido A

El contenido de rebaudiósido A en el primer extracto de *Stevia* fue de 69.51 % y 42.15 % para el segundo. Dichos datos fueron tomados de los cromatogramas en el análisis de HPLC, los cuales se realizaron por triplicado y se reportan como un promedio.

Tabla 11: Rebaudiósido A en los extractos de *Stevia*

Rebaudiósido A en extractos de <i>Stevia</i>			
Primer extracto de <i>Stevia</i>		Segundo extracto de <i>Stevia</i>	
Muestra	Pureza (%)	Muestra	Pureza (%)
Primera réplica	63.13	Primera réplica	41.32
Segunda réplica	73.85	Segunda réplica	43.02
Tercera réplica	71.56	Tercera réplica	42.13
Promedio	69.51	Promedio	42.15

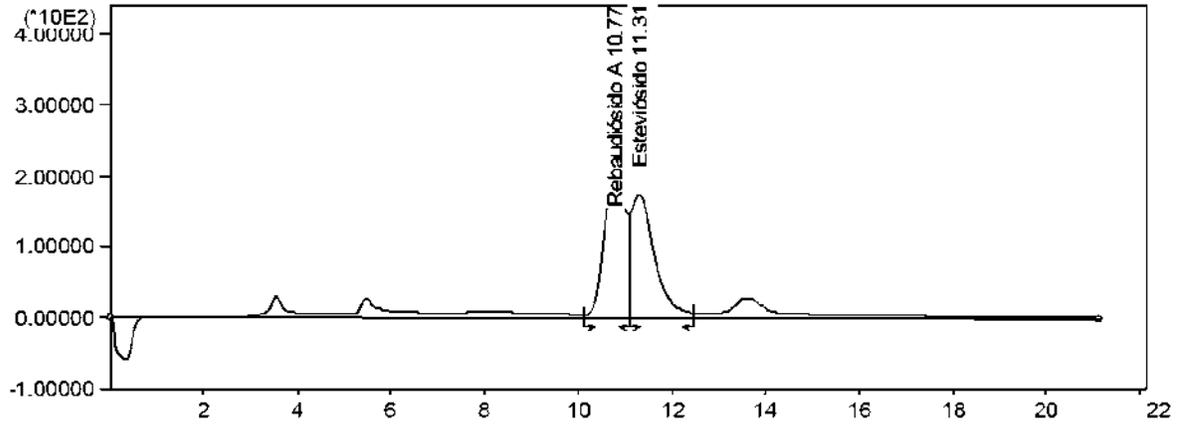


Figura 17: Cromatograma de segundo extracto de *Stevia*

8.8.1. Prueba de saturación a 15 % sólidos

La prueba de saturación a 15 % de sólidos fue generada con una mezcla etanol: agua 85: 15 para ambos extractos de *Stevia*. Se generaron 6 unidades experimentales de las cuales tres pertenecían a cada uno de los extractos de *Stevia*, las seis muestras fueron manejadas de forma independiente de las cuales las pertenecientes al segundo extracto de *Stevia* se disolvieron a temperatura ambiente.

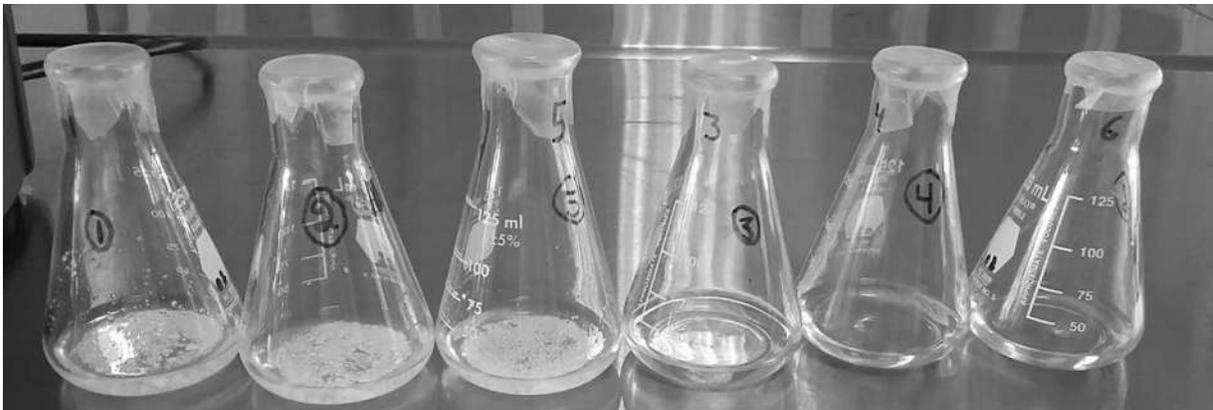


Figura 18: Muestras en etapa inicial de cristalización de rebaudiósido A en prueba de saturación a 15 % de sólidos

8.8.1.1. Primer extracto de *Stevia*

Se llevó a cabo una solución saturada de rebaudiósido A y esteviósido en la cual se procedió a la nucleación de cristales de rebaudiósido A bajando el contenido de agua con la adición de etanol. Después de 6 días se observó formación de cristales los cuales tenían forma tipo aguja. Los cristales fueron cosechados por filtración y lavados con etanol 96°. El rendimiento obtenido en la cristalización en promedio fue de 65.85 % con una pureza promedio de 88.06 % (Tabla 12).

Tabla 12: Resultados en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 15 % de sólidos con el primer extracto de *Stevia*

Muestra	Peso (g)	Pureza (%)	Rendimiento de rebaudiósido A (%)
Primera réplica	1.2101	92.39	80.42
Segunda réplica	0.666	75.9	36.36
Tercera réplica	1.1711	95.9	80.78

El rendimiento bajo obtenido en la segunda replica pudo ser efecto de factores como la presencia de algún agente extraño en la solución que inhibió la cristalización, el cual pudo estar en alguno de los materiales de cristal con los que se trabajó, o por efecto de pérdida de alcohol al momento del calentamiento ocasionando que aumentara la solubilidad de la solución.

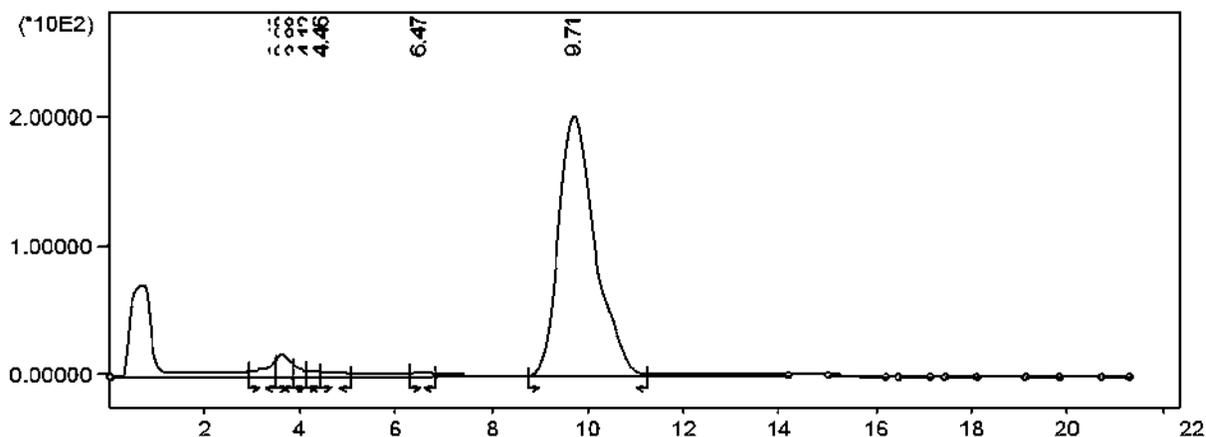


Figura 19: Cromatograma en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 15 % de sólidos con el primer extracto de *Stevia*

8.8.1.2. Segundo extracto de *Stevia*

Se llevó a cabo una solución saturada de rebaudiósido A y esteviósido en la cual se procedió a la nucleación de cristales de rebaudiósido A bajando el contenido de agua con la adición de etanol. Después de 6 días se observó formación de cristales los cuales tenían forma tipo aguja. Los cristales fueron cosechados por filtración y lavados con etanol 96°. El rendimiento obtenido en la cristalización en promedio fue de 19.25 % con una pureza promedio de 93.43 % (Tabla 13).

Tabla 13: Resultados en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 15 % de sólidos con el segundo extracto de *Stevia*

Muestra	Peso (g)	Pureza (%)	Rendimiento de rebaudiósido A (%)
Segunda réplica	0.1714	93.77	19.06
Tercera réplica	0.1761	93.1	19.45

*La primera réplica no cristalizó.

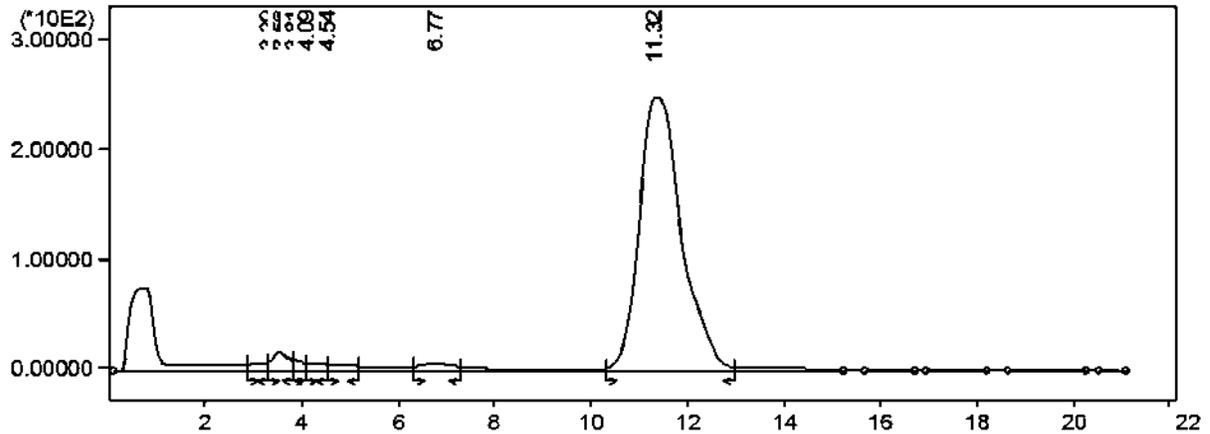


Figura 20: Cromatograma en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 15 % de sólidos con el segundo extracto de *Stevia*



Figura 21: Cristales de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 15 % de sólidos

8.8.2. Prueba de saturación a 56 % sólidos

La prueba de saturación a 56 % de sólidos fue generada con una mezcla etanol: agua 65: 35 para ambos extractos de *Stevia*. Se generaron 6 unidades experimentales de las cuales tres pertenecían a cada uno de los extractos de *Stevia*, las seis muestras fueron manejadas de forma independiente las cuales se disolvieron a temperatura ambiente.



Figura 22: Muestras en etapa inicial de cristalización de rebaudiósido A en prueba de saturación a 56 % de sólidos

8.8.2.1. Primer extracto de *Stevia*

Se llevó a cabo una solución saturada de rebaudiósido A y esteviósido en la cual se procedió a la nucleación de cristales de rebaudiósido A bajando el contenido de agua con la adición de etanol. Después de 1 día se observó formación de cristales los cuales tenían forma tipo aguja. Los cristales fueron cosechados por filtración y lavados con etanol 96°. El rendimiento obtenido en la cristalización en promedio fue de 96.57 % con una pureza promedio de 89.57 % (Tabla 14).

Tabla 14: Resultados en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 56 % de sólidos con el primer extracto de *Stevia*

Muestra	Peso (g)	Pureza (%)	Rendimiento de rebaudiósido A (%)
Primera réplica	1.5065	89.91	97.43
Segunda réplica	1.4830	90.09	96.10
Tercera réplica	1.5070	88.73	96.18

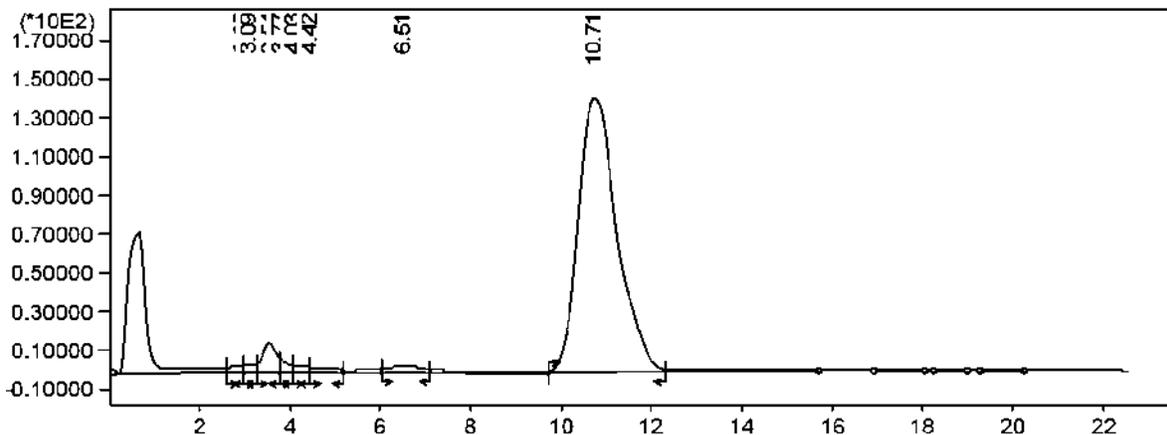


Figura 23: Cromatograma en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 56 % de sólidos con el primer extracto de *Stevia*

8.8.2.2. Segundo extracto de *Stevia*

Se llevó a cabo una solución saturada de rebaudiósido A y esteviósido en la cual se procedió a la nucleación de cristales de rebaudiósido A bajando el contenido de agua con la adición de etanol. Después de 13 días se observó formación de cristales los cuales tenían forma tipo aguja. Los cristales fueron cosechados por filtración y lavados con etanol 96°. El rendimiento obtenido en la cristalización en promedio fue de 63.83 % con una pureza promedio de 92.04 % (Tabla 15).

Tabla 15: Resultados en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 56 % de sólidos con el segundo extracto de *Stevia*

Muestra	Peso (g)	Pureza (%)	Rendimiento de rebaudiósido A (%)
Primera réplica	0.5879	88.49	61.70
Segunda réplica	0.5817	95.6	65.96

*La tercera réplica no cristalizó.

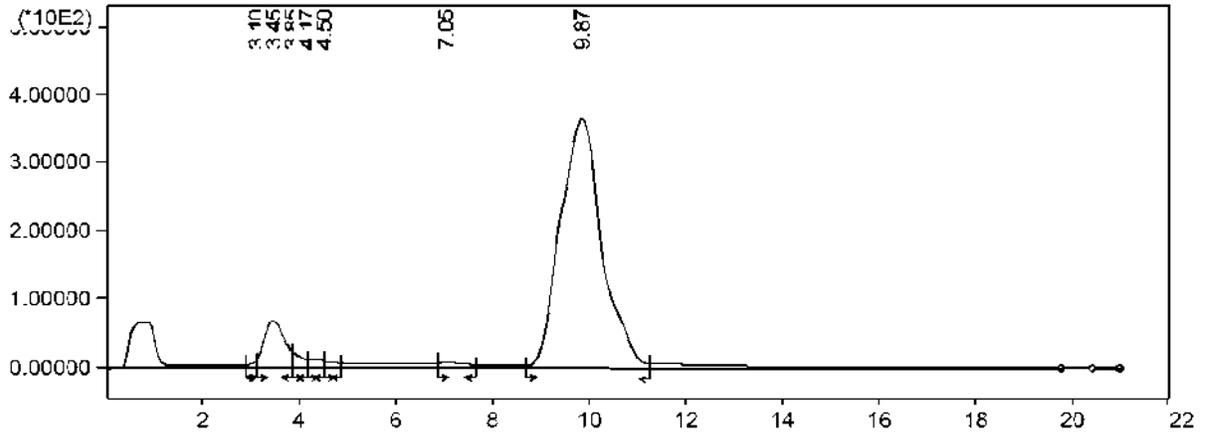


Figura 24: Cromatograma en el proceso de cristalización de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 56 % de sólidos con el segundo extracto de *Stevia*



Figura 25: Cristales de rebaudiósido A en la prueba de saturación a 56 % de sólidos

Tabla 16: Resumen de resultados en pruebas de cristalización de rebaudiósido A de los extractos de *Stevia*

Pruebas de cristalización de rebaudiósido A					
15 % de sólidos					
Primer extracto de <i>Stevia</i>			Segundo extracto de <i>Stevia</i>		
Promedio	Pureza	Rendimiento	Promedio	Pureza	Rendimiento
	88.0633 %	65.8533 %		93.435 %	19.255 %
56 % sólidos					
Primer extracto de <i>Stevia</i>			Segundo extracto de <i>Stevia</i>		
Promedio	Pureza	Rendimiento	Promedio	Pureza	Rendimiento
	89.5766 %	96.57 %		92.045 %	63.83 %

8.9. Análisis estadístico

Para entender el comportamiento de las variables en el proceso de cristalización de rebaudiósido A, así como el efecto de cada una de ellas, se llevaron a cabo pruebas estadísticas como: pruebas de normalidad, análisis anova y análisis de Wilcoxon que muestren de una forma clara el efecto de los tratamientos sobre el rendimiento y la pureza de rebaudiósido A en el proceso de cristalización. Resultados con valores de probabilidad menores a 0.05 muestran diferencias significativas a un 95 % de confianza.

Los análisis se realizaron con ayuda del software estadístico JMP.

Los datos experimentales se enlistan en la siguiente tabla.

Tabla 17: Datos experimentales en pruebas de cristalización

Resultados experimentales en pruebas de cristalización					
Tratamiento	Mezcla etanol: agua	Sólidos (%)	<i>Stevia</i>	Pureza de rebaudiósido A (%)	Rendimiento de rebaudiósido A (%)
1	85	15	1	92.39	80.42
1	85	15	1	75.9	36.36
1	85	15	1	95.9	80.78
2	65	56	1	89.91	97.43
2	65	56	1	90.09	96.1
2	65	56	1	88.73	96.18
3	85	15	2	93.43	19.25
3	85	15	2	93.77	19.06
3	85	15	2	93.1	19.45
4	65	56	2	88.49	61.7
4	65	56	2	95.6	65.96
4	65	56	2	92.04	63.83

*En la prueba de saturación a 15 % de sólidos con el segundo extracto de *Stevia* la primera réplica no cristalizó, de igual forma, en la prueba de saturación a 56 % de sólidos en el segundo extracto de *Stevia* la tercera réplica no cristalizó, por lo que se trabajó con los promedios de las dos réplicas restantes en el tratamiento correspondiente, a fin de realizar un mejor análisis estadístico.

8.9.1. Análisis de rendimiento de rebaudiósido A

Para el análisis de rendimiento de rebaudiósido A una de las primeras pruebas realizadas fue la prueba de normalidad de Shapiro wilk para determinar si se podía realizar estadística paramétrica y aplicar análisis anova. Valores de probabilidad menores a 0.05 rechazan la normalidad en los datos a un 95 % de confianza.

Tabla 18: Prueba de Shapiro Wilk en análisis de normalidad para el rendimiento en los tratamientos de cristalización

Prueba de Shapiro-Wilk	
W	Prob<W
0.870893	0.0671
Nota: Ho = Los datos son de una distribución normal Los valores de prob<W pequeños rechazan Ho	

Para analizar la normalidad de los datos se aplicó la prueba de Shapiro Wilk en la cual se determinó que los datos se ajustan a una distribución normal al tener una probabilidad mayor a 0.05 lo que nos permite realizar análisis anova.

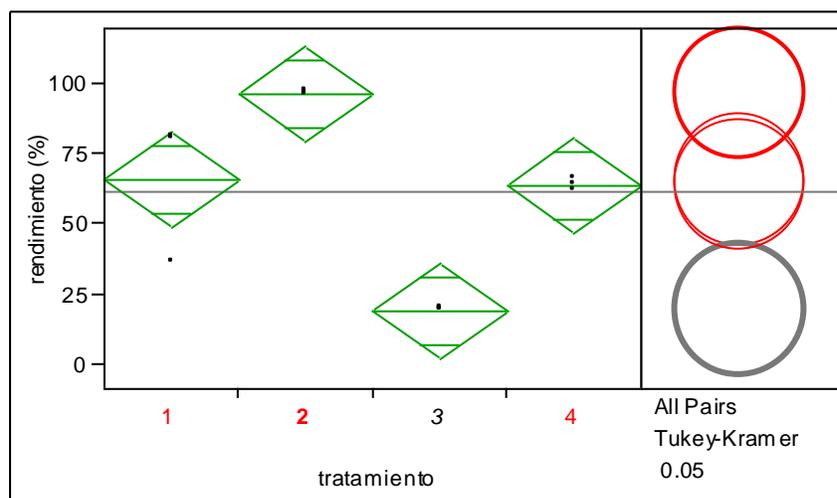


Figura 26: Rendimiento de rebaudiósido A en análisis anova en los tratamientos de cristalización

Tabla 19: Resumen de ajuste en análisis anova en los tratamientos de cristalización

R ²	0.873931
R ² ajustado	0.826655
Cuadrado medio del error	12.82143
Media de respuesta	61.37708
Observaciones	12

El análisis de ajuste nos muestra que podemos confiar un 82 % en la experimentación.

Tabla 20: Análisis de varianza para análisis anova en los tratamientos de cristalización

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón de F	Prob > F
Tratamiento	3	9116.595	3038.86	18.4858	0.0006*
Error	8	1315.112	164.39		
C. Total	11	10431.707			

El análisis de varianza nos muestra que hay diferencia estadísticamente significativa en al menos uno de los tratamientos de cristalización al tener una probabilidad menor al 0.05.

Tabla 21: Comparación para todos los pares utilizando Tukey-Kramer HSD en los tratamientos de cristalización

q*		Alfa		
3.20238		0.05		
Abs(Dif)-LSD	2	1	4	3
2	-33.525	-2.808	-0.785	43.790
1	-2.808	-33.525	-31.501	13.074
4	-0.785	-31.501	-33.525	11.050
3	43.790	13.074	11.050	-33.525
Valores positivos muestran pares de medias que son significativamente diferentes				

Tabla 22: Comparación de medias en análisis anova en los tratamientos de cristalización

Nivel		Media
2	A	96.570000
1	A	65.853333
4	A	63.830000
3	B	19.255000
Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes		

En el análisis de comparación de medias se puede observar que el tratamiento tres es el tratamiento que muestra una diferencia estadísticamente significativa siendo el tratamiento con menor rendimiento obtenido. Los tratamientos uno dos y cuatro estadísticamente no muestran diferencias significativas entre ellos. Más sin embargo el tratamiento dos es el que mayor rendimiento obtuvo.

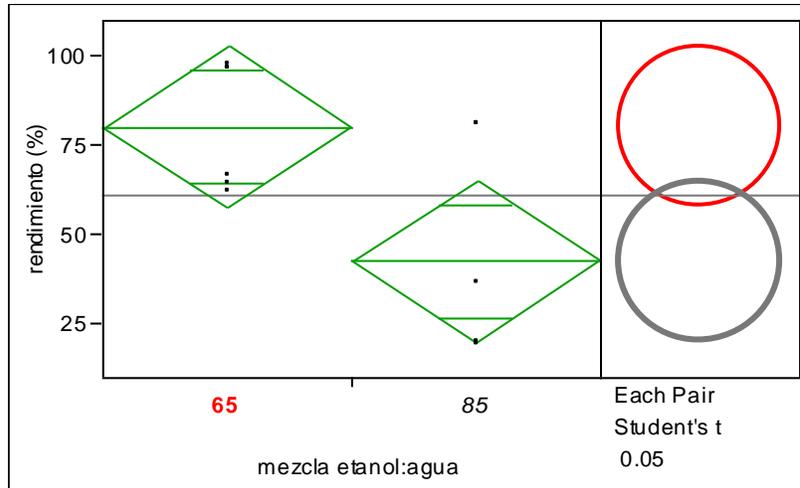


Figura 27: Rendimiento de rebaudiósido A en análisis anova para las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización

Tabla 23: Resumen de ajuste en análisis anova para las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización

R ²	0.407568
R ² ajustado	0.348324
Cuadrado medio del error	24.85977
Media de respuesta	61.37708
Observaciones	12

El análisis de ajuste nos muestra que podemos confiar en un 34 % en la experimentación.

Tabla 24: Análisis de varianza en mezclas etanol: agua para análisis anova en los tratamientos de cristalización

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Razón de F	Prob > F
Mezcla etanol: agua	1	4251.626	4251.63	6.8796	0.0255*
Error	10	6180.081	618.01		
C. Total	11	10431.707			

El análisis de varianza nos muestra que hay diferencia estadísticamente significativa en las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización al tener una probabilidad menor al 0.05.

Tabla 25: Límites de confianza en mezclas etanol: agua para análisis anova en los tratamientos de cristalización

Nivel	Número	Media	Error estándar	Límite inferior a 95 % de confianza	Límite superior a 95 % de confianza
65	6	80.2000	10.149	57.587	102.81
85	6	42.5542	10.149	19.941	65.17

La prueba de límites de confianza nos muestra que si hay diferencia entre los tratamientos ya que la media de cada uno de ellos está por fuera del intervalo de confianza del otro.

Tabla 26: Comparación de medias en análisis de mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización

T	Alfa	
2.22814	0.05	
Abs(Dif)-LSD	65	85
65	-31.980	5.666
85	5.666	-31.980
Valores positivos muestran pares de medias que son significativamente diferentes		

En el análisis de comparación de medias se puede observar que hay diferencia estadísticamente significativa esto al tener valores positivos en el análisis. La mezcla 65:35 etanol: agua es el tratamiento con mayor rendimiento.

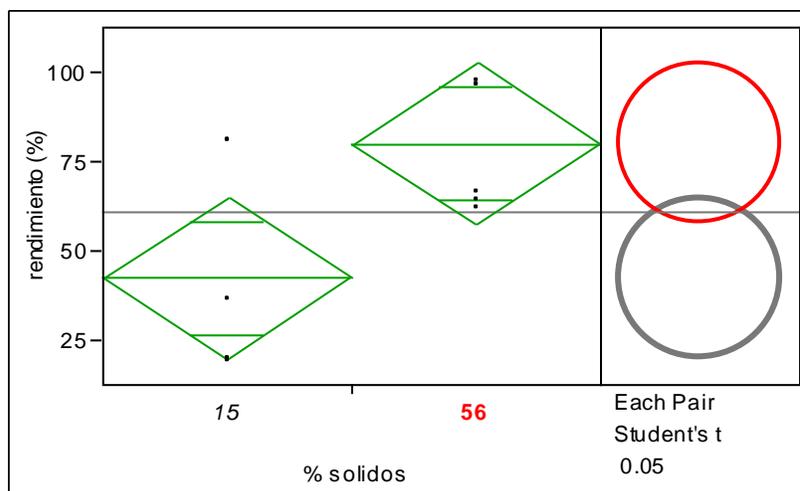


Figura 28: Rendimiento de rebaudiósido A en análisis anova para el porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización

Tabla 27: Resumen de ajuste en análisis anova para el porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización

R ²	0.407568
R ² ajustado	0.348324
Cuadrado medio del error	24.85977
Media de respuesta	61.37708
Observaciones	12

El análisis de ajuste nos muestra que podemos confiar en un 34 % en la experimentación.

Tabla 28: Análisis de varianza en el porcentaje de sólidos para análisis anova en los tratamientos de cristalización

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Razón de F	Prob > F
% sólidos	1	4251.626	4251.63	6.8796	0.0255*
Error	10	6180.081	618.01		
C. Total	11	10431.707			

El análisis de varianza nos muestra que hay diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de sólidos en los tratamientos de cristalización al tener una probabilidad menor al 0.05.

Tabla 29: Límites de confianza en el porcentaje de sólidos para análisis anova en los tratamientos de cristalización

Nivel	Número	Media	Error estándar	Límite inferior a 95 % de confianza	Límite superior a 95 % de confianza
15	6	42.5542	10.149	19.941	65.17
56	6	80.2000	10.149	57.587	102.81

La prueba de límites de confianza nos muestra que si hay diferencia entre los tratamientos ya que la media de cada uno de ellos está por fuera del intervalo de confianza del otro.

Tabla 30: Comparación de medias en análisis del porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización

T		Alfa
2.22814		0.05
Abs(Dif)-LSD	56	15
56	-31.980	5.666
15	5.666	-31.980
Valores positivos muestran pares de medias que son significativamente diferentes		

En el análisis de comparación de medias se puede observar que hay diferencia estadísticamente significativa al tener valores positivos en el análisis. El 56 % de sólidos es el tratamiento con mayor rendimiento.

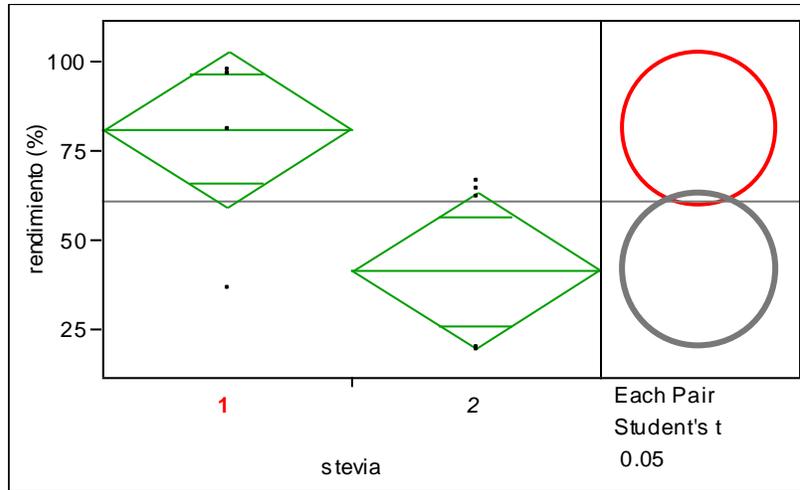


Figura 29: Rendimiento de rebaudiósido A en análisis anova para los extractos de *Stevia* en los tratamientos de cristalización

Tabla 31: Resumen de ajuste en análisis anova para los extractos de *Stevia* en los tratamientos de cristalización

R ²	0.452556
R ² ajustado	0.397811
Cuadrado medio del error	23.89724
Media de respuesta	61.37708
Observaciones	12

El análisis de ajuste nos muestra que podemos confiar en un 39 % en la experimentación.

Tabla 32: Análisis de varianza en los extractos de *Stevia* para análisis anova en los tratamientos de cristalización

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Razón de F	Prob > F
<i>Stevia</i>	1	4720.928	4720.93	8.2667	0.0165*
Error	10	5710.779	571.08		
C. Total	11	10431.707			

El análisis de varianza nos muestra que hay diferencia estadísticamente significativa entre los extractos de *Stevia* en los tratamientos de cristalización al tener una probabilidad menor al 0.05.

Tabla 33: Límites de confianza en los extractos de *Stevia* para análisis anova en los tratamientos de cristalización

Nivel	Número	Media	Error estándar	Límite inferior a 95 % de confianza	Límite superior a 95 % de confianza
1	6	81.2117	9.7560	59.474	102.95
2	6	41.5425	9.7560	19.805	63.28

La prueba de límites de confianza nos muestra que si hay diferencia entre los extractos ya que la media de cada uno de ellos está por fuera del intervalo de confianza del otro.

Tabla 34: Comparación de medias en análisis de los extractos de *Stevia* en los tratamientos de cristalización

T		Alfa
2.22814		0.05
Abs(Dif)-LSD	1	2
1	-30.742	8.927
2	8.927	-30.742
Valores positivos muestran pares de medias que son significativamente diferentes		

En el análisis de comparación de medias se puede observar que si hay diferencia estadísticamente significativa al tener valores positivos en el análisis. El primer extracto de *Stevia* es el que tuvo mayor rendimiento.

8.9.2. Análisis de pureza de rebaudiósido A

Para el análisis de pureza de rebaudiósido A, la primera prueba realizada fue la prueba de normalidad de Shapiro wilk, para determinar si se realiza estadística paramétrica y aplicar análisis anova. Valores de probabilidad menores a 0.05 rechazan la normalidad en los datos a un 95 % de confianza.

Tabla 35: Prueba de Shapiro Wilk en análisis de normalidad para el grado de pureza en los tratamientos de cristalización

Shapiro-Wilk	
W	Prob<W
0.766640	0.0040*
Nota: Ho = Los datos son de una distribución normal	
Los valores de prob<W pequeños rechazan Ho	

Para determinar la normalidad en los datos se aplicó la prueba de Shapiro Wilk en la cual se determinó que los datos no se ajustan a una distribución normal al tener una probabilidad menor a 0.05, limitándonos a no poder realizar análisis anova, por lo que se realizaron análisis no paramétricos como la prueba de Wilcoxon.

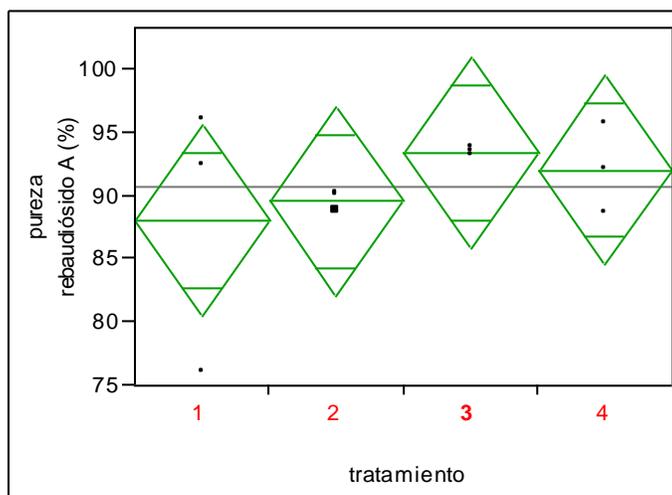


Figura 30: Pureza de rebaudiósido A en análisis de Wilcoxon para los tratamientos de cristalización

Tabla 36: Sumas de rango en prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis en tratamientos de cristalización

Nivel	Número	Suma de rangos	Media de rangos	(Media-Media0)/Std0
1	3	20.000	6.66667	0.000
2	3	12.000	4.00000	-1.294
3	3	27.000	9.00000	1.294
4	3	19.000	6.33333	0.000

Tabla 37: Prueba de ji cuadrada en tratamientos de cristalización

Ji cuadrada	Grados de libertad	Prob>ji cuadrada
2.8974	3	0.4077

La prueba de Wilcoxon nos dice que no hay diferencia estadísticamente significativa en el grado de pureza de rebaudiósido A en los tratamientos de cristalización al tener un valor de probabilidad de ji cuadrada mayor a 0.05.

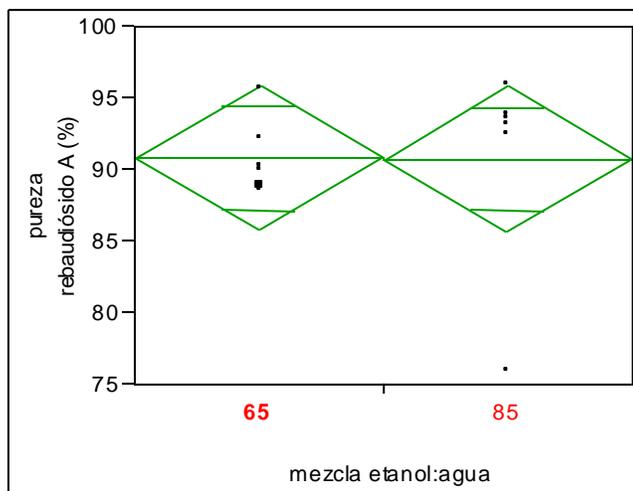


Figura 31: Pureza de rebaudiósido A para las mezclas etanol: agua en análisis de Wilcoxon en los tratamientos de cristalización

Tabla 38: Sumas de rango en prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis para las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización

Nivel	Número	Suma de rangos	Media de rangos	(Media-Media0)/Std0
65	6	31.000	5.16667	-1.201
85	6	47.000	7.83333	1.201

Tabla 39: Prueba de 2 muestras para las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización

S	Z	Prob> Z
47	1.20096	0.2298

Tabla 40: Prueba de ji cuadrada para las mezclas etanol: agua en los tratamientos de cristalización

Ji cuadrada	Grados de libertad	Prob>ji cuadrada
1.6410	1	0.2002

La prueba de Wilcoxon nos dice que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las mezclas etanol: agua para el grado de pureza de rebaudiósido A en los tratamientos de cristalización al tener un valor de probabilidad en Z y de ji cuadrada mayor a 0.05.

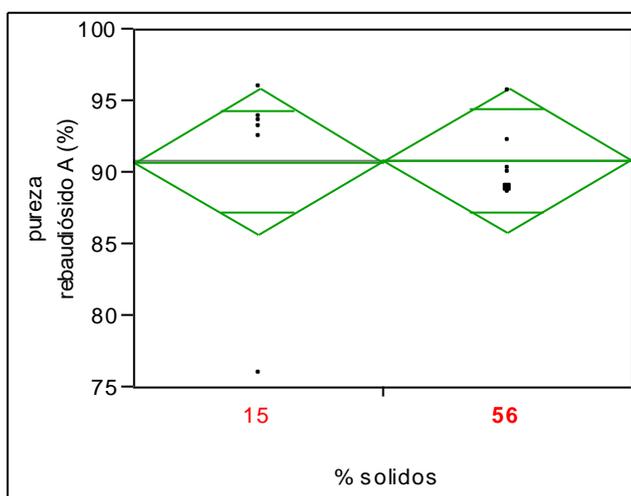


Figura 32: Pureza de rebaudiósido A para el porcentaje de sólidos en análisis de Wilcoxon en los tratamientos de cristalización

Tabla 41: Sumas de rango en prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis para el porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización

Nivel	Número	Suma de rangos	Media de rangos	(Media-Media0)/Std0
15	6	47.000	7.83333	1.201
56	6	31.000	5.16667	-1.201

Tabla 42: Prueba de 2 muestras para el porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización

S	Z	Prob> Z
31	-1.20096	0.2298

Tabla 43: Prueba de ji cuadrada para el porcentaje de sólidos en los tratamientos de cristalización

Ji cuadrada	Grados de libertad	Prob>ji cuadrada
1.6410	1	0.2002

La prueba de Wilcoxon nos dice que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de sólidos para el grado de pureza de rebaudiósido A en los tratamientos de cristalización al tener un valor de probabilidad en Z y de ji cuadrada mayor a 0.05.

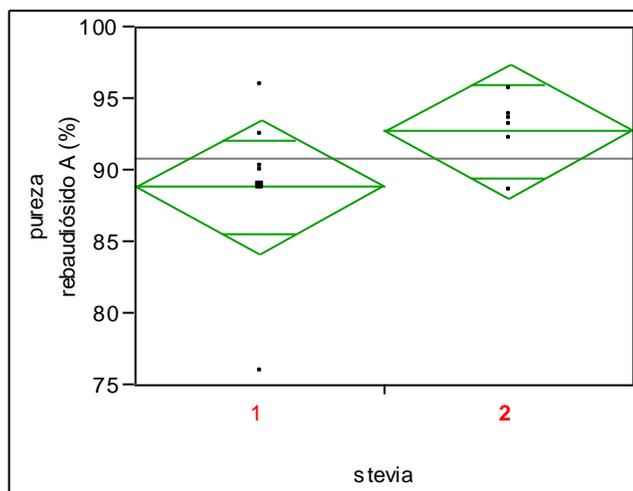


Figura 33: Pureza de rebaudiósido A para los extractos de *Stevia* en análisis de Wilcoxon en los tratamientos de cristalización

Tabla 44: Sumas de rango en prueba de Wilcoxon / Kruskal-Wallis para los extractos de *Stevia* en los tratamientos de cristalización

Nivel	Número	Suma de rangos	Media de rangos	(Media-Media0)/Std0
1	6	32.000	5.33333	-1.041
2	6	46.000	7.66667	1.041

Tabla 45: Prueba de 2 muestras para los extractos de *Stevia* en los tratamientos de cristalización

S	Z	Prob> Z
46	1.04083	0.2980

Tabla 46: Prueba de ji cuadrada para los extractos de *Stevia* en los tratamientos de cristalización

Ji cuadrada	Grados de libertad	Prob>ji cuadrada
1.2564	1	0.2623

La prueba de Wilcoxon nos dice que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de *Stevia* para el grado de pureza de rebaudiósido A en los tratamientos de cristalización al tener un valor de probabilidad en Z y de ji cuadrada mayor a 0.05.

CAPÍTULO IX

9. DISCUSIÓN

El proceso de extracción y purificación comercial de *Stevia* se encuentra descrito a detalle en más de 150 patentes en el mundo, así como diversos ejemplos se han generado en las notificaciones de la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos a solicitudes de alimentos generalmente reconocidos como saludables o seguros (Oehme *et al.*, 2017). El presente proyecto tiene como objetivo el diseñar un proceso que permite la obtención de Reb A con un contenido de pureza superior al 85 %, y al mismo tiempo comparar en dicho proceso la implementación de técnicas de extracción asistidas por ultrasonido y concentración por adsorción en matrices inertes, con respecto a la eficiencia operativa y reducción de gastos de energía, al incorporar diversas operaciones descritas en los trabajos antes mencionados.

Referente a los métodos de extracción seleccionados vemos que ambos presentan altos porcentajes de extracción, sin embargo, se observa que el tiempo para llevar a cabo la operación de extracción, así como la temperatura requerida durante el proceso cuando está activo son muy diferentes en el caso del uso de extracción con agua caliente y la asistida por ultrasonido. En la primera se observa un alto consumo de agua la cual tiene que ser calentada a 60 °C e incubarse a esta temperatura por 30 minutos, lo cual genera un consumo energético de 16.72 kJ por cada g de biomasa procesada, de acuerdo a la ecuación de Fourier $Q = m \cdot cp \cdot (\Delta T)$. En el caso de consumo energético por el método de ultrasonido, en las condiciones de operación mencionadas se consumirían 4.5 kJ por cada g de biomasa procesada. Estos resultados son concomitantes con los exhibidos por Zlabur y colaboradores en el 2015, ya que como ellos mencionan el método de extracción asistida por ultrasonido es un método ambientalmente amigable de extracción debido a que reduce el tiempo de operación, reduce el consumo energético, y el uso de agua como solvente.

Otro beneficio importante es el del consumo de solvente utilizado en el proceso de extracción de los glucósidos de esteviol de las hojas de *Stevia*, donde se observa que

el consumo utilizado en el proceso asistido por ultrasonido es 3 veces menor, al requerido cuando la difusión se lleva a cabo simplemente por temperatura, lo cual genera que la solución obtenida esté más concentrada en el proceso que utiliza ultrasonido facilitando así los subsecuentes procesos.

El proceso de floculación es necesario para remover algunas moléculas que se encuentran en solución y que, con la ayuda de los floculantes aniónicos, estos forman coágulos que pueden ser removidos tras un proceso de filtración, y ayudar así a bajar la carga iónica de la solución para facilitar el proceso de intercambio iónico. De manera interesante, el presente proyecto demostró que la floculación puede no llevarse a cabo si se utiliza el proceso de adsorción no sólo como un medio para concentrar los glucósidos de esteviol, sino para remover una cantidad importante de moléculas en suspensión al evitar la adsorción de estas a la matriz macroporosa de las resinas utilizadas. Esta conclusión quedó de manifiesto al ver que los volúmenes necesarios para saturar las columnas de intercambio iónico aumentan si el jugo alimentado a estas es previamente tratado en un proceso de adsorción. El volumen procesado del licor que pasó por la columna de adsorción, fue 1.14 veces mayor al volumen del jugo que no pasó por el proceso de adsorción y la cantidad de glucósidos de esteviol de ese proceso durante el ciclo útil del sistema de intercambio iónico fue de 75 g contra 65.49 g respectivamente. Estos resultados están en concordancia con los presentados por Li y colaboradores (2012), donde ellos incrementan no sólo el rendimiento sino el desempeño del proceso al utilizar un sistema de cama mixta de adsorción con resinas macroporosas. Sin embargo, en el presente trabajo encontramos rendimientos más elevados a los reportados por Anvari y Khayati (2016), donde ellos encuentran rendimientos de extracción del 81 % utilizando resinas de adsorción macroporosas pero que presentan mediana polaridad, contra el 86 % que encontramos en el presente trabajo y que es un rendimiento global de extracción. Es decir, el rendimiento en la operación de adsorción, a pesar de que no se cuantificó de manera independiente, se estima que es superior al 90 % de acuerdo a la curva de saturación que se presenta. Es importante señalar que las resinas de adsorción utilizadas en este trabajo son

neutras no presentan ningún tipo de polaridad y por lo tanto pudiera ser que esto límite en algún grado la adsorción de los glucósidos de esteviol en dicha matriz.

En el caso del proceso de desmineralización por cromatografía de intercambio iónico de los jugos de *Stevia*, la reducción en la concentración de los contaminantes en los licores de *Stevia* durante el proceso de adsorción de los glucósidos de esteviol ayudó a aumentar el desempeño del sistema de intercambio iónico como ya se mencionó previamente. Durante el desarrollo del proceso de desmineralización llevado a cabo en el presente trabajo debido al tipo de columnas utilizadas se presentó un fenómeno de dilución importante en la concentración del licor de *Stevia*, por lo que se recomienda el uso de columnas empacadas que permitan trabajar a presiones superiores a la atmosférica para tratar, en la medida de lo posible, generar un flujo tipo pistón que reduzca el fenómeno de dilución, y así consumir menos agua y ahorrar energía en los procesos subsecuentes de concentración y secado (Weiss, 2004).

El proceso de secado por aspersion de los glucósidos de esteviol se llevó a cabo sin contratiempos y de acuerdo a lo reportado previamente (Zorzenon, *et al.*, 2020). Esta operación unitaria demanda de tiempo ya que los flujos de operación tienden a ser bajos, por lo que sería interesante implementar una nueva operación de adsorción, que facilite la concentración de los glucósidos de esteviol y reduzca los tiempos de operación en concentración y secado. Es importante señalar que en el presente trabajo no se persiguió ninguna técnica de micro encapsulación ni se adicionaron aditivos durante el proceso de secado a la *Stevia* ya que este producto será utilizado para la obtención y purificación del rebaudiósido A. Por otro lado, los rendimientos globales de extracción del proceso los cuales fueron superiores al 85 %, deben considerarse como satisfactorios ya que dichos valores tienden a estar alrededor del 80 % (Oehme *et al.*, 2017).

Analizando el proceso de cristalización en función de los rendimientos se observó que la mezcla etanol: agua funciona mejor al estar alejada de concentraciones elevadas de etanol, así como también, el porcentaje de saturación de sólidos genera efecto en la cristalización. Al igual que Matheus y Picone (2019) entre más saturación mejor. En

los tratamientos realizados se lograron obtener rendimientos del 96.5 % y una pureza de 93.4 %. Para el caso de los extractos de *Stevia* entre mayor pureza de rebaudiósido A cristaliza mejor esto en concordancia con Matheus y Picone (2019). En comparación con los métodos descritos por las patentes US 7,838,044, US 9,012,626 y la US 2019 / 0169220 el proceso de cristalización es muy similar al descrito en el presente trabajo, donde se logró obtener cristalizados de rebaudiósido A de mayor pureza respecto a ellos quienes en sus mejores tratamientos solo lograron un 84.4 % y 87 % de pureza respectivamente. Salvo el trabajo realizado en la patente US 2019 / 0169220 donde obtuvieron una pureza del 99 %. En cuanto a solubilidad, en la prueba a 56 % de sólidos las 6 muestras se disolvieron a temperatura ambiente mientras que en la prueba a 15 % de sólidos solo el segundo extracto de *Stevia* se disolvió a temperatura ambiente. Después de seis días se observó formación de cristales en los dos extractos de *Stevia* al 15 % de sólidos en comparación con la prueba al 56 % de sólidos en la cual el primer extracto cristalizó al primer día y el segundo a los 13 días. El segundo extracto de *Stevia* fue el que obtuvo menores rendimientos además de tener problemas al no cristalizar una de las repeticiones en cada uno de sus dos tratamientos.

En el análisis estadístico se observó que en el caso del rendimiento de rebaudiósido A hubo efecto en los tratamientos mostrando que el tratamiento tres es el que tiene una diferencia significativa siendo el tratamiento con menor rendimiento al solo lograr el 19.2 %. Para el resto de tratamientos no se encuentran diferencias significativas entre ellos, sin embargo, el tratamiento dos es el que mayor rendimiento obtiene logrando recuperar el 96.5 %.

En el análisis de los factores por separado se tiene que los tres factores: mezcla etanol: agua, el porcentaje de saturación de sólidos y la pureza de rebaudiósido A tuvieron efecto. Para el caso de las mezclas etanol: agua la mezcla 65: 35 es la que mejor funciona, en la prueba de sólidos la saturación al 56 % es la que mejor resulta y en el caso de los extractos de *Stevia* el primer extracto de *Stevia* es el que obtiene el mejor rendimiento. De esta manera el tratamiento con mayor rendimiento es el que tiene a los tres mejores factores juntos (65: 35 etanol: agua, 56 % sólidos y primer extracto de

Stevia) y el peor, el que tiene los peores tres factores (85: 15 etanol: agua, 15 % sólidos y segundo extracto de *Stevia*).

En el análisis de pureza de rebaudiósido A se pudo concluir que no hay diferencia significativa entre los tratamientos, así como tampoco entre los factores, sin embargo, el tratamiento uno es el que menor pureza obtiene con un 88 % y el tratamiento tres el que obtiene la más alta con 93.4 %. En los extractos de *Stevia* a pesar de no tener diferencia estadística significativa el segundo extracto de *Stevia* es el que logra el mejor grado de pureza.

CAPÍTULO X

10. CONCLUSIÓN

La implementación para el proceso de extracción de glucósidos de esteviol de hojas de *Stevia rebaudiana* del uso de sondas ultrasónicas para favorecer la extracción de glucósidos de esteviol al agua, a temperatura ambiente, y el uso de una columna preparativa de adsorción con resinas macroporosas neutras, las cuales se utilizan para purificar parcialmente y concentrar los glucósidos de esteviol presentes en los licores madres, reducen de manera importante el consumo energético durante el proceso así como el consumo de agua y aumenta la eficiencia del proceso al reducir los tiempos de operación.

Los cristales obtenidos a partir de los glucósidos de esteviol totales generados por el proceso desarrollado presentan los niveles de pureza necesarios para poder ser comercializados, y para poder ser utilizados como precursores para la obtención enzimática de moléculas de mayor valor agregado como lo son los rebaudiósidos D y M.

CAPÍTULO XI

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar sondas ultrasónicas para favorecer la extracción de biomoléculas a partir de material vegetativo en solventes como el agua.

Se recomienda la implementación de un segundo paso de adsorción al final del proceso de desmineralización para favorecer el proceso de concentración y reducir los tiempos de proceso, así como el consumo energético en el mismo.

Para el proceso de cristalización se recomienda:

Utilizar mezclas etanol: agua en un rango de 60 a 70 % de etanol.

Saturar las soluciones en un rango de 50 a 60 % de sólidos.

Mantener los cristales en recipientes cerrados para evitar que absorban humedad.

Se recomienda iniciar los trabajos de expresión de la proteína UDP-glucosil transferasa, para poder iniciar con la síntesis de los rebaudiósidos D y M.

CAPÍTULO XII

12. REFERENCIAS

- Abelyan, V. H., Ghochikyan, V. T., Markosyan, A. A., Adamyan, M. O., y Abelyan, L. A. (2010). *United States Patente n° US 7,838,044 B2*.
- Anvari, M., y Khayati, G. (2016). Separation and purification of rebaudioside A from extract of *Stevia Rebaudiana* leaves by macroporous adsorption resins. *Polish Journal of Chemical Technology*, 18(1), 127-132.
- González, A. I., Ordoñez, M. Y., y Ancona, B. D. (2015). Determination of Rebaudioside A and Stevioside in Leaves of *S. rebaudiana Bertoni* Grown in México by a Validated HPLC Method. *American Journal of Analytical Chemistry*, 6(11), 878-885.
- Barba, F. J., Grimi, N., y Vorobiev, E. (2015). Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Journal of Food Engineering*, 149(1), 222-228.
- Bautista, S. V. (2010). *CARACTERIZACIÓN GÉNICA Y BIOQUÍMICA DE UNA CICLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASA, ENZIMA IMPLICADA EN EL METABOLISMO DE ALMIDÓN EN *Haloferax mediterranei** (Tesis doctoral). Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, Alicante, España.
- Campos Garcia, J., Sosa Aguirre, C. R., y Reyes de la Cruz, H. (2008). *México Patente n° MX 273569*.
- Cargill. (26 de Septiembre de 2019). *El Reto de la Reducción de Azúcar con Edulcorantes*. Obtenido de Food Tech SUMMIT & EXPO 2019: <http://www.enfasis.com/FTS/2019/Presentaciones/Talks-1-Sustitutos-de-azucar-Oscar-Arreola.pdf>

- Celaya, L. S., Kolb, E., y Kolb, N. (2016). Solubility of Stevioside and Rebaudioside A in water, ethanol and their binary mixtures. *International Journal of Food Studies*, 5(2), 158-166.
- Ceunen, S., y Geuns, J. M. (2013). Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *Journal of Natural Products*, 76(6), 1201–1228.
- Chranioti, C., Chanioti, S., y Tzia, C. (2015). Microencapsulation of steviol glycosides (*Stevia rebaudiana* Bertoni) by a spray drying method - Evaluation of encapsulated products and prepared syrups. *International Journal of Food Studies*, 4(2), 212-220.
- de Oliveira, B. H., Packer, J. F., Chimelli, M., y de Jesus, D. A. (2007). Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Biotechnology*, 131(1), 92–96.
- Dornblaser, L. (2017). Trends in sugar, sugar reduction, and sweeteners. *34th annual Sweetener Symposium*. MINTEL.
- Formigoni, M., Gimenez, M. P., da Silva, A. A., dos Santos, V. J., Benossi, L., Dacome, A. S., . . . da Costa, S. C. (2018). Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. *Food Chemistry*, 241(1), 452-459.
- Galaev, I., y Sahoo, M. R. (2019). *United States Patente nº US 2019 / 0169220 A1*.
- GRAS ASSOCIATES, LLC. (2016). *GRAS Assessment of Rebaudioside M ((≥ 95 %) Food Usage Conditions for General Recognition of Safety for Blue California*. Rancho Santa Margarita: GRAS ASSOCIATES, LLC.
- Gutiérrez, C. A. (2015). *Bioquímica, farmacología y toxicología de Stevia rebaudiana Bertoni* (Tesis de grado). FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, Madrid, España.
- Hielscher Company. (s.f.). *Tecnología de ultrasonido de Hielscher*. Obtenido de UIP2000hdT – Ultrasonicador industrial con una potencia de 2000 W y un

control completo del proceso: <https://www.hielscher.com/es/uip2000hdt-2000-watts-powerful-industrial-ultrasonicator-for-full-process-control.htm>

International Food Information Council Foundation. (22 de Mayo de 2019). *Interest in Sustainability, Plant-Based Diets Among Trends in IFIC Foundation's 2019 Food & Health Survey*. Obtenido de Food Insight: <https://foodinsight.org/interest-in-sustainability-plant-based-diets-among-trends-in-ific-foundation-2019-food-and-health-survey/>

Jentzer, J. B., Alignan, M., Vaca Garcia, C., Rigal, L., y Vilarem, G. (2015). Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chemistry*, 166(1), 561-567.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2010). FAO JECFA Monographs. *COMPENDIUM OF FOOD ADDITIVE SPECIFICATIONS*. Roma, Italia: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

Kai, T. M. (4 de Noviembre de 2015). *A 1108 - Rebaudioside M as a Steviol Glycoside Intense Sweetener*. Obtenido de Food Standards Australia New Zealand: <https://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Documents/A1108-AppR-SD1.pdf>

Kent, S. K. (1995). For your next separation consider adsorption. *Chemical Engineering*, 102(11), 92-101.

Khoddami, A., Wilkes, M. A., y Roberts, T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *molecules*, 18(2), 2328-2375.

Krishnaswamy, K., Orsat, V., Gariépy, Y., y Thangavel, K. (2013). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Grape Seeds (*Vitis vinifera*). *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), 441-455.

- Kumari, N., Rana, R. C., Sharma, Y. P., y Kumar, S. (2017). Extraction, Purification and Analysis of Sweet Compounds in *Stevia rebaudiana* Bertoni using Chromatographic Techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79(4), 617-624.
- Lee, S. G., Salomon, E., Yu, O., y Jez, J. M. (2019). Molecular basis for branched steviol glucoside biosynthesis. *PNAS*, 116(26), 13131-13136.
- Li, J., Chen, Z., y Di, D. (2012). Preparative separation and purification of Rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* Bertoni crude extracts by mixed bed of macroporous adsorption resins. *Food Chemistry*, 132(1), 268-276.
- Li, S., Li, W., Xiao, Q. y., y Xia, Y. (2013). Transglycosylation of stevioside to improve the edulcorant quality by lower substitution using cornstarch hydrolyzate and CGTase. *Food Chemistry*, 138(1), 2064-2069.
- Li, Y., Li, Y., Wang, Y., Chen, L., Yan, M., Chen, K., . . . Ouyang, P. (2016). Production of Rebaudioside A from Stevioside Catalyzed by the Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(8), 1586–1598.
- Liu, Y., Hua, X., Wang, M., y Yang, R. (2019). Purification of the mother liquor sugar from industrial *Stevia* production through one-step adsorption by non-polar macroporous resin. *Food Chemistry*, 274(1), 337-344.
- Mao, G., Chaturvedula, V. P., Vick, J. E., y Yu, O. (2017). Enzymatic Synthesis and Structural Characterization of Rebaudioside D3, a Minor Steviol Glycoside of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *American Journal of Plant Sciences*, 8(3), 441-450.
- Martins, P. M., Lanchote, A. D., Thorat, B. N., y Freitas, L. A. (2017). Turbo-extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* using a fractional factorial design. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(4), 510-518.

- Martins, P. M., Thorat, B. N., Lanchote, A. D., y Freitas, L. A. (2016). Green extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bert.) with low solvent consumption: A desirability approach. *Resource-Efficient Technologies*, 2(4), 247-253.
- Martono, Y., Adiwibowo, Y. D., y Aminu, N. R. (2020). Optimization of Supersaturated Solution from *Stevia rebaudiana* water extract lead to crystal nucleation. *AIP Conference Proceedings*, 2237(1), 1-7.
- Martono, Y., Darmawan, F. A., y Ratuaminu, N. (s.f.). *Water-Based Crystallization and Formulation of Stevioside from Stevia rebaudiana (Bert.) As Natural Sweetener With Antidiabetic Activity*. Obtenido de ACADEMIA: https://www.academia.edu/10986509/Water_Based_Crystallization_and_Formulation_of_Stevioside_from_Stevia_rebaudiana_Bert_As_Natural_Sweetener_With_Antidiabetic_Activity
- Matheus, G. S., y Picone, C. S. (2019). Evaluation of the crystallization process of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Revista de trabajos de iniciación científica en UNICAMP*, 27(1), 1-1.
- Miron, T. L., Herrero, M., y Ibáñez, E. (2013). Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1288(1), 1-9.
- Oehme, A., Wüst, M., y Wölwer, R. U. (2017). Steviol glycosides are not altered during commercial extraction and purification processes. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 1-7.
- Olsson, K., Carlsen, S., Semmler, A., Simón, E., Mikkelsen, M. D., y Møller, B. L. (2016). Microbial production of next-generation stevia sweeteners. *Microbial Cell Factories*, 15(207), 1-14.
- Piasecka, A., Krzemińska, I., y Tys, J. (2014). Physical methods of microalgal biomass pretreatment. *International Agrophysics*, 28(3), 341-348.

- Prakash, I., Upreti, M., DuBois, G. E., King, G. A., y Mehta, A. (2015). *United States Patente n° US 9.012,626 B2*.
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J., y Tiwary, A. K. (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, 132(3), 1113-1120.
- Ramírez, J. G. (2011). Paquete tecnológico Estevia (*Stevia rebaudiana*) Establecimiento y mantenimiento. Mocochoá, Yucatán, México.
- Ramírez, J. G., Avilés, B. W. I., Moguel, O. Y. B., Góngora, G. S. F., y May, L. C. (2011). ESTEVIA (*Stevia rebaudiana*, Bertoni), UN CULTIVO CON POTENCIAL PRODUCTIVO EN MÉXICO. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste*, 1-88.
- Richman, A., Swanson, A., Humphrey, T., Chapman, R., McGarvey, B., Pocs, R., y Brandle, J. (2005). Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *The Plant Journal*, 41(1), 56–67.
- Rodenburg, D. L., Alves, K., Perera, W. H., Ramsaroop, T., Carvalho, R., y McChesney, J. D. (2016). Development of HPLC Analytical Techniques for Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni: Strategies to Scale-Up. *Sociedade Brasileira de Química*, 27(8), 1406-1412.
- Salvador, R. R., Sotelo, H. M., y Paucar, M. L. (2014). Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria*, 5(3), 157-163.
- Savita, S. M., Sheela, K., Sunanda, S., Shankar, A. G., y Ramakrishna, P. (2004). *Stevia rebaudiana* – A Functional Component for Food Industry. *Journal of Human Ecology*, 15(4), 261-264.
- Secretaría de Economía. (5 de Abril de 2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010. *Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y*

bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria. Ciudad de México, México: Diario Oficial de la Federación.

- Žlabur, J. Š., Voća, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F., y Brnčić, S. R. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *International Agrophysics*, 29(2), 231-237.
- Singla, R., y Jaitak, V. (2016). Synthesis of rebaudioside A from stevioside and their interaction model with hTAS2R4 bitter taste receptor. *Phytochemistry*, 125(1), 106-111.
- TAO, J., LI, G., LIANG, X., LEE, T., YEP, G., y TAO, A. (2016). *United States Patente n° US 2016/0298159 A1*.
- Universidad Nacional Autónoma de México. (Diciembre de 2007). Técnicas Cromatográficas. *Química Analítica Instrumental II*. Ciudad de México, México.
- Ye, F., Yang, R., Hua, X., Shen, Q., Zhao, W., y Zhang, W. (2013). Modification of stevioside using transglucosylation activity of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase to reduce its bitter aftertaste. *LWT - Food Science and Technology*, 51(2), 524-530.
- Ye, F., Yang, R., Hua, X., Shen, Q., Zhao, W., y Zhang, W. (2014). Modification of steviol glycosides using α -amylase. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 400-405.
- Zorzenon T., M. R., Formigoni, M., da Silva, S. B., Hodas, F., Piovan, S., Ciotta, S. R., . . . Costa, S. C. (2020). Spray drying encapsulation of stevia extract with maltodextrin and evaluation of the physicochemical and functional properties of produced powders. *Journal of Food Science*, 85(10), 3590-3600.