



**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado. Maestría
en Tecnología de los Alimentos.**

Maestranda
Ing. Qca. Liliana Soledad Celaya

Optimización de la extracción de esteviolglicósidos de Stevia rebaudiana Bertoni

**Tesis de Maestría presentada para obtener el título de “Magíster
en Tecnología de los Alimentos”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Director
Mgter. Ing. Qco. Nicolás Kolb Kozlobsky
Co-Director
Dr. Ing. Qco. Miguel Eduardo Schmalko

Posadas, Misiones 2013



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-
CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS QUIMICAS Y NATURALES
MAESTRIA EN TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS



**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN
DE ESTEVIOLGLICÓSIDOS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni**

TESISTA: Ing. Qca. Liliana Soledad Celaya

DIRECTOR: Mter. Ing. Qco. Nicolás Kolb Kozlobsky

CO DIRECTOR: Dr. Ing. Qco. Miguel Eduardo Schmalko

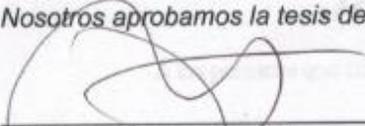
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES



AÑO 2013

A Ireneo...

Nosotros aprobamos la tesis de Maestría de la Ing. Liliانا Soledad Celaya



Dr. Roque Alberto Hours
Evaluador Externo
Universidad Nacional de la Plata - CONICET

27/09/2013

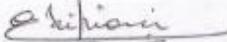
Fecha



Dr. José Luis Herrera
Evaluador Interno – FCEQyN
Universidad Nacional de Misiones

27-09-13

Fecha



Mgter. Griselda Patricia Scipioni
Evaluador Interno – FCEQyN
Universidad Nacional de Misiones

27/09/2013

Fecha

Mgter. Ing. Nicolás Kolb Koslowsky
Director de Tesis – FCEQyN
Universidad Nacional de Misiones



Fecha



Dr. Ing. Miguel Eduardo Schmalko
Co-Director de Tesis – FCEQyN
Universidad Nacional de Misiones

Fecha

CALIFICACIÓN: Elaboración de Tesis.....^{10(0/02)}.....

CALIFICACIÓN: Defensa de Tesis.....^{10(0/02)} *Scipioni*.....

AGRADECIMIENTOS

A las personas que contribuyeron a la terminación exitosa de este trabajo:

Dario Ferreyra

Roberto Bloos

Silvia Resnik

Angela Meireles

Cristina Mayol

Eugenio Kolb

Irina Kolb

Cecilia Yulán

Alicia Martos

RESUMEN

En el presente trabajo, se estudió la influencia de la temperatura y las proporciones relativas de etanol y agua en el solvente de extracción, en lecho percolador, de los componentes edulcorantes principales de las hojas molidas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Los ensayos se realizaron a escala laboratorio, partiendo de un material vegetal con alta proporción de Rebaudiósido A, el componente de mejores características edulcorantes.

El rango de temperaturas estudiadas fue de 30 °C a 70 °C, mientras que el rango estudiado de mezclas etanol:agua estuvo entre 0:100 y 100:0 desde agua pura a etanol puro. A partir de los resultados obtenidos, se realizó un tratamiento estadístico con el fin de determinar las condiciones óptimas de operación.

Complementariamente, se determinaron las curvas de solubilidad del Esteviósido, del Rebaudiósido A y de mezclas de Esteviósido y Rebaudiósido A en los mismos rangos de temperaturas y proporciones etanol:agua utilizados en las experiencias de extracción.

En cuanto a la eficiencia de la extracción, ésta aumentó linealmente con la temperatura y fue mayor cuando el porcentaje de etanol en el solvente mixto se encontraba entre el 30 y 70 %. Los resultados obtenidos fueron concordantes con las solubilidades de Esteviósido y Rebaudiósido A en estos solventes mixtos; difirieron en solvente acuoso, posiblemente debido al fenómeno de co-solubilización de los glicósidos en agua. Los extractos de mayor pureza se obtuvieron con etanol:agua 70:30. Sin embargo, no se pudo establecer la dependencia de la pureza con la temperatura y el solvente mixto utilizando una ecuación de segundo orden. En condiciones óptimas (etanol:agua 36:64 y 70°C), el porcentaje de Esteviósido recuperado fue del 93,46 % y el de Rebaudiósido A, del 87,50 %, cuando el tiempo de operación fue de una hora y obteniendo 1 L de extracto bruto por cada 200 g de hojas secas molidas.

ABSTRACT

In the present work, the influence of temperature and relative ratios of ethanol and water in the extraction solvent, in percolator bed, of the main sweetener components of ground leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni were studied. Assays were performed at laboratory scale, from plant material with high proportion of Rebaudioside A, the component carrying the best sweetener characteristics.

The range of temperatures studied was of 30 °C to 70 °C, while the scope of the ethanol:water varied from 0:100 up to 100:0 from pure water to pure ethanol. From the results obtained, a statistical treatment was performed with the aim of determining the optimal conditions of operation.

In addition, and as complimentary to this work, solubility curves of Stevioside, Rebaudioside A and mixtures of Stevioside and Rebaudioside A in the same ranges of temperature and proportions ethanol:water used in the extraction experiences were determined.

As for the efficiency of the extraction, this increased linearly with temperature and is greater when the percentage of ethanol in the mixed solvent fell between 30 and 70 %. The results obtained were in agreement with solubilities of Stevioside and Rebaudioside A in mixed solvents. They differed in aqueous solvents, probably due to the phenomenon of co-solubilization of glycosides in water. The extracts with greater purity were obtained with ethanol:water 70:30. However, the dependence of purity with temperature and the mixed solvent could not be established using a second degree equation. In optimal conditions (ethanol:water 36:64 and 70 °C), the percentage of recovered Stevioside was 93,46 % and of Rebaudioside A was 87.50 %, when the operation time was one hour, obtaining 1 liter of crude extract from 200 g of ground dry leaves.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	6
OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
JUSTIFICACIÓN	13
CAPÍTULO II	14
II.1 EDULCORANTES	14
II.2 <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	16
II.2.1 Aspectos históricos	17
II.2.3 Panorama actual y legislación	19
II.3 ASPECTOS BOTÁNICOS Y AGRONÓMICOS	20
Generalidades biológicas	20
Cultivo	21
Reproducción	22
Siembra	23
Prácticas culturales	23
Cosecha	24
Rendimientos agronómicos	25
II.4 COMPOSICIÓN DE LA <i>STEVIA REBAUDIANA</i>	27
II.4.1 Composición centesimal	27
II.4.2 Compuestos fitoquímicos caracterizados	28
II.4.3 Esteviolglicósidos o glicósidos de esteviol	30

II.4.4	Variedades de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	33
II.5	PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS ESTEVIOLGLICÓSIDOS	35
II.5.1	Comportamiento químico	35
II.5.2	Estudios de estabilidad	36
II.5.3	Formas cristalinas	37
II.5.4	Solubilidad	38
II.5.5	Análisis de esteviolglicósidos	41
II.6	PROCESAMIENTO DE LA STEVIA	42
II.6.1	Calidad de stevia para procesamiento	42
II.6.2	Pre-tratamientos	44
	Secado	44
	Molienda	44
	Almacenamiento	45
II.6.3	Proceso de producción	45
II.7	OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN	47
II.7.1	Optimización	47
II.7.1.1	Preparación de material sólido	48
II.7.1.2	Solventes de extracción	48
II.7.1.3	Temperatura de operación	49
II.7.1.4	Modo de operación y equipo	49
II.7.2	Extracción de esteviolglicósidos	50
II.7.3	Optimización de la extracción de esteviolglicósidos	51
 CAPÍTULO III		
III.1	PROPUESTA METODOLÓGICA	55

III.2	MATERIALES Y MÉTODOS	57
III.2.1	MATERIALES	57
	a. Material vegetal	57
	b. Esteviolglicósidos	58
	c. Equipos	58
III.2.2	MÉTODOS	61
	a. Obtención de datos experimentales	61
	a.1 Ensayos de extracción	61
	a.2 Ensayos de solubilidad	63
	b. Métodos analíticos	64
	b. 1 Determinación de humedad del lote	64
	b. 2 Determinación del contenido de Esteviósido y Rebaudiósido A	64
	b. 3 Determinación de extractos totales	67
	b. 4 Determinación de la granulometría del lote	68
	c. Métodos estadísticos y análisis de datos experimentales	69
	c. 1 Diseños experimentales	69
	i. Diseño experimental 3*5	70
	ii. Diseño experimental CCD	71
	iii. Diseño compuesto	72
	c. 2 Solubilidad de Esteviósido y Rebaudiósido A	74
	c. 3 Ajuste de los datos a modelos cinéticos	74
III.2.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
	a. Capacidad del método analítico para la cuantificación de esteviolglicósidos en extractos brutos	77
	b. Diseños experimentales	78
	i. Diseño experimental 3*5	78

ii.	Diseño experimental CCD	82
iii.	Diseño experimental compuesto	83
c.	Condiciones óptimas de extracción	88
d.	Consumo de solventes	90
e.	Solubilidad del Esteviósido y Rebaudiósido A	90
f.	Ajuste de los datos a modelos cinéticos	94
III.2.4	CONCLUSIONES	100
CAPÍTULO IV		102
IV.1	PROPUESTAS DE TRABAJOS FUTUROS	102
IV.2	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	103
IV.3	ANEXOS	127
	ANEXO A. Tablas	128
	ANEXO B. Figuras	140
	ANEXO C. Ecuaciones	144

LISTA DE TABLAS

Tabla II.1	Edulcorantes de alto poder (bajo contenido calórico)
Tabla II.2	Rendimientos agronómicos
Tabla II.3	Composición química centesimal proximal de las hojas de <i>S. rebaudiana</i>
Tabla II.4	Caracterización fitoquímica
Tabla II.5	Composición típica (% b.s.) reportada en hojas de algunas variedades de <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.
Tabla II.6	Esteviolglicósidos, N° de CAS y radicales unidos a las posiciones 4 y 13 del núcleo ent-kaureno
Tabla II.7	Variedades de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni
Tabla II.8	Datos físicos de los esteviolglicósidos
Tabla II.9	Correlación entre el análisis por HPLC y el análisis de carbohidratos totales
Tabla II.10	Carbohidratos solubles, sólidos solubles totales y sólidos totales obtenidos por extracción en diferentes condiciones
Tabla II.11	Separación y detección de esteviolglicósidos con HPLC
Tabla II.12	Obtención del extracto bruto, algunos procesos patentados
Tabla II.13	Optimización de la extracción de esteviolglicósidos de stevia
Tabla III.1	Contenido de humedad, Esteviósido y Rebaudiósido A del lote
Tabla III.2	Distribución granulométrica
Tabla III.3	Dimensiones del equipo extractor y condiciones de trabajo
Tabla III.4	Datos físicos de los solventes de extracción empleados
Tabla III.5	Variables de diseño experimental
Tabla III.6	Diseño experimental 3*5
Tabla III.7	Diseño experimental CCD
Tabla III.8	Diseño experimental compuesto
Tabla III.9	Variables de ajuste cinético
Tabla III.10	Análisis de varianza (p-valor)
Tabla III.11	Variables de peso significativo en la ecuación de segundo orden
Tabla III.12	Coefficientes de la ecuación de segundo orden (Ec. 15)

Tabla III.13 Bondad de ajuste (Ec. 15)

Tabla III.14 Esteviósido recuperado (%). Parámetros de la Ec. de Pilosof

Tabla III.15 Rebaudiósido A recuperado (%). Parámetros de la Ec. de Pilosof

LISTA DE FIGURAS

- Figura II.1 Bioclima de *S. rebaudiana* en la Argentina
- Figura II.2 Plantines de stevia
- Figura II.3 Composición y contenido de esteviolglicósidos en órganos vegetativos y reproductivos de la *Stevia rebaudiana*
- Figura II.4 Etapas en la floración
- Figura II.5 Plantación experimental de stevia
- Figura II.6 Estructura de los glicósidos de esteviol
- Figura II.7 Glicósidos de esteviol
- Figura II.8 Pre-tratamiento de las hojas de stevia
- Figura II.9 Etapas principales de procesamiento
- Figura II.10 Equipo de extracción para la obtención del extracto bruto de *S. rebaudiana*
- Figura III.1 Equipo percolador de laboratorio para el estudio de la extracción de Esteviósido y Rebaudiósido A
- Figura III.2 Características cromatográficas del Esteviósido y Rebaudiósido A
- Figura III.3 Contenido de Esteviósido y Rebaudiósido A, cuantificados por HPLC en el extracto bruto total obtenido con etanol:agua 30:70 a 70°C.
- Figura III.4 Stv_{rec} vs. porcentaje de etanol
- Figura III.5 Stv_{rec} vs. temperatura
- Figura III.6 RbA_{rec} vs. porcentaje de etanol
- Figura III.7 RbA_{rec} vs. temperatura
- Figura III.8 Pureza (%Stv) vs. porcentaje de etanol
- Figura III.9 Pureza (%RbA) vs. porcentaje de etanol
- Figura III.10 RbA/Stv vs. porcentaje de etanol
- Figura III.11 RbA/Stv vs. temperatura
- Figura III.12 Gráfico de superficie de respuesta estimada (Ec. 16) para la variación de la concentración de Esteviósido en el extracto bruto con el solvente mixto y la temperatura

- Figura III.13 Gráfico de superficie de respuesta estimada (Ec. 17) para la variación de la concentración de Rebaudiósido A en el extracto bruto con el solvente mixto y la temperatura
- Figura III.14 Gráfico de superficie de respuesta estimada (Ec. 18) para la variación del extracto total (g / L) con el solvente mixto y la temperatura
- Figura III.15 Gráfico de superficie de respuesta estimada (Ec. 19) para la recuperación porcentual de Esteviósido, a partir de la matriz vegetal con el solvente mixto y la temperatura
- Figura III.16 Gráfico de superficie de respuesta estimada (Ec. 20) para la recuperación porcentual de Rebaudiósido A, a partir de la matriz vegetal con el solvente mixto y la temperatura
- Figura III.17 Curvas de Nivel (Ec. 19) para la recuperación porcentual de Esteviósido, a partir de la matriz vegetal con el solvente mixto y la temperatura
- Figura III.18 Curvas de Nivel (Ec. 20) para la recuperación porcentual de Rebaudiósido A, a partir de la matriz vegetal con el solvente mixto y la temperatura
- Figura III.19 Variación de la solubilidad del Esteviósido y Rebaudiósido A con la temperatura en diferentes solventes mixtos (etanol:agua) de prueba
- Figura III.20 Comparación entre la variación de la solubilidad del Esteviósido y Rebaudiósido A y de las mezclas 1:1 (co-solubilización) con la temperatura en etanol:agua 30:70 y 70:30
- Figura III.21 Stv_{rec} con etanol:agua 0:100
- Figura III.22 Stv_{rec} con etanol:agua 30:70
- Figura III.23 Stv_{rec} con etanol:agua 50:50
- Figura III.24 Stv_{rec} con etanol:agua 70:3
- Figura III.25 Stv_{rec} con etanol:agua 100:0
- Figura III.26 RbA_{rec} con etanol:agua 0:100
- Figura III.27 RbA_{rec} con etanol:agua 30:70
- Figura III.28 RbA_{rec} con etanol:agua 50:50
- Figura III.29 RbA_{rec} con etanol:agua 70:30
- Figura III.30 RbA_{rec} con etanol:agua 100:0

NOMENCLATURA

Símbolo	Definición
b.h.	base húmeda
b.s.	base seca
C	capacidad
c	carga
CV %	coeficiente de variación
χ^2	Chi-cuadrado
D	diámetro del tubo externo
d	diámetro del tubo interno
E %	error medio porcentual
ET (i)	fracción de extracto total (g/100 mL)
ET (j)	extracto total (g/L)
ET	extracto total
H	altura
h	altura del lecho
i	fracción de extracto de 100 mL de un ensayo j
j	fracción de extracto de 1000 mL de un ensayo j
LC	límite de confianza
mesh	mallas por pulgada
mmHg	milímetros de mercurio
n	número de individuos observados (tamaño de la muestra)
N	número total de individuos
P _{fu}	temperatura de fusión
p/p	proporción en peso
p:p	proporciones en pesos de solvente sobre solvente
q	caudal de flujo del fluido calefactor
Q	caudal de salida de extractos
R ²	variabilidad explicada (coeficiente de determinación porcentual)

RbA/Stv	relación Rebaudiósido A / Esteviósido
RbA	Rebaudiósido A
RbA-Co	Rebaudiósido A en una mezcla Esteviósido - Rebaudiósido A
RbA _{rec}	porcentaje de Rebaudiósido A recuperado a partir de la matriz vegetal (%)
RbA (i)	concentración de Rebaudiósido A en una muestra (g/100 mL)
RbA (j)	concentración de Rebaudiósido A en una muestra (g/L)
%RbA	pureza expresada como porcentaje de Rebaudiósido A en un extracto total (% p/p)
RMSE	error cuadrático medio
Stv	Esteviósido
Stv-Co	Esteviósido en una mezcla Esteviósido - Rebaudiósido A
Stv _{rec}	porcentaje de Esteviósido recuperado a partir de la matriz vegetal (%)
Stv (i)	concentración de Esteviósido en una muestra (g/100 mL)
Stv (j)	concentración de Esteviósido en una muestra (g/L)
%Stv	pureza expresada como porcentaje de Esteviósido en un extracto total (% p/p)
v/v	proporción en volumen

SIGLAS Y ABREVIATURAS

CAA	Código Alimentario Argentino
CAS	Chemical Abstracts Service
HPLC	cromatografía líquida de alta performance
JECFA	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
SFE	extracción con fluidos supercríticos
UHPLC	cromatografía líquida de ultra alta performance

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

Stevia rebaudiana Bertoni, “stevia” o “estevia”, es una hierba perenne originaria del Paraguay y naturalizada en el sur de Brasil y en el litoral argentino. Se presenta como una importante fuente de edulcorantes en un mercado creciente; los principios endulzantes que de ella se extraen, constituyen una alternativa a edulcorantes de alto poder con la ventaja de ser componentes naturales.

Los compuestos de sabor dulce se encuentran presentes principalmente en las hojas de la planta. Su contenido como esteviolglicósidos totales puede variar entre 4 - 20 % b.s. (Abelyan et al., 2011a; Geuns, 2003; JECFA/63, 2004). Se extraen cuatro glicósidos principales: Esteviósido, Rebaudiósido A, Rebaudiósido C (Dulcósido B), y Dulcósido A y seis glicósidos menores, Rebaudiósido B, D, E, F, Rubusósido y Esteviolbiósido (Geuns, 2007a).

Según las especificaciones del Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios FAO/OMS (JECFA/63, 2004), los extractos de stevia contienen alto porcentaje de Esteviósido y Rebaudiósido A y pequeñas cantidades de los otros esteviolglicósidos, además de componentes típicos de las hojas como ser pigmentos, carbohidratos, proteínas (Chabot y Beaulieu, 2012; Goto, 2004; JECFA/69, 2008a; Kutowy et al., 1999; Pasquel, 1999).

La composición química de los preparados comerciales de stevia varía considerablemente en función del proceso de elaboración así como de las hojas utilizadas como materia prima (Geuns, 2007a; JECFA/68, 2007). Los productos disponibles en el mercado no contienen menos del 80 % de los cuatro esteviolglicósidos principales y la suma de los porcentajes de Esteviósido y Rebaudiósido A no es menor al 70 %. Los seis glicósidos menores están presentes en pequeñas cantidades (5 - 10 %) y la composición (cualitativa y

cuantitativa) de las restantes fracciones de los extractos no ha sido suficientemente caracterizada (JECFA/69, 2008b).

El Estevióside y Rebaudiósido A son los mayores responsables del sabor dulce; la relación entre estos dos determina la calidad del sabor (Geuns, 2007a; Kinghorn y Soejarto, 2001); en el edulcorante de uso tradicional, el Estevióside representa más del 50 % del total de los esteviolglicósidos ofreciendo un sabor a “regaliz” o retrogusto persistente; si el porcentaje de Rebaudiósido A es superior a 50 % hay una apreciable reducción de retrogusto.

A nivel nacional, la denominación Estevióside fue sustituida por esteviolglicósidos como aditivo, con la descripción y especificaciones establecidas por JECFA/69 (CAA, 2011). El Código Alimentario Argentino aprueba como edulcorantes siete glicósidos de esteviol: el Estevióside, el Rebaudiósido A y los glicósidos asociados: Rebaudiósido C (Dulcósido B), Dulcósido A, Rubusósido, Esteviolviósido y Rebaudiósido B; obtenidos por extracción con agua a alta temperatura a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. El CAA especifica además una pureza no inferior a 95% como esteviolglicósidos totales para los productos comercializados como formulaciones en polvo (CAA, 2011).

Para obtener los principios endulzantes valiosos de las hojas existen reportados en la literatura científica y patentados, numerosos procesos (Jonnala et al., 2006; Midmore y Rank, 2002; Rojas, 2009). Ellos involucran, en general:

- (I) Obtención del extracto bruto.
- (II) Floculación / separación por intercambio iónico / procesos de membranas.
- (III) Precipitación / filtración.
- (IV) Cristalización / concentración y secado.

La primera etapa en el procesamiento de stevia es la extracción con agua, solventes orgánicos o fluidos supercríticos, en algunos casos, precedida de una eliminación de los componentes lipídicos de las hojas o desengrase (Geuns, 2007a; JECFA/69, 2008b; Jonnala et al., 2006; Pasquel et al., 2000; Pól et al., 2007a; Yoda et al., 2003).

Desde el punto de vista de la tecnología de alimentos, la extracción sólido-líquido, extracción con solventes o lixiviación, es una operación de transferencia de materia basada en la disolución preferente de uno o más principios solubles de una matriz sólida, por contacto con un disolvente líquido selectivo (Mafat y Béliard, 1994; Treybal, 1988). Se trata de una operación de transferencia de masa en un sistema multicomponente, multifásico y en estado transitorio (Aguilera, 2003). Durante la operación, en una etapa, el solvente se mezcla íntimamente con el sólido, el contacto se mantiene durante el tiempo requerido y la mezcla se divide en dos corrientes (Brennan et al., 1998). Por regla general, la fase noble resultante de la operación de separación está constituida por la solución o mezcla del extracto y la fase insoluble constituye el residuo o torta; se da el caso contrario cuando lo que se busca es eliminar componentes indeseables de la matriz (Mafat y Béliard, 1994).

Durante la interacción entre el sustrato que contiene los solutos y el solvente, se desarrolla una secuencia de pasos fenomenológicos en la extracción de principios valiosos a partir de una matriz biológica (Aguilera, 2003; Mafat y Béliard, 1994). Estos incluyen:

1. *Sorción*, entrada del solvente en la matriz sólida e hinchamiento de las partículas.
2. *Lavado*, un porcentaje de solutos contenidos en las células dañadas por la molienda o el secado, se extrae directamente.
3. Solubilización y/o descomposición de componentes por hidrólisis.
4. *Difusión*, transporte de solutos hacia el exterior de la matriz sólida y migración hacia la solución de extracto.
5. *Separación y descarga*.

La extracción selectiva con solventes se utiliza ampliamente para recuperar componentes valiosos de los alimentos o eliminar compuestos indeseables. También para la extracción de fitoquímicos de las plantas (Aguilera, 2003). Como método de separación, continúa siendo uno de los más importantes en la producción de sustancias de aroma y sabor a partir de matrices naturales

(Lee y Lee, 2003). Esto debido a que estas formulaciones son a menudo muy complejas para sintetizarlas económicamente. Las materias primas utilizadas a tal fin son: hojas, raíces, semillas, ramas, madera, cortezas, bayas, flores, brotes, frutas, pastos, gomas, duramen, bálsamos y exudación de las resinas. La tecnología de extracción con fluidos supercríticos ha sido el avance más importante en este campo.

La extracción ideal, a nivel industrial, debería cumplir cuatro condiciones (Mafat y Béliard, 1994):

- i. Caudal elevado.
- ii. Máximo rendimiento.
- iii. Elevada concentración de extractos.
- iv. Elevada o débil selectividad en función del objetivo buscado.

La eficiencia de extracción (lixiviación) depende significativamente de varios parámetros que determinan el diseño del proceso y las características de la operación (Tzia, 2003); optimizar será entonces, el proceso de encontrar las condiciones o valores de las variables de proceso que dan el óptimo (máximo o mínimo) de la función o cantidad estudiada.

El método de lixiviación y la técnica de inmersión total del sólido en el líquido han sido los elegidos históricamente para obtener los principios activos valiosos a partir de las hojas de stevia (Abelyan 2006; Dobberstein y Ahmed, 1982; Jonnala et al., 2006; Kienle, 1992; Kutowy et al., 1999; Morita et al., 1978). El sistema de lecho percolador por su parte, se ha utilizado ampliamente en la industria farmacéutica y cosmética (Handa et al., 2008) para separar ingredientes o partes activas de las plantas o tejidos, de los componentes inactivos o inertes, utilizando solventes selectivos de extracción. No se dispone de referencias sobre las características del proceso extractivo en estos equipos, para obtener principios endulzantes valiosos a partir de hojas de stevia con solventes mixtos (Kutowy et al., 1999; Persinos et al., 1973).

Básicamente, los tanques de percolación son equipos donde sólidos de tamaño intermedio pueden lixivarse adecuadamente (Treybal, 1988); son de

construcción variable según la naturaleza del sólido, el líquido que se va a manejar y la escala de operación y son relativamente baratos. Las partículas sólidas por lixiviar descansan sobre un falso fondo, una rejilla que puede cubrirse con filtro de lona sujeto a la periferia para sostener partículas más finas. Después de que el equipo se carga, se bombea solvente dejando que toda la masa se empape o remoje durante cierto periodo, durante el cual, el lote del líquido puede circularse o no sobre el sólido (Treybal, 1988). La fase líquida resultante puede drenarse a través del fondo falso del tanque.

Destacando la relevancia que ha adquirido en la última década el Rebaudiósido A, esteviolglucósido de mejores propiedades como aditivo y por ende de mayor valor comercial que el Esteviósido (Carakostas et al., 2008; Geuns, 2007a; Goto y Clemente, 1998; Morita, 2010), que la información disponible sobre la recuperación de glicósidos individuales y la pureza de los extractos obtenidos es escasa, especialmente en el caso de solventes mixtos orgánicos-inorgánicos, el presente trabajo plantea la posibilidad de una operación de extracción más eficiente utilizando solvente mixto etanol-agua, trabajando a temperaturas mayores a las normales, y se propone realizar un aporte al conocimiento del proceso extractivo en lecho percolador como técnica para extraer los aditivos valiosos a partir la matriz vegetal.

ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Cuando se realiza la lixiviación partiendo de hojas molidas de stevia, se obtiene una mezcla compleja donde los componentes principales son esteviolglicósidos acompañados de otros constituyentes vegetales solubilizados y material en suspensión extraído con los solubles de las hojas (Abou-Arab et al., 2010; JEFCA/69, 2008b; Kolb, 2011; Kutowy et al., 1999).

La meta a alcanzar a la hora de diseñar y optimizar el proceso extractivo son el máximo rendimiento y la más elevada selectividad y dos aspectos tienen relevancia a la hora de seleccionar una técnica de extracción son:

1. La *eficiencia del proceso extractivo*, que viene dada por el grado de extracción de los principios activos valiosos, Esteviósido, Rebaudiósido A, la suma de ambos o los esteviolglicósidos totales (CAA, 2011; Geuns, 2007a; JEFCA/69, 2008b).

2. La *calidad de los extractos*, que se pondera en base a la concentración de Esteviósido y Rebaudiósido A en la mezcla líquida extraída, la proporción relativa entre los dos glicósidos (relación Rebaudiósido A / Esteviósido), y a la pureza expresada como porcentaje de esteviolglicósidos valiosos en el extracto o materia seca (Kutowy et al., 1999).

La composición de las impurezas es un aspecto que condiciona las posteriores operaciones unitarias de purificación del extracto bruto o crudo (Jonnala et al., 2006; Rezende et al., 2004).

Tanto la eficiencia del proceso extractivo como la calidad del extracto obtenido dependen de muchos factores. Entre ellos composición de la materia prima empleada, los tratamientos preliminares, la temperatura y tiempo de operación, el solvente de extracción y la relación hojas / solvente (Liu et al., 2010; Tzia, 2003; Zamora, 2007). Pueden emplearse adicionalmente ácidos, álcalis o sales minerales así como la aplicación de agitación, sonicación, microondas para aumentar los rendimientos (Abelyan et al., 2011b; Giovanetto et al., 1990; Jiménez et al., 2010; Kolb et al., 2001a; Liu et al., 2010; Soto y Del Val, 2002;

Zamora, 2007); enzimas o mezclas de enzimas para mejorar la cinética de la extracción o la proporción relativa de determinados principios valiosos en el extracto bruto (Abelyan et al., 2006; Puri et al., 2012).

En la mayoría de las patentes e investigaciones publicadas, se emplea agua como solvente para obtener el extracto bruto de stevia, aunque algunos procesos utilizan solventes orgánicos mixtos: etanol y CO₂, metanol y CO₂; o solventes mixtos orgánicos-inorgánicos: propanol-agua, etanol-agua, metanol-agua o etanol-agua-CO₂ (Abelyan et al., 2011a; Dobberstein y Ahmed, 1982; Erkucuk et al., 2009; JEFCA, 2008b; Pasquel et al., 2000).

Los procedimientos clásicos son la maceración (con agua a baja temperatura) y la infusión o decocción (con agua a alta temperatura). Liu et al. (2010) optimizaron la extracción acuosa asistida con sonicación determinando un tiempo de 32 min a 68 °C como condiciones óptimas para obtener el máximo rendimiento, utilizando una relación 1/10 (hojas / agua), e informaron los resultados como carbohidratos totales. En cambio, Chhaya et al. (2012), determinaron las siguientes condiciones óptimas para la extracción acuosa: 78 °C durante 56 min, utilizando una relación 1/14 (hojas / agua) en la extracción discontinua de esteviolglicósidos. Con agua a temperatura de ebullición, los rendimientos reportados están entre el 93 – 98% (Alvarez y Kusumoto, 1987; Chhaya et a., 2012). Celaya et al. (2012), determinaron un rendimiento de extracción de 94,55 % para Esteviósido y de 96,69 % para Rebaudiósido A con agua a temperatura de ebullición, utilizando material vegetal de la variedad estudiada en el presente trabajo, siendo el tiempo de extracción de 5 min y la relación hojas / agua de 1/100.

Zamora (2007) estudió el efecto de las variables tiempo, temperatura, tamaño de partícula y relación hoja / agua, sobre la concentración de edulcorante en el extracto, en la extracción discontinua de esteviolglicósidos (en tanque agitado), concluyendo que todas las variables consideradas influyen en el contenido de glicósidos en el extracto (no reportó efectos de interacción entre variables estudiadas). Dobbelstein et al. (1982), por su parte, patentaron un

proceso para la obtención y purificación de edulcorantes de stevia utilizando solvente mixto orgánico-inorgánico (metanol-agua), precediendo a la extracción una etapa de separación de impurezas “no glicósidos” con solvente de baja polaridad (cloroformo). Los trabajos mencionados (Dobberstein y Ahmed, 1982; Zamora, 2007), no hacen referencia a la variedad de stevia utilizada y no reportan resultados relativos a los rendimientos de extracción.

Realizando la extracción con agua a bajas temperaturas (maceración), en medio ácido (Kutowy et al., 1999), se obtiene un extracto de mayor pureza. Kutowy et al. (1999) utilizaron agua desmineralizada acidificada con ácido fosfórico para tratar las partículas pre-secadas de tamaño uniforme (10 - 40 mm) durante 10 a 20 min, a temperatura menor a 10 °C siendo la relación hojas secas / agua de 1/20.

La principal ventaja de realizar la operación con solvente acuoso, está en su simplicidad y bajo costo. Sin embargo, las operaciones que utilizan agua como solvente suelen asociarse a grandes volúmenes o a altos costos de recuperación del solvente; largos tiempos de extracción o alto consumo de energía para calentamiento o sonicación; además de operaciones posteriores complejas de separación y purificación (Aguilera, 2003; Erkucuk et al., 2009; Liu et al., 2010).

Respecto a la eficiencia de los procesos por lotes con solventes mixtos y a la calidad de los extractos obtenidos, la bibliografía disponible es escasa, no aporta mayor información sobre la recuperación de componentes valiosos a partir de la matriz vegetal y en general no se especifica la variedad de stevia empleada (Erkucuk et al., 2009; Evans et al., 2010; Dobbelstein et al., 1982; Giraldo et al., 2005).

Giraldo et al. (2005) estudiaron la extracción discontinua de los glicósidos de stevia con solventes mixtos etanol:agua determinando que los factores solvente, pH y relación hoja / solvente no influyen significativamente en la concentración de azúcares reductores (variable respuesta) siendo la temperatura óptima estimada para una extracción eficiente de entre 40 °C y 60 °C. Por su parte, Kolb et al. (2001a) optimizaron la extracción de Esteviósido y Rebaudiósido

A para el control de calidad de las hojas de stevia (a escala analítica); determinando un tiempo de 45 min, utilizando una relación hojas / solvente de 1/100 para la extracción discontinua de los glicósidos con etanol:agua 70:30 (p:p) asistida con sonicación a 70 °C.

Otros estudios recientes investigan la extracción de glicósidos utilizando fluidos supercríticos (Erkucuk et al., 2009; Pasquel et al., 2000; Pól et al., 2007a; Yoda et al., 2003). Yoda et al. (2003) investigaron la extracción de Esteviósido y Rebaudiósido A, utilizando una molienda de hojas de tamaño inferior a 10 mesh con una relación RbA/Stv = 0,61, y plantearon un proceso en dos etapas: (i) extracción con CO₂ (en el cual los glicósidos son insolubles), (ii) extracción con CO₂-H₂O durante 12 h; se extrajo aproximadamente el 50 % del Esteviósido y el 72 % del Rebaudiósido A presentes en las hojas, en las mejores condiciones. Erkucuk et al. (2009), en cambio, optimizaron las condiciones de extracción con fluidos supercríticos (SFE) utilizando como co-solvente, etanol:agua 70:30 en la extracción con CO₂ durante 60 min (medidos desde el momento de puesta en régimen). En las mejores condiciones (250 bar; 80 °C; 17,4 % de co-solvente) obtuvieron un rendimiento de 3,67 g de Esteviósido y 1,78 g de Rebaudiósido A por cada 100 g de material de partida; en la extracción clásica con agua, Erkucuk et al. (2009) obtuvieron los siguientes resultados: 4,17 g de Esteviósido y 2,25 g de Rebaudiósido A por cada 100 g de hojas; con la extracción con etanol: 3,38 g de Esteviósido y 1,48 g de Rebaudiósido A por cada 100 g de material vegetal. Erkucuk et al. compararon además, los costos asociados al empleo de SFE frente a las plantas convencionales de extracción (sin considerar costos de equipos de evaporación y costos energéticos asociados a la separación del solvente acuoso), indicando que para SFE es mayor el costo de capital que para los extractores convencionales, mientras los costos de operación son más bajos (Erkucuk et al., 2009). Similar es el caso de la utilización de equipos que producen ondas ultrasónicas o microondas (Alupului et al., 2009) que requieren mayor inversión inicial y costos energéticos mayores.

Los esteviolglicósidos pueden entonces extraerse con solvente acuoso, con solventes orgánicos, orgánicos-inorgánicos y por diversas técnicas incluyendo SFE. Cabe señalar que la operación unitaria de obtención del extracto bruto de stevia no puede considerarse en forma aislada, sino como la primera etapa en el proceso de obtención y purificación de los componentes valiosos de las hojas, de manera que la selección del método y la técnica empleados a tal efecto, así como los pre-tratamientos, solventes y condiciones de operación, también están condicionados por las posteriores operaciones unitarias de purificación, sobre las cuales existen reportados y patentados múltiples métodos y procesos, los cuales escapan a los límites del presente trabajo.

HIPÓTESIS GENERAL

Es posible obtener elevados rendimientos en la extracción de Esteviósido y Rebaudiósido A en lecho percolador, partiendo de hojas secas y molidas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, utilizando solventes mixtos etanol:agua y trabajando a temperatura elevada.

OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la operación de obtención de extracto bruto de *Stevia rebaudiana* utilizando mezclas solventes etanol:agua y como materia prima, hojas molidas de stevia con alta proporción de Rebaudiósido A. Para ello, se realizaron ensayos de extracción discontinua a escala de laboratorio, en lecho percolador, utilizando etanol:agua en diferentes proporciones y trabajando a diferentes temperaturas; se determinaron los rendimientos de extracción y la pureza de los extractos resultantes. La información obtenida se sometió a un tratamiento estadístico con el fin determinar las condiciones óptimas de operación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Son objetivos específicos:

1. Realizar ensayos de extracción en lecho percolador, utilizando hojas secas y molidas de *S. rebaudiana*, con solventes mixtos etanol:agua en diferentes proporciones (0:100, 30:70, 50:50, 70:30, 100:0) y trabajando a diferentes temperaturas (30 °C, 50 °C, 70 °C).

2. Realizar el seguimiento del proceso extractivo cuantificando las siguientes variables dependientes de las condiciones de operación:

- Esteviósido (g/L).
- Rebaudiósido A (g/L).
- Extracto total (g/L).
- Porcentaje de Esteviósido recuperado de la matriz vegetal.
- Porcentaje de Rebaudiósido A recuperado de la matriz vegetal.
- Pureza expresada como porcentaje de Esteviósido en el extracto total o materia seca.
- Pureza expresada como porcentaje de Rebaudiósido A en el extracto total o materia seca.

- Relación entre el contenido de Rebaudiósido A y Esteviósido en el extracto.
3. Analizar estadísticamente el comportamiento de las variables dependientes para determinar las condiciones óptimas de lixiviación:
 - Temperatura de extracción.
 - Porcentaje de etanol en la mezcla solvente (solvente mixto).
 4. Realizar ensayos de solubilidad de Rebaudiósido A y Esteviósido en diferentes solventes mixtos y comparar las solubilidades de los glicósidos investigados con los resultados obtenidos en los ensayos de extracción.
 5. Ajustar los datos cinéticos obtenidos a modelos matemáticos en función de variables de operación en lecho percolador.

JUSTIFICACIÓN

Existen numerosos procesos de obtención y purificación de extractos a fin de aislar los componentes valiosos de las hojas de stevia, principalmente Rebaudiósido A y Esteviósido. Para la primera etapa de proceso, en la mayoría de las investigaciones y patentes publicadas, se emplea agua como solvente para obtener el extracto bruto aunque algunos procesos utilizan solventes mixtos orgánico-inorgánicos como propanol-agua, etanol-agua o metanol-agua; sin embargo la información respecto a la eficiencia de la operación de extracción con solventes mixtos aptos para su aplicación en la industria alimentaria, a la calidad de los extractos obtenidos y a los rendimientos expresados en función de la composición del material vegetal empleado, es muy escasa.

El presente trabajo se propone realizar un aporte novedoso al conocimiento de la operación de extracción de los esteviolglicósidos, utilizando lecho de percolación como técnica extractiva y mezclas etanol:agua como solvente. Se pone énfasis en dos aspectos de interés para la industrialización de la stevia, la eficiencia del proceso extractivo y la calidad de los extractos brutos obtenidos, estudiando el contenido de Esteviósido y Rebaudiósido A (los dos esteviolglicósidos de mayor valor como aditivos) de manera independiente.

Los resultados podrán ser aplicados a escala industrial en la primera etapa del proceso de obtención de los glicósidos diterpénicos valiosos como aditivos, a partir de las hojas secas y molidas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

CAPÍTULO II

II.1 EDULCORANTES

Hasta principios del siglo XX, el hombre solo disponía de edulcorantes naturales como el azúcar y la miel; sin embargo, la alta incidencia de la diabetes mellitus, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares y los esfuerzos puestos en la promoción de la salud por parte de gobiernos y organismos internacionales, llevaron a la industria alimentaria a desarrollar diversos sustitutos del azúcar (Benjumea y Correa, 2001).

Los “edulcorantes” son sustancias que proporcionan sabor dulce (Kolb, 2008); los “edulcorantes alternativos” son sustancias que sustituyen total o parcialmente a la sacarosa (Chattopadhyaya, 2007; Nabors, 2011). Los “aditivos edulcorantes” en particular, poseen características endulzantes superiores a la sacarosa, son hipocalóricos y se utilizan ampliamente en la formulación de alimentos dietéticos o de reducido valor calórico (Abelyan et al., 2011a; Nabors, 2011).

El sabor dulce aparece en moléculas concretas y no es posible precisar a qué átomo en particular se debe. Se acepta que el fenómeno de percepción de este sabor consiste en una interacción física reversible entre la molécula de la sustancia edulcorante y la estructura molecular característica del centro receptor (Bartoshuk, 1983). No es posible establecer una clasificación de los edulcorantes basándose en sus estructuras químicas debido a la falta de homogeneidad entre éstas (Cubero et al., 2002; Kolb, 2008); la clasificación frecuente se basa en su aporte calórico (Kroger et al., 2006; Nabors, 2011):

- Edulcorantes de alto contenido calórico: Son ejemplos los monosacáridos y disacáridos (sacarosa, glucosa, fructosa) y los polialcoholes (maltitol, xilitol, sorbitol entre otros). Son edulcorantes de baja potencia.

- Edulcorantes de bajo contenido calórico: Son ejemplos la sacarina, ciclamato, acesulfamo K, sucralosa, aspartamo, NHDC (Neohesperidina dihidrochalcona) y el Estevióside y Rebaudiósido A. Son edulcorantes de alta potencia.

Los edulcorantes de alta potencia y bajo contenido calórico, pueden ser de origen natural o sintético, derivados de la modificación de componentes naturales por fermentación, tratamiento enzimático o derivación (Abelyan et al., 2011a).

En cuanto a las mezclas de edulcorantes de bajo contenido calórico (de alta potencia), el ejemplo más representativo (Nabors, 2011) el de la mezcla ciclamato-sacarina (3:1); pueden incluirse en este grupo, las mezclas de esteviolglicósidos como ser Estevióside-Rebaudiósido A.

Si definimos “edulcorantes” como las sustancias que proporcionan sabor dulce, es inmensa la cantidad de sustancias que satisfacen esta definición (Kolb, 2008); si nos limitamos a las sustancias susceptibles de ser empleadas para consumo humano, el número de ellas se reduce apreciablemente. Al considerar su uso como aditivos, deben poseer una serie de propiedades y cumplir determinados requisitos técnico-alimentarios para ser utilizados en reemplazo de la sacarosa (Cubero et al., 2002; Nabors, 2011; Kolb, 2008): sabor dulce lo más puro posible; bajo contenido calórico; poder edulcorante superior al de la sacarosa; propiedades físicas similares a la sacarosa: estabilidad en un rango amplio de temperatura y pH; solubilidad suficiente; deben ser no tóxicas y no producir sustancias tóxicas al ser empleadas en la formulación de alimentos; deben ser inertes respecto a las demás sustancias utilizadas en los alimentos; deben ser estables con el tiempo una vez aplicados en la formulación de alimentos; inocuos, no carcinogénicos.

En la Tabla II.1 se presenta una lista de los edulcorantes de alto poder y bajo contenido calórico de uso frecuente en la actualidad, aprobados por el Código Alimentario Argentino.

Tabla II.1. Edulcorantes de alto poder (bajo contenido calórico)

Edulcorante	Origen ^{a, b, d, e}	Código INS ^c	Poder edulcorante ^{a, b, d, e}
Sacarosa	Natural		1 (estándar)
Ciclamato	Síntesis	952	30
Acesulfamo k	Síntesis	950	200
Aspartamo	Síntesis	951	200
Esteviolglicósidos	Natural	960	150-300
Sacarina	Síntesis	954	300
Sucralosa	Síntesis	955	600
Neohesperidina dihidrochalcona	Síntesis (*)	959	300-1000
Taumatina	Natural (**)	957	2000-3000

(a) Abelyan et al. (2011a); (b) Carakostas et al. (2011); (c) CAA (2011); (d) Nabors (2011); (e) Talebi et al. (2011).

(*) Obtenida por hidrogenación alcalina a partir de neoesperidina de *Citrus aurantium* o naringina de *Citrus paradisi* (Borrego y Montijano, 2001).

(**) Mezcla de proteínas extraídas de los frutos de *Thaumatococcus danielli* (Shallenberger, 1993).

Los aditivos edulcorantes de alto poder tienen un metabolismo en el cuerpo independiente de la insulina, no afectan el nivel de glucosa en la sangre y dar bajo valor nutritivo (Abelyan et al., 2011a; Cubero et al., 2002). Poseen sin embargo, características de sabor diferentes a la sacarosa: regaliz o retrogusto, perfil temporal y respuesta máxima, perfil de sabor, sensación en la boca y comportamiento de adaptación diferenciados (Abelyan et al., 2011a); por ejemplo, el sabor dulce de algunos edulcorantes de alta potencia es más lento al inicio y de mayor duración que el del azúcar y por lo tanto cambian el equilibrio del sabor en algunos alimentos; en otros casos, como las bebidas bajas en calorías, pueden proporcionar características de sabor más deseables para los consumidores. Por otro lado, los edulcorantes de alta potencia pueden tener ciertas ventajas en cuanto a costos y funcionalidad en comparación con la sacarosa y son fuertemente competitivos en la industria alimentaria (Abelyan et al., 2011a).

II.2 *Stevia rebaudiana* Bertoni

II.2.1 Aspectos históricos

La primera descripción de *Stevia rebaudiana* Bertoni en la literatura científica fue realizada por el naturalista de origen suizo Dr. Moisés Bertoni en 1899; inicialmente la denominó *Eupatorium rebaudianum* (en honor al químico paraguayo Dr. Ovidio Rebaudi), transfiriéndola al género *Stevia* en 1905 (Goto, 2004; Midmore y Rank, 2002; Wood et al., 1955). Bertoni aprendió las propiedades de las hojas de la planta, de los aborígenes de Paraguay que la denominaban “Kaá-hê-ê”, “Ka-Hee” o “Caá-êhê” (hierba dulce) y la utilizaban para endulzar infusiones o contrarrestar el sabor amargo de diversas preparaciones medicinales (Brandle, 1998; Chattopadhyaya, 2007; Midmore y Rank, 2002; Yoda, 2001). Desde entonces y debido al interés suscitado por la dulzura de las hojas ha sido objeto de múltiples estudios botánicos, químicos y fitoquímicos (Kennelly, 2002; Kinghorn y Soejarto, 1985; Wood et al., 1955).

Las primeras investigaciones sobre composición química fueron llevadas a cabo por Rasenack que en 1908 obtuvo un producto cristalino a partir del extracto alcohólico de las hojas con presencia de taninos y resinas no caracterizados (Kennelly, 2002; Wood et al., 1955). Al año siguiente Dieterich aisló dos fracciones a partir del extracto acuoso: una cristalina soluble en alcohol, eupatorin, y otra no-cristalina insoluble en alcohol designada rebaudin (Kennelly, 2002).

En 1931, los investigadores franceses Bridel y Lavieille determinaron la composición de la fracción rebaudin indicando que se trataba de una mezcla de eupatorin con varias impurezas orgánicas (Bridel y Lavieille, 1931), así mismo la denominación eupatorin fue cambiada a steviosido debido al cambio de género de *Eupatorium rebaudianum* a *Stevia rebaudiana* realizada por Bertoni (Kennelly, 2002; Wood et al., 1955). Bridel y Lavieille (1931) establecieron también, que la molécula de steviosido estaba conformada por tres unidades de glucosa enlazadas a un núcleo aglicón. Finalmente, en 1955, Wood et al. determinaron la naturaleza de las uniones entre los glicósidos y el núcleo terpénico de la molécula (Wood et al., 1955).

Varias décadas transcurrieron hasta que en EE.UU., el grupo dirigido por Mosseting estableciera en 1963, la fórmula estructural completa del Esteviósido, Steviol e Isosteviol (Kennelly, 2002; Levy, 1984).

El Rebaudiósido A en cambio no fue identificado sino hasta 1975 (Kohda et al., 1976). Entre los años 1976 y 1977 fueron establecidas las fórmulas estructurales del Rebaudiósido A, B, C (Dulcósido B), D, E y del Dulcósido A (Kohda et al., 1976; Pasquel, 1999).

Aunque el Esteviósido fuera aislado en forma impura en los primeros años del siglo XX, el compuesto no fue ampliamente utilizado como edulcorante sino hasta su desarrollo con este fin por un grupo de fabricantes japoneses en la década de 1970 (Kinghorn et al., 2001). El cultivo comercial de stevia no había sido desarrollado en forma extensiva en Paraguay, debido a los costos implicados en su multiplicación (Kumuda, 2006; Wood et al., 1955). En 1942, las semillas fueron enviadas a Inglaterra en un fracasado intento de establecer su producción y en 1970 un grupo de técnicos japoneses introdujeron las primeras plantas de origen sudamericano en el Japón y publicaron numerosos y detallados estudios sobre la especie (Brandle et al., 1998a; Levy, 1984).

Fueron los japoneses los primeros en realizar una investigación sistemática sobre la obtención a nivel industrial de extractos de stevia y de los glicósidos como cristales purificados si bien en diferentes países se abordó su estudio en diversas áreas e incluso se han desarrollado en las últimas décadas variedades de stevia con mayor proporción de los glicósidos de mayor valor para la industria de los aditivos edulcorantes (Kolb et al., 2001b).

En cuanto a la obtención y purificación de extractos, han sido patentados más de 200 procesos para la obtención de los metabolitos vegetales valiosos en extractos con diferentes grados de pureza o los cristales purificados de los fitoquímicos dulces de stevia.

Hasta fines del siglo 20, stevia y los edulcorantes obtenidos de la planta, se han utilizado ampliamente en Japón donde están prohibidos los edulcorantes sintéticos (Kinghorn et al., 2001) y se emplearon en diverso grado en Corea, en

algunos países de Europa, en Brasil y Paraguay, ya sea como edulcorante de mesa o bien con diferentes aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica.

II.2.2 Panorama actual y legislación

En el año 2007, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, aprobó los edulcorantes obtenidos de las hojas de stevia como aditivos (JECFA/68, 2007) y en 2008, se estableció una IDA (ingesta diaria admisible) de 0 - 4 mg / kg / día (de peso corporal) para todos los esteviolglicósidos expresados como Esteviol (Codex alimentarius 2011; JECFA/69a). En 2011, se modificó la Legislación Argentina adoptando la denominación de esteviolglicósidos para los fitoquímicos obtenidos de “stevia” o “estevia” (CAA, 2011); actualmente el CAA aprueba también, el uso de las hojas adicionadas al té o hierbas para infusiones (CAA, 2012), como medio para proporcionar sabor dulce.

El cultivo comercial de la especie vegetal está ampliamente extendido en China, Japón, Singapur, Taiwán, Malaysia, Corea, Israel, India, Australia y varios países de América del Sur incluyendo Paraguay, Brasil, Argentina, Colombia, Bolivia, entre otros (Álvarez, 2010; Rojas, 2012; Upreti et al., 2011).

Esteviolglicósidos sólidos purificados y extractos acuosos sin purificar o parcialmente purificados de stevia tienen uso como edulcorantes y se utilizan ampliamente en la industria de los alimentos (Abou-Arab et al., 2010; Chabot y Beaulieu, 2012; Codex alimentarius, 2011; Singh y Verma 2009).

Las formulaciones comerciales y cristales purificados poseen poder endulzante variable dependiendo de la proporción relativa de Esteviósido, Rebaudósido A, Rebaudósido C y otros glicósidos o endulzantes ya que en general, se trata de mezclas de edulcorantes (Carakostas et al., 2011; Nabors, 2011).

Las principales aplicaciones de los glicósidos de steviol, hasta 2010 han incluido edulcorantes de mesa, bebidas, alimentos salados y procesados,

productos de higiene personal y diversos manjares populares del Japón (Codex alimentarius, 2011; Puri et al., 2011); actualmente, tanto la industria de los alimentos como la farmacéutica concentran sus esfuerzos en la funcionalización de los fitoquímicos dulces de stevia y en la formulación de nuevos productos basados en esteviolglicósidos.

II.3 ASPECTOS BOTÁNICOS Y AGRONÓMICOS

Generalidades biológicas. *Stevia* es un género de la familia Asteraceae (Compuestas) subfamilia Asteroideae, originaria de zonas tropicales y subtropicales de América del Sur y América Central (Kinghorn et al., 2001); más de 120 especies del género se encuentran distribuidas en una zona triangular delimitada por Perú-Bolivia, sur de Brasil-Paraguay y norte de Argentina (Soejarto, 2002; Soejarto et al., 1982).

De las 110 especies examinadas, sólo en *S. rebaudiana* se hallaron los esteviolglicósidos valiosos como edulcorantes si bien se ha detectado Esteviósido en *Stevia phlebophylla*, originaria de México (actualmente extinta) y se reportó la presencia de glicósidos de esteviol con características endulzantes en algunas especies del género *Rubus* (Kinghorn et al., 1984; Prakash et al., 2012; Soejarto, 2002; Soejarto et al., 1982).

Stevia rebaudiana Bertoni es una hierba perenne, nativa del Paraguay y presumiblemente endémica en ese país, originaria de la cordillera del Amambay (Rio Monday), zona selvática cercana a Ciudad del Este, en el límite con Brasil (Soejarto, 2002).

Es una planta arbustiva, con tallo anual subleñoso, levemente piloso en las extremidades, ramificado formando múltiples brotes con tendencia a inclinarse pudiendo alcanzar 80 cm de altura (Brandle et al., 1998a; Jarma, 2010; Soejarto, 2002); de hojas simples, opuestas, rara vez alternas, lanceoladas muy dulces; flores dispuestas en capítulos pequeños generalmente blancas y terminales. La raíz es perenne (5 a 6 años de vida), fibrosa, filiforme y abundante. El fruto es un

aqueno delgado y plumoso (Jarma, 2010). Como la mayoría de los miembros suramericanos del género, *S. rebaudiana* Bertoni es diploide y tiene 11 cromosomas apareados (Frederico et al., 1996).

El hábitat natural de stevia es semi-húmedo subtropical, a 200 - 400 metros sobre el nivel del mar con 1500 - 1800 mm de lluvia y temperaturas extremas de -6° y 43 °C y mejor comportamiento a 35 - 45° de latitud a cada lado Ecuador (Brandle y Rosa, 1992; Midmore y Rank, 2002); crece en suelos pobres y arenosos, requieren constantemente mojado de tallos y aguas poco profundas (Midmore y Rank, 2002). Es una planta de días cortos de hasta 13 h (Brandle et al., 1998a), con extensa variabilidad dentro de las poblaciones.

Cultivo. Stevia ha sido cultivada con éxito en gran variedad de ubicaciones geográficas en todo el mundo, ya sea como cultivo perenne en regiones subtropicales o como un cultivo anual o de vivero en regiones altas, demostrando una extraordinaria versatilidad (Brandle y Rosa, 1992; Ramesh et al., 2006). El clima ideal para su cultivo es sin embargo semihúmedo, subtropical con temperaturas que oscilan entre - 6 a 43 °C con un promedio de 23 °C (Brandle y Rosa, 1992; Valio y Rocha, 1977).

En Argentina, el bioclima de la *S. rebaudiana* (delimitado por índices climáticos), abarca la totalidad de la provincia de Misiones, norte y centro de Corrientes, sureste de Chaco y extremo noreste de Santa Fe (Falasca y Ulberich, 2004) (ver Figura II.1).

Con respecto a la adaptación de stevia, Lavini et al. (2008), han indicado la importancia de un programa de mejoramiento para desarrollar genotipos con mejor respuesta a medioambientes específicos en concordancia con Jarma y Tatis (2010); la concentración diferencial de glicósidos sería gobernada por características del genotipo que ante estos estímulos ambientales codificarían diferencialmente los genes involucrados en síntesis de enzimas que catalizan reacciones específicas de glicosilaciones de Esteviol (Morita y Bu., 2000). La planta ha demostrado además, un desarrollo más vigoroso en condiciones controladas de cultivo si estas son comparables a su hábitat natural (Shock, 1982).

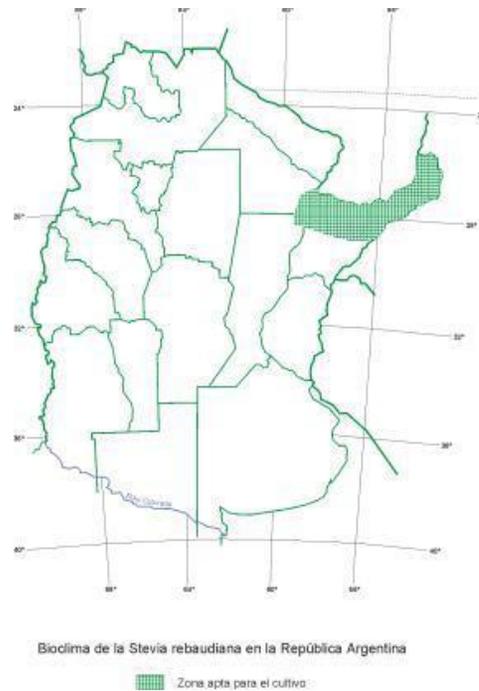


Figura II.1. Bioclima de *S. rebaudiana* en la Argentina
Tomado de Falasca y Ulberich (2004)

Reproducción. *S. rebaudiana* se reproduce por semillas o mediante propagación vegetativa a partir de plantas madres por esquejes, micropropagación o división de raíces (Maeshwar, 2005; Magalhaes, 2000; Ramesh, 2006), (Figura II.2).

La reproducción por polinización cruzada puede producir grandes variaciones en la composición, en poblaciones obtenidas a partir de especímenes no seleccionados (Jarma, 2010; Kolb, 2001b; Kumuda, 2006; Magalhaes, 2000); la propagación vegetativa (más costosa), garantiza la obtención del mismo genotipo con la limitante del número de plantas (a excepción del cultivo de tejidos o micropropagación).

El momento más propicio para realizar la multiplicación es en la primavera con el rebrote (Andolfi et al., 2006; Magalhaes, 2000). Si la reproducción es por esquejes, es más apropiado realizar la propagación antes de la floración, para obtener un mayor desarrollo de raíces (Kolb, 2011).

Siembra. La siembra al inicio de la primavera se presenta como la mejor opción (Ramesh et al., 2006). El momento adecuado para el trasplante de plantines (Figura II.2) está influenciado por condiciones climáticas: temperatura, radiación solar, humedad relativa, precipitaciones (Jarma, 2010; Ramesh et al., 2006); el verano se asocia a clima seco y pobres condiciones de humedad del suelo que dificultan el establecimiento del cultivo; la siembra a finales de otoño se asocia con la temperatura bajas y menores tiempo para el desarrollo de la planta.



Figura II.2. Plantines de stevia. Tomado de Álvarez (2010)

Kolb (2011) recomienda hacer coincidir el trasplante definitivo con épocas de abundantes lluvias (en el litoral argentino) y prever un sistema de riego para los primeros meses. El cultivo debe mantenerse libre de malezas; la competencia con estas es muy fuerte en las primeras etapas (Andolfi et al., 2002); *Allium schoenoprasum* (cebollín) ha resultado el mayor problema en la primera etapa del desarrollo de stevia (Bartoletti y Pozo, 2012).

En cuanto a las densidades de plantación, utilizando hileras simples o hileras dobles, se obtienen rendimientos altos (kg de hojas secas) con arreglos de 100000 plantas/Ha - 133333 plantas/Ha (Guerrero et al., 2012; Serrati, 2006).

Prácticas culturales. El crecimiento de stevia y la floración son afectados por la duración del día, la radiación incidente, temperatura, humedad del suelo y por el viento en los lugares expuestos (Ramesh et al., 2006; Valio y Rocha, 1977).

Días cortos promueven la floración; los días largos mejoran los rendimientos en hojas y aumentan la producción de esteviolglucósidos (Shock, 1982).

Los requerimientos de nutrientes para el cultivo van de moderados a bajos, sin embargo para el cultivo comercial, el abono y un sistema de riego aseguran mayores rendimientos (Goenadi, 1987; Ramesh et al., 2006).

La aplicación combinada de biofertilizantes mejora en general la disposición de N, P y K en suelo con el aumento simultáneo de crecimiento, nutrición de stevia y rendimiento de las hojas (Das et al., 2009). Por otro lado, la deficiencia de nutrientes se traduce en disminución del crecimiento (N), reducción en el número de ramas por planta (K), o reducción del contenido de glucósidos (P), además de cambios visuales en las hojas (Jarma et al., 2010; Utumi et al., 1999).

Stevia presenta baja a moderada resistencia a la sequía y sensibilidad a las heladas con disminución del rendimiento en las hojas (Ramesh et al., 2006). En cuanto a los requerimientos de agua, los niveles de Esteviósido y Rebaudiósido A no se ven afectados por el régimen de riego (Lavini et al., 2008), sin embargo la provisión de un sistema de riego protege a la planta del estrés hídrico.

Las plagas comúnmente encontradas, identificadas en hojas, tallos y raíces han sido fitohongos (*Fusarium* sp, *Rhizoctonia* sp, *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Sclerotium* sp, *Septoria* sp); nematodos (*Meloidogyne* sp); ácaros (*Tetranychus* sp) e insectos (*Diabrotica* sp, *Pseudoplusia includens*, *Spodoptera* sp, *Schistocerca* sp y *Agromyza* sp), (Arturo et al., 2009; González et al., 2007; Madia, et al., 2007; Orrego, 2001).

Cosecha. Son posibles 3 a 4 cosechas al año (Kolb, 2011; Magalhaes, 2000; Ramesh et al., 2006) en regiones donde las condiciones de cultivo son las ideales, con tres o cuatro ciclos reproductivos anuales: temprano (110 días), medio (180 días) o tardío (200 días), dependiendo de la variedad (Garnighian, 2012).

La parte aprovechable son las hojas (Bondarev et al., 2003; Yadav et al., 2011); el contenido de los tres principales glucósidos de la planta (Esteviósido,

Rebaudiósido A, Rebaudiósido C) decrece en el siguiente orden: hojas, flores, tallos, semillas, raíces (Figura II.3). Durante el ciclo, se observa además, un aumento gradual del contenido de glicósidos en hojas maduras y tallos hasta la floración (Bondarev et al., 2003).

La cosecha puede realizarse antes del inicio de la floración coincidente con niveles máximos de esteviolglicósidos o al inicio de la floración coincidente con el máximo de masa foliar para obtener mayores rendimientos en glicósidos valiosos (Andolfi et al., 2002; Kolb et al., 2001c; Rojas, 2009), (ver Figura II.4, Figura II.5).

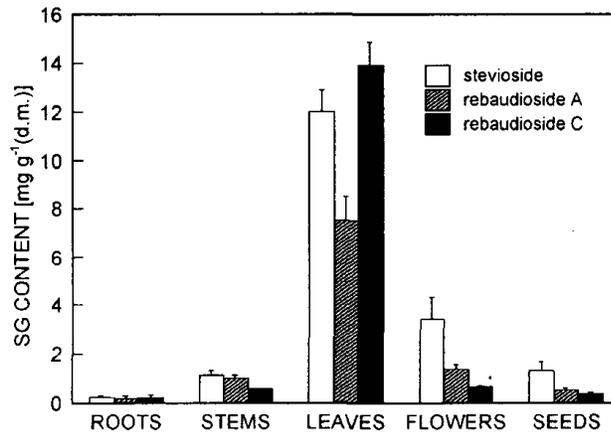


Figura II.3. Composición y contenido de esteviolglicósidos en órganos vegetativos y reproductivos de *Stevia rebaudiana*. Tomado de Bondarev et al. (2003)

Rendimientos agronómicos. Los rendimientos agronómicos dependen principalmente de los caracteres genéticos de las plantas utilizadas y de su expresión fenotípica regida por factores climáticos, ambientales y culturales (Jarma et al., 2010; Metivier y Viana, 1979). La calidad de las hojas, por su parte, también varía ampliamente en función de múltiples factores que incluyen exposición al sol, método de irrigación, prácticas agrícolas, saneamiento, pre-tratamiento y almacenamiento (Yadav et al., 2010).



Figura II.4. Etapas en la floración. Tomado de Yadav et al. (2011)



Figura II.5. Plantación experimental de stevia. Tomado Guerrero et al. (2012)

Andolfi et al. (2006) estudiaron la adaptación de dos genotipos originarios del Brasil en Italia central, obteniendo rendimientos de 3600 kg/Ha en el primer año (expresados como materia seca) con un aumento en la producción de las hojas hacia el tercer año, alcanzando un máximo de 6100 kg/Ha hacia el sexto año. También establecieron una vida útil comercial de 5 a 6 años para las plantaciones de estudio con dos cortes anuales y observaron diferencias en cuanto a rendimiento en los genotipos investigados (Andolfi et al., 2006). Otros resultados se presentan en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Rendimientos agronómicos

Variedad	Ciclos, cortes	Rendimientos	País	Fuente
Eireté	temprano, 4 ciclos por año	5.000 kg / Ha / año	Paraguay	Álvarez (2010)
PC1	tardío, 2 cortes por año	5.000 kg / Ha / año	Paraguay	Álvarez (2010)
AKH L4	temprano, 4 ciclos por año, 3 cortes	4.500 kg / Ha / año	Paraguay	Álvarez (2012)
Morita I		1.174 kg/Ha (primer corte)	Colombia	Jarma et al. (2011)
Morita II		1.789 kg/Ha (primer corte)	Colombia	Jarma et al. (2011)
Morita II	5 - 6 cortes al año	6000-9000 kg / Ha / año	Paraguay	González (2006)
No especifica		1.144,8 kg/Ha (primer corte)	Bolivia	Candeira et al. (2002)
No especifica	2 - 3 cortes al año	2.000 kg/Ha	Bolivia	Candeira et al. (2002)
Genotipo B2	2 cortes por año	3.600-6.100 kg / Ha / año	Italia	Andolfi et al. (2006)

II.4 COMPOSICIÓN DE *STEVIA REBAUDIANA*

II.4.1 Composición centesimal

Más de 100 compuestos han sido identificados en especies del género *Stevia*, siendo los más conocidos (Kennelly, 2002), los glicósidos de esteviol o entkaurenglicósidos.

Numerosas investigaciones se realizaron sobre composición química de las hojas de *S. rebaudiana*, desde la composición química centesimal proximal (Abou-Arab et al., 2010; Kaushik et al., 2010; Rodríguez-Pérez et al., 2010; Savita et al., 2004; Tadhani y Subhash, 2006; Wölwer-Rieck, 2012), hasta pruebas específicas de identificación o cuantificación de vitaminas, ácidos grasos,

flavonoides y polifenoles, terpenos y terpenoides (Abou-Arab y Abu-Salem, 2010; Kaushik et al., 2010; Kennelly, 2002; Kim et al., 2011; McGarvey et al., 2003; Siddique et al., 2012).

Kinghorn (1992) reportó los siguientes valores para la composición centesimal proximal de las hojas: proteínas: 6,5 %; lípidos: 5,6 %; carbohidratos totales: 52,8 %; glicósidos totales: 15 % (Chabot y Beaulieu, 2012). Otros valores reportados por diferentes autores, se presentan en la Tabla II.3. Los resultados obtenidos difieren según la variedad estudiada y su expresión fenotípica regida por factores ambientales y culturales (Jarma et al., 2010; Lei y Shi, 2010; Siddique et al., 2012; Tavarini et al., 2010; Utumi et al., 1999; Yadav et al., 2011).

Tabla II.3. Composición química centesimal proximal de las hojas de *S. rebaudiana*

Componentes	Abou-Arab et al. (2010)	Savita et al. (2004)	Kaushik et al. (2010)
Humedad (% b.s.)	5,37	7,00	7,70
Carbohidratos (% b.s.)	61,93	52,00	
Lípidos (% b.s.)	3,73	3,00	2,70
Proteínas (% b.s.)	11,41	10,00	12,00
Fibra cruda (% b.s.)	15,52	18,00	
Cenizas (% b.s.)	7,41	11,00	8,40
K (mg/100 g b.s.)	21,15		
Ca (mg/100 g b.s.)	17,7		
Na (mg/100 g b.s.)	14,93		
P (mg/100 g b.s.)		11,40	
Mg ((mg/100 g b.s.).)	3,26		
Cu (mg/100 g b.s.)	0,73		
Mn (mg/100 g b.s.)	2,89		
Fe (mg/100 g b.s.)	5,89		
Zn (mg/100 g b.s.)	1,26		

II.4.2 Compuestos fitoquímicos caracterizados

Con respecto a caracterización de compuestos fitoquímicos y actividades biológicas de diferentes extractos o fracciones de extractos de *Stevia rebaudiana*, existen reportados en la literatura científica, numerosos estudios (Abou-Arab y Abu-Salem, 2010; Abou-Arab et al., 2010; Kaushik et al., 2010; Savita et al., 2004; Shivanna et al., 2013, entre otros), (ver Tabla II.4).

Tabla II.4. Caracterización fitoquímica

Grupo fitoquímico	mg/100 g (b.s.)	Referencia
Pigmentos totales	75,61	Abou-Arab et al. (2010)
Clorofila A	40,71	Abou-Arab et al. (2010)
Clorofila B	27,22	Abou-Arab et al. (2010)
Carotenoides totales	7,67	Abou-Arab et al. (2010)
Polifenoles totales	4150	Kaushik et al. (2010)
Flavonoides totales	2300	Shivanna et al. (2013)
Taninos	0,01	Savita et al. (2004)

Los grupos fitoquímicos preliminarmente identificados en extractos de hojas han sido taninos y alcaloides, seguidos de glucósidos cardíacos, saponinas, esteroides y triterpenos, compuestos reductores y antraquinonas (Kenelly, 2002; Lemus-Mondaca et al., 2012; Rodríguez-Pérez et al., 2010); las pruebas para glucósidos cianogénicos, resultaron negativas.

Otros constituyentes vegetales incluyen labdanos, flavonoides, clorofilas, ácidos orgánicos, mono y disacáridos y sales inorgánicas (Gardana et al., 2010; Tadhani y Subhash, 2006).

Los aceites esenciales y componentes lipídicos han sido caracterizados en algunas variedades de stevia (Hossain et al., 2010; Marković et al., 2008; Siddique et al., 2012). Siddique et al. (2012) han detectado cerca de 50 componentes en el aceite esencial, siendo los de mayor presencia (-)-espatulenol, oxido de cariofileno, oxido de ledeno-(II), β -guaieno, geranil vinil eter, indol y epoxido de aristona. La fracción lipídica de las hojas está conformada

principalmente por ácido palmítico, ácido linoléico, ácido linolénico y ácido esteárico (Siddique et al., 2012; Tadhani y Subhash, 2006).

En cuanto a los ácidos orgánicos (Savita et al., 2004), el de mayor presencia es el oxálico; también fueron identificados ácido tartárico, fórmico y cítrico (Goto, 2004).

En la planta se cuantificaron diversos polifenoles y flavonoides con actividad antioxidante (Deetae et al., 2012; Kim et al., 2011; Shivanna et al., 2013; Tadhani et al., 2007); al respecto, Tavarini et al. (2010), concluyeron que el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos, guardan relación directa con la proporción de Rebaudiósido A, siendo el genotipo en última instancia, el determinante de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de stevia.

Al hablar de esteviolglicósidos particularmente, se ha investigado su actividad sobre la secreción de insulina y los niveles de glucosa en plasma; si bien no se ha determinado con exactitud el mecanismo de acción de los entkaurenglicósidos; se ha comprobado que actúan como anti-hiperglucémicos en pacientes con diabetes, actuando además como anti-hipertensivos en pacientes con hipertensión (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009; Geuns, 2003). Los efectos sobre el nivel de glucosa en plasma y la presión arterial sólo se observan cuando estos parámetros son más altos que la media normal (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

Desde el punto de vista del procesamiento de las hojas de stevia, los componentes de mayor interés (impurezas) son pigmentos, taninos y compuestos fenólicos, las gomas (principalmente goma arábica y karaya), los ácidos grasos, péptidos y proteínas y los aceites esenciales (Chabot y Beaulieu, 2012; Goto, 2004; Goto y Clemente, 1998; Kutowy et al., 1999).

II.4.3 Esteviolglicósidos o glicósidos de esteviol

En 2008, el Comité Mixto JECFA aprobó como aditivos, 10 glicósidos de esteviol (JECFA/69, 2008b) y desde esa fecha hasta la actualidad han sido aislados y caracterizados, 20 glicósidos más (Ohta et al., 2010; Wölwer-Rieck, 2012) que componen en total entre un 4 - 20 % del peso seco de las hojas (Abelyan et al., 2010; Brandle, 2001; Geuns, 2003) y cuyas concentraciones varían según la variedad, el fenotipo y las condiciones de cultivo (Carakostas et al., 2011; Wang et al., 2012), entre otros factores (ver sección II.3). El contenido de los principales glicósidos en hojas de stevia presenta la siguiente variabilidad: Esteviósido: 1 - 10 %, Rebaudiósido A: 2 - 13 %, Rebaudiósido C: 1 - 2 %, Dulcósido: 0,5 - 1 % (Morita et al., 2011; Wang et al., 2012). En la Tabla II.5 se presenta la composición típica (% b.s.) reportada en hojas de algunas variedades de *S. rebaudiana*; otros glicósidos de esteviol, normalmente se encuentran presentes en menor proporción (Pfister y Sehgal., 2012).

Tabla II.5. Composición típica (% b.s.) reportada en hojas de algunas variedades de *Stevia rebaudiana* Bert.

Variedad	Esteviol glicósido			
	Esteviósido	Rebaudiósido A	Rebaudiósido C	Dulcósido
94 - 751 Marsolais et al. (1998)	4,88	11,84	1,33	0,05
Mejorada Celaya et al. (2012)	3,54	11,81	1,31	
SR13 Marsolais et al. (1998)	9,25	3,39	0,59	0,35
Brazil Marsolais et al. (1998)	7,61	3,00	0,54	0,25

Los ent-kauren glicósidos (o glicósidos de esteviol), tienen un aglicón común, ácido ent- kaurenico (ent-13-hydroxykaur-16-en-19-oico), (Brandle et al., 1998a; Cataokostas et al., 2011). Difieren en el número y el tipo de azúcares unidos a las posiciones 4 y 13 del núcleo kaurenico (ver Figura II.6; Tabla II.6).

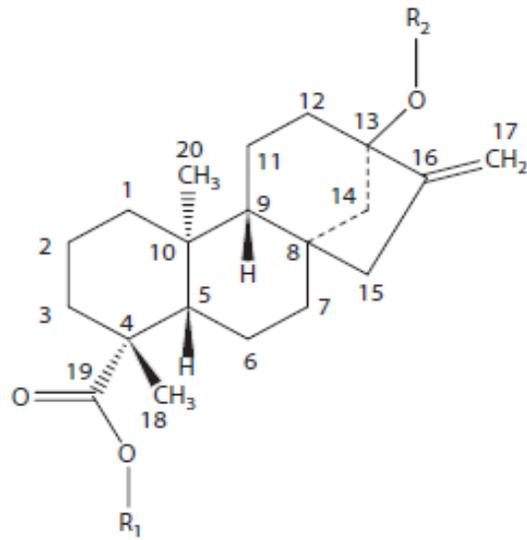


Figura II.6. Estructura de los glicósidos de esteviol.

Tomado de Cataokostas et al. (2011)

Tabla II.6. Esteviolglicósidos, N° de CAS y radicales unidos a las posiciones 4 y 13 del núcleo entkaureno

	Esteviol glicósido	N° CAS	R1	R2
1	Esteviol	471-80-7	H	H
2	Esteviolbiósido	41093-60-1	H	β -Glu- β -Glu (2→1)
3	Esteviósido	57817-89-7	β -Glu	β -Glu- β -Glu (2→1)
4	Rebaudiósido A	58543-16-1	β -Glu	β -Glu- β -Glu (2→1) Glu (3→1)
5	Rebaudiósido B	58543-17-2	H	β -Glu- β -Glu (2→1) Glu (3→1)
6	Rebaudiósido C (Dulcósido B)	63550-99-2	β -Glu	β -Glu- α -Rha (2→1) Glu (3→1)
7	Rebaudiósido D	63279-13-0	β -Glu- β -Glu (2→1)	β -Glc- β -Glu (2→1) Glu (3→1)
8	Rebaudiósido E	63279-14-1	β -Glc- β -Glu (2→1)	β -Glu- β -Glu (2→1)
9	Rebaudiósido F	438045-89-7	β -Glu	β -Glu- β -Xyl (2→1) Glu (3→1)
10	Dulcósido A	64432-06-0	β -Glu	β -Glu- α -Rha (2→1)
11	Rubusósido	63849-39-4	β -Glu	β -Glu
12 (*)	Esteviolmonósido		H	β -Glu

Tomado de JECFA/69 (2008b)

(*) Shibata et al. (1995)

Glu: glucosa; Rha: ramnosa; Xyl: xilosa

II.4.4 Variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Hasta fines del siglo XX, aunque muchos estudios se habían realizado sobre composición química de stevia, pocos exploraron la variabilidad genética de la especie (Brandle, 1998; Brandle y Rosa, 1992; Kolb. et al., 2001c; Magalhaes, 2000; Morita et al., 1978; Morita y Bu., 2000).

Desde principios del siglo XXI, el desarrollo de nuevas variedades de stevia con alto contenido de Rebaudiósido A, o también con mayor proporción de Rebaudiósido C, Rebaudiósido D o Rubusósido ha sido el principal objetivo de muchos investigadores y criadores de plantas (Álvarez, 2010; Brandle, 2001; Garnighian, 2012; Kolb et al., 2001b; Kumar et al., 2011; Morita et al., 2011; Markosyan et al., 2011; Ohta et al., 2010). En la Tabla II.7 se presentan los contenidos de Esteviósido y Rebaudiósido A de algunas variedades de stevia obtenidas por selección y cruzamiento entre especímenes seleccionados.

Tabla II.7. Variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Variedad	Rebaudiósido A (%)	Esteviósido (%)	RbA/Stv	País	Fuente
Criolla	3,00	6,00	0,50		Geuns (2007b)
Eireté	6,78	7,26	0,93	Paraguay	Álvarez (2010); Serrati (2006)
Seleccionada	3,10-6,00	5,10-10,00	0,60	Paraguay	Jiménez et al. (2010)
Mejorada	11,81	3,54	3,34	Argentina	Celaya et al. (2012)
AKH L1	11,50	1,30	7,08	Paraguay	Álvarez (2012)
SF6-I	12,70	3,60	3,53	Japón	Morita y Bu (2000)
SF6-II	9,00-10,50	2,00-4,10	5,25-6,00	Paraguay	Gonzalez (2006); Morita y Bu (2000)
SF6-III	7,80	3,60	2,17	Japón	Morita y Bu (2000)
FERM BP-10354	13,10	1,10	11,91	Japón	Morita et al. (2011)
RSIT 94-751	4,88	11,84	2,43	Canadá	Marsolais et al. (1998)
Brasil Zairai	3,00	7,61	0,39	Canadá	Brandle et al. (1998b)
RSIT 94-1838	4,40	5,70	0,77 (*)	Canadá	Brandle et al. (1998b)
Genotipo I	5,72	8,36	0,68	Italia	Lavini et al. (2008)

(*) Rebaudiósido C: 10,00 %.

El rendimiento de las hojas y la concentración glicósidos específicos son factores que presentan un alto grado de heredabilidad (Brandle y Rosa, 1992; Brandle, 1998; Garnighian, 2012; Kinghorn, 2002; Kolb et al., 2001b). El enfoque por selección y cruzamiento entre genotipos deseables es el método convencional para optimizar las características de calidad, obtener variedades superiores y especialmente uniformes en un cultivo de alta polinización cruzada como el de stevia (Kolb, 2008; Kumar et al., 2011; Magalhaes, 2000).

II.5 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS ESTEVIOLGLICÓSIDOS

II.5.1 Comportamiento químico

Además de las reacciones de síntesis metabólica de esteviolglucósidos en las células de la planta, pueden mencionarse como las de mayor interés (Ohtani y Yamasaki, 2002; Prakash y Prakash, 2012), la transglucosilación enzimática, la hidrólisis enzimática y la hidrólisis química (ácida o básica).

Las reacciones de hidrólisis enzimática y la transglucosilación enzimática tienen su principal aplicación en la interconversión de glucósidos de esteviol (Abelyan et al., 2004; De Oliveira et al., 2007; Higashi et al., 1994; Kinghorn, 2002; Shibata et al., 1995). La transglucosilación enzimática en particular, se emplea para mejorar la calidad natural de la mezcla (Abelyan et al., 2004; De Oliveira et al., 2007; Higashi et al., 1994; Kinghorn, 2002; Markosyan, 2012), o bien para obtener altos rendimientos en glucósidos valiosos; por medio de la misma, se transforma Esteviolósido o los esteviolglucósidos obtenidos de la planta, en otros de mayor aceptación comercial.

La hidrólisis química de los glucósidos puede producirse en las diferentes etapas del procesamiento de stevia (Kolb, 2008): secado, extracción o purificación de extractos, con consiguiente disminución de los rendimientos (porcentaje de

esteviolglicósidos valiosos) y aumento de productos de hidrólisis (como el Esteviolbioso, Rebaudiósido B, Isoesteviol y Esteviol).

II.5.2 Estudios de estabilidad

Hidrólisis. Los glicósidos de esteviol son estables a pH entre 3 - 9 en disolución acuosa a temperaturas de 100 °C (Goto, 2004; Kolb, 2008).

Chang y Cook (1983) encontraron que en solución acuosa neutra, los productos principales de degradación del Esteviósido y Rebaudiósido A con la temperatura son el Esteviolbioso y Rebaudiósido B además de D-glucosa (ver Tabla II.6); con el calentamiento en condiciones ácidas, aparecen también otros productos de degradación menores, entre ellos Isoesteviol (ver Figura II.7).

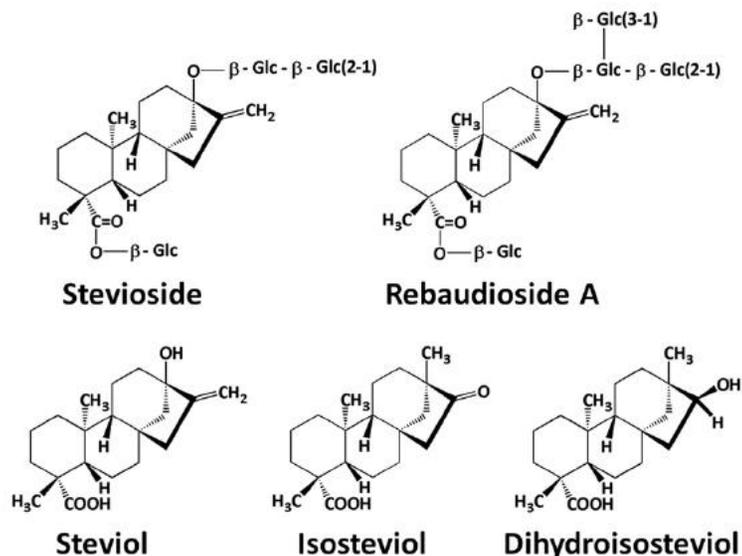


Figura II.7. Glicósidos de esteviol.

Tomado de Chatsudthipong y Muanprasat (2009)

Los resultados experimentales indican que la hidrólisis enzimática, ácida o alcalina del Rebaudiósido A, produce seis compuestos de degradación menores

(Prakash y Prakash, 2012), además de D-glucosa; en la hidrólisis alcalina, el principal producto es el Rebaudiósido B.

La hidrólisis alcalina de Esteviósido produce principalmente Esteviolbiósido (Prakash y Prakash, 2011a). En solución ácida, los principales productos de hidrólisis del Esteviósido y glicósidos asociados son D-glucosa, Isoesteviol y Esteviol (Catharino y Santos, 2012; Kolb, 2008; Prakash y Prakash, 2011a), (ver Figura II.7).

Temperatura. Los glicósidos funden a temperaturas que rondan los 200 °C (ver Tabla II.8). En cambio, con la exposición a temperaturas de 60 °C durante varias h (Chang y Cook, 1983), no se produce un deterioro significativo de los compuestos valiosos.

En el secado de las hojas de stevia, una consideración importante es la de utilizar con el material recién cosechado, temperaturas que no superen los 70 °C si el secado se realiza en secaderos ya que en estas condiciones, se produce un aumento del contenido de Esteviolbiósido y Rebaudiósido B, a expensas del Esteviósido y Rebaudiósido A respectivamente (Kolb, 2011; Ramesh et al., 2006). La pérdida de componentes valiosos es mayor con el aumento de la temperatura de secado (Abelyan et al., 2006).

II.5.3 Formas Cristalinas

Los esteviolglicósidos en estado cristalino, presentan puntos de fusión relativamente altos (Tabla II.7) y pueden existir en varias formas polimórficas (Cataokostas et al., 2011; Furlano et al., 2012; Prakash et al., 2008; Prakash y Upeti, 2008; Salemme y Daines, 2012; Shi et al., 2012); también pueden ser aislados en forma amorfa. El estado cristalino o amorfo de cada esteviolglicósido tiene influencia en sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. Las formas metanolato y etanolato se obtienen en la cristalización del Esteviósido y Rebaudiósido A, a partir de metanol y etanol respectivamente (Cataokostas et al., 2011).

II.5.4 Solubilidad

Solventes. Los glicósidos de esteviol son moléculas orgánicas de alto peso molecular, con grupos hidrofílicos (glicósidos) e hidrofóbicos (diterpenos), (Upreti et al., 2011), siendo las solubilidades de Rebaudiósido A y Esteviósido en agua a 25 °C (Kinghorn, 2002) de sólo 0,8 % y 0,13 % (p/v) respectivamente (Tabla II.8).

Tabla II.8. Datos físicos de los esteviolglicósidos

Componente	P.M. ^a	P _{fu} (°C) ^{a, b, c}	Rotación específica [α] _{D₂₅} ^c	Solubilidad en agua % (p/v) (25°C) ^{b, c}
Esteviol	318,45	212-213	ND	ND
Esteviolbioside	642,72	195-200	-39,78	0,03
Esteviósido	804,88	196-198	-43,53	0,13
Rebaudiósido A	967,01	242-244	-30,70	0,80
Rebaudiósido B	804,88	245-250	-26,44	0,11
Rebaudiósido C (Dulcósido B)	951,01	225-227	-38,11	0,21
Rebaudiósido D	1129,15	245-247	-28,91	0,10
Rebaudiósido E	967,01	205-207	-34,20	1,70
Rebaudiósido F	936,99	204-206	-30,96	0,60
Dulcósido A	788,87	193-195	-52,22	0,58
Rubusósido	642,73	180-182	-57,40	0,08

Tomado de: (a) Abelyan et al. (2011a); (b) Kinghorn (2002); (c) Carakostas et al. (2011)

Con respecto a la solubilidad de los esteviolglicósidos individuales o mezclas de glicósidos en solventes mixtos alcohólicos-acuosos, la bibliografía disponible es escasa; existen sin embargo, procesos patentados basados en el empleo de estos solventes mixtos como un método de separación para obtener los glicósidos individuales (ver sección II.6.3).

Formas polimórficas y cristalización. Tanto el solvente de pre-cristalización como la forma amorfa o cristalina de los glicósidos o mezclas de

glicósidos tienen influencia en la solubilidad de los mismos (Lee, 2011; Prakash y Upreti, 2008; Upreti et al., 2011). Al respecto, Prakash et al. (2008), reportaron diferencias de solubilidad considerables en función del Rebaudiósido A pre-tratado. Formas anhidras y amorfas forman soluciones sobresaturadas en agua por simple agitación (más de 20 g/100 g, a 25 ° C en 5 min). Sin embargo, si el hidrato de Rebaudiósido A se aísla por filtración y secado, exhibe una baja cinética de disolución en agua (menor a 0,2 g/100 g at 25 °C en 5 min), (Catakostas et al., 2011; Prakash et al., 2008).

Co-solubilización. La co-solubilización tiene su aplicación industrial más importante en el aumento de la solubilidad acuosa de principios activos, mediante co-solutos, solventes, sales, etc (Benavente-García et al., 2001; Uchiyama et al., 2012; Upreti et al., 2011). En el caso particular de la solubilidad de los esteviolglicósidos individuales en solvente acuoso, esta es en general baja (ver Tabla II.8), pero puede aumentarse por la presencia de componentes orgánicos como ser glicósidos, vitaminas, carotenoides, polifenoles o dextrinas, ácidos orgánicos entre otros (Liu, 2011).

Extracción de glicósidos y solubilidad. Al hablar de solubilización de glicósidos durante el proceso de extracción, no se dispone de estudios realizados sobre el mecanismo de extracción y los fenómenos involucrados en el. Al respecto, Handa (2008), explican que la extracción con solventes implica transferencia de materia de los principios activos solubles al disolvente con un gradiente de concentración. La tasa de transferencia de masa disminuye a medida que aumenta la concentración del principio en el solvente hasta alcanzar un equilibrio donde ya no se extrae relativamente más principio activo desde la matriz vegetal (Handa, 2008).

En el caso particular de la extracción de glicósidos a partir de hojas de stevia, el mismo fenómeno ocurre con esteviolglicósidos y componentes no glicósidos como pigmentos, polisacáridos y constituyentes vegetales afines al solvente, que se extraen de las hojas ya sea por difusión y solubilización o simplemente por lavado (ver Sección II.4.2). En la extracción acuosa de glicósidos,

Goto y Clemente (1998), han reportado un aumento de la solubilidad del Esteviósido en la mezcla del extracto, como consecuencia del aumento de la proporción relativa de Rebaudiósido A en el material vegetal investigado.

En cuanto a los carbohidratos solubles totales, sólidos solubles totales y sólidos totales (ver Tabla II.9), los resultados de investigaciones anteriores avalan la tesis de que el contenido de glicósidos y el de carbohidratos en la extracción acuosa presentan un alto grado de correlación (Abou-Arab et al., 2010; Liu et al., 2010; Rojas, 2009; Yoda, 2001), por lo cual es frecuente realizar la determinación del contenido de carbohidratos solubilizados, carbohidratos totales (o bien, sólidos solubles totales) y ponderar en base a este resultado, el contenido de esteviolglicósidos totales en la mezcla de extracto bruto (ver Tabla II.9, Tabla II.10).

Tabla II.9. Correlación entre el análisis por HPLC y el análisis de carbohidratos totales

Contenido de carbohidratos totales (%)	Contenido de glicósidos totales (%)	Valor estándar relativo (comercial)
2,50 - 4,50	0,00 - 0,60	1
4,50 - 6,20	0,60 - 2,40	2
6,20 - 8,05	2,40 - 3,60	3
8,05 - 9,90	3,60 - 4,80	4
9,90 - 11,75	4,80 - 6,00	5
11,75 - 13,60	6,00 - 7,20	6
13,60 - 15,45	7,20 - 8,40	7
15,45 - 17,30	8,40 - 9,60	8
17,30 - 19,15	9,60 - 10,80	9
19,15 - 21,00	10,80 - 12,00	10
21,00 - 22,85	12,00 - 13,20	11
22,85 - 24,70	13,20 - 14,40	12
24,70 - 26,55	14,40 - 15,60	13
26,55 - 28,40	15,60 - 18,00	14

Tomado de Rojas (2009)

Tabla II.10. Carbohidratos solubles, sólidos solubles totales y sólidos totales obtenidos por extracción en diferentes condiciones

Componentes	% b.s.	Solvente	Condiciones	Referencia
carbohidratos solubles totales	11,60	agua	100 °C, 120 min batch	Liu et al. (2010)
	16,90	agua	68 °C, 32 min batch, sonicación	Liu et al. (2010)
sólidos solubles totales	22,22	etanol:agua 70:30	Tamb	Rodríguez et al. (2007)
	27,78	agua	Tamb	Rodríguez et al. (2007)
	36,50	agua	Tamb	Savita et al. (2004)
	52,80	agua		Kinghorn (1992)
sólidos totales	38,34	etanol 96° (variedad Mejorada)	8,5 h extracción soxhlet	Kolb (2011, no publicado)
	47,96	agua (variedad Mejorada)	8,5 h extracción soxhlet	Kolb (2011, no publicado)
	58,71	agua (variedad Mejorada)	100 °C, 5 min relación 1/100	Celaya et al. (2012)

II.5.5 Análisis de esteviolglicósidos

Una amplia gama de técnicas analíticas se han investigado y desarrollado para cuantificar de glicósidos diterpénicos de stevia en hojas, extractos y formulaciones comerciales de edulcorantes (Gardana et al., 2010; Prakash y Prakash, 2011b; Pól et al., 2007b; Puri et al., 2011). La cromatografía líquida de alta resolución (JECFA/68, 2007) ha sido el método más ampliamente utilizado.

En la Tabla II.11 (tomado de Wölwer-Rieck, 2012), se presentan diferentes técnicas de separación, utilizando HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y UHPLC (cromatografía líquida de ultra-alta resolución) y diferentes técnicas de detección.

Tabla II.11. Separación y detección de esteviolglicósidos con HPLC (Tomado de Wolwer-Rieck, 2012)

Separación	Columnas	Detector	Citado por Wölwer-Rieck (2012)
HPLC	amino	UV	Wölwer-Rieck et al. (2010a); JECFA/69 (2008c)
	amino	PAD	Ahmed y Smith (2002)
	C18 UV	UV	JECFA/73 (2010); Vaněk et al. (2003); Rajasekaran et al. (2008)
	C18 + C18	UV	Geuns (2010a), Geuns (2010b)
	HILIC	UV	Wölwer-Rieck et al. (2010b)
	Hydro-RP	UV	Hoekstra et al. (2009)
	Hydro-RP	CAD	Clos et al. (2008)
	Carbohidato	MS	Richman et al. (2005)
UHPLC	C18	MS	Choi et al. (2002); Gardana et al. (2010)
	RP amida C16	UV + MS	Pól et al. (2007a)
	HILIC	MS	Zimmermann (2011); Zimmermann et al. (2012)
	PA + C18	UV	Cacciola et al. (2011)
	C18 + amino	TOF-MS	Pól et al. (2007b)
	C18 + C18	UV	Cabooter et al. (2010)

La técnica de HPLC utilizando como columna amino NH_2 (fase estacionaria) y detector UV (Kolb et al., 2001a) utilizada en el presente trabajo, ha resultado apropiada para el control de calidad de un gran número de muestras vegetales y también en el análisis de extractos brutos, extractos parcialmente purificados y muestras comerciales de edulcorantes de stevia, con algunas modificaciones en la preparación de las muestras para análisis, según el caso.

II.6 PROCESAMIENTO DE LA STEVIA

II.6.1 Calidad de stevia para procesamiento

Hasta fines de los '90, la mayoría de los procesos industriales patentados y formulaciones comerciales se centraban en el Esteviósido (Jonnala et al., 2006), pero durante la última década, la industria de alimentos ha migrado a partir de

extractos que contienen principalmente Esteviósido a extractos que contienen predominantemente Rebaudiósido A (Carakostas et al., 2011; Chabot y Beaulieu, 2012; Kolb, 2001b). Se han establecido nuevos estándares definidos en base a la proporción relativa de este componente en las hojas.

Actualmente, la calidad de la stevia para procesamiento industrial se pondera en función del contenido de glicósidos totales en base seca, del contenido de los glicósidos principales (Esteviósido + Rebaudiósido A) y de la relación Rebaudiósido A / Esteviósido (Álvarez, 2010; De Oliveira et al., 2007; Geuns, 2007a; Jarma y Jarma y Aramendiz, 2010; Rojas, 2009).

El contenido de (Esteviósido + Rebaudiósido A) de stevia de calidad comercial varía entre 6 % a 14 % o mayor (Abelyan et al., 2011b; Carneira et al., 2002; Morita y Bu, 2000). También es importante la homogeneidad del lote (Kolb et al., 2012), la cual normalmente se logra realizando la multiplicación y siembra a partir de plantas madres con similar composición o de la misma calidad (Tabla II.7).

Los cristales purificados de Rebaudiósido A en el mercado internacional tienen precios muy superiores; puede tomarse por ejemplo, el precio relativo Rebaudiósido A / Esteviósido de 4/1 (US\$) o mayor, siendo el precio del Esteviósido, de US\$ 30,0/kg FOB, Puerto Shanghai, China (Rojas, 2012). La calidad mínima para procesamiento exige una relación Rebaudiósido A / Esteviósido de 0,4 a 0,5 (Álvarez, 2010; Geuns, 2007a) o una relación igual o mayor a 1, según el caso.

Otros glicósidos, también considerados valiosos para la industria alimenticia y farmacéutica debido a sus propiedades fisicoquímicas o funcionales, son Rebaudiósido C, Rebaudiósido D y Rubusósido (Abelyan et al., 2011b; Ley et al., 2011, Lui et al., 2012; Shi et al., 2010; Shi et al., 2012).

La purificación de los glicósidos individuales se realiza por líneas de procesamiento diferentes en la industria, de modo que la aptitud de un lote para su procesamiento, también estará condicionada por las características del proceso

productivo y su capacidad de obtener determinados glicósidos o grupos de glicósidos purificados (Jonnala et al., 2006; Wölwer-Rieck, 2012).

A los fines del presente trabajo, se definen los parámetros de calidad de las hojas de stevia para procesamiento (Kolb et al., 2001a; 2001b), como sigue:

- Porcentaje de (Esteviósido + Rebaudiósido A).
- Porcentaje de Esteviósido.
- Porcentaje Rebaudiósido A.
- Relación Rebaudiósido A / Esteviósido.

Expresados como porcentajes en base seca, determinados en las hojas molidas obtenidas del lote en cuestión por cuarteo sucesivo y determinados por HPLC según Kolb et al. (2001a).

II.6.2 Pre-tratamientos

Secado. El secado industrial de stevia puede realizarse por oreo (al sol), si las condiciones de temperatura ambiente (media o alta) y humedad relativa (baja) lo permiten (Kolb, 2011; Rojas, 2009) en un tiempo variable de entre 3-5 días, o bien bajo cubierta (en galpón). Se utilizan mallas media sombra en capas que no superen los 15 cm de espesor (Casaccia y Álvarez, 2006).

El secado rápido proporciona hojas de mejor calidad (Ramesh et al., 2006). Pueden emplearse estufas o equipos de circulación de aire caliente (Rojas, 2009); en tal caso, la consideración más importante es utilizar temperaturas de secado que no superan los 70°C (Kolb, 2011), para evitar el deterioro de los componentes valiosos (ver Sección II.5.2).

La humedad del material seco, almacenado, oscila entre el 6 - 10 % (b.h.) dependiendo la temperatura y humedad relativa ambiente (Kolb, 2011; Rojas, 2009).

Molienda. Luego del secado (Figura II.8), la separación de ramas e inflorescencias puede hacerse de manera manual o por medio de un tamiz de 10 mm de malla (Rojas, 2009). En la extracción discontinua de esteviolglicósidos de

stevia se han utilizado diferentes granulometrías o tamaños de partículas (Tabla II.12, Tabla II.13).

En el caso de extracción en lecho percolador, Kolb (2011), en concordancia con Kutowy et al. (1998), indica la conveniencia de trabajar con partículas de tamaño intermedio en la extracción de glicósidos de stevia; de esta manera, se asegura una buena distribución de flujo del solvente a través del lecho evitando canalizaciones.

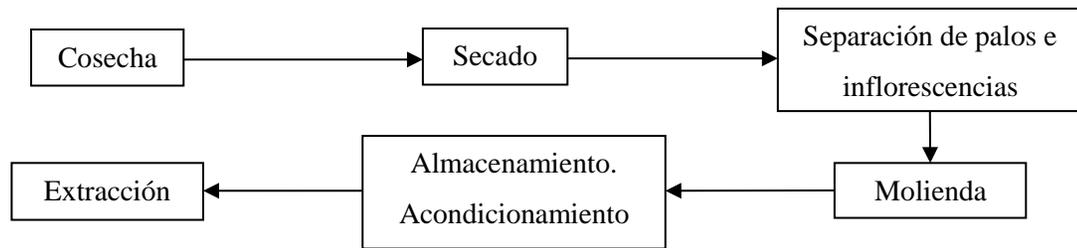


Figura II.8. Pre-tratamientos de las hojas de stevia

Almacenamiento. Las hojas bien secas pueden ser colocadas en bolsas de plástico, para proteger las hojas de la humedad o enfardarse mediante prensas, similares a las de alfalfa o tabaco (Casaccia y Álvarez, 2006); para la exportación, se utilizan los fardos contenedores que pueden albergar a 18.000 a 20.000 kg de hojas secas.

II.6.3 Proceso de producción

Todos los procesos reportados en la literatura y patentados, siguen aproximadamente la misma metodología con variaciones en las operaciones finales de purificación y separación de los glicósidos individuales (Chabot y Beaulieu, 2012; Geuns, 2007a; Moraes y Camargo, 2001); involucran en general múltiples y complejas operaciones.

En una primera etapa, se realiza extracción con solvente acuoso, alcohólico o mixto y / o fluidos supercríticos (Abelyan et al., 2006; Chabot y Beaulieu, 2012; Jonnala et al., 2006; Pasquel, 1999; Rojas, 2009), en algunos casos precedida de un desengrase con solventes apolares como cloroformo, hexano o CO₂ (Dobbelstein et al., 1982; Goto, 2004; Kienle, 1992; Yoda, 2001).

Luego, puede realizarse una filtración con filtro de arena o carbón activado (Rojas, 2009) para retener partículas en suspensión; después una clarificación con iones metálicos (floculación / coagulación) y una decoloración, microfiltración cerámica y / o ultrafiltración, donde se separan coloides, pigmentos y gomas entre otras impurezas (Chabot y Beaulieu, 2012; Goto, 2004; Moraes y Camargo, 2001; Pasquel, 1999; Zhang et al., 2000).

Finalmente se realiza la purificación del extracto primario o clarificado (Chhaya et al., 2012; Kohn, 2010; Wood et al., 1955; Zhang et al., 2000), utilizando resinas de intercambio iónico o bien sistemas de membranas (en los procesos más recientes), obteniendo como producto, un extracto claro concentrado donde los glicósidos son los principales componentes (Figura II.9).

Las siguientes operaciones de separación y purificación dependerán de los productos buscados (Chabot y Beaulieu, 2012), pudiéndose diferenciar entre dos líneas generales de procesamiento: aquellas en la cuales el principal producto es Rebaudiósido A y/o afines, y aquellas donde se obtiene Esteviósido como producto principal. El procedimiento usado más frecuentemente en esta etapa de separación, es la obtención de glicósidos individuales o grupos de glicósidos por cristalización preferencial (Abelyan et al., 2011a; Abelyan et al., 2006; Evans et al.; 2010; Jackson et al., 2011; Jonnala et al., 2006; Kienle, 1992; Kumar, 1986; Pasquel, 1999; Persinos 1973).

Procesos patentados más recientes, tratan sobre etapas finales de procesamiento con disolventes por precipitación, cristalización o disolución preferencial donde el producto principal es el Rebaudiósido C o D (Abelyan et al., 2011b; Markosyan, 2011).

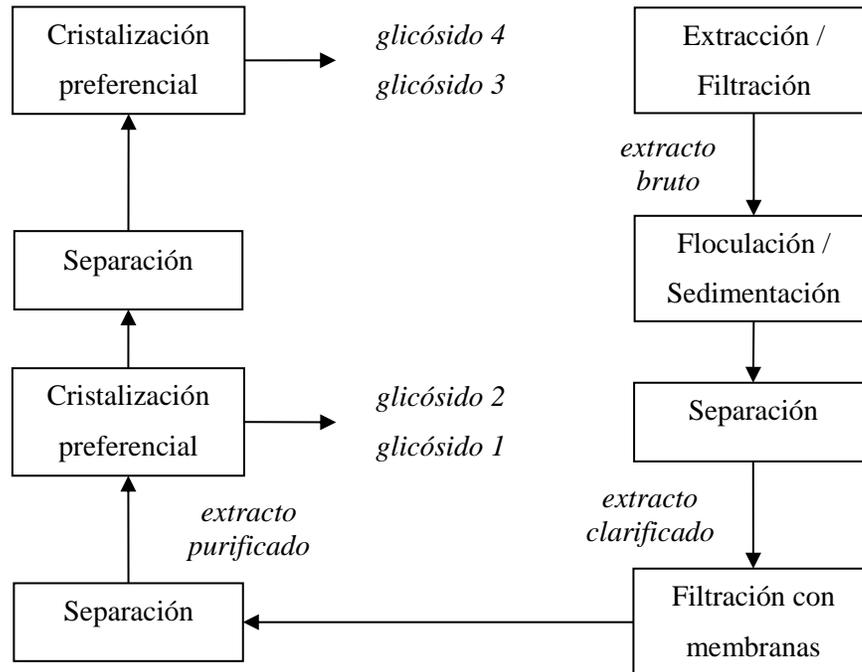


Figura II.9. Etapas principales de procesamiento

En cuanto a la tasa de conversión de materia prima en cristales edulcorantes, en 2004, la Planta Procesadora de Steviafarma (Brasil) reportó valores del 10 %, o sea, 1 kg de cristales de edulcorantes obtenidos por cada 10 kg de hojas secas de stevia (Penner et al., 2004). Siendo el material de partida empleado de la variedad Criolla con un contenido total de glicósidos endulzantes de 14 % (Chabot y Beaulieu, 2012), el rendimiento teórico del proceso completo a fin de obtener los principios dulces valiosos será del 71,43 % (de los glicósidos totales presentes en las hojas).

II.7 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN

II.7.1 Optimización

Optimizar es el proceso de encontrar las condiciones o valores de las variables de proceso que dan el óptimo (máximo o mínimo) de una función o

cantidad deseada (Tzia, 2003). Los variables de operación a tener en cuenta en la optimización de un proceso extractivo (Tzia, 2003; Treybal, 1988), se dan a continuación:

II.7.1.1 Preparación de material sólido. Incluye dos pre-tratamientos, reducción de tamaños y secado.

- Reducción de tamaños (trituration, molienda o corte): la trituration acelera la acción de lixiviación, porque las porciones solubles quedan más accesibles al solvente. Los productos que se van a lixiviar a partir de materiales biológicos se encuentran generalmente dentro de las células; si éstas están intactas, el proceso, por osmosis, puede ser lento. El tamaño de sólidos debe ser el adecuado (superficie por unidad de volumen). Cuando la sustancia soluble está distribuida de manera más o menos uniforme en el sólido, la acción de la lixiviación puede proporcionar canales para el paso del solvente fresco y no es necesaria una molienda muy fina. Si las partículas son muy finas, en cambio, pueden causar obstrucción e impedir el libre flujo de solventes (Treybal, 1988; Tzia, 2003).

- Secado: Cuando la extracción se realiza a partir de materiales vegetales, el sólido naturalmente contiene una fase líquida (acuosa). En el caso de muchos productos recuperados a partir de raíces, tallos y hojas, el material vegetal con frecuencia se seca antes del tratamiento favoreciendo la ruptura de las paredes celulares (Aguilera, 2003; Treybal, 1988); luego, el solvente impregna el sólido, difunde en el sustrato y libera los solutos por acción directa.

II.7.1.2 Solventes de extracción. La elección del solvente es la primera consideración para un proceso de extracción (Lee y Lee, 2003; Tzia, 2003); se basa en una serie de características:

- i. Solubilidad de solutos valiosos
- ii. Selectividad
- iii. Recuperabilidad
- iv. Idealmente no tóxico, no reactivo, no inflamable
- v. Disponibilidad y bajo costo

La selectividad es de especial importancia (Lee y Lee, 2003); la elección se basa comúnmente en la similitud de polaridad con los solutos.

Solventes utilizados en la producción de alimentos e ingredientes alimentarios, además del agua y el hexano, en el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación (BPM) para todos los usos son: agua, propano, butano, acetato de etilo, acetato de butilo, etanol, acetona y dióxido de carbono (Aguilera, 2003; Wakelyn y Wan, 2003). Su uso resulta sólo en la presencia de residuos o derivados en cantidades técnicamente inevitables que no representen peligro para la salud humana.

II.7.1.4 Temperatura de operación. Por lo general se busca realizar la lixiviación a las temperaturas más elevadas posibles debido a que producen la mayor solubilidad del soluto o los solutos en el disolvente y concentraciones finales mayores en la fase noble (Treybal, 1988); también aumenta la velocidad de extracción en todas las etapas (Ibarsz y Barboza-Cánovas, 2005).

Sin embargo, temperaturas muy elevadas pueden producir pérdidas apreciables de solvente, lixiviación de cantidades excesivas de solutos indeseables (impurezas) o deterioro químico de componentes sensibles (Treybal, 1988; Tzia, 2003).

II.7.1.4 Modo de operación y equipo. El equipo utilizado depende del modo de operación: en condiciones continuas (estado estacionario) o en estado no estacionario; de la técnica de manejo de los sólidos: lecho fijo, percolación, inmersión total del sólido en el líquido, drenaje intermitente o disperso; y la disposición a realizar: en una sola etapa o de varias etapas (Treybal, 1988; Tzia, 2003). Las operaciones en estado no estacionario incluyen aquellas en las que los sólidos y los líquidos se ponen en contacto únicamente por lotes (batch) y aquellas donde un lote de sólidos se pone en contacto con una corriente del líquido que fluye continuamente (técnica por semilotes). Los sólidos finamente divididos pueden mantenerse en suspensión y dispersarse en todo el líquido con la ayuda de algún tipo de agitador, mientras partículas gruesas generalmente se tratan en lechos fijos por percolación (Treybal, 1988).

II.7.2 Extracción de esteviolglicósidos

Para la obtención del extracto crudo o bruto, se realiza una extracción discontinua (maceración, infusión, decocción), (ver Figura 2.10), o percolación a partir de las hojas de stevia pre-tratadas, con solvente acuoso, alcohólico o mixto (Chabot y Beaulieu, 2012; Goto, 2004; Pasquel, 1999; Rojas, 2009). El producto obtenido en esta primera etapa de procesamiento consiste en una mezcla de color marrón o verde intenso conteniendo los principios endulzantes, pigmentos de las hojas, polisacáridos solubles, proteínas y pectinas, gomas, partículas coloidales y otras impurezas (Chabot y Beaulieu, 2012; Pasquel, 1999), (ver Sección II.4.2).

El grado de extracción (porcentaje extraído) puede variar del 50 al 85 % de los glicósidos presentes en las hojas en el proceso a escala industrial, si bien han sido reportados rendimientos superiores al 93 % (Chabot y Beaulieu, 2012; Chhaya et al., 2012; Kolb, 2011).

El solvente más ampliamente utilizado para extraer los esteviolglicósidos de stevia ha sido agua, trabajando a diferentes temperaturas; el grado de remoción de componentes valiosos es en general mayor con la temperatura y se correlaciona positivamente con los sólidos solubles totales extraídos (ver Tabla II.8 y Tabla II.9).

La eficiencia de extracción, en general aumenta con la disminución del tamaño de partículas si la extracción se realiza en tanque agitado; lo frecuente es la utilización de partículas de tamaño intermedio (Tabla II.2), evitando la obstrucción posterior de los filtros (Rojas, 2009; Zamora, 2007). Si la técnica elegida es lecho percolador, también resulta más efectivo realizar la extracción con partículas de tamaño intermedio (ver sección II.8.1).

La selección del solvente, de la técnica de extracción y de los parámetros de operación, afectan directamente la calidad del extracto bruto (Chabot y Beaulieu, 2012; Kutowy et al., 1999). Realizando la extracción a pH bajo (menor

que 3), se obtiene un extracto de mayor pureza (Kutowy et al., 1999), y resultados comparables a pH 10 (Chabot y Beaulieu, 2012).

- A. Tanque de extracción
 1. Alimentación de material vegetal
 2. Alimentación de solvente
 3. Sólidos lixiviados
 4. Mezcla lixiviada

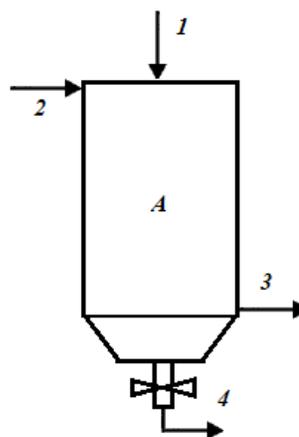


Figura 2.10. Equipo de extracción para la obtención del extracto bruto de *S. rebaudiana*. Adaptado de Kutowy et al. (1999); Singh (2008)

El empleo de altas temperaturas también influye en la calidad del extracto (Chabot y Beaulieu, 2012; Kutowy et al., 1999); a 50 °C (en columna) se extrae 50 % más de pigmentos que trabajando a 25 °C (Chabot y Beaulieu, 2012); a 4 °C por su parte, la concentración de impurezas se reduce en 70 % en relación a la operación a 25 °C.

II.7.3 Optimización de la extracción de esteviolglicósidos

Para la caracterización del producto obtenido en la operación de obtención del extracto bruto o crudo de *S. rebaudiana*, se definen las siguientes variables de respuesta o parámetros de calidad:

- Concentración de glicósidos valiosos en el extracto bruto expresados como g de esteviolglicósidos valiosos por L de mezcla del extracto (g/L o bien kg/m³).

- Grado de extracción de los principios activos valiosos (glicósidos recuperados), expresado como porcentaje de esteviolglicósidos extraídos en relación a los glicósidos presentes caracterizados en la matriz vegetal.
- Carbohidratos totales según Rojas (2009), en g/L o kg/m³, por correlación (Rojas, 2009).
- Sólidos totales (extracto total o materia seca) en g/L o kg/m³.
- Pureza expresada como porcentaje de esteviolglicósido valioso en el extracto seco total o materia seca.

En cuanto a su aptitud para optimizar la concentración de glicósidos en los extractos, la recuperación de esteviolglicósidos, la cinética de la extracción o la pureza de los extractos, se han estudiado con anterioridad, las siguientes variables controladas: condiciones de pre-extracción o desengrase, grado de molienda (tamaño de partículas), solvente mixto de extracción y pH de solvente extractor, temperatura y tiempo de operación, relación hojas / solvente, potencia de sonicación, agitación o microondas, presión de extracción con fluidos supercríticos, concentración de enzimas y tiempo de incubación en la extracción enzimática, entre otras (Abelyan et al., 2011b; Abelyan et al., 2006; Giovanetto et al., 1990; Jiménez et al., 2010; Kolb et al., 2001a; Liu et al., 2010; Puri et al., 2012; Soto y Del Val, 2002; Tzia, 2003; Zamora, 2007). En la Tabla II.12, se presentan las condiciones de operación presentadas en diferentes patentes, para obtener los principios endulzantes a partir de la matriz vegetal.

En la Tabla II.13 se muestran algunos resultados de optimización obtenidos por diferentes autores, al estudiar la extracción de esteviolglicósidos de *S. rebaudiana*.

Tabla II.12. Obtención del extracto bruto, algunos procesos patentados

Técnica	Solvente temperatura tiempo	Relación hojas / solvente (g/mL o kg/L)	Tamaño de partículas	Otros	Referencia
Extracción discontinua con agitación interrumpida	agua a pH = 6,5 60 °C 5 h	1 / 10	30 mesh	hojas pre- secadas a 55 °C (en vacío)	Abelyan et al. (2010)
Extracción en columna	agua acidificada con ácido fosfórico (pH = 2) 4 °C 20 min	1 / 20	10 - 40 mm	hojas secas; velocidad de circulación de agua = 24 - 30 L / min	Kutowy et al. (1999)
Extracción discontinua	agua 20 - 65 °C			Ca(OH) ₂	Giovanetto et al. (1990)
Extracción discontinua	agua a pH = 6,5 55 °C 1 - 12 h	1 / 10	30 mesh		Purkayastha et al. (2012)
Extracción discontinua	agua 50 - 55 °C 30 - 60 min	1 / 5 - 1 / 15			Magomet et al. (2011)
Extracción discontinua	etanol:agua (80:20 p:p); 80 °C; 60 min			respuesta optimizada: pureza	Chabot y Beaulieu (2012)
Extracción discontinua	agua en presencia de pectinasa, celulasa, α - amilasa		pulverizado	hojas secas; respuesta optimizada: cinética de extracción	Abelyan et al. (2006)

Tabla II.13. Optimización de la extracción de esteviolglicósidos de stevia

Técnica de extracción	Condiciones de operación	Variables estudiadas	Respuesta optimizada	Referencia
Extracción discontinua, solvente acuoso	100 g hojas secas / 1000 mL de agua (1 / 10)	temperatura, tiempo y potencia de sonicación	32 min a 68 °C y 60 W	Liu et al. (2010)
Extracción discontinua de Esteviósido con solvente acuoso	hojas secas	temperatura, tiempo y relación hojas/solvente	56 min a 78°C y relación 1 / 14 (g/mL) hojas secas / agua	Chhaya et al. (2012)
Extracción discontinua en tanque agitado, solvente acuoso	tanque de 800 mL de capacidad y agitador de 400 rpm (valores en escala)	temperatura, tiempo, tamaño de partícula y relación hojas/solvente	120 min a 40 °C, diámetro promedio de partícula de 0,625 mm y relación 0,05 sólido / agua	Zamora (2007)
Extracción discontinua con buffer acetato y metanol, con agitación	100 g hojas secas en 100 mL de buffer acetato a pH 5, metanol (200 mL) y mezclas de enzimas. Agitación a 150 rpm	temperatura, mezcla de enzimas y tiempo de incubación	45 min a 51-54 °C, y una mezcla de enzimas de pectinasa-celulasa-hemicelulasa de 2 % (c/u)	Puri et al. (2012)
Extracción discontinua, solvente mixto etanol:agua	Relación hojas / solvente 1 / 6,25 y 1 / 8 (kg/L) a pH 3, 7 y 11	solvente mixto etanol:agua, relación hojas/solvente, pH	agua a temperatura de 40-60 °C	Giraldo et al. (2005)
Extracción con fluidos supercríticos, solvente mixto CO ₂ -H ₂ O	pre-extracción con CO ₂ , extracción con CO ₂ -H ₂ O durante 12 h	temperatura y presión de SFE	8 h a 16 °C y presión de 250 bar	Yoda (2001)
Extracción con fluidos supercríticos con solvente mixto CO ₂ -H ₂ O-etanol	30 g hojas y 90 g de CO ₂ en 60 min	temperatura, presión y co – solvente 70:30	presión de 211 bar, 80 °C y 17,4 % de etanol:agua 70:30	Erkucuk et al. (2009)

CAPÍTULO III

III.1 PROPUESTA METODOLÓGICA

Para estudiar la primera etapa de operación en el proceso de obtención y purificación de Estevióside y Rebaudiósido A, a partir de hojas secas y molidas de *Stevia rebaudiana* Bertoni con solvente mixto etanol:agua, se llevaron a cabo experiencias de extracción a escala de laboratorio en condiciones no estacionarias, con un sistema de lecho percolador. Se utilizaron 5 solventes de extracción (relaciones en peso): etanol:agua 0:100 (agua desmineralizada), etanol:agua 30:70, etanol:agua 50:50, etanol:agua 70:30, etanol:agua 100:0 (etanol absoluto), y trabajando a tres diferentes temperaturas (30 °C, 50 °C, 70 °C).

Para hacer el seguimiento del proceso extractivo, durante cada experiencia, se retiraba continuamente disolución de extracto por medio de una válvula de drenaje situada debajo del falso fondo del equipo de percolación, regulando el caudal de salida y tomando volúmenes iguales de extractos en tiempos iguales.

Se obtenían diez fracciones de extracto de 100 mL cada una (ET_i), las cuales se utilizaban para determinar la concentración de Estevióside (g/100 mL), Rebaudiósido A (g/100 mL) y extracto total o materia seca (g/100 mL). Luego se reunían las 10 fracciones obtenidas y se realizaban las mismas determinaciones (g/1 L) sobre los extractos resultantes (ET_j). También se cuantificaron el volumen de solvente empleado y retención de solvente en el lecho por impregnación.

Se procesaron estadísticamente los datos correspondientes a los extractos totales ET_j , analizando el efecto de la utilización de diferentes solventes y temperaturas de operación en los resultados de concentración, recuperación de esteviolglicósidos y pureza y se verificó la existencia de interacciones entre las variables experimentales.

Con los datos medidos en las fracciones de extractos ET_i, se determinó la cinética de extracción de los esteviolglicósidos investigados, expresados como porcentaje de componente valioso recuperado en función del tiempo de ensayo.

Por otro lado, se investigó la variación de la solubilidad del Esteviósido y Rebaudiósido A con la temperatura en los solventes de prueba. Se realizaron ensayos preparando soluciones sobresaturadas de cada glicósido en tubos de ensayo con cierre hermético, se llevaron a ultrasonido a la temperatura de experimentación y luego se colocaron en baño de temperatura hasta alcanzar el equilibrio. Finalmente, se compararon los resultados obtenidos de concentración de glicósidos valiosos con sus correspondientes solubilidades en los solventes de prueba.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1 MATERIALES

a. Material vegetal

El material vegetal utilizado en los ensayos de extracción consistió en un lote de 12 kg de hojas secas y molidas de stevia con alta proporción de Rebaudiósido A, correspondiente a la cosecha realizada a inicios de la floración, de acuerdo a Kolb et al. (2001c), en una plantación experimental de *Stevia rebaudiana* Bertoni variedad mejorada (Departamento Capital, Misiones, Argentina), durante los meses de enero y febrero de 2010.

El pre-tratamiento del lote consistió en cosecha manual, secado al sol, separación de ramas e inflorescencias y posterior reducción de tamaños en molino industrial de cuchillas. A los fines de asegurar la uniformidad del lote entregado al laboratorio, se mezcló manualmente. Para caracterizar el material pre-tratado, adaptando la clasificación realizada por Sabbatella (2008) para la molienda de yerba mate, se distinguieron las siguientes fracciones:

- Hoja gruesa, fracción retenida en malla de tamiz de 40 mesh.
- Hoja fina, fracción retenida en malla entre 40 y 100 mesh.
- Polvo, fracción que pasa el tamiz de 100 mesh.
- Palos, presentes en muy baja proporción.
- Inflorescencias, presentes en muy baja proporción debido a la fenología (inicio de floración), en el momento de cosecha.

Se determinó la distribución granulométrica de las hojas molidas del lote, para ponderar la proporción de hoja fina, hoja gruesa y polvo del material de partida. Los palos presentes fueron retirados manualmente, antes del secado de la muestra para cada ensayo de extracción.

Los resultados de contenido medio de Esteviósido y Rebaudiósido A del lote se determinaron para caracterizar al material de partida y se tomaron como

base para determinar el porcentaje de estevioglicósidos recuperados de la matriz vegetal en cada ensayo de extracción.

En la Tabla III.1 se presenta el contenido de humedad, así como el contenido de Esteviósido y Rebaudiósido A del lote (n = 4) y en la Tabla III.2 se presenta la distribución granulométrica del mismo.

Tabla III.1. Contenido de humedad, Esteviósido y Rebaudiósido A del lote

Componente	% (b.h.)	CV % (b.s.)
Contenido de humedad	7,92 ± 3,01	43,21
Esteviósido	2,40 ± 0,08	3,10
Rebaudiósido A	10,08 ± 0,63	4,75
Relación RebA/Stv	4,21 ± 0,14	3,38

Tabla III.2. Distribución granulométrica

Distribución de tamaño	Fracción	Porcentaje
Retenido en malla de 5 mesh	Palos	0,49
Retenido entre 5 y 40 mesh	hojas gruesas	71,02
Retenido entre 40 y 100 mesh	hojas finas	23,73
Pasa malla de 100 mesh	Polvo	4,76

b. Estevioglicósidos

El material sólido utilizado en los ensayos de solubilidad fueron cristales de Esteviósido 95 % de pureza y Rebaudiósido A 99,5 % de pureza, provistos por Kolb et al., obtenidos en el Laboratorio Central de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

c. Equipos

Las experiencias se realizaron en un conjunto constituido por un equipo extractor construido a tal efecto y un sistema termostatzado.

El sistema termostatzado permitía controlar la temperatura mediante un baño termostático SHOTT GERATE, modelo CTI 150, con un sistema de control de temperatura diferencial. El agua de calefacción, a la temperatura correspondiente al ensayo era circulada a través del tubo externo del equipo extractor.

El equipo extractor consistió en un tanque percolador, abierto, de acero inoxidable, provisto de doble fondo, en donde el sólido a extraer se colocaba sobre el falso fondo (una rejilla metálica provista de una tela de trama abierta, colocada sobre este para cada ensayo). El solvente se distribuye sobre la superficie del lecho sólido y percola a través de él. Durante cada ensayo, se regulaba la válvula de drenaje con la finalidad de obtener un flujo constante de salida de extractos. Las dimensiones del equipo extractor, determinadas experimentalmente y las condiciones de trabajo se listan en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Dimensiones del equipo extractor y condiciones de trabajo

Variable	Símbolo	Magnitud
Altura	H	30,00 cm
Diámetro del tubo interno	D	9,70 cm
Diámetro del tubo externo	d	15,00 cm
Capacidad	C	2215,82 cm ³
Carga	c	200,00 g
Altura del lecho (c = 200 g)	H	12,50 cm
Volumen de lecho sólido (c = 200 g)	V	923,26 cm ³
Caudal de salida de extractos	Q	100,00 mL/6 min (16,67 mL / min)
Caudal de flujo del fluido calefactor	q	2,13 ± 0,15 L / min (n = 10)

Para asegurar condiciones isotérmicas, todo el sistema se acondicionaba a la temperatura del ensayo antes de cada corrida: sistema termostatzado, equipo extractor, solventes, material sólido (Figura III.1).

El mismo sistema termostatzado utilizado en las experiencias de extracción se utilizó como baño de temperatura, con recirculación, en los ensayos

de solubilidad. En este caso se aseguró el control y mantenimiento de condiciones isotérmicas durante la solubilización de los esteviolglicósidos.

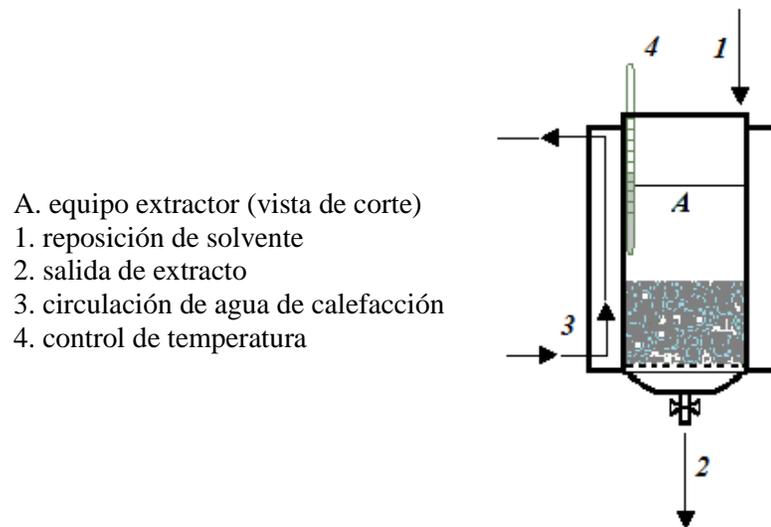


Figura III.1. Equipo percolador de laboratorio para el estudio de la extracción de Esteviósido y Rebaudiósido A

III. 2.2 MÉTODOS

a. Obtención de datos experimentales

a.1 Ensayos de extracción

Para la extracción de esteviolglicósidos de stevia, se pesaron 250 g de hojas molidas (separando manualmente los palos) y se secaron en estufa de vacío a 60 °C y 100 mm Hg hasta peso constante; de la muestra seca resultante, se pesaron 200 g y se llevaron a la temperatura de ensayo en estufa de vacío.

Los ensayos de extracción se llevaron a cabo utilizando agua desmineralizada, etanol absoluto grado analítico y etanol:agua en las proporciones 30:70, 50:50 y 70:30 (p:p). Los solventes de polaridad intermedia se prepararon por la mezcla de agua desmineralizada y etanol 96° obteniendo una solución de densidad acorde a los datos de tablas (Maloney, 2008). Las densidades se midieron con un densímetro para propósitos generales con un intervalo nominal entre 0,790 y 1,010 y división mínima de 0,002 .Los datos de las propiedades físicas de los solventes de extracción utilizados en los ensayos se presentan en la Tabla III.4. Otros solventes mixtos de ensayo (diseño experimental CCD, Sección III.c.ii) se prepararon siguiendo el mismo procedimiento.

Tabla III.4. Datos físicos de los solventes de extracción empleados

Solvente	Densidad g/mL (20°C) ^a	etanol:agua (v/v) ^b	T _{eb} (°C) ^c	Constante Dieléctrica (20°C) ^{d, e}
agua desmineralizada	0,998	0,0	100,0	80,20
etanol:agua 30:70 (p:p)	0,952	35,9	84,6	63,73
etanol:agua 50:50 (p:p)	0,914	56,9	81,9	52,75
etanol:Agua 70:30 (p:p)	0,868	76,4	79,8	41,77
etanol absoluto	0,789	100,0	77,9	25,57

(a) Maloney (2008); (b) Helbing y Burkart (1985); (c) Ackland (2011); (d) Dean (1972); (e) Gennaro (2003).

Para cada ensayo, el solvente extractor se acondicionó a la temperatura de prueba en un vaso de precipitados y dentro del reservorio de fluido calefactor del sistema termostatzado (Figura B.1).

Previo a cada ensayo, el sistema fue equilibrado a la temperatura planificada; la temperatura del sistema fue medida utilizando 2 termómetros, uno colocado dentro del equipo extractor y el otro, dentro del reservorio de fluido calefactor en el sistema termostatzado.

La temperatura dentro del extractor se mantuvo constante con un rango de variación de 1 °C.

La determinación experimental se realizó acomodando 200 g de hojas secas y molidas de stevia sobre la tela y falso fondo del recipiente percolador; luego se vertió sobre el lecho 1000 mL de solvente y se esperó hasta verificar la ausencia de formación de burbujas, indicando esto, que el lecho se encontraba completamente impregnado con solvente de extracción (la operación consumió un tiempo de 5 a 6 min). Se abrió entonces la válvula de drenaje tomando el tiempo de inicio de salida de extractos como tiempo cero.

En el tiempo tomado como tiempo cero, todo el sistema: lecho de sólidos – solvente, sistema termostatzado, vaso de precipitados con solvente de reposición, se encontraban a la temperatura del ensayo.

La reposición de solvente de extracción se realizó, durante cada ensayo, luego de obtener la cuarta fracción de extracto, entre los 25 y los 30 min en cada experiencia.

El caudal de salida de extractos (definido en base a los resultados de ensayos preliminares) fue de 100 mL/6 min (16,67 mL/min). El volumen de solvente empleado en cada ensayo y la retención de solvente en el lecho por impregnación figuran en la Tabla A.3 (ANEXO A).

Se obtuvieron 10 fracciones de extracto bruto (E_i), colectadas en 10 matraces de 100 mL de capacidad, en un tiempo de ensayo de 60 min (6 min por matraz). Se agitó el contenido de cada matraz y se colocó en un baño a temperatura ambiente acondicionándolos para la toma de muestras para análisis.

Luego del muestreo para análisis, se mezclaron las 10 fracciones, se agitó y se dejó en reposo para muestro para análisis del extracto total Ej.

a.2 Ensayos de solubilidad

Se realizaron ensayos para determinar la variación de la solubilidad del Esteviósido y Rebaudiósido A con la temperatura en agua desmineralizada, etanol absoluto y solventes mixtos etanol:agua 30:70; 50:50; 70:30 (p:p); también la variación de la solubilidad de las mezclas Esteviósido + Rebaudiósido A en etanol:agua 30:70 y 70:30. Los cristales de Esteviósido y Rebaudiósido A se secaron en estufa de vacío a 60°C hasta peso constante. En la preparación de los solventes de prueba de acuerdo a Maloney (2008) se utilizó agua desmineralizada, etanol 96° y etanol absoluto grado analítico.

Las condiciones de prueba fueron definidas en ensayos previos. Se prepararon soluciones sobresaturadas de cada glicósido en tubos de ensayo con tapa de goma y cierre hermético. Las mezclas de prueba se llevaron ultrasonido a 50 °C durante 60 min con agitación frecuente; se mantuvieron en heladera a 5 °C durante 5 días. Luego, se llevaron a ultrasonido a temperatura de ensayo durante 60 min con agitación frecuente y se colocaron en baño de temperatura con recirculación de fluido calefactor durante 48 h (30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C). Se realizaron dos ensayos con cada mezcla de prueba a cada temperatura.

b. Métodos analíticos

b.1 Determinación de humedad del lote

La determinación del contenido medio de humedad del lote se realizó para caracterizar al material de partida. Se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Humedad (b.h.)} = \left(\frac{\text{Peso de agua en la muestra}}{\text{Peso de la Muestra Humeda}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Humedad (b.s.)} = \left(\frac{\text{Peso de agua en la muestra}}{\text{Peso de la Muestra Seca}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

El contenido de humedad b.h. (Nielsen et al., 2003) y b.s. del lote de partida se determinó pesando 20 g de hojas molidas en bandejas de aluminio previamente taradas y se llevaron a estufa a 102 ± 1 °C durante 45 min. La eliminación de humedad se completó secando en estufa de vacío a 102 ± 2 °C y 100 mm Hg, hasta peso constante. La determinación se realizó sobre el lote de partida por cuadruplicado, se procedió tomando una muestra de la parte superior, dos de la parte media de la bolsa y una de la parte inferior. Los resultados expresan el contenido de humedad medio del lote y se presentan en la Tabla III.1.

b. 2 Determinación del contenido de Esteviósido y Rebaudiósido

A

La cuantificación de Esteviósido y Rebaudiósido A se realizó utilizando cromatografía líquida de alta performance (HPLC) por el método de Kolb et al. (2001a). Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu Prominence con software de análisis y sistema de control automático de suministro de solventes (Modelo SPD-M20A). El sistema de inyección automático utilizó viales de muestras de 1,50 mL y loop dosificador de 200 µL. El sistema de detección fue un espectrofotómetro

UV-visible por arreglo de diodos marca Shimadzu Prominence, modelo SPD-M20A.

La fase estacionaria utilizada para separar los esteviolglicósidos fue una columna amino NH₂, Zorbax, 5 µm, 250 x 4,6 mm Agilent Thechnologies. Las condiciones de operación fueron las siguientes: elución isocrática acetonitrilo:agua 80:20 (v/v) a pH 5 ajustado con ácido acético, operando a temperatura ambiente, con un tiempo de ejecución de 9 min, el caudal fue de 2 mL/min y la longitud de onda del detector UV fue de 210 nm.

Reactivos. Se utilizó etanol 99,5 % pro-análisis Cicarelli, y ácido acético grado analítico y acetonitrilo grado isocrático Merck, también agua tri-distilada. Se prepararon dos soluciones stock de estándar, uno de Esteviósido y otro de Rebaudiósido A disolviendo 1,000 g de cada estándar (cristales provistos por Kolb et al.) en 100 mL de etanol:agua 70:30 (p:p). Las soluciones de stock fueron conservadas en la heladera y llevadas a temperatura ambiente antes de su uso para calibración.

Curvas de calibración. Para la cuantificación de los analitos de interés se utilizó el método de estándar externo. Con las soluciones stock de Esteviósido y Rebaudiósido A estándares se prepararon los siguientes patrones: 0,300 g/L; 0,600 g/L; 1,000 g/L. Para esto, se tomaron cantidades medidas de soluciones stock de estándares y se diluyeron en etanol:agua 70:30 hasta lograr las concentraciones mencionadas. Los patrones se inyectaron por triplicado y se obtuvieron las áreas de los picos correspondientes.

Las concentraciones de Esteviósido y Rebaudiósido A en las muestras fueron calculadas por el software del equipo mediante la comparación de las áreas de los picos con las correspondientes de cada curva de calibración.

Las características cromatográficas del Esteviósido y Rebaudiósido A se muestran en la Figura III.2. Los picos obtenidos fueron simétricos y agudos con buena resolución de la línea de base.

Contenido de Esteviósido y Rebaudiósido A del lote. Se pesaron 1,00 g de cada muestra (hojas secas molidas especificadas en III. 2. 2. b. 1). Luego se

adicionó en cada caso solución etanol:agua, 70:30 (p:p) hasta completar 100 mL. Para una extracción efectiva, se colocaron en baño termostatzado a 70 °C por 30 min utilizando en varias ocasiones un equipo de ultrasonido para una mejor separación. Finalmente, se enfrió a temperatura ambiente, se filtró una alícuota de 10 mL en filtro de papel y se tomó de cada muestra una alícuota de 1,50 mL para el vial del inyector automático del cromatógrafo.

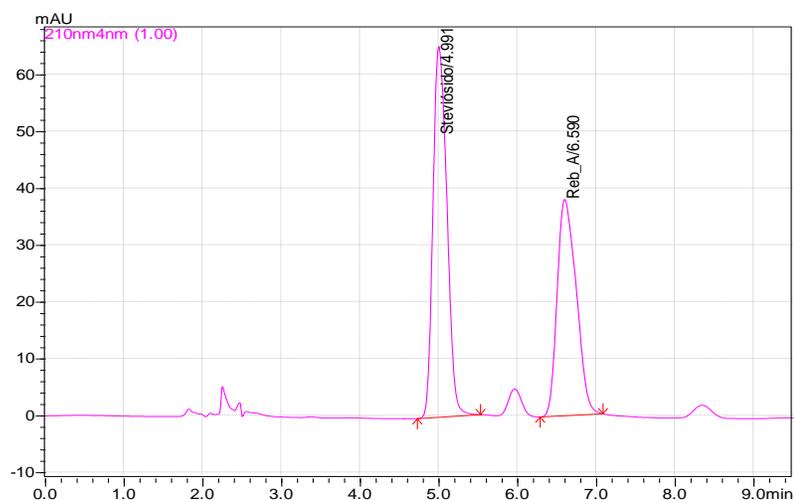


Figura III.2. Características cromatográficas del Estevisido y Rebaudisido A

Contenido de Estevisido y Rebaudisido A en extractos brutos. Se cuantificaron los analitos investigados en las 10 fracciones de extractos de 100 mL cada una, rotuladas desde M1 a M10. Una alícuota de 500 μ L de extractos fue tomada de cada matraz y diluida a 10 mL con etanol:agua 70:30 para obtener una dilución 1:20 (v/v). Luego se centrifugaron las diluciones para sedimentar material en suspensión y se tomaron alícuotas de 1,50 mL para los viales del inyector automático. Los resultados se presentaron como sigue:

$$Stv(i) = \text{Esteviósido}(g) / 100 \text{ mL de Extracto } (i) \quad (3)$$

$$RbA(i) = \text{Rebaudiósido A}(g) / 100 \text{ mL de Extracto } (i) \quad (4)$$

Finalmente se reunieron las 10 fracciones de extractos correspondientes a cada experimento (extracto bruto total) y se le realizó el mismo procedimiento. En la Figura III.3 se muestra un cromatograma típico. Los resultados se presentaron como sigue:

$$Stv(j) = \text{Esteviósido}(g) / 1 \text{ L de Extracto } (j) \quad (5)$$

$$RbA(j) = \text{Rebaudiósido A}(g) / 1 \text{ L de Extracto } (j) \quad (6)$$

Esteviósido y Rebaudiósido A solubilizados. La preparación de las muestras para análisis a partir de las mezclas obtenidas en los ensayos de solubilidad se realizó con solventes y jeringas acondicionadas a temperatura de ensayo. Se tomó una alícuota de 100 μL de sobrenadante con jeringa y se diluyó a 10 mL con etanol:agua 70:30 para obtener una dilución 1:100 (v/v); se tomó de cada muestra una alícuota de 1,50 mL para el vial del inyector automático del cromatógrafo. Los resultados de solubilidad se expresaron en g/L.

b. 3 Determinación de extractos totales

Los sólidos totales o extractos totales ETi se determinaron en las 10 fracciones obtenidos en cada ensayo de extracción de la siguiente manera: se tomaron 10 mL de muestra y se llevaron a sequedad en recipientes de acero inoxidable previamente tarados, sobre una placa calefaccionada mediante vapor en un baño de agua; posteriormente se colocaron en estufa de vacío donde se

mantuvieron a 102 ± 2 °C y 100 mm Hg hasta pesada constante. Los resultados obtenidos a partir de la determinación de ET en cada fracción de extracto de 100 mL (rotuladas desde M1 a M10) expresan como en la Ec. (7). Finalmente, reuniendo las 10 fracciones obtenidas en cada ensayo, se procedió de la misma manera, determinando los ET_j en cada extracto de 1000 mL (extracto bruto total) expresado los resultados según la Ec. (8):

$$ET(i) = \text{Peso de sólidos}(g) / 100 \text{ mL de Extracto}(i) \quad (7)$$

$$ET(j) = \text{Peso de sólidos}(g) / 1 \text{ L de Extracto}(j) \quad (8)$$

Los resultados de ET se expresaron en las mismas unidades que la concentración el Estevióside y Rebaudiósido A.

b. 4 Determinación de la granulometría del lote

La distribución granulométrica de las hojas molidas del lote de partida se determinó de acuerdo con la Norma IRAM N°20514/2007 desarrollada para yerba mate, utilizando un equipo tamizador con tres aperturas de mallas diferentes: 5, 40 y 100 mesh. Se pesaron 100,00 g de muestra de ensayo y se dispusieron sobre el tamiz de 5 mesh. Se dispuso el conjunto de tamices con tapa y colector sobre el dispositivo vibrador y se mantuvo funcionando durante 30 min. Finalmente se pesaron las porciones retenidas en cada tamiz, expresando los resultados en tanto por ciento.

c. Métodos estadísticos y análisis de datos experimentales

c. 1 Diseños experimentales

Con el fin de optimizar la etapa de obtención del extracto bruto de stevia en lecho percolador, se utilizaron 3 diseños experimentales para evaluar el efecto de las variables controladas (independientes) solvente y temperatura sobre las siguientes variables respuestas (Tabla III.5): concentración de Estevióside, concentración de Rebaudiósido A, relación Rebaudiósido A/Estevióside, Estevióside recuperado del material vegetal, Rebaudiósido A recuperado del material vegetal, extracto total, y pureza expresada como porcentaje del componente valioso presente en los extractos totales.

Tabla III.5. Variables de diseño experimental

Variables		Descripción
Variables respuesta	Stv (j)	Concentración de Estevióside en una muestra (g/L)
	RbA (j)	Concentración de Rebaudiósido A en una muestra (g/L)
	ET (j)	Extracto total en una muestra (g/L)
	RbA/Stv	Relación Rebaudiósido A/Estevióside en una muestra
	Stv _{rec} (*)	Porcentaje de Estevióside recuperado a partir de la matriz vegetal (%)
	RbA _{rec} (*)	Porcentaje de Rebaudiosido A recuperado a partir de la matriz vegetal (%)
	%Stv (*)	Pureza expresada como porcentaje de Estevióside en un extracto total o extracto seco (% p/p)
	%RbA (*)	Pureza expresada como porcentaje de Rebaudiósido A en un extracto total o extracto seco (% p/p)
Variables controladas	Solvente	Porcentaje en peso sobre peso, de etanol en agua (p:p)
	Temperatura	Temperatura de operación (°C)

(*) las ecuaciones se presentan en el ANEXO C

Con los resultados obtenidos de los dos primeros diseños, se estableció un tercer diseño, compuesto, que sirvió para obtener los coeficientes de la ecuación que describe el comportamiento de las variables respuesta medidas, en

función a la variación de la temperatura y el porcentaje de etanol en el solvente mixto.

La influencia de las variables controladas sobre el extracto total excluidos Rebaudiósido A y Esteviósido, no se evaluó en este análisis debido a que esta fracción en los extractos brutos contiene esteviolglicósidos que no fueron cuantificados en el presente trabajo (ver Sección II.4).

i. Diseño experimental 3*5

Se planteó un diseño multinivel factorial 3*5 (Tabla III.6) para estudiar los efectos de 2 factores en 15 ensayos. La selección del intervalo de polaridad del solvente se basó en los resultados de estudios anteriores (Evans et al., 2010; Kolb et al., 2001a).

Tabla III.6. Diseño experimental: 3*5

Ensayo	Variables controladas	
	Porcentaje de etanol	Temperatura (°C)
1	0	30
2	30	30
3	50	30
4	70	30
5	100	30
6	0	50
7	30	50
8	50	50
9	70	50
10	100	50
11	0	70
12	30	70
13	50	70
14	70	70
15	100	70

El límite inferior de temperatura corresponde a una temperatura ambiente estimada en planta de procesos, en el litoral argentino, durante las campañas de recolección de stevia; el límite superior de temperatura corresponde a una temperatura de trabajo elevada, pero evitando pérdidas de solvente mixto por evaporación preferencial de etanol, lo cual cambiaría la polaridad del solvente de extracción (ver Tabla III.4).

Los resultados (Stv, RbA y ET) medidos en las 10 fracciones de extractos brutos, obtenidas en las experiencias correspondientes al diseño multinivel factorial 3*5 se utilizaron para ajustar los datos a modelos cinéticos (Sección III.2.2. apartado c.3).

ii. Diseño experimental CCD

Se planteó un diseño central compuesto de superficie de respuesta CCD, para validar los resultados del diseño multinivel factorial 3*5 y definir los coeficientes de peso significativos en la ecuación de segundo orden (Ec. 9), planteada para describir el comportamiento de las variables respuestas en función de las variables controladas:

$$\text{Variable respuesta} = c + a \cdot x + b \cdot y + ab \cdot x \cdot y + aa \cdot x^2 + bb \cdot y^2 \quad (9)$$

dónde:

x: variable reducida solvente (porcentaje de etanol) = $(X-50)/35$

y: variable reducida temperatura = $(Y-50)/14$

X: porcentaje de etanol (% en peso)

Y: temperatura (°C)

Se estudió el efecto de los 2 factores en 11 ensayos (Tabla II.7). El intervalo de temperatura fue definido de manera de poder abarcar en el rango de

análisis a la temperatura más alta de trabajo evitando pérdidas de solvente (70 °C). El intervalo de composición de solvente mixto se definió de manera de poder abarcar en el rango de análisis al agua desmineralizada (0:100) y al etanol absoluto (100:0). Se mantuvo el punto central para este diseño conforme al diseño multinivel factorial 3*5.

Tabla III.7. Diseño experimental CCD

Experiencia	Variables controladas		Variables reducidas	
	X	Y	x	y
1	15	36	-1	-1
2	85	36	1	-1
3	15	64	-1	1
4	85	64	1	1
5	0	50	-1,41	0
6	100	50	1,41	0
7	50	30	0	-1,41
8	50	70	0	1,41
9	50	50	0	0
10	50	50	0	0
11	50	50	0	0

iii. Diseño compuesto

Con los resultados obtenidos en el diseño factorial 3*5 y en el diseño CCD se planteó un diseño compuesto para establecer los coeficientes de peso significativo que permitan explicar el efecto de las variables controladas sobre las variables respuestas, por medio de la ecuación de segundo orden planteada (Ec. 10):

$$\text{Variable respuesta} = c + a \cdot X + b \cdot Y + ab \cdot X \cdot Y + aa \cdot X^2 + bb \cdot Y^2 \quad (10)$$

El diseño incluyó 19 combinaciones de solvente mixto y temperatura con dos repeticiones del punto central (Tabla III.8).

Tabla III.8. Diseño experimental compuesto

Experiencia	Variables controladas	
	X	Y
1	0	30
2	0	50
3	0	70
4	15	36
5	15	64
6	30	30
7	30	50
8	30	70
9	50	30
10	50	50
11	50	50
12	50	50
13	50	70
14	70	30
15	70	50
16	70	70
17	85	36
18	85	64
19	100	30
20	100	50
21	100	70

La bondad de ajuste del modelo se evaluó considerando los parámetros R^2 (coeficiente de determinación o variabilidad explicada), RMSE (raíz cuadrada del

error medio cuadrático), E % (error porcentual promedio) y χ^2 dados por las Ec. (12), (13), (14).

c.2 Solubilidad de Estevióside y Rebaudiósido A

Se determinó experimentalmente la solubilidad de los glicósidos investigados en los solventes de prueba. Los pesos de glicósidos investigados utilizados en cada ensayo se determinaron en base a ensayos preliminares. También se investigó la co-solubilización de los glicósidos en los solventes etanol:agua 30:70 y 70:30 según Benavente-García et al. (2001).

De los resultados obtenidos, se tomaron los valores más altos de concentración de glicósido solubilizado en cada ensayo (primer y segundo ensayo) correspondientes a la mayor solubilidad lograda en cada condición de prueba.

c.3 Ajuste de los datos a modelos cinéticos

Los datos obtenidos en los ensayos de extracción correspondientes al diseño experimental 3*5 (Sección III.2.2., apartado c.1) se ajustaron al modelo cinético de Pilosof et al. (1985), expresando los porcentajes de Estevióside y Rebaudiósido A recuperados de partir de la matriz vegetal, por la siguiente ecuación:

$$R(t) = \frac{R_{\infty} \cdot t}{t_{1/2} + t} \quad (11)$$

dónde:

$R(t)$: recuperación porcentual del componente a partir de la matriz vegetal a tiempo t .

t : tiempo de extracción (min).

Y los parámetros del modelo:

R_{∞} : recuperación porcentual del componente a partir de la matriz vegetal a tiempo infinito (% b.s.).

$t_{1/2}$: tiempo en que se recupera la mitad del componente a partir de la matriz vegetal ($R_{\infty}/2$), min.

Las variables dependientes e independientes consideradas en este ajuste se listan en la Tabla III.9.

Tabla III.9. Variables de ajuste cinético

Variables	Descripción	Símbolo
Variables dependientes	recuperación porcentual de Rebaudiósido A	RbA_{rec}
	recuperación porcentual de Esteviósido	Stv_{rec}
Variable independiente	tiempo (min)	t (min)

Los valores R_{∞} y $t_{1/2}$ se obtuvieron a partir de la Ec. (11) y los datos experimentales se analizaron mediante regresión no lineal. La bondad de ajuste del modelo se evaluó considerando los parámetros R^2 , RMSE, E % y χ^2 , dados por las ecuaciones:

$$RMSE = \left[\frac{1}{N} \sum (R_{exp} - R_{pre})^2 \right]^{0.5} \quad (12)$$

$$E\% = \left(\frac{1}{N} \sum \left| \frac{R_{exp} - R_{pre}}{R_{exp}} \right| \right) \cdot 100 \quad (13)$$

$$\chi^2 = \frac{\sum (R_{exp} - R_{pre})^2}{(N - np)} \quad (14)$$

dónde:

R_{exp} : recuperación porcentual del componente a partir de la matriz vegetal a tiempo t , valor experimental.

R_{pre} : recuperación porcentual del componente a partir de la matriz vegetal a tiempo t , valor predicho.

np = número de parámetros del modelo (2).

N = número total de datos (11).

Un buen ajuste es indicado por valores pequeños de RMSE, por $R^2 > 85\%$ y $E\% < 10\%$ (Brousse et al., 2012; Park et al., 2002).

Para realizar el tratamiento estadístico de los datos obtenidos, se utilizó en todos los casos, el software estadístico Statgraphics Plus 5.1.

III.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan a continuación, corresponden extracción en lecho percolador de Estevióside y Rebaudiósido A en las condiciones de prueba: 200 g de hojas secas molidas, siendo el volumen de extracto bruto colectado de 1000 mL y el tiempo de extracción de 60 min; las variables controladas fueron solvente mixto etanol:agua (p:p) y temperatura de operación (°C). Las dimensiones del equipo extractor y condiciones de operación fueron las presentadas en la Tabla III.2.

a. Capacidad del método analítico para la cuantificación de esteviolglicósidos en extractos brutos

En la Figura III.3, se muestra un cromatograma típico del análisis instrumental de un extracto bruto, obtenido por extracción en lecho percolador con solvente etanol:agua 30:70, operando a 70 °C durante 60 min.

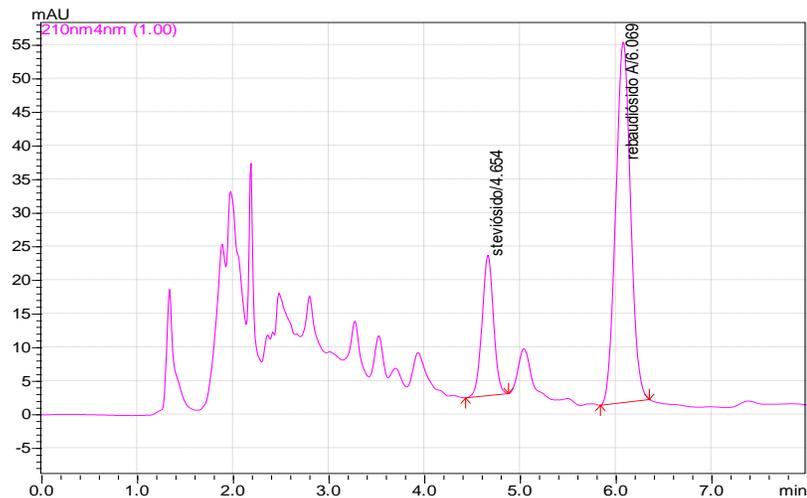


Figura III.3. Contenido de Estevióside y Rebaudiósido A, cuantificados por HPLC, en el extracto bruto total obtenido con etanol:agua 30:70 a 70°C.

El método de análisis empleado resultó apropiado por su rapidez, tanto para cuantificar los fitoquímicos investigados en hojas molidas de *S. rebaudiana* como para el análisis de rutina de un gran número de muestras de extractos brutos obtenidos con solventes mixtos etanol:agua de diferentes polaridades y donde los estevioglucósidos son los analitos de interés.

b. Diseños experimentales

i. Diseño experimental 3*5

Se planteó un diseño multinivel factorial 5*3 para estudiar los efectos de 2 factores en 15 ensayos. Los valores medidos se analizaron estadísticamente. Los resultados de análisis de varianza se listan en la Tabla III.10. Los datos de las variable respuestas, en el orden del diseño se listan en la Tabla A.1 (ANEXO A).

Tabla III.10. Análisis de varianza (p-valor)

Variable respuesta	Efecto de las variables controladas (p-valor)		
	Solvente	Temperatura	Solvente * Temperatura
Stv (g/L)	0,0000	0,0085	NS
RbA (g/L)	0,0000	0,0350	NS
ET (g/L)	0,0000	0,0040	NS
Stv _{rec} (%)	0,0000	0,0085	NS
RbA _{rec} (%)	0,0000	0,0350	NS
%Stv	0,0280	NS	NS
%RbA	0,0010	NS	NS
RbA/Stv	0,0049	0,0108	NS

NS: No significativo (p-valor > 0,05)

En las Figuras III.4 a III.7 se presenta la variación de los porcentajes recuperados de Esteviósideo y Rebaudiósido A con el solvente mixto y la temperatura. En las Figuras III.8 a III.9 se presenta la influencia de la utilización de

diferentes solventes sobre la pureza de Esteviósido y Rebaudiósido A. En las Figuras III.10 a III.11, la variación de la relación Rebaudiósido A / Esteviósido con el solvente mixto y temperatura. En las Figuras B.3 a B.8 (ANEXO B), se presenta la representación gráfica de la dependencia de la concentración de cada componente, en función del solvente mixto de extracción y de la temperatura.

Con respecto a la concentración de glicósidos en el extracto bruto, es mayor en la zona de polaridad intermedia de solvente mixto (Figuras B.3 y B.5), es menor al utilizar los solventes puros (Prueba LSD Fisher de múltiples rangos). El mismo comportamiento observado en la concentración de los glicósidos, se observa en ET (extracto total), (Figura B.7).

La concentración del Stv aumenta entre los 30 °C y los 70 °C (Figura B.4); la concentración de RbA y de ET, aumentan con la temperatura entre los 30 °C y los 50 °C (Figura B.6, B.8), luego no se produce un aumento significativo en la concentración (Prueba LSD).

En cuanto a la recuperación porcentual de componentes valiosos a partir de la matriz vegetal (Stv_{rec} y RbA_{rec}), se encontró la misma dependencia que en el caso de concentraciones. Los porcentajes de esteviolglicósidos recuperados del material de vegetal, fueron mayores al trabajar con etanol:agua 30:70 (Figura III.4 y III.6). La variación con la temperatura, determinada en Stv_{rec} y RbA_{rec} , es la misma que se observa en la concentración de Stv y RbA (Figura III.5 y III.7).

Los extractos de mayor pureza se obtienen con etanol:agua 70:30 y la menor pureza se obtiene cuando el solvente es etanol absoluto (Figura III.8 y III.9).

La menor relación RbA/Stv se obtiene cuando el solvente es etanol absoluto, (Figura III.10), y trabajando a mayor temperatura (Figura III.11).

Los extractos acuosos fueron de color caramelo y color verde intenso al trabajar con etanol. En extractos acuosos se observó la presencia de una fase inferior diferenciable al centrifugar; también en estos casos, la formación de espuma en los matraces al agitar o muestrear, dificultando el muestreo.

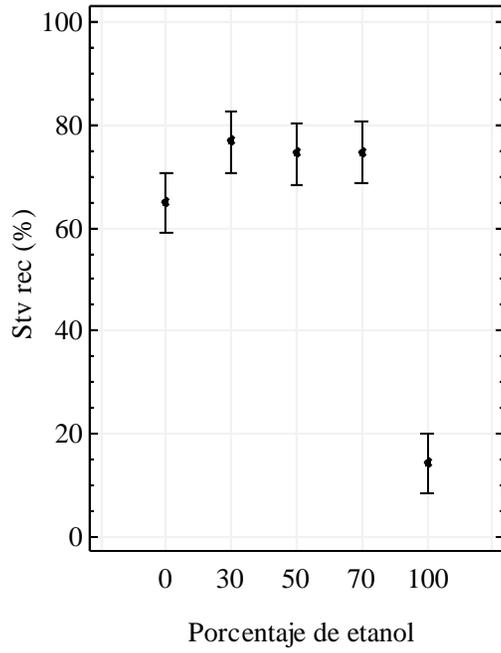


Figura III.4. Stv_{rec} vs. porcentaje de etanol

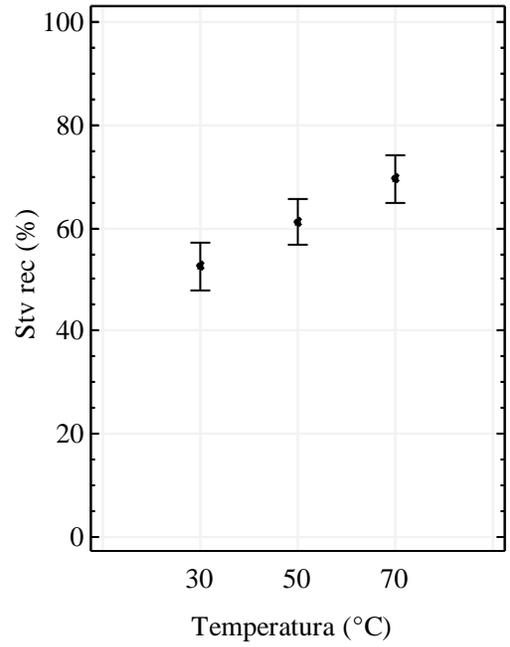


Figura III.5. Stv_{rec} vs. temperatura

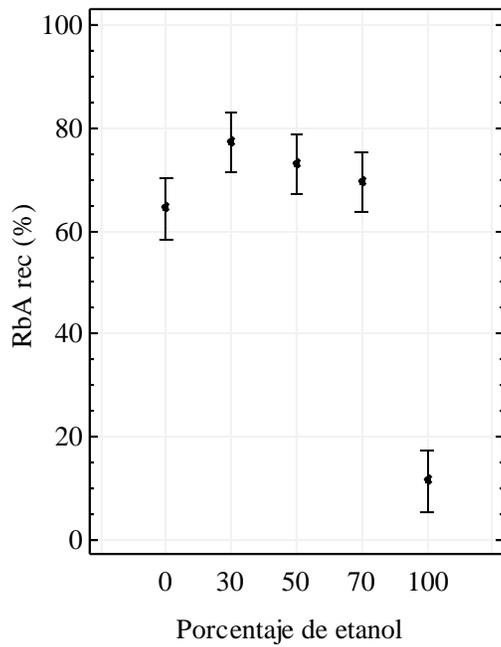


Figura III.6. RbA_{rec} vs. porcentaje de etanol

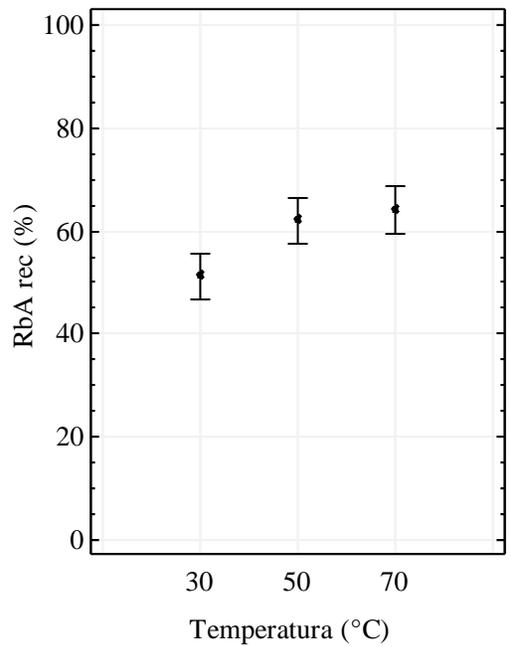


Figura III.7. RbA_{rec} vs. temperatura

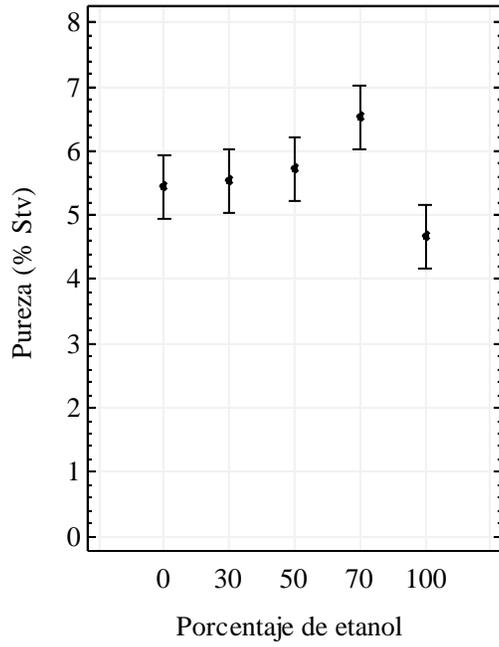


Figura III.8.
Pureza (%Stv) vs. porcentaje de etanol

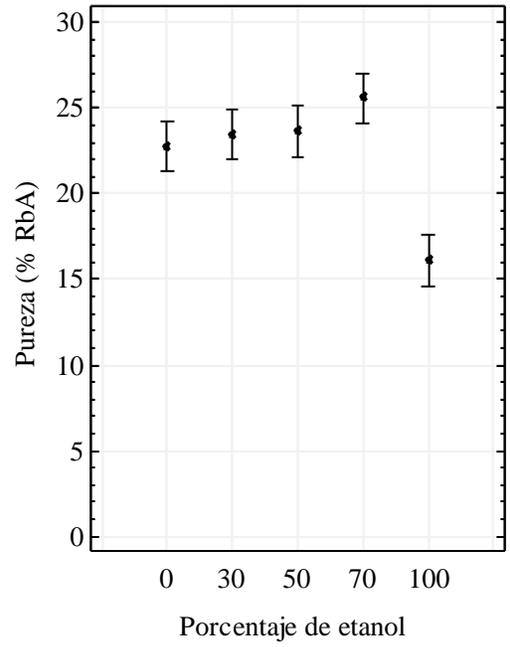


Figura III.9.
Pureza (%RbA) vs. porcentaje de etanol

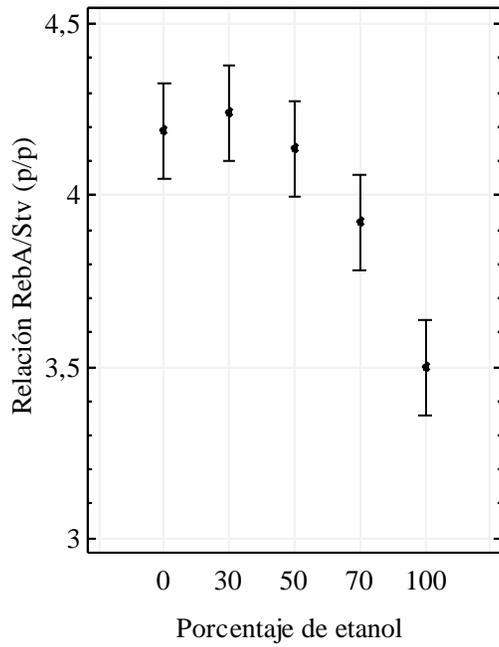


Figura III.10.
RbA/Stv vs. porcentaje de etanol

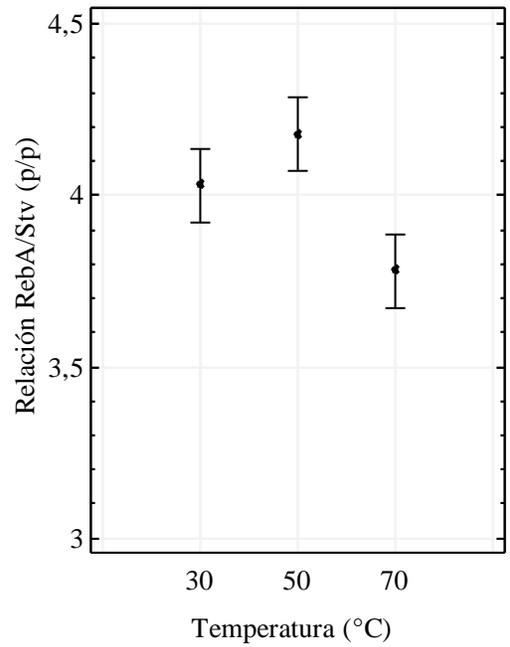


Figura III.11.
RbA/Stv vs. temperatura

En base a los resultados del primer análisis, tanto el solvente mixto empleado como la temperatura influyen en la concentración de los glicósidos y en los ET, también en la relación RbA/Stv. En cambio, sólo el solvente mixto, influye en la pureza (expresada como porcentaje de esteviolglicósido en el extracto total). En los casos analizados, no se observaron efectos de interacción entre las variables independientes estudiadas (solvente mixto y temperatura).

ii. Diseño experimental CCD

Para validar los resultados del diseño multinivel factorial 3*5 y definir los coeficientes de peso significativos en la ecuación de segundo orden planteada para describir el comportamiento de las variables respuestas en función de las variables controladas, se utilizó un diseño CCD. Los datos obtenidos de concentración, pureza, glicósidos recuperados y RbA/Stv (Tabla A.2) se analizaron estadísticamente; los resultados del análisis se listan en la Tabla III.11.

Tabla III.11. Variables de peso significativo en la ecuación de segundo orden

Variable respuesta analizada	Efecto de las variables controladas					Variabilidad explicada % (R ²)
	X	Y	X ²	Y ²	X*Y	
Stv (g/L)	0,0260	NS	0,0185	NS	NS	66,84
RbA (g/L)	0,0010	0,0360	0,0009	NS	NS	90,46
ET (g/L)	0,0001	0,0045	0,0001	NS	NS	95,05
Stv _{rec} (%)	0,0271	NS	0,0195	NS	NS	66,33
RbA _{rec} (%)	0,0012	0,0386	0,0010	NS	NS	90,10
%Stv	NS	NS	NS	NS	NS	ND
%RbA	NS	NS	NS	NS	NS	ND
RbA/Stv	NS	NS	NS	NS	NS	ND

NS: No significativo (p-valor > 0,05); ND: No definido.

Para obtener los efectos de las variables de peso significativo se procedió en el análisis, eliminando los factores con efectos no significativos mediante el diagrama de Pareto.

De las variables respuestas consideradas, pueden ajustarse a la ecuación de segundo orden planteada las siguientes: Stv (g/L), RbA (g/L), ET (g/L), St_{rec} y RbA_{rec}. En todos los casos, se observó ausencia de efectos de interacción entre las variables controladas estudiadas. La pureza expresada como %Stv y %RbA y la relación RbA/Stv no pueden ajustarse con la ecuación planteada. En cuanto a la recuperación de Esteviósido y Rebaudiósido A, se encontró la misma dependencia que en el caso de las concentraciones de los esteviolglicósidos.

iii. Diseño experimental compuesto

Se realizó una regresión no lineal para determinar los coeficientes de la ecuación de segundo orden (Ec. 10). Las variables Stv (g/L), RbA (g/L) y ET (g / L), Stv_{rec} y RbA_{rec} se ajustaron a la ecuación (Ec. 15).

$$\text{Variable respuesta} = c + a \cdot X + aa \cdot X^2 + b \cdot Y \quad (15)$$

Dónde:

X: porcentaje de etanol (% en peso)

Y: temperatura (°C)

En la Tabla III.12 se dan los resultados del ajuste y en la Tabla III.13, los parámetros de bondad de ajuste del modelo.

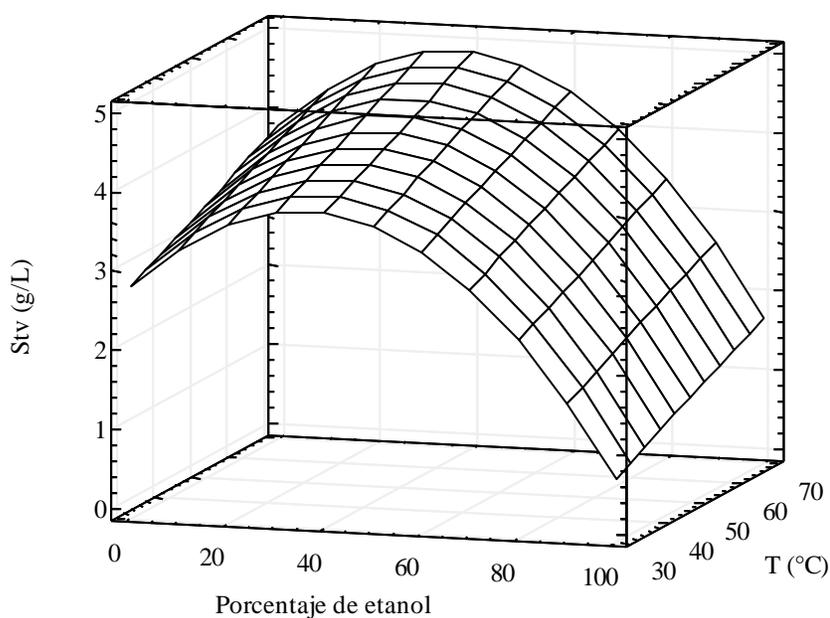
En las Figuras III.13 a III.16 se presentan los gráficos de los datos ajustados con dicha ecuación. Las variables respuesta %Stv, %RbA y relación RbA/Stv, no pudieron ajustarse a la ecuación de segundo orden planteada.

Tabla III.12. Coeficientes de la ecuación de segundo orden (Ec. 15)

Variable respuesta analizada	Coeficientes estimados			
	c	a	aa	b
Stv (g/L)	2,01748	0,057922	-0,00079070	0,0254849
RbA (g/L)	8,92369	0,251059	-0,00346561	0,0813796
ET (g/L)	36,90290	0,865323	-0,01286000	0,4392140
Stv _{rec}	38,79120	1,113220	-0,01519590	0,4903200
RbA _{rec}	40,74970	1,146270	-0,01582350	0,371578

Tabla III.13. Bondad de ajuste (Ec. 15)

Respuesta	Variabilidad explicada % (R ²)	RSME	E %	χ^2
Stv (g/L)	85,1564	0,465	8,907	0,176
RbA (g/L)	90,8502	1,525	5,434	1,510
ET (g/L)	95,4541	4,819	1,287	8,644
Stv _{rec} (%)	85,1593	8,946	8,955	65,191
RbA _{rec} (%)	90,8474	6,962	5,436	31,496

**Figura III.12.** Gráfico de superficie de respuesta estimada (Ec. 16) para la variación de la concentración de Esteviósido en el extracto bruto con el solvente mixto y la temperatura.

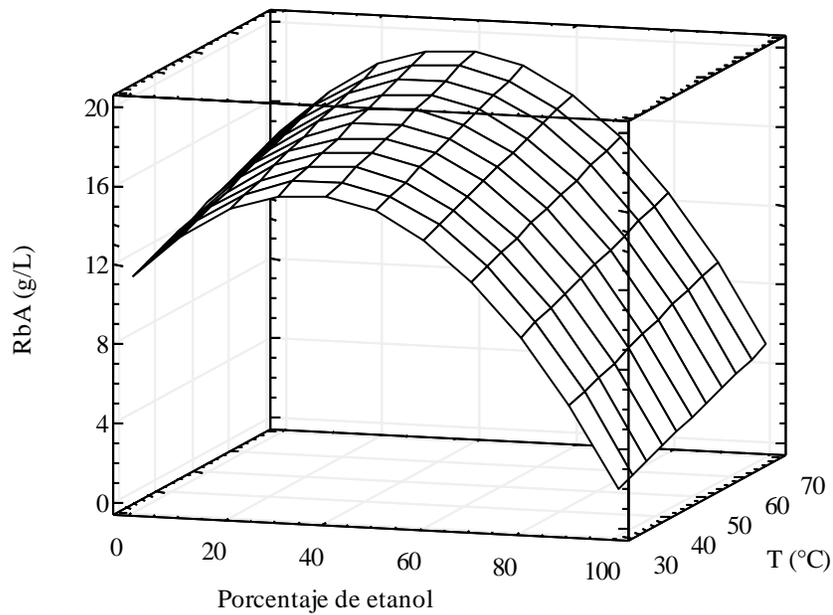


Figura III.13. Gráfico de superficie de respuesta estimada (Ec. 17) para la variación de la concentración de Rebaudiósido A en el extracto bruto con el solvente mixto y la temperatura.

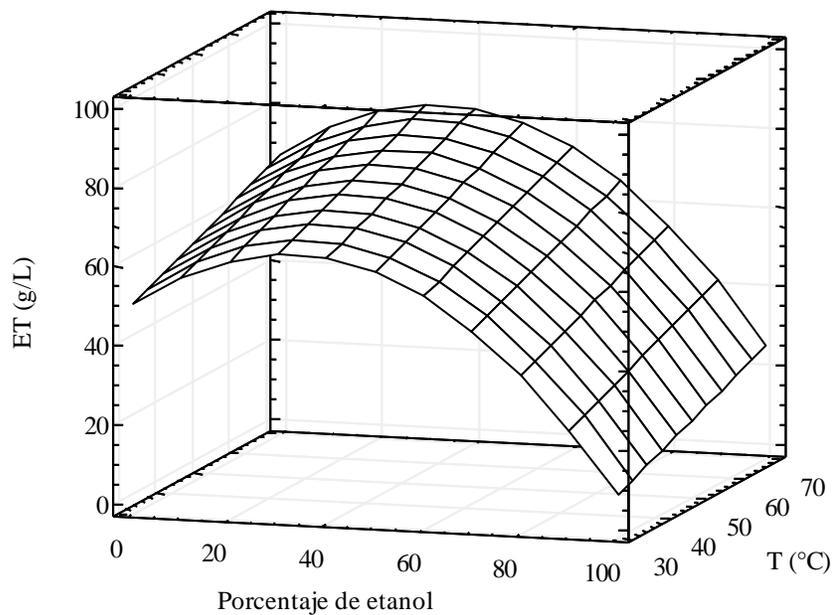


Figura III.14. Gráfico de superficie de respuesta estimada (Ec. 18) para la variación del extracto total (g/L) con el solvente mixto y la temperatura.

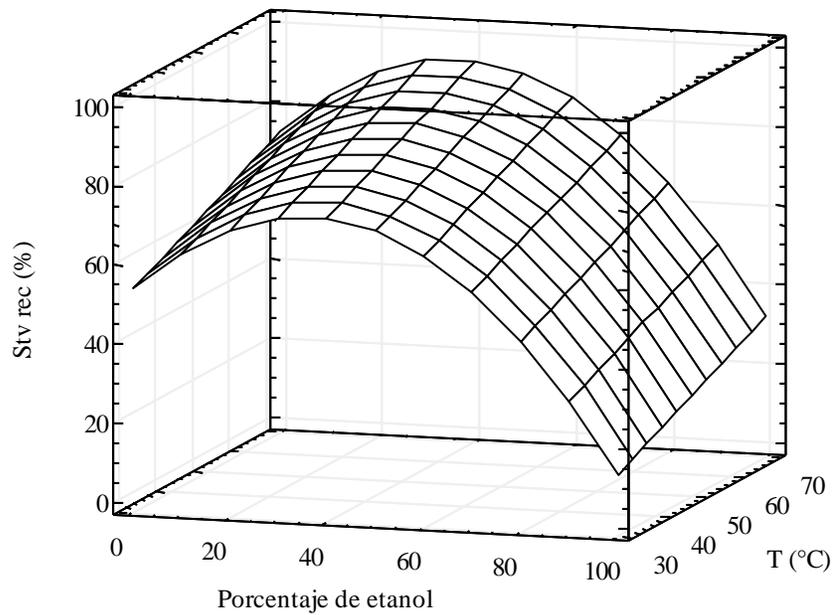


Figura III.15. Gráfico de superficie de respuesta estimada (Ec. 19) para la recuperación porcentual de Esteviósido, a partir de la matriz vegetal con el solvente mixto y la temperatura.

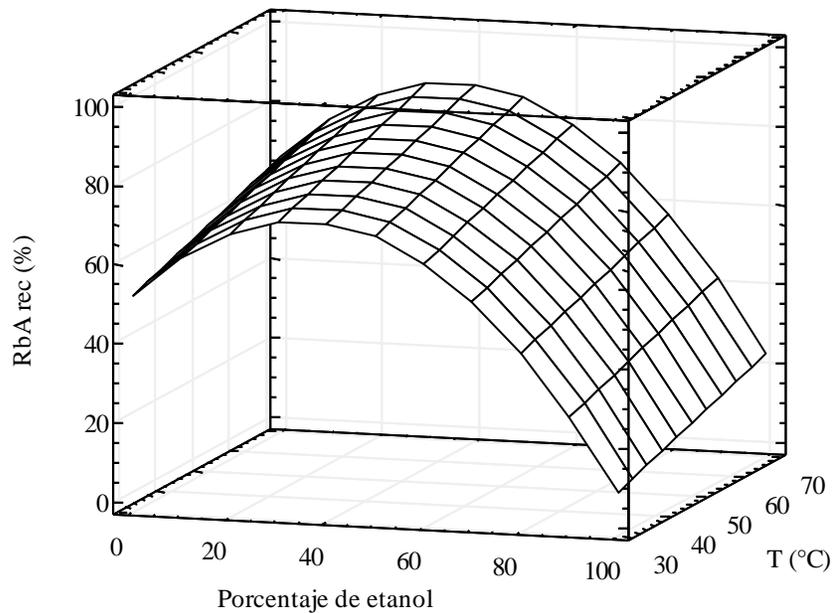


Figura III.16. Gráfico de superficie de respuesta estimada (Ec. 20) para la recuperación porcentual de Rebaudiósido A, a partir de la matriz vegetal con el solvente mixto y la temperatura.

La variabilidad explicada en el comportamiento de RbA , RbA_{rec} y ET es mayor a 90 %, en cambio R^2 es menor a 90 %, en el caso de Stv y Stv_{rec} .

Con respecto al ajuste realizado para la variables Stv (g/L) y Stv_{rec} , aun cuando los resultados del análisis del diseño CCD indican que la temperatura no es una variable controlada de peso significativo para describir el comportamiento de Stv (g/L) y Stv_{ec} , se optó por definir las ecuaciones respuestas con los mismos coeficientes utilizados para el ajuste de RbA (g/L) y RbA_{rec} .

De esta manera, puede representarse la variación de la concentración de los dos glicósidos, con las mismas ecuaciones:

$$Stv (g / L) = 2,01748 + 0,057221 \cdot X - 0,00079070 \cdot X^2 + 0,0254849 \cdot Y \quad (16)$$

$$RbA (g / L) = 8,92369 + 0,251059 \cdot X - 0,00346561 \cdot X^2 + 0,0813796 \cdot Y \quad (17)$$

$$ET (g/L) = 36,90290 + 0,865323 \cdot X - 0,01286000 \cdot X^2 + 0,4392140 \cdot Y \quad (18)$$

$$Stvrec (\%) = 38,79120 + 1,113220 \cdot X - 0,01519590 \cdot X^2 + 0,4903200 \cdot Y \quad (19)$$

$$RbArec (\%) = 40,74970 + 1,146270 \cdot X - 0,01582350 \cdot X^2 + 0,371578 \cdot Y \quad (20)$$

Las ecuaciones obtenidas (Ec. 16, 17 y 18) describen el comportamiento de las variables respuesta estudiadas en función de la temperatura y el solvente mixto; pueden aplicarse directamente o expresadas en kg/m^3 , realizando el escalado, manteniendo constantes las proporciones del equipo y la relación volumen del lecho a volumen del tanque, trabajando con material de partida de la variedad estudiada, de molienda intermedia previamente secado.

Las ecuaciones que describen el comportamiento de la recuperación de componentes valiosos a partir de la matriz vegetal, (Ec. 19 y Ec. 20), se expresan como porcentajes.

Las ecuaciones definidas mediante la utilización del diseño compuesto, cubren todo el rango de polaridad del solvente y son aplicables a temperaturas de entre los 30 °C y los 70 °C.

La variabilidad explicada utilizando el diseño compuesto (R^2), es mayor a la obtenida en el análisis con CCD.

c. Condiciones óptimas de extracción

La temperatura óptima de operación es la más alta en el rango de aplicación de las Ec.16 a Ec.20 (70 °C). Para determinar el solvente mixto de extracción óptimo de los componentes de interés, se tomaron derivadas parciales (Ec.16 a Ec.20) con respecto al porcentaje de etanol en el solvente mixto (Ec. 21):

$$X = \frac{a}{(2 \cdot aa)} \quad (21)$$

En cuanto a Stv (g/L), su concentración es máxima cuando el solvente empleado es etanol:agua 36:64 (p:p), el mismo caso se da con RbA (g/L); el porcentaje de Estevióside recuperado en estas condiciones es del 93,46 % y el porcentaje de Rebaudiósido A, del 87,50 %. En la Figura III.17 y III.18 se presentan las Curvas de Nivel para Stv_{rec} , y RbA_{rec} (Ec. 19 y 20).

Para la variable ET (g/L) la mayor concentración (82,18 g/L), se obtiene con etanol:agua 34:66.

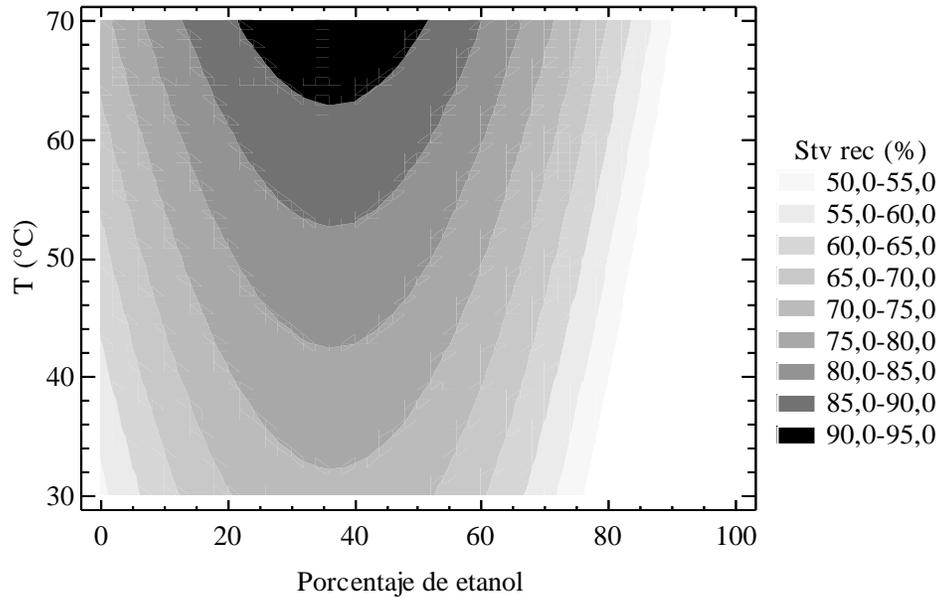


Figura III.17. Curvas de Nivel (Ec. 19) para la recuperación porcentual de Esteviósidio, a partir de la matriz vegetal con el solvente mixto y la temperatura.

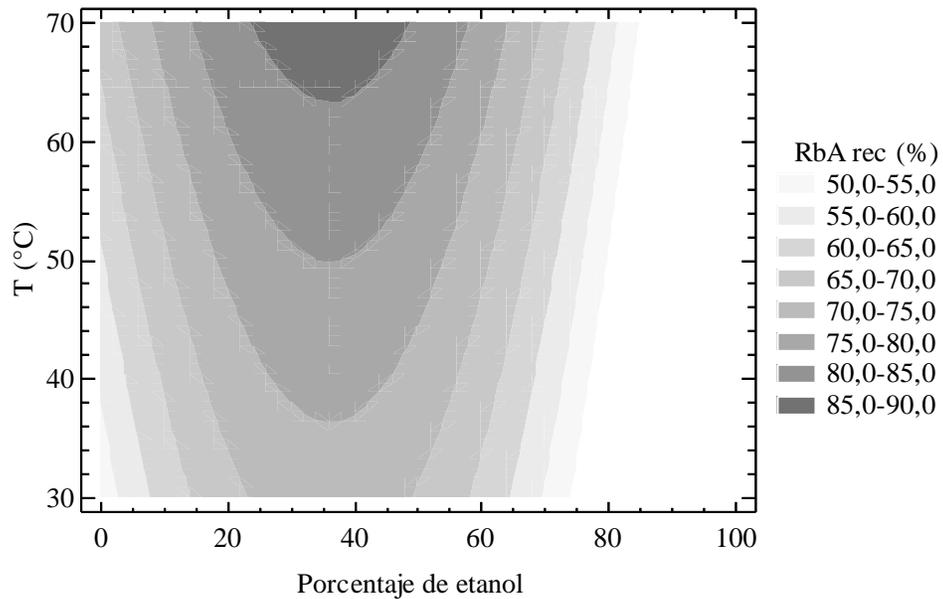


Figura III.18. Curvas de Nivel (Ec. 20) para la recuperación porcentual de Rebaudiósido A, a partir de la matriz vegetal con el solvente mixto y la temperatura.

Los resultados estimados al trabajar a 70 °C y con solvente mixto de polaridad intermedia, son muy superiores a los obtenidos por Yoda et al. (2003), en la extracción de los glicósidos con CO₂-H₂O, (50 % del Esteviósido y el 72 % del Rebaudiósido A presentes en las hojas). Los porcentajes de esteviolglucósidos recuperables de las hojas son comparables a los obtenidos en la extracción por decocción, 93 – 98 % (Alvarez y Kusumoto, 1987; Celaya et al., 2012; Nishiyama, 1991) en el caso del Esteviósido y son menores en el caso del Rebaudiósido A.

En cuanto a los sólidos totales extraídos (41,09 % b.s. en condiciones óptimas), son inferiores a los obtenidos por Kolb (2011, no publicado), en la extracción soxhlet con agua durante 8,5 h.

d. Consumo de solventes

Los volúmenes de solvente empleados en cada ensayo, así como los volúmenes de extracto bruto obtenidos y volúmenes de extracto bruto retenidos en el lecho por impregnación, en las condiciones de prueba se presentan en la Tabla A.3.

En las condiciones de ensayo se obtiene 1 L de extracto bruto por cada 200 g de hojas secas molidas (5 L de extracto bruto por kg de hojas secas molidas).

e. Solubilidad del Esteviósido y Rebaudiósido A

Se determinó la variación de la solubilidad de los cristales de Esteviósido y Rebaudiósido A con la temperatura (5 °C a 50 °C), en agua desmineralizada, etanol absoluto y solventes mixtos etanol:agua 30:70; 50:50; 70:30; también la variación de la solubilidad de las mezclas Esteviósido + Rebaudiósido A en etanol:agua 30:70 y 70:30.

Las curvas de variación de la solubilidad con la temperatura (Tabla A.4, Tabla A.5), se presentan en las Figuras III.19 y III.20 Para alcanzar el equilibrio a 5

°C fueron necesarios 5 días de acondicionamiento en heladera y realizando los ensayos a mayores temperaturas se requirió un tiempo menor.

Solubilidad en agua. Los resultados indican que ambos glicósidos son escasamente solubles en agua (menor que 8 g/L) en las condiciones de prueba, mostrando diferencias respecto a los valores presentados por Prakash et al. (2008) para el Rebaudiósido A en agua desmineralizada y se aproximan a los referidos por Kinghorn (2002); sin embargo, debe considerarse que las condiciones de determinación fueron diferentes a las utilizadas por Prakash et al. (2008). Otro aspecto que debe considerarse, es que en este análisis no se evaluó el efecto de las impurezas (5 % glicósidos) sobre la concentración de Esteviósido en la disoluciones sobresaturadas de prueba en concordancia con el descubrimiento realizado por Liu (2011).

Las solubilidades que pudieron lograrse en agua, son inferiores a las concentraciones de glicósidos obtenidas en los ensayos de obtención del extracto bruto, en todos los casos. Esta diferencia de comportamiento de los fitoquímicos en la extracción acuosa, a partir de la matriz vegetal respecto a los componentes puros, puede explicarse tomando como base el fenómeno de co-solubilización de los glicósidos en agua favorecida por la presencia de los otros glicósidos o componentes solutos orgánicos como ser carbohidratos, vitaminas, pigmentos o polifenoles (Goto y Clemente, 1998; Liu, 2011).

Solubilidad en etanol absoluto. Se observó un comportamiento diferencial; el Rebaudiósido A es escasamente soluble (menor que 5 g/L) mientras el Esteviósido exhibe una solubilidad creciente en función de la temperatura, entre 40,50 y 281,29 g/L (5 °C a 50 °C).

Los resultados son asimilables a métodos de separación patentados por diferentes investigadores, que utilizaron solvente mixto etanol:agua de muy baja polaridad, como medio para cristalizar Rebaudiósido A, a partir de extractos clarificados de stevia (Evans et al., 2010; Jackson et al., 2011; Jonnala et al., 2006; Kienle, 1992; Kumar, 1986; Pasquel, 1999, entre otros).

Solubilidad en solventes mixtos. El Rebaudiósido A mostró la mayor solubilidad en etanol:agua 50:50, entre 46,1 g/L y 270,64 g/L (entre 5 °C y 50 °C). El Esteviósido en cambio, mostró la mayor solubilidad en etanol:agua 50:50, 49,26 g/L y 325,76 g/L (entre 5°C y 50°C) y resultados comparables en etanol:agua 70:30.

La solubilidad del Esteviósido fue menor en solvente acuoso, a diferencia de este, el Rebaudiósido A mostró menor solubilidad en solventes de polaridad intermedia.

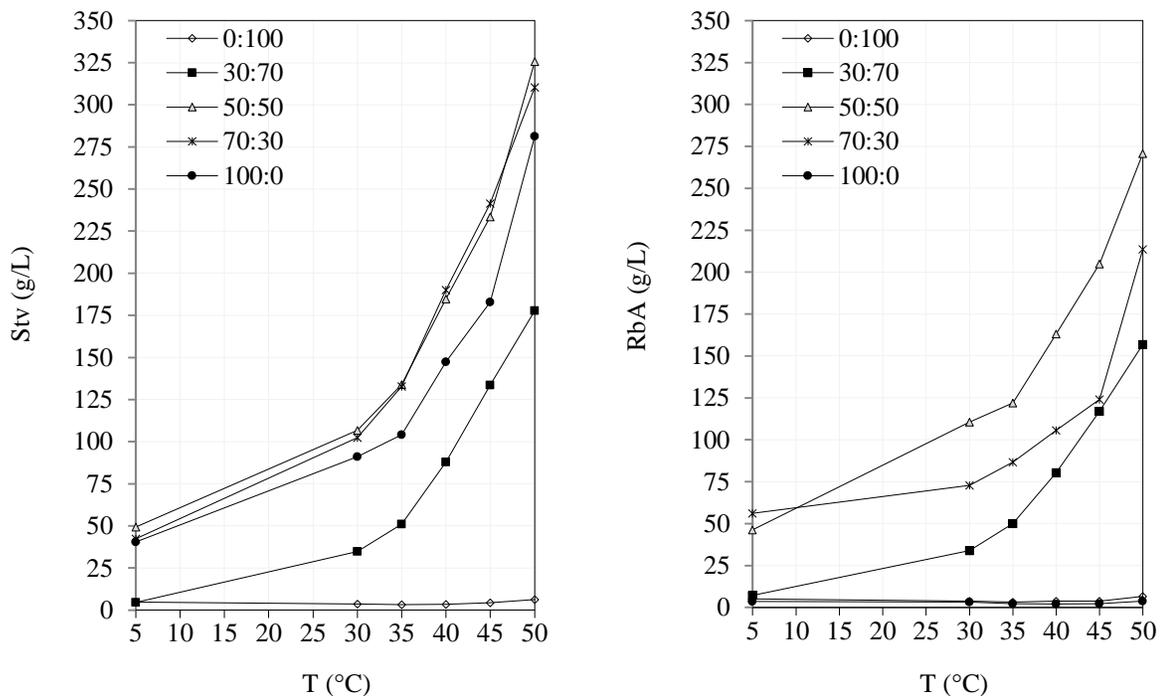


Figura III.19. Variación de la solubilidad del Esteviósido y Rebaudiósido A con la temperatura en diferentes solventes mixtos (etanol:agua) de prueba.

Solubilidad de mezclas Esteviósido y Rebaudiósido A. En etanol:agua 30:70 ambos glicósidos (Stv-Co, RbA-Co) mostraron un mejor comportamiento que los glicósidos individuales; a baja temperatura, los resultados indican que 5 días en heladera no fueron suficientes para lograr la cristalización completa de los glicósidos en exceso (en etanol:agua 30:70). En etanol:agua 70:30, los glicósidos mostraron mejor comportamiento que los edulcorantes puros a temperaturas

entre los 5 °C y los 35 °C. En el caso del Esteviócido a mayor temperatura, el glicósido puro mostró un mejor comportamiento que en la mezcla.

En solvente etanol:agua 30:70, la solubilidad de los glicósidos aumenta considerablemente a los 50°C en la co-solubilización.

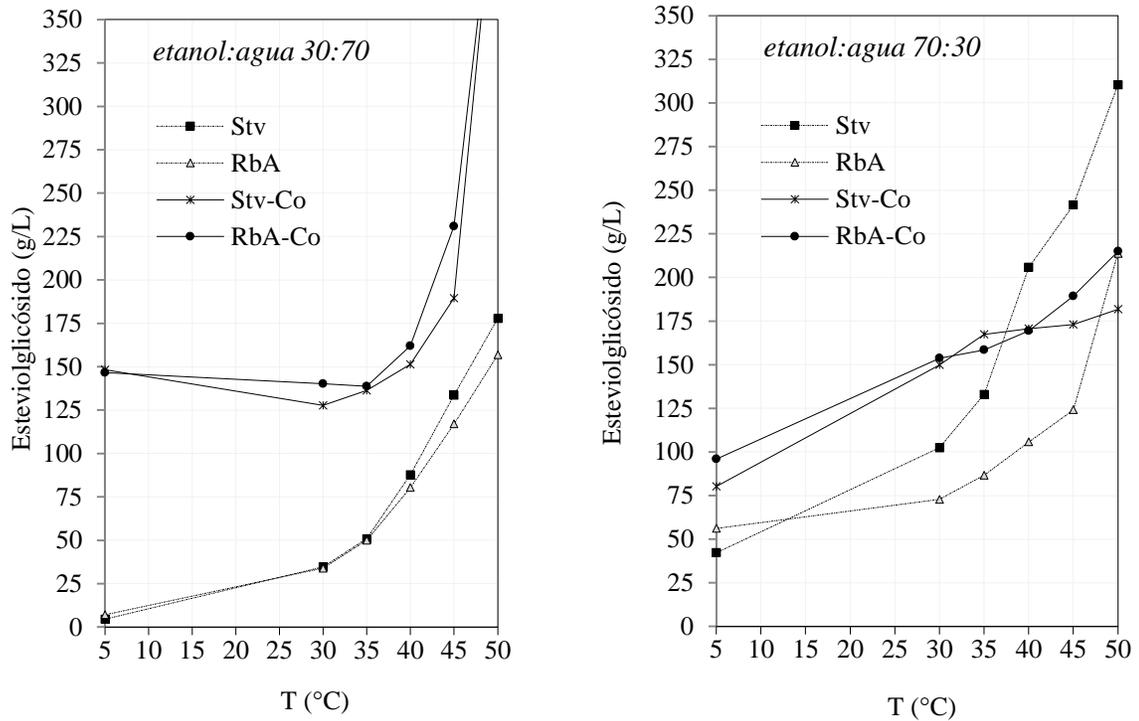


Figura III.20. Comparación entre la variación de la solubilidad del Esteviócido y Rebaudiósido A y de las mezclas 1:1 (co-solubilización) con la temperatura en etanol:agua 30:70 y 70:30.

Comparando los resultados obtenidos en la extracción en lecho percolador, con los datos de solubilidad, las concentraciones de Esteviócido y Rebaudiósido A en el extracto bruto son en general mayores al trabajar con solvente mixto etanol:agua. También, en solventes mixtos se obtuvieron los valores más altos de solubilidad de los esteviólglucósidos.

En etanol absoluto, en cambio se observa un comportamiento diferente del Esteviócido (muy soluble) en comparación con Rebaudiósido A (escasamente

soluble); los rendimientos de extracción obtenidos con este solvente fueron por su parte, bajos para ambos esteviolglicósidos.

La escasa solubilidad de los glicósidos en agua contrasta con los altos rendimientos de extracción obtenidos en estas condiciones, tal comportamiento puede deberse al fenómeno de co-solubilización en solvente acuoso (en la obtención del extracto bruto), debido a la presencia de otros esteviolglicósidos u otros constituyentes orgánicos en la matriz vegetal lixiviada.

f. Ajuste de los datos a modelos cinéticos

Para evaluar la repetitividad de los resultados cinéticos obtenidos en los ensayos de extracción, se realizó la repetición del ensayo realizado a 70 °C, con solvente etanol:agua 30:70 (Figura B.9 y B.10, ANEXO A). Se compararon los LC (límites de confianza) de las curvas obtenidas en ambos ensayos, obteniéndose valores muy similares de las constantes R_{∞} y $t_{1/2}$, existiendo además superposición entre los LC inferior y superior de las dos constantes (Tablas A.6 y A.7).

Los datos experimentales obtenidos (g/100 mL) y los resultados de porcentajes recuperados por componente, se presentan en las Tablas A.8 a A.13. Los resultados del análisis se presentan en la Tabla III.14 y III.15. Los datos obtenidos ($R_{bA_{rec}}$, StV_{rec}), se analizaron mediante regresión no lineal ajustando los porcentajes recuperados de cada componente a partir de la matriz vegetal a la ecuación de Pilosof et al. (1985). Las variables dependientes e independientes consideradas en este ajuste son la que se listan en la Tabla III.9. Las constantes R_{∞} y $t_{1/2}$ estimadas a partir de Ec. (11) y el análisis de bondad del ajuste se presentan en la Tabla III.14 y III.15. La representación gráfica de la variación de los porcentajes recuperados en función del tiempo (con la temperatura) para cada componente según el solvente mixto empleado, se presentan en las Figuras III.21 a III.30.

Tabla III. 14. Esteviósido recuperado (%). Parámetros de la Ec. de Pilosof

etanol:agua	T (°C)	R_{∞}	$t_{1/2}$	R^2	RSME	E %	χ^2
0:100	30	39811,200	41554,500	99,213	1,667	8,884	3,398
30:70	30	259,701	152,879	98,966	2,435	7,344	7,244
50:50	30	232,937	158,698	99,392	1,614	4,893	3,183
70:30	30	198,605	128,238	99,263	1,764	5,475	3,802
100:0	30	17,321	78,920	99,763	4,698	1706,736	26,979
0:100	50	156,595	90,133	99,691	1,114	3,534	1,517
30:70	50	182,836	62,430	98,770	0,294	1762,621	4025,636
50:50	50	182,965	63,784	99,370	2,257	4,454	6,225
70:30	50	203,089	112,932	99,246	1,990	7,241	4,839
100:0	50	74,461	327,360	98,628	6,702	1856,197	54,892
0:100	70	116,423	42,287	99,905	0,656	1,135	0,525
30:70	70	128,092	19,587	99,940	0,711	0,338	0,618
50:50	70	148,984	26,332	99,335	2,617	1,874	8,370
70:30	70	200,869	69,363	98,897	3,174	6,321	12,314
100:0	70	61,027	92,039	99,364	0,620	5,070	0,470

Tabla III.15. Rebaudiósido A recuperado (%). Parámetros de la Ec. de Pilosof

etanol:agua	T (°C)	R_{∞}	$t_{1/2}$	R^2	RSME	E %	χ^2
0:100	30	4926,130	4881,300	99,121	1,840	10,024	4,139
30:70	30	267,031	158,724	99,070	2,307	7,038	6,504
50:50	30	240,798	173,110	99,293	1,693	5,339	3,504
70:30	30	183,407	139,476	99,328	1,465	4,619	2,622
100:0	30	15,142	81,180	99,800	3,322	335,221	13,489
0:100	50	170,773	92,406	99,650	1,275	4,022	1,988
30:70	50	177,138	63,803	98,842	45,218	34,760	2498,998
50:50	50	178,791	66,173	99,316	2,260	4,904	6,243
70:30	50	203,245	119,457	99,330	1,806	6,955	3,988
100:0	50	46,831	225,357	98,980	4,780	358,947	27,924
0:100	70	113,658	42,328	99,771	1,000	1,981	1,222
30:70	70	122,009	18,920	99,923	0,775	0,382	0,734
50:50	70	145,700	28,285	99,217	2,734	2,371	9,135
70:30	70	194,672	73,595	98,938	2,926	6,783	10,466
100:0	70	40,602	72,757	99,496	0,417	3,704	0,213

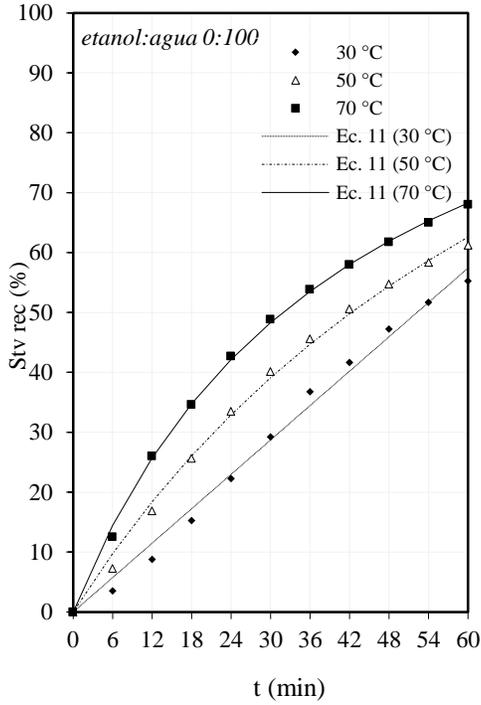


Figura III.21. Stv_{rec} con etanol:agua 100:0

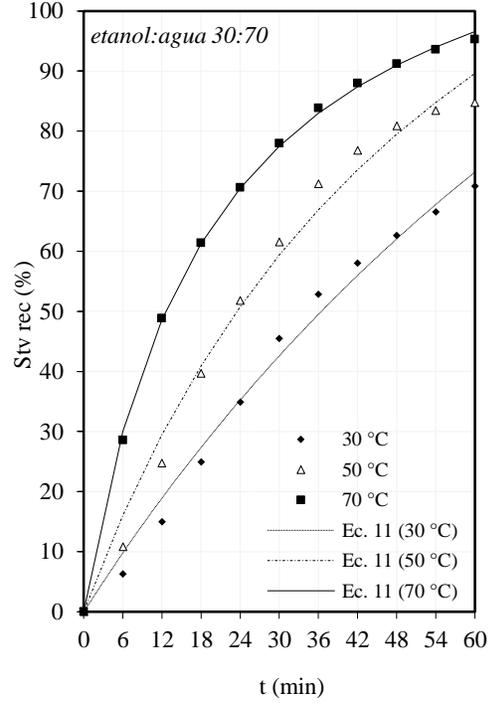


Figura III.22. Stv_{rec} con etanol:agua 30:70

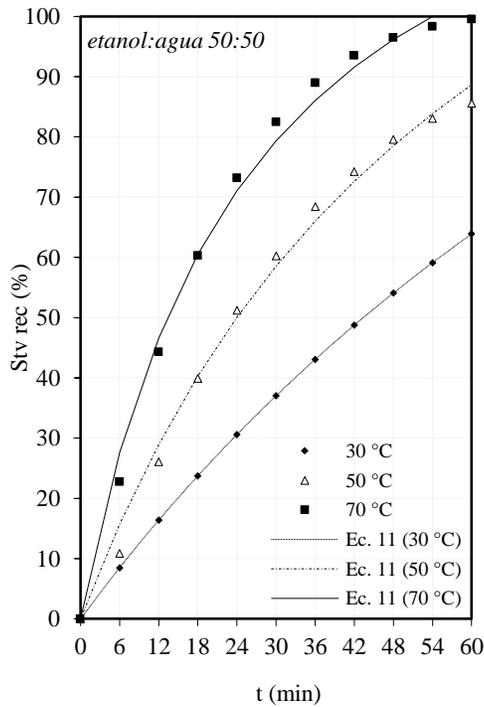


Figura III.23. Stv_{rec} con etanol:agua 50:50

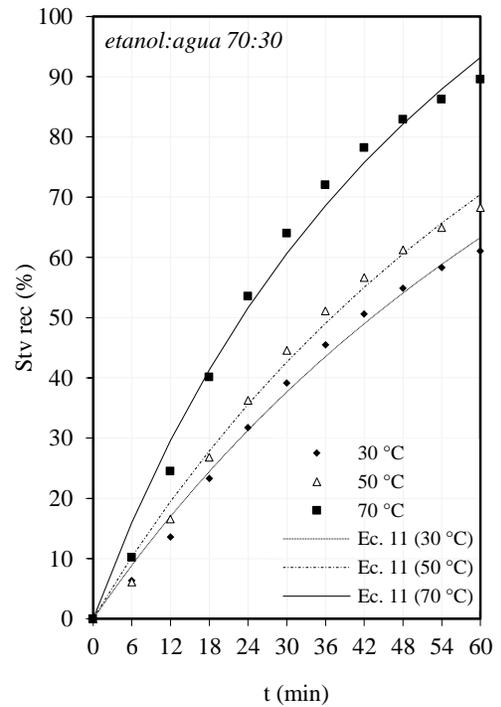


Figura III.24. Stv_{rec} con etanol:agua 70:30

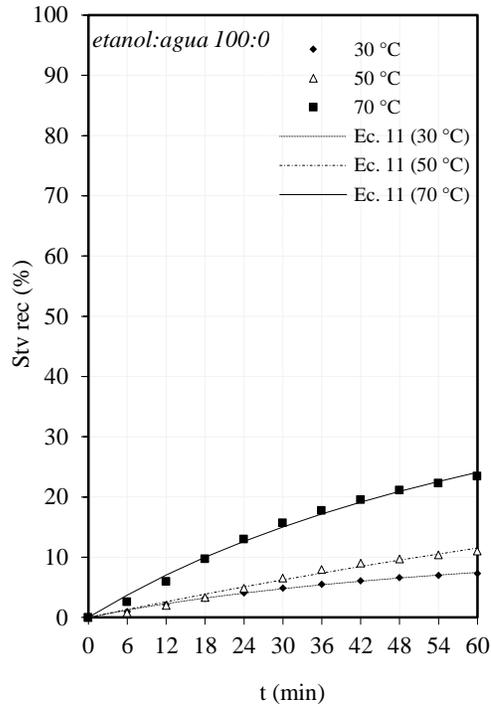


Figura III.25. Stv_{rec} con etanol:agua 100:0

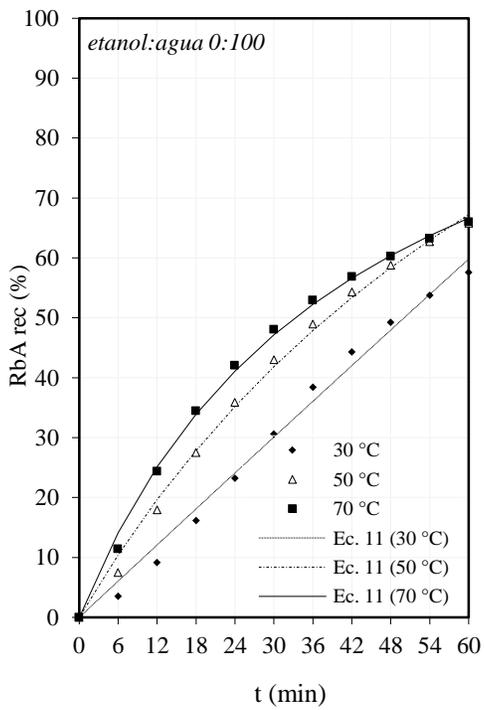


Figura III.26. RbA_{rec} con etanol:agua 100:0

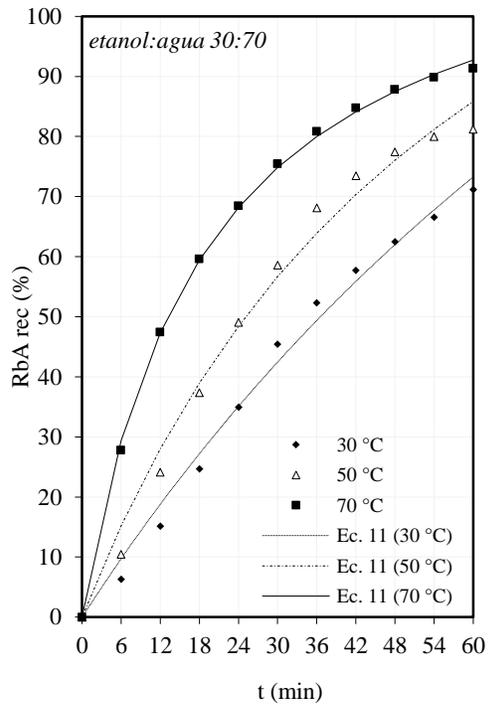


Figura III.27. RbA_{rec} con etanol:agua 30:70

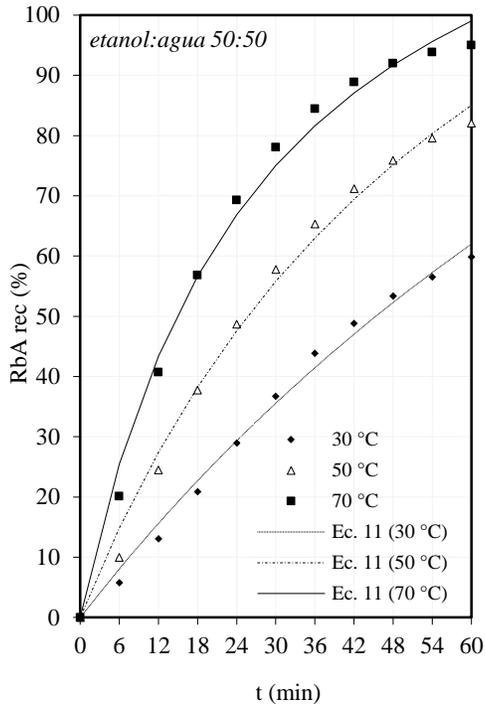


Figura III.28. RbA_{rec} con etanol:agua 50:50

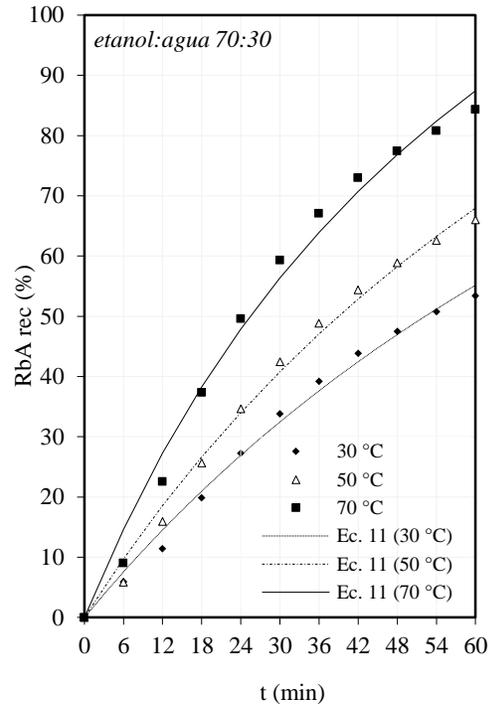


Figura III.29. RbA_{rec} con etanol:agua 70:30

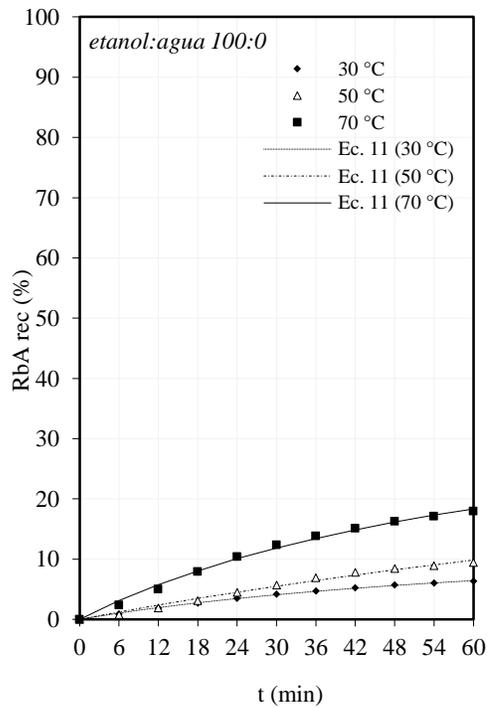


Figura III.30. RbA_{rec} con etanol:agua 100:0

Realizando un análisis de varianza para las constantes R_{∞} y $t_{1/2}$ estimadas, se encontró que R_{∞} aumenta al aumentar el porcentaje de etanol hasta 70 %, luego se reduce bruscamente; se observó un comportamiento similar en las dos variables dependientes estudiadas: $R_{bA_{rec}}$ y Stv_{rec} . En este análisis, no se consideraron los valores obtenidos con etanol:agua 0:100 a 30 °C (Tabla III.14 y III.15), debido a que en estos casos, los porcentajes de componentes recuperados aumentan linealmente con el tiempo y para esta situación, el modelo de Pilosof tiene muchos errores.

La Ec. De Pilosof, ajusta mejor resultados obtenidos a mayores temperaturas con solventes mixtos etanol:agua. El solvente menos apto para su aplicación en la obtención del extracto bruto es etanol absoluto, que proporciona un pobre comportamiento cinético con rendimientos de extracción muy por debajo del obtenido con agua desmineralizada o con los solventes mixtos estudiados.

En base al análisis del ajuste de los datos obtenidos, el mejor comportamiento cinético (menor $t_{1/2}$) se obtiene a la mayor temperatura de ensayo (70 °C), siendo los tiempos necesarios para extraer la mitad del componente de interés (Esteviósido o Rebaudiósido A) menores a 20 min, cuando el solvente es etanol:agua 30:70. En tal caso el volumen de extracto bruto obtenido es menor al 35 % del volumen total colectado en las condiciones de ensayo. Son necesarios estudios posteriores que permitan explicar los mecanismos involucrados en la extracción de los esteviolglicósidos investigados y de los sólidos totales con solventes mixtos (30:70 a 70:30), en lecho percolador.

Al cabo de una hora de operación, en las condiciones de ensayo, no se extraen cantidades de significativamente mayores de esteviolglicósidos, sin embargo, el comportamiento del extracto total indica que se continúa extrayendo cuantitativamente más impurezas con el tiempo (ver Figura B.10).

III.3 CONCLUSIONES

Se estudió la obtención del extracto bruto de *Stevia rebaudiana* Bertoni, partiendo de un material vegetal con alta proporción de Rebaudiósido A, utilizando solventes mixtos etanol:agua y trabajando a temperaturas de entre 30 °C y 70 °C.

Para ello, se realizaron ensayos de extracción discontinua, en lecho percolador, a escala de laboratorio, a diferentes temperaturas y utilizando solventes mixtos en diferentes proporciones; se determinaron los rendimientos de extracción y la pureza de los extractos resultantes. La información obtenida se sometió a un tratamiento estadístico con el fin de optimizar el método de extracción y ajustar los parámetros de operación. Se concluye:

- Las variables independientes solvente mixto y temperatura influyen en la concentración de Esteviósido y Rebaudiósido A, en los porcentajes de glicósidos recuperados y en la pureza de los extractos obtenidos. No se observaron efectos de interacción entre las variables estudiadas.
- La eficiencia de la extracción aumenta linealmente con la temperatura entre los 30 °C y los 70 °C; es mayor cuando el porcentaje de etanol en el solvente mixto está entre el 30 y 70 % (p:p). La variación de la concentración de los edulcorantes y de los sólidos totales (extracto total) pueden ajustarse a una ecuación de segundo orden, al igual que los porcentajes de esteviolglicósidos recuperados a partir de la matriz vegetal.
- Los resultados de la optimización indican la conveniencia de trabajar a la mayor temperatura considerada siendo el solvente más efectivo para una extracción más eficiente, el etanol:agua 36:64 (p:p). En condiciones óptimas, el porcentaje de Esteviósido recuperado será del 93,46 % y el porcentaje de Rebaudiósido A, del 87,50 %.
- Los extractos de mayor pureza se obtuvieron con etanol:agua 70:30, sin embargo no pudo establecerse una dependencia de la pureza con la temperatura, con la ecuación de segundó orden planteada.

- En las condiciones de ensayo se obtiene 1 L de extracto bruto por cada 200 kg de hojas secas molidas (5 L de extracto bruto por kg de hojas secas molidas), en la extracción por percolación, en un equipo con las dimensiones utilizadas en el presenta trabajo.

- Se observó un comportamiento diferencial de la solubilidad de los dos esteviolglicósidos con la temperatura: el Rebaudiósido A es escasamente soluble los solvente puros, muy soluble en solventes mixtos. El Esteviósido es escasamente soluble en agua, y su solubilidad aumenta al aumentar el porcentaje de etanol disminuyendo con respecto a los solventes mixtos, en etanol absoluto.

- La escasa solubilidad determinada para los esteviolglicósidos en agua contrasta con los altos rendimientos de extracción obtenidos en estas condiciones, tal comportamiento puede deberse al fenómeno de co-solubilización en solvente acuoso durante la obtención del extracto bruto, debido a la presencia de otros esteviolglicósidos u otros constituyentes orgánicos en la matriz vegetal. En solvente mixto ambos glicósidos mostraron un comportamiento en la extracción coincidente con la alta solubilidad determinada para Esteviósido y Rebaudiósido A, en los solventes de prueba.

- La Ec. de Pilosof ajusta mejor los datos cinéticos obtenidos a mayores temperaturas con solventes mixtos etanol:agua. El mejor comportamiento cinético se obtiene a la mayor temperatura de ensayo (70 °C), siendo los tiempos necesarios para extraer la mitad del Esteviósido o Rebaudiósido A presentes en las hojas, menores a 20 min, cuando el solvente es etanol:agua 30:70.

- Son necesarios estudios posteriores que permitan explicar los mecanismos involucrados en la extracción de los esteviolglicósidos investigados y de los sólidos totales, en lecho percolador con solvente mixtos.

CAPITULO IV

IV.1 PROPUESTAS DE TRABAJOS FUTUROS

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo y a la revisión realizada la literatura científica y técnica sobre la operación de obtención de extracto bruto de *Stevia rebaudiana* Bert., considerando los aspectos más relevantes en relación al estado actual del arte, surgen las siguientes propuestas para trabajos futuros:

- Estudiar la influencia del material de partida empleado (variedades Criolla, Eireté, Morita, Mejorada) y de los pre-tratamientos: método de secado, grado de molienda, sobre la eficiencia de extracción (grado de remoción de componentes valiosos) en lecho percolador con solventes mixtos.
- Modelizar la cinética de la extracción discontinua con solvente acuoso y con solvente mixto etanol:agua para determinar los mecanismos involucrados en el proceso extractivo; modelizar la cinética de la extracción en lecho percolador con solvente acuoso y con solvente mixto etanol:agua para determinar los mecanismos involucrados en el proceso extractivo.
- Realizar la caracterización de las impurezas obtenidas con diferentes solventes de extracción y estudiar el efecto de la utilización de diferentes solventes sobre la composición y la pureza del extracto bruto de stevia.
- Estudiar las diferentes opciones de clarificación del extracto bruto; en particular, el uso de sustancias químicas (ácidos, álcalis, sales minerales) y la purificación con solventes en comparación con los procesos de ulftafiltración y microfiltración.
- Investigar la optimización del proceso productivo, a fin de determinar las factibilidad de obtención de diferentes subproductos de stevia: (a) polifenoles y flavonoides a partir de residuos de pre-procesamiento (tallos) o en diferentes extractos de stevia; (b) residuos sólidos de obtención del extracto bruto de stevia.

VI.2 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abelyan V., Markosyan A., Abelyan L. (2011a). High-purity Rebaudioside D and low-calorie tooth paste composition containing the same. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/0091394 A1.
- Abelyan V., Markosyan A., Abelyan L. (2011b). High-purity Rebaudioside D. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/0092684A1.
- Abelyan V., Markosyan A., Abelyan L. (2010). Process for manufacturing a sweetener and se thereof. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2010/0112171 A1.
- Abelyan V. H., Ghochikyan V. T., Markosyan A. A., Adamyan M. O., Abelyan L. A (2006). Extraction, separation and modification of sweet glycosides from the *Stevia rebaudiana* plant. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2006/7838044.
- Abelyan V. A., Balayan A. M., Ghochikyan V. T., Markosyan A. A. (2004). Transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferases of various groups of microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40(2):129-134.
- Abou-Arab E. A. y Abu-Salem F. M. (2010). Evaluation of bioactive compounds of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *African Journal of Food Science* 4(10):627–634.
- Abou-Arab E. A., Abou-Arab A. A., Abu-Salem F. M (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science* 4(5):269-281.
- Ackland T. (2011). Basic data for ethanol-water binary mix. Capturado el 23/05/2011. Disponible en <http://homedistiller.org/calc.htm>
- Aguilera J. M. (2003). Extraction Optimization in Food Engineering. Food science and technology, Textbooks. Edited by George Liadakis and Constantina Tzia. Cap. 2, Solid Líquid Extraction.

- Ahmed M. J. y Smith R. M. (2002). Determination of stevioside by high performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Separation Science* 25:170-172.
- Alupului A., Calinescu I., Lavric V. (2009). Ultrasonic vs. Microwave Extraction Intensification of Active Principles from Medicinal Plants. Selected Papers of IChea P-9, Rome 10-13 June, 2009.
- Álvarez B. R. E. (2012). Stevia plant named 'AKH L1'. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2012/0090062P1.
- Álvarez E. (2010). Mejoramiento Genético de la stevia en Paraguay; Avances y Logros en el país de origen. V Simposio Internacional de Stevia, Paraguay. 17 y 18 de Noviembre de 2010, Asunción, Paraguay. Capturado el 16/08/2011. Disponible en www.rediex.gov.py/beta/userfiles/file/
- Alvarez M. y Kusumoto I. T. (1987). Citado por Midmore D. J. y Rank A. H. (2002).
- Andolfi L., Machchia M., Ceccarini L. (2006). Agronomic-productive Characteristics of Two Genotype of *Stevia Rebaudiana* in Central Italy. *Italian Journal of Agronomy* 2:257-262.
- Andolfi L., Ceccarini L., Machchia M. (2002). Caratteristiche bioagronomiche di *Stevia rebaudiana*. *L' Informatore Agrario* 23:48-51.
- Arturo M. C., González C. T., Peña E. J., Díaz J. E. (2009). Microorganismos patógenos de *Estevia rebaudiana* Bertoni. *Bioagro* 21(3):173-178.
- Bartoletti D. y Pozo E. (2012). Desarrollo del cultivo, caracterización, experiencia local. III Congreso Internacional de Stevia, Perico 22 y 23 de junio de 2012. Repositorio de Conferencias.
- Bartoshuk L. M. (1983). Sensory properties of food. Editors: Birch G. G., Brennan J. G., Parker K. J., pp. 5-23.
- Benavente-García O., Castillo J., Del Baño M. J. y Lorente J. (2001). Improved water solubility of neohesperidin dihydrochalcone in sweetener blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:189-191.
- Berjumea M. V. y Correa I. G. (2001). Edulcorantes. *Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde* 6:33-46.

- Bondarev N. I., Sukhanova M. A., O.V. Reshetnyak, Nosov A.M. (2003). Steviol Glycoside Content in Different Organs of *Stevia rebaudiana* and Its Dynamics during Ontogeny. *Biologia Plantarum* 47(2):261-264.
- Borrego F. y Montijano H. (2001). Neohesperidin Dihydrochalcone. *Alternative Sweeteners*. Third Edition, Revised and Expanded. Edition: Marcel Dekker, Inc., Cap. 10, pp. 167-184.
- Brandle J. (2001). *Stevia rebaudiana* with altered steviol glycoside composition. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2001/6255557B1.
- Brandle J. (1998). Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. Agriculture and Agri-Food Canada. *Canadian Journal of Plant Science* 79(1):85-91.
- Brandle J. E., Starratt A. N., Gijzen M. (1998a). *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. Agriculture and Agri-Food Canada. *Canadian Journal of Plant Science* 78(4):97-114.
- Brandle J., Sys E. A., Marsolais A. A. (1998b). *Stevia* Plant Named "RST 95-166-13". United States Patent Database. Patent Application Publication US/1998/PP10563.
- Brandle J. E., Rosa N. (1992). Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science* 72:263-266.
- Brennan J. G., J. R., Cowell N. D., Lilley A. E. (1998). *Las Operaciones de la Ingeniería de Los Alimentos*. Tercera Edición. Editorial Acribia S. A., Cap. 8, pp. 205-207.
- Bridel M. y Lavieille R. (1931). Citado en Wood et al. (1955).
- Bridel M. y Lavieille R. (1931). Citado en Kennelly (2002).
- Brousse M. M., Nieto A. B., Linares A. R., Vergara M. L. (2012). Cinética de adsorción de agua en purés deshidratados de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3 (1):80-96.

- CAA (2012). Código Alimentario Argentino. Cap. XV, Productos estimulantes o frutivos. Artículo 1192tris. Actualizado 07/2012. Disponible en www.anmat.gov.ar
- CAA (2011). Código Alimentario Argentino Cap. XVIII, Aditivos Alimentarios. Artículos 1398, Actualizado al 2/2011. Disponible en www.anmat.gov.ar
- Cabooter D., Amery R., Jooken E., Meesschaert B., Desmet G. (2010). Ultra-High Performance Liquid Chromatography for the analysis of steviol glycosides. In *Stevia, Science, No Fiction. Proceedings of the 4th Stevia Symposium*, Geuns J. M. C., Ed. Euprint.
- Cacciola F., Delmonte P., Jaworska K., Dugo P. (2011). Employing ultra high pressure liquid chromatography as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts. *Journal of Chromatography A* 1218(15):2012-2018.
- Candeira A. C. V., Castellón C. Z., Apaza V. A. C., Marca S. M., Arteaga R. M. R. (2002). Desarrollo agroindustrial de la Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni en Los Yungas de La Paz, Síntesis del Informe Técnico. Programa Regional FIDA MERCOSUR. Capturado el 31/03/2012. Disponible en www.fidamerica.org
- Carakostas M., Prakash I., Kinghorn a. D., Wu C. D., Soejarto D. S. (2011). Steviol Glycosides. *Alternative Sweeteners. Fourth Edition*. Edition: Marcel Dekker, Inc., Taylor & Francis Group. Cap. 11, pp. 159-180.
- Carakostas M. C., Curry L. L., Boileau A. C., Brusick D. J. (2008). Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology* 46:S1-10.
- Casaccia J. y Álvarez E. (2006). Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del Ka'a he'e (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) en el Paraguay. Instituto Agronómico Nacional, Manual Técnico N°8, pp. 21-48.

- Catharino R. R. y Santos L. S. (2012). On-line monitoring of stevioside sweetener hydrolysis to steviol in acidic aqueous solutions. *Food Chemistry* 133:1632-1635.
- Celaya L., Cabana R., Viturro C., Molina A., Kolb N. (2012). Infusión de *Stevia rebaudiana* Bertoni: sólidos totales, esteviolglicósidos endulzantes y actividad antioxidante. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos CICyTAC 2012.
- Chabot S. y Beaulieu M. (2012). Extraction method for providing an organic certifiable *Stevia rebaudiana* extract. WIPO Patent Database. Patent Application WO/2012/006742.
- Chang S. S. y Cook J. M. (1983). Stability Studies of Stevioside and Rebaudioside A in Carbonated Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31:409-412.
- Chatsudthipong V. y Muanprasat C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics* 121:41-54.
- Chattopadhyaya D. (2007) *Stevia: Prospects as an Emerging Natural Sweetener*. Veena Sharma International Food Division. Assisted by Dr D. Chattopadhyaya Assistant Director General (IF). Capturado el 21/10/2010. Disponible en www.whoindia.org/LinkFiles.
- Chhaya R., Majumdar G.C., Sirshendu D. (2012). Optimization of process parameters for water extraction of stevioside using response surface methodology. *Separation Science and Technology* 47:1-9.
- Choi Y. H., Kim I., Yoon K. D. (2002). Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from *Stevia rebaudiana* leaves. *Chromatographia* 55:617-620.
- Clos J. F., DuBois G. E., Prakash I. (2008). Photostability of Rebaudioside A and Stevioside in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:8507-8513.

- Codex alimentarius (2011). Informe de la 43 Reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Comisión del Codex, 34 Período de Sesiones, REP 11/FA – Apéndice VII.
- Cubero N., Monferrer A., Villalta J. (2002). Aditivos alimentarios. Edición conjunta Multi-Prensa y A. Madrid Vicente. Edulcorantes, pp. 189-207.
- Das K., Dang R., Shivanandac T. N. (2009). Effect of biofertilizers on the nutrient availability in soil in relation to growth, yield and yield attributes of *Stevia rebaudiana*. Archives of Agronomy and Soil Science 55(4):359-366.
- De Oliveira B. H., Packer J. F., Chimelli M., de Jesus D. A. (2007). Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. Journal of Biotechnology 131:92-96.
- Dean J. A. (1972). Large's Handbook of Chemistry. McGraw-Hill. Fifteenth Edition, Section 5, Table 5.17, Table 5.19.
- Deetae P., Parichanon P., Trakunleewatthana P., Chanseetis C., Lertsiri S. (2012). Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. Food Chemistry 133:953-959.
- Dobberstein R. H. y Ahmed M. S. (1982) Extraction, separation and recovery of diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* plants. United States Patent Database. Patent Application Publication US/1982/4361697.
- Erkucuk A., Akgun I. H., Yesil-Celiktas O. (2009). Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. Journal of Supercritical Fluids 51:29-35.
- Evans J C., Hahn J. J., Myerson A. S., Oolman T., Rhonemus T. A., Storo K. M., Tyler C. A. (2010). Method for producing purified Rebaudioside A compositions using solvent / antisolvent crystallization. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2010/0099857A1.
- Falasca S. y Ulberich A. (2004). El bioclima de *Stevia rebaudiana* Bertoni en argentina. X Reunión Argentina y IV Latinoamericana de Agrometeorología. 13-

- 15 de octubre de 2004. La Plata, Argentina. Capturado el 20/01/2012. Disponible en <http://agro.unc.edu.ar/~clima/AADA/Congresos/>
- Frederico A. P., Ruas P. M., Marin-Morales M. A., Ruas C. F., Nakajima J. N. (1996). Citado en Jarma (2010).
- Furlano B., Myerson A. S., Ohmes A. K., Rhonemus T. A., Tyler C. A. (2012). Stevioside polymorphic and amorphous forms, methods for their formulation and uses. WIPO Patent Database. Patent Application WO/2012/082493.
- Gardana C., Scaglianti M., Simonetti P. (2010). Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217:1463-1470.
- Garnighian G. V. (2012). Stevia Plant Named "T60". United States Patent Database. Patent Application Publication US/2012/PP22593P3.
- Gennaro, A. R. (2003). Remington Farmacia. Editorial Médica Panamericana. 20° Edición. Tomo 2. Cap. 16, pp. 255.
- Geuns, J. M. C. (2010a). Analysis of steviol glycosides. In *Stevia and steviol glycosides*; Ed. Geuns, J. M. C., Euprint Heverlee, Belgium, ISBN 978-90-742-53116.
- Geuns J. M. C. (2010b). Validated techniques of analysis. In *Stevia and Steviol Glycosides*; Geuns, Ed. J. M. C., Euprint Heverlee, Belgium, ISBN 978-90-742-53116, pp 61-113.
- Geuns, J. M. (2007a). Stevia glycosides as Food Additive. SUMMARY of New Application by EUSTAS. European Stevia Association. Capturado el 14/02/2011. Disponible en www.eustas.org/Steviol_glycosides
- Geuns J. M. (2007b). *Stevia rebaudiana* Bertoni plants and dried leaves as novel food. Summary of the Application and Specifications of the EUSTAS Quality Label. EUSTAS. Capturado el 27/03/2009. Disponible en www.eustas.org/
- Geuns, J. M. (2003). Molecules of Interest, Stevioside. *Phytochemistry* 64:913-921.

- Giovanetto R. H. (1990). Method for the recovery of steviosides from plant raw material. United States Patent Database. Patent Application Publication US/1990/4892938.
- Giraldo C. E., Luz D. M. P., Habeych D. I. N. (2005). Obtención de Edulcorantes de *Stevia Rebaudiana* Bertoni. Revista CENIC Ciencias Biológicas 36, No. Especial.
- Goenadi D. H. (1987). Effect of slope position on growth of Stevia in Indonesia. Communications in Plant Science and Analysis 18(11):1317-1328.
- González H. R., Acosta de la Luz I. L., Sosa I. H., Rivera Amita M. M. R., Rodríguez C. A. F., Govín E. S., Figueredo M. M. (2007). Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni en Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales 12(4).
- González D. M. (2006). Ka'a He'e en Ecuador, experiencia con éxito. ABC Digital Suplemento Rural. Capturado el 31/03/2012. Disponible en <http://archivo.abc.com.py/suplementos/rural>
- Goto A. (2004). Avaliação da clarificação de subproduto da extração de esteviosídeo por troca iônica. Tese apresentada à Comissão de Pós graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos, INICAMP. Cap. 3, pp. 14-84.
- Goto A. y Clemente E. (1998). Influência do rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do esteviosídeo. Ciência e Tecnologia de Alimentos 18(1):3-6.
- Guerrero D., Domínguez M., Sforza O., Kryvenki M. (2012). Cultivo de Stevia, Proyectos e investigaciones en la Provincia de Misiones. III Congreso Internacional de Stevia, Perico 22 y 23 de junio de 2012. Repositorio de Conferencias.
- Handa S. S. (2008). An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology, Cap. I, p. 25-33.

Capturado el 14/11/2010. Disponible en www.unido.org/fileadmin/user_media/Publications/

- Helbing W. y Burkart A. (1985). Tablas Químicas para laboratorios e industrias. Editorial Reverte, Edición en español, Materia: Densidad en tanto por ciento en volumen y en peso de las mezclas, pp. 132.
- Higashi S., Abe M., Uchiumi T., Fujisaki K., Nakayama N., Nishi Y., Nanya S. (1994). Conversion of Stevioside to Rebaudioside by Stevia-Glucosyltransferase. *Kagoshima University Repository* 27:199-207.
- Hoekstra B., Traub J., Chamberlain K., Baugh S., Venkataraman S. K. (2009). Comparative study of HPLC methods for the Analysis of Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Planta Med.* 75(9):1003.
- Hossain A. M., Siddique A. B., Mizanur R. S. M., Hossain A. M. (2010). Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Asian Journal of Traditional Medicine* 5(2).
- Ibarsz A. y Barboza-Cánovas G. V. (2005), Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos. Editorial Mundi-Prensa, Cap. 22, pp. 768-770.
- Jackson M. C., Francis G. J., Chase G. (2011). Pure and substantially pure rebaudioside A. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/0207918 A1.
- Jarma O. A., Araméndiz H. T., Cleves A. L. (2011). Estabilidad fenotípica y densidades de planta de genotipos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en la región Caribe de Colombia. *Acta Agronómica* 60(2):165-175.
- Jarma O. A. (2010). Adaptación de dos clones de Estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) a tres ambientes del Caribe colombiano. Tesis de doctorado presentada como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Cap. 1.
- Jarma O. A., Combatt C. E. M., Cleves A. L. (2010). Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. *Agronomía Colombiana* 18(2):199-208.

- Jarma O. A. y Aramendiz T. H. (2010). Efecto de variables ambientales sobre la síntesis de steviósido y rebaudiósido A. V Simposio Internacional de Stevia, Paraguay. 17 y 18 de Noviembre de 2010, Asunción, Paraguay. Capturado el 16/08/2011. Disponible en www.rediex.gov.py/beta/userfiles/JECFA/73
- JECFA/73 (2010) Steviol glycosides. Compendium of Food Additive Specifications, 73th Meeting, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, FAO JECFA Monographs 10; FAO: Rome, 2010; pp 17–22.
- JECFA/69 (2008a). Fact Sheet. Steviol glycosides (INS 960) Final 5.11.2008. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2008). Sixty-ninth meeting. Food and Agriculture Organization, World Health of the United Nations Organization. Capturado el 16/10/2010. Disponible en www.fao.org/ag/agn/agns/files/FACTSHEET
- JECFA/69 (2008b). Steviol Glycosides, Chemical and Technical Assessment (CTA, 2007) Revised by Harriet Wallin for the 69th JECFA. Original prepared by Harriet Wallin for the 63rd JECFA, revised by Paul M. Kuznesof for the 68th JECFA. Capturado el 11/11/2011. Disponible en www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa/cta/69/Steviol_glycosides_CTA_69.pdf
- JECFA/69 (2008c) Steviol glycosides. Compendium of Food Additive Specifications, 69th Meeting, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, FAO JECFA Monographs 5; pp 75–78.
- JECFA/68 (2007). Steviol Glycosides. Chemical and Technical Assessment (CTA, 2007) Revised by Paul M. Kuznesof for the 68th JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2008). Sixty-ninth meeting. Food and Agriculture Organization, World Health of the United Nations Organization. Capturado el 16/06/2010. Disponible en www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta
- JECFA/63 (2004). Steviol Glycosides. Chemical and Technical Assessment, Prepared by Harriet Wallin, FAO 2004. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2008). Sixty-ninth meeting. Capturado el 16/06/2010. Disponible en www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa

- Jiménez T., Cabrera G., Álvarez E., Gómez F. (2010). Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaâ heê) cultivada comercialmente. Estudio preliminar. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud 6(1):47-53.
- Jonnala K. K., Babu G. D. K., Vijay K. K., Paramvir S. A. (2006). Process for production of steviosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2006/0142555.
- Kaushik R., Narayanan P., Vasudevan V., Muthukumaran G., Usha A. (2010). Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. Abstract. Journal of Food Science and Technology (47)1:27-33.
- Kennelly E. J. (2002). Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. Edited by A. Douglas Kinghorn, Vol. 19, Taylor and Francis, Cap. 4, pp. 68-82.
- Kienle U. (1992). Method of making a natural sweetener based on *Stevia rebaudiana*, and use thereof. United States Patent Database. Patent Application Publication US/1992/5112610.
- Kim I-S., Yang M., Lee O-H., Kang S-N. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. Food Science and Technology 44:1328-1332.
- Kinghorn A. D. (2002). Overview. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. Edited by A. Douglas Kinghorn, Vol. 19, Taylor and Francis, Cap. 1, pp. 1-17.
- Kinghorn A. D., Wu C. D., Soejarto D. D. (2001). Stevioside. Alternative Sweeteners. Third Edition, Revised and Expanded. Edición: Marcel Dekker, Inc., Cap. 10, pp. 167-184.
- Kinghorn A. D. (1992). Citado en Chabot y Beaulier (2012).
- Kinghorn A. D. y Soejarto D. D. (1985). Economic and Medicinal Plant Research. Edited by H. Wagner, H. Hikino, N. R. Farnsworth, Academic Press, Cap. 1, pp. 1-52.

- Kinghorn A. D., Soejarto D. D., Nanayakkara N. P., Compadre C. M., Makapugay H. C., Hovanec-Brown J. M., Medon P. J., Kamath S. K. (1984). A phytochemical screening procedure for sweet ent-kaurene glycosides in the genus *Stevia*. *Journal of Natural Products* 47(3):439-444.
- Kohda H., Kasai R., Yamasaki K., Murakami K., Tanaka O. (1976). New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 158:981-983. Abstract.
- Kohn C. (2010). Membrane Technologies Microfiltration, Ultrafiltration, Nanofiltration and Reverse Osmosis. V Simposio Internacional de Stevia, Paraguay. 17 y 18 de Noviembre de 2010, Asunción, Paraguay. Capturado el 16/08/2011. Disponible en www.rediex.gov.py/beta/userfiles/file/V-simposio/
- Kolb K. N., Kolb E., Ferreyra D., Le Vraux A., Celaya L. (2012). Variación del contenido de Esteviósido y Rebaudiósido A durante el ciclo de crecimiento de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. Universidad Nacional de Misiones. III Congreso Internacional de Stevia. Perico, Argentina. Repositorio de Conferencias.
- Kolb K. N. (2011). Responsable del Laboratorio Central, FCEQyN, UNaM. Comunicación personal 03/03/2011.
- Kolb K. N. (2008). Edulcorantes, Curso de Pos-Grado Res. 354/08. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM, Maestría en Tecnología de los Alimentos, Repositorio Documental.
- Kolb N., Herrera J. L., Ferreyra D. J., Uliana R. F. (2001a). Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia Rebaudiana*: Improved HPLC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 9:4538-4541.
- Kolb N., Kolb E., Kolb. E., Ferreira D., Rodriguez R., (2001b). Desarrollo de un cultivar de *Stevia rebaudiana* de alta proporción de Rebaudiósido A. Jornadas de Investigación Científico-Tecnológicas 2001, FCEQyN, UNaM. Libro de Resúmenes Extendidos, pp. 125-126.
- Kolb N., Kolb E., Kolb. E., Ferreira D., Rodriguez R., (2001c). Variación del contenido de Esteviósido y Rebaudiósido A durante el ciclo de crecimiento de la

- Stevia rebaudiana* Bertoni. Jornadas de Investigación Científico-Tecnológicas 2001, FCEQyN, UNaM. Libro de Resúmenes Extendidos, pp. 123-124.
- Kroger M., Meister K., Kava R. (2006). Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5(2):35-47.
- Kumar A. Y., Singh S., Dhyani D., Ahuja P. S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science* 91(1):1-27.
- Kumar S. (1986). Method for recovery of Stevioside. United States Patent Database. Patent Application Publication US/1986/4599403.
- Kumuda C. N. (2006). Influence of plant growth regulators and nitrogen on regulation of flowering in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). Thesis submitted to the University of Agricultural Sciences, Dharwad, requirements for the Degree of Master of Science (Agriculture). Capturado el 24/01/2011. Disponible en <http://etd.uasd.edu/ft/th8652.pdf>
- Kutowy O. y Zhang S. Q., Kumar A. (1999). Extraction of sweet compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. United States Patent Database. Patent Application Publication US/1999/5972120.
- Lavini A., Riccardi M., Pulvento C., De Luca S., Scamosci M., D'Andria R. (2008). Yield, Quality and Water Consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown under Different Irrigation Regimes in Southern Italy. *Italian Journal of Agronomy* 2:135-143.
- Lee T. (2011). Method to Increase Solubility Limit of Rebaudioside D in an Aqueous Solution. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/0104353A1.
- Lee Y-W. y Lee Y. Y. (2003). Extraction Optimization in Food Engineering. *Food science and technology, Textbooks*. Edited by George Liadakis and Constantina Tzia. Cap. 9, Flavor and Aroma Substances.

- Lei M. y Shi Y. (2010). Identification of *Stevia rebaudiana* Proteins by Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Asian Journal of Crop Science* 2(3):223-225.
- Lemus-Mondaca R., Vega-Gálvez A., Zura-Bravo L., Ah-Hen K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* 132:1121-1132.
- Levy R. G. (1984). *Stevia rebaudiana* Bertoni: Un Singular Edulcorante Natural. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 3(1):47-50.
- Ley J. P., Reicehlt K., Riess T., Lanfer K. (2011). Use of Rubusodie for reducing or suppressing certain unpleasant taste impressions. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/0293538A1.
- Liu Z. (2011). Diterpene Glycosides as Natural Solubilizers. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/0033525A1.
- Liu J., Li J-W., Tang J. (2010). Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food and Bioproducts Processing* 88(2-3)215-221.
- Madia M., Rubió M., Gaetán, S. (2007). Podredumbre basal y marchitamiento en *Stevia rebaudiana* causada por *Rhizoctonia solani* en plantas bajo cubierta. XXXII Congreso Argentino de Horticultura, Salta, Argentina, 23 al 26 de septiembre de 2009. Resúmenes de Trabajos, N° 357.
- Maeshwar H. M. (2005). Effect of different levels of nitrogen and dates of planting on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) Thesis submitted to the University of Agricultural Sciences, Dharwad, requirements for the Degree of Master of Science (Agriculture).
- Mafat P. y Béliard E. (1994). *Ingeniería Industrial Alimentaria*. Editorial Acribia. Volumen II. Cap. 2, pp. 29-62.
- Magalhaes P. M. (2000). Agroecología para el cultivo de estévia o hierba dulce. *Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas*, CYTED-CAB, Bogotá pp. 441-450.

- Magomet M., Tomov T., Somann T., Abalyan V. H. (2011). Process for manufacturing a sweetener and use thereof. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/7862845B2.
- Maloney J. O. (2008). Perry Chemical Engineer's Handbook, 8va. Edition. The Mc Graw-Hill Companies. Section 2, pp. 2-96, Tabla 2-30 y p. 2-117, Tabla 2-112.
- Markosyan A. (2012). Glucosyl Stevia Composition. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2012/0214751.
- Markosyan A. (2011). High-purity Rebaudioside C and process for purification the same. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/0287164A1.
- Marković I. S., Darmati Zoltan A., Abramović Biljana F. (2008). Chemical composition of leaf extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown experimentally in Vojvodina. Journal of the Serbian Chemical Society 73(3):283-297.
- Marsolais A. A., Brandle J., Sys E. A. (1998). Stevia plant named RSIT 94-751. United States Patent Database. Patent Application Publication US/1998/PP10564.
- McGarvey B. D., Attygalle A. B., Starratt A. N., Xiang B., Schroeder F. C., Brandle J. E., Meinwald J. (2003). New Non-Glycosidic Diterpenes from the Leaves of *Stevia rebaudiana*. Journal of Natural Products 66:1395-1398.
- Midmore D. J. y Rank A. H. (2002). A new rural industry—Stevia—to replace imported chemical sweeteners. Rural Industries Research and Development Corporation, Project No. UCQ-16A. Edición: RIRDC, Publicación Web W02/022, Proyecto No UCQ-16A. pp. 13-15.
- Moraes de P. É. y Camargo F. M. N. R. (2001). Clarification of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni extract by adsorption in modified zeolites. Acta Scientiarum 23(6):1375-1380.
- Morita T., Morita K., Komai K. (2011). Hight Rebaudioside-A plant. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/7884265B2.

- Morita T. T. (2010). Introducing the Only 100% Natural High-Intensity Sweetener. Morita RA 95, Making life sweeter. Editado por Morita Kagaku Kogyo CO., LTD. Capturado el 02/12/2010. Disponible en www.morita-stevia.com
- Morita T. y Bu Y. (2000). Variety of *Stevia rebaudiana* Bertoni. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2000/6031157.
- Morita T. T., Fujita I. K., Iwamura Y. J. (1978). Sweetening compound, method of recovery and use thereof. United States Patent Database. Patent Application Publication US/1978/ 4082858.
- Nabors L. O'B. (2011). Alternative Sweeteners: An Overview. Alternative Sweeteners. Fourth Edition. Edición: Marcel Dekker, Inc., Taylor & Francis Group. Cap. 11, pp. 159-180.
- Nielsen S. S. (2003). Análisis de los alimentos. Manual de Laboratorio. Edición en Castellano. Editorial Acribia. Cap. 3, pp. 18-19.
- Nishiyama P. (1991) Correlation between total carbohydrate content and stevioside content in *Stevia rebaudiana* leaves. *Biologia e Technologia* 34:3-4.
- Ohta M., Sasa S., Inoue A., Tamai T., Morita K., Matsuura F. (2010). Characterization of Novel Steviol Glycosides from Leaves of *Stevia rebaudiana* Morita. *Journal of Applied Glycoscience* 57:199-209.
- Ohtani K. y Yamasaki K. (2002). Methods to improve the taste of the sweet principles of *Stevia rebaudiana*. *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles*. Edited by A. Douglas Kinghorn, Vol. 19, Taylor and Francis. *Stevia*, the genus *Stevia*, Cap. 7, pp. 138-159.
- Orrego A. L. F. (2001). Levantamiento de enfermedades y plagas en Ka'a He'e (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)). *Revista de Ciencia y Tecnología* 1(3):29-33.
- Park J. P., Vohnikova Z., Brod F. P. R. (2002). Evaluation of drying parameters and desorption isotherms of garden mint leaves (*Mentha crispa* L.). *Journal of Food Engineering* 51:193-199.
- Pasquel A., Meireles M. A. A., Marques M. O. M., Petenate A. J. (2000). Extraction of *Stevia* Glicosides with CO₂ + water, CO₂ + ethanol and CO₂ + water + etanol. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 17(3):271-282.

- Pasquel A. R. (1999). Extração dos glicosídeos da estevia com fluidos pressurizados. Tese apresentada à Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos, INICAMP. Cap. II.
- Penner R., Shanks T., Timcke K., Krigbaum J., Uno J. (2004). Stevia from Paraguay. USAID, Asunción 2004, Cap. 3. Capturado el 21/12/2011. Disponible en <http://paraguay.usaid.gov/sites>
- Persinos G. J. (1973). Method of producing Stevioside. United States Patent Database. Patent Application Publication US/1973/3723410.
- Pfister W. R. y Sehgal S. (2012). Natural low caloric sweetener compositions for use in beverages, foods and pharmaceuticals, and their methods of manufacture. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/0021111A1.
- Pilosof A. M. R., Boquet R., Bartholomai G. B. (1985). Kinetics of water uptake by food powders. *Journal of Food Science* 50(1):278-279.
- Pól J., Ostrá E. V., Karásek P., Roth M., Benešová K., Kotlaříková P., Čáslavský J. (2007a). Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388:1847-1857.
- Pól J., Barbora Hohnová B., Hyötyläinen T. (2007b). Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1150:85-92.
- Prakash C. V. S. y Prakash I. (2012). Spectral Analysis and Chemical Studies of the Sweet Constituent, Rebaudioside A. *European Journal of Medicinal Plants* 2(1):57-65.
- Prakash C. V. S., San Miguel R. I., Prakash I. (2012). Chemical Constituents from the Polar Fraction of *Rubus suavissimus*. *Organic Chemistry Current Research* 1(1):1-6.

- Prakash C. V. S. y Prakash I. (2011a). Acid and Alkaline Hydrolysis Studies of Stevioside and Rebaudioside A. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1(08):104-108.
- Prakash C. V. S. y Prakash I. (2011b). Utilization of RP-HPLC fingerprint analysis for the identification of diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology* 1:88:92.
- Prakash I., DuBois G.E., Clos J.F., Wilkens K.L., Fosdick L.E. (2008). Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food and Chemical Toxicology* 46:S75-S82.
- Prakash I. y Upreti M. (2008). Stevioside polymorphic and amorphous forms, methods for their formulation, and uses. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2008/0292764A1.
- Puri M., Sharma D., Barrow C. J., Tiwary A. K. (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry* 132:1113-1120.
- Puri M., Sharma D., Tiwari A. K. (2011). Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances* 29:781–791.
- Purkayastha S., Markosyan A., Malsagov, M. (2012). Process for Manufacturing a Sweetener and Use Thereof. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2012/8337927B2.
- Rajasekaran T., Ramakrishna A., Sankar K. U., Giridhar P., Ravishankar G. A. (2008). Analysis of Predominant Steviosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni by Liquid Chromatography/Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry. *Food Biotechnology* 22:179-188.
- Ramesh K., Singh V., Megeji N. W. (2006). Cultivation of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy* 89:137-177.
- Rezende S. L., Bergamasco R., Machado N. R. C. F., Andrade C. M. G., Ribeiro R. M., Urio, H. (2004). Purificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni através dos processos com zeólitas e membranas. *Acta Scientiarum. Technology* 26(1):21-26.

- Richman A., Swanson A., Humphrey T. (2005). Functional genomics uncovers three glycosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glycosides of *Stevia rebaudiana*. *The Plant journal* 41:56–67.
- Robinson B. L. (1930). Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University. Citado en Brandle y col. (1998).
- Rodríguez-Pérez W., Perdomo-Giraldo D. C., Sánchez-Ortiz I., Rosas-Patiño G., Bedoya de M. C. D. (2010). Caracterización física, química y sensorial de la hoja de *Stevia rebaudiana* (var. morita II) cultivada en tres paisajes del Caquetá (Colombia). *Momentos de Ciencia* 7:(1).
- Rodríguez H. G., Acosta L. L. de la L., Isabel Hechevarría I. S., Rivera M. M. A., Rodríguez C. A. F., Sánchez E. G., Milanés M. F. (2007). Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 12(4).
- Rojas S. W. M. (2012). La Estevia, primera alternativa estratégica para generar riqueza, proteger la salud y mejorar la calidad de vida. III Congreso Internacional de Stevia, Perico 22 y 23 de junio de 2012. Repositorio de Conferencias.
- Rojas S. W. M. (2009). *Stevia, Edulcorante Orgánico del Siglo XXI*. Editorial Universidad Nacional Agraria La Molina, Escuela de Post Grado Universidad Nacional Agraria La Molina, Cap. 2, pp. 37-83, Cap. 5, pp. 183-188., Cap. 6, pp. 303-306.
- Sabattella P. O. (2008). Extracción de Solubles de la Yerba Mate: Influencia de la Composición de la Mezcla. Tesis de Maestría en Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Cap. 3.
- Salemme R. F. y Daines R. A. (2012). Novel polymorphs of rebaudioside C and methods for making and using the same. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2012/0230922A1.
- Savita S. M., Sheela K., Sunanda S., Shankar A. G., Ramakrishna P. (2004). *Stevia rebaudiana* - A functional Component for Food Industry. *Journal of Human Ecology* 15:261-264.

- Serrati E. (2006). Ka'a He'e variedad Eireté, con buen contenido de steviósido. ABC Digital Suplemento Rural. Capturado el 31/03/2012. Disponible en <http://archivo.abc.com.py/suplementos/rural>
- Shallenberger R. S. (1993). Taste chemistry. First edition, Springer Science and Business Media Dordrecht. Chapter 7, pp. 250-252.
- Shevchenko Y., Wendt A., Gutiérrez A. B. H., Smetanska I. (2011). Use of sprout culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni as amendment in green tea mixtures. 6th International CIGR Technical Symposium 2011, Symposium Website www.oniris-nantes.fr
- Shi J., Feng Y., Zhao C., Wang H. (2012). Rebaudioside A polymorphs and methods to prepare them. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2011/0111115 A1.
- Shi J., Feng Y., Chenghai Z., Hansheng W. (2010). Process for Rebaudioside D. United States Patent Database. Patent Application Publication US/2010/0316782A1.
- Shibarta H., Sawa Y., Oka T., Sonoke S. (1995). Steviol and steviol-glycoside: glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni - purification and partial characterization Archives of Biochemistry and Biophysics 321(2):390-396.
- Shock C. C. (1982). Experimental cultivation of Rebaudis Stevia in California. Agronomy Progress Report 122.
- Shivanna N., Naika M., Khanum F., Kaul V. K. (2013). Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. Journal of Diabetes and Its Complications 27:103-113.
- Siddique A. B., Mizanur Rahman S. M., Hossain M. A. (2012). Chemical composition of essential oil by different extraction methods and fatty acid analysis of the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Arabian Journal of Chemistry XXX, doi 10.1016/j.arabjc.2012.01.004.
- Singh J. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology. Cap. 3, Maceration, Percolation and Infusion Techniques for the Extraction of Medicinal and

- Aromatic Plants, pp. 72-73. Capturado el 14/11/2010. Disponible en www.unido.org/fileadmin/user_media/Publications/
- Singh A. y Verma A. (2009). Development, standardization and quality evaluation of stevia-mint-tea. Abstract, Journal of Food Science and Technology 46(5):491-493.
- Soejarto D. D. (2002). Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. Edited by A. Douglas Kinghorn, Vol. 19, Taylor and Francis. Cap. II, pp. 18-39.
- Soejarto D. D., Kinghorn A. D., Farnsworth N. R. (1982). Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of stevia leaf herbarium samples for sweetness. Journal of Natural Products 45:590–599.
- Soto A. E. y Del Val S. (2002). Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*. Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos (20)1666-2016.
- Tadhani M. B., Patel V. H., Subhash R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. Journal of Food Composition and Analysis 20:323-329.
- Tadhani M. y Subhash R. (2006). Preliminary Studies on *Stevia rebaudiana* Leaves: Proximal Composition, Mineral Analysis and Phytochemical Screening. Journal of Medical Sciences 6:321-326.
- Talebi F., Arce G. M. A., Lee T., Chang P. K., Chen H., Zaniwski T. A. (2011). Beverage products. United States Patent Database. Patent Application Publication 2011/8029846B2.
- Tavarini S., Ribuoli M., Bimbatti M., Angelini L.G. (2010). Functional components from *Stevia rebaudiana* Bert. Leaves. Journal of Biotechnology 150S:S1:S576, P-F.81.
- Treybal R. E. (1988) Operaciones de Transferencia de Masa. Segunda Edición. Editorial Mc Graw Hill. Cap. 13, pp. 792-799.

- Tzia C. (2003). Extraction Optimization in Food Engineering. Food science and technology, Textbooks. Edited by George Liadakis and Constantina Tzia. Cap. 5, Optimization.
- Uchiyama H., Tozuka Y., Nishikawa M., Takeuchi H. (2012). Nanocomposite formation between alpha-glucosyl stevia and surfactant improves the dissolution profile of poorly water-soluble drug. International Journal of Pharmaceutics 428:183-186.
- Upreti M., Strassburger K., Chen Y. L., Wu S., Prakash I. (2011). Solubility Enhancement of Steviol Glycosides and Characterization of Their Inclusion Complexes with Gamma-Cyclodextrin. International Journal of Molecular Sciences 12:7529-7553.
- Utumi M. M., Monnerat P. H., Pereira P. R. G., Fontes P. C., Godinho V. de P. C. (1999). Macronutrient deficiencies in *Stevia rebaudiana*: Visual symptoms and effects on growth, chemical composition and stevioside production. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 34:1039-1043.
- Valio I. F. M., Rocha R. F. (1977). Effect of photoperiod and growth regulators on growth and flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Jap. J. Crop Sci. 46:243-248.
- Vaněk T., Nepovim A., Valiček P. (2003). Determination of stevioside in plant material and fruit teas. Journal of Food Composition and Analysis 14:383-388.
- Wakelyn P. J. y Wan P. J. (2003). Extraction Optimization in Food Engineering. Food science and technology, Textbooks. Edited by George Liadakis and Constantina Tzia. Cap. 13, Solvent Extraction: Safety, Health, and Environmental Issues.
- Wang Q. (2012). High Rebaudioside A plant and methods of producing the same and uses thereof. WIPO Patent Database. Patent Application WO/2012/0886112A1.
- Wölwer-Rieck U. (2012). The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(4):86-95.

- Wölwer-Rieck U., Lankes C., Wawrzun A., Wüst M. (2010a). Improved HPLC method for the evaluation of steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. European Food Research and Technology 231:581-588.
- Wölwer-Rieck U., Tomberg W., Wawrzun A. (2010b). Investigations on the Stability of Stevioside and Rebaudioside A in Soft Drinks. . Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 12216–12220.
- Wood H. B., Allerton R., Diehl H. W., Fletcher H. G. (1955). Stevioside. I. The Structure of the Glucose Moieties. Journal of The American Chemical Society 20:875-883.
- Yadav A. K., Singh S., Dhyan D., Ahuja P. S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. Canadian Journal of Plant Science 91(1):1-27.
- Yoda S. K., Marques M. O. M., Petenate A. J., Meireles M. A. A. (2003). Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂/water: extraction kinetics and identification of extracted components. Journal of Food Engineering 57:125-134.
- Yoda S. K. (2001). Estudo da cinética de extração dos glicosídeos da *Stevia rebaudiana* Bertoni com mistura CO₂+Água. Tese de Mestrado apresentada á Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, INICAMP.
- Zamora J. (2007). Estado del arte de la Stevia en Colombia. Laboratorios Vida Stevia Ltda (Colombia). III Simposio Internacional de la Stevia – Ka’a He’ê, Presentación. Capturado el 30/06/2011. Disponible en www.capaste.org.py/archivos
- Zhang S. Q., Kumar A., Kutowy O. (2000). Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves. Food Research International 33: 617-620.
- Zimmermann B. F. (2011). Tandem mass spectrometric fragmentation patterns of known and new steviol glycosides with structure proposals. Rapid Communications in Mass Spectrometry 25:1575-1582.

Zimmermann B. F., Woelwer-Rieck U., Papagiannopoulos M. (2012). Separation of Steviol Glycosides by Hydrophilic Liquid Interaction Chromatography. *Food Analytical Methods* 5(2):266-271.

ANEXOS

ANEXO A

Tabla A.1. Valores de variables respuesta en el orden del diseño experimental. Diseño experimental 3*5

N° de Experimento	etanol:agua	T (°C)	Stv (g/L)	RbA (g/L)	ET (g/L)	Stv %	RbA %	RbA/Stv	Stv _{rec}	RbA _{rec}
1	0:100	30	3,18	13,21	56,20	5,66	23,51	4,15	61,15	60,32
2	30:70	30	3,63	15,66	64,00	5,67	24,47	4,31	69,81	71,51
3	50:50	30	3,24	13,50	53,70	6,03	25,14	4,17	62,31	61,64
4	70:30	30	3,20	12,30	47,60	6,72	25,84	3,84	61,54	56,16
5	100:0	30	0,37	1,36	9,80	3,78	13,88	3,68	7,12	6,21
6	0:100	50	3,21	14,40	61,80	5,19	23,66	4,55	61,73	66,76
7	30:70	50	4,30	18,35	79,50	5,41	23,08	4,27	82,69	83,79
8	50:50	50	4,17	17,94	74,10	5,63	24,21	4,30	80,19	81,92
9	70:30	50	3,66	15,19	56,90	6,43	26,17	4,07	70,38	67,99
10	100:0	50	0,56	2,07	12,60	4,44	16,43	3,70	10,77	9,45
11	0:100	70	3,53	14,44	68,80	5,42	19,90	3,67	71,73	62,51
12	30:70	70	4,05	16,75	73,60	5,50	22,76	4,14	77,88	76,48
13	50:50	70	4,19	16,48	76,40	5,48	21,57	3,93	80,58	75,25
14	70:30	70	4,79	18,42	74,40	6,44	24,76	3,85	92,12	84,11
15	100:0	70	1,29	4,01	22,30	5,78	17,98	3,11	24,81	18,31

ANEXO A

Tabla A.2. Valores de variables respuesta en el orden del diseño experimental. Diseño experimental CCD

x	y	Stv (g/L)	RbA (g/L)	ET (g/L)	Stv %	RbA %	RbA/Stv	Stv _{rec}	RbA _{rec}
-1	-1	3,82	13,32	56,0	6,82	23,78	3,49	73,40	60,81
1	-1	2,52	7,36	31,8	7,91	23,14	2,92	48,38	33,60
-1	1	4,71	16,36	68,3	6,89	23,95	3,48	90,50	74,70
1	1	4,01	13,10	49,3	8,13	26,57	3,27	77,12	59,82
-1,41	0	3,21	14,62	61,8	5,19	23,66	4,55	61,73	66,76
1,41	0	0,56	2,07	12,6	4,47	16,43	3,68	10,83	9,45
0	-1,41	3,24	13,50	53,7	6,03	25,14	4,17	62,31	61,64
0	1,41	4,19	16,48	76,4	5,48	21,57	3,93	80,58	75,25
0	0	4,17	17,94	74,1	5,63	24,21	4,3	80,19	81,92
0	0	3,77	16,05	70,6	5,34	22,73	4,26	72,50	73,29
0	0	4,40	17,79	75,1	5,86	23,69	4,04	84,62	81,23

ANEXO A

Tabla A.3. Volúmenes de solventes empleados en los ensayos de extracción (Diseño experimental 3*5)

N° de Experimento	etanol:agua	T (°C)	Volumen de solvente vertido en el lecho (mL)	Volumen de extracto bruto obtenido (mL)	Volumen de solvente retenido por impregnación
1	0:100	30	1700	1100	600
2	30:70	30	1700	1150	550
3	50:50	30	1600	1050	550
4	70:30	30	1700	1100	600
5	100:0	30	1400	1000	400
6	0:100	50	1550	1050	500
7	30:70	50	1550	1050	500
8	50:50	50	1550	1050	500
9	70:30	50	1500	1000	500
10	100:0	50	1500	1100	400
11	0:100	70	1550	1200	350
12	30:70	70	1650	1200	450
13	50:50	70	1600	1200	400
14	70:30	70	1550	1000	550
15	100:0	70	1400	1000	400

ANEXO A

Tabla A.4. Variación de la solubilidad de los glicósidos individuales con la temperatura, en solventes mixtos etanol:agua

Solvente mixto Temperatura (°C)	Solubilidad (g/L)									
	0:100		30:70		50:50		70:30		100:0	
	Stv	RbA	Stv	RbA	Stv	RbA	Stv	RbA	Stv	RbA
5	4,77	5,02	4,53	7,07	49,26	46,17	42,24	56,16	40,50	3,64
30	3,66	3,69	34,77	33,91	106,74	110,60	102,33	72,81	91,14	3,21
35	3,21	3,16	50,98	50,07	133,87	121,99	132,90	86,61	104,04	2,31
40	3,44	3,83	87,80	80,40	184,77	163,13	190,00	105,66	147,37	2,10
45	4,37	3,84	133,62	117,07	233,50	204,94	241,46	124,09	182,93	2,31
50	6,26	6,55	177,84	156,83	325,76	270,64	310,32	213,71	281,29	3,74

Tabla A.5. Variación de la solubilidad con la temperatura, de los glicósidos en mezclas 1:1, en solventes mixtos etanol:agua

Solvente mixto Temperatura (°C)	Solubilidad (g/L)			
	30:70		70:30	
	Stv	RbA	Stv	RbA
5	148,33	146,60	80,21	95,89
30	127,66	140,25	149,89	153,64
35	136,38	138,78	167,38	158,35
40	151,47	162,10	170,56	169,37
45	189,59	230,89	173,08	189,22
50	> 400,00	> 400,00	181,78	214,87

ANEXO A

Tabla A.6. Ensayo con repetición (70 °C, solvente mixto 30:70). Componente recuperado de la matriz vegetal

		Recuperación porcentual del componente valioso							
		Ensayo (1)				Ensayo (2)			
t (min)	V _{eb} (mL)	Stv _(i)	Stv _{rec}	RbA _(i)	RbA _{rec}	Stv _(i)	Stv _{rec}	RbA _(i)	RbA _{rec}
0	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	100	1,485	28,558	6,080	27,763	1,099	21,135	4,434	20,247
12	200	1,055	48,846	4,310	47,443	1,079	41,885	4,299	39,877
18	300	0,652	61,385	2,659	59,584	0,883	58,865	3,285	54,877
24	400	0,480	70,615	1,944	68,461	0,614	70,673	2,244	65,123
30	500	0,384	78,000	1,527	75,434	0,417	78,692	1,478	71,872
36	600	0,303	83,827	1,187	80,854	0,248	83,462	0,967	76,288
42	700	0,217	88,000	0,856	84,763	0,182	86,962	0,685	79,416
48	800	0,167	91,212	0,671	87,826	0,135	89,558	0,486	81,635
54	900	0,124	93,596	0,447	89,868	0,093	91,346	0,369	83,320
60	1000	0,087	95,269	0,321	91,333	0,135	93,942	0,526	85,721

Stv_(i) se presenta en (g/100 mL).

RbA_(i) se presenta en (g/100 mL).

Stv_{rec} es el incremento porcentual en la recuperación de Esteviósideo con el tiempo.

RbA_{rec} es el incremento porcentual en la recuperación de Esteviósideo con el tiempo.

V_{eb} (mL) es el volumen de extracto bruto colectado a tiempo t (min).

ANEXO A

Tabla A.7. Ensayo con repetición (70 °C, solvente mixto 30:70). Coeficientes de la Ecuación de Pilosof y bondad del ajuste.

Componente	Ensayo	R ²	Constante	Valor Estimado	Límite Inferior	Límite Superior
Stv _{rec}	1	99,940	R _∞	128,092	124,939	131,244
			t _{1/2}	19,586	18,271	20,902
	2	99,125	R _∞	135,991	120,738	151,245
			t _{1/2}	24,383	17,672	31,094
RbA _{rec}	1	99,923	R _∞	122,015	118,681	125,349
			t _{1/2}	18,923	17,488	20,359
	2	99,238	R _∞	121,078	109,100	133,055
			t _{1/2}	22,623	16,931	28,315

Stv_{rec} el incremento porcentual en la recuperación de Esteviósido con el tiempo.

RbA_{rec} es el incremento porcentual en la recuperación de Esteviósido con el tiempo.

ANEXO A

Tabla A.8. Recuperación porcentual de Esteviósido (Stv_{rec}) a 30 °C con diferentes solventes.

t (min)	etanol:agua 0:100		etanol:agua 30:70		etanol:agua 50:50		etanol:agua 70:30		etanol:agua 100:0	
	$Stv_{(i)}$	Stv_{rec}								
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,185	3,558	0,327	6,288	0,325	8,486	0,330	6,346	0,051	0,981
12	0,272	8,788	0,451	14,962	0,385	16,375	0,376	13,577	0,060	2,135
18	0,337	15,269	0,520	24,962	0,455	23,729	0,506	23,308	0,054	3,173
24	0,364	22,269	0,517	34,904	0,412	30,600	0,439	31,750	0,048	4,096
30	0,364	29,269	0,551	45,500	0,411	37,033	0,385	39,154	0,040	4,865
36	0,390	36,769	0,382	52,846	0,380	43,070	0,330	45,500	0,034	5,519
42	0,256	41,692	0,271	58,058	0,232	48,747	0,267	50,635	0,031	6,115
48	0,288	47,231	0,239	62,654	0,266	54,093	0,221	54,885	0,027	6,635
54	0,232	51,692	0,203	66,558	0,171	59,138	0,180	58,346	0,018	6,981
60	0,186	55,269	0,222	70,827	0,186	63,906	0,142	61,077	0,018	7,327

$Stv_{(i)}$ se presenta en (g/100 mL).

Stv_{rec} es el incremento porcentual en la recuperación de Esteviósido con el tiempo.

ANEXO A

Tabla A.9. Recuperación porcentual de Esteviósido (Stv_{rec}) a 50 °C con diferentes solventes.

t (min)	etanol:agua 0:100		etanol:agua 30:70		etanol:agua 50:50		etanol:agua 70:30		etanol:agua 100:0	
	$Stv_{(i)}$	Stv_{rec}								
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,378	7,269	0,562	10,808	0,566	10,885	0,318	6,115	0,040	0,763
12	0,501	16,904	0,726	24,769	0,790	26,077	0,544	16,577	0,064	1,988
18	0,455	25,654	0,775	39,673	0,719	39,904	0,532	26,808	0,071	3,344
24	0,409	33,519	0,630	51,788	0,587	51,192	0,493	36,288	0,080	4,873
30	0,344	40,135	0,507	61,538	0,470	60,231	0,429	44,538	0,088	6,565
36	0,286	45,635	0,504	71,231	0,427	68,442	0,341	51,096	0,074	7,990
42	0,259	50,615	0,289	76,788	0,302	74,250	0,290	56,673	0,053	9,017
48	0,216	54,769	0,213	80,885	0,278	79,596	0,238	61,250	0,037	9,735
54	0,188	58,385	0,131	83,404	0,181	83,077	0,193	64,962	0,034	10,390
60	0,149	61,250	0,071	84,769	0,131	85,596	0,171	68,250	0,033	11,021

$Stv_{(i)}$ se presenta en (g/100 mL).

Stv_{rec} es el incremento porcentual en la recuperación de Esteviósido con el tiempo.

ANEXO A

Tabla A.10. Recuperación porcentual de Esteviósido (Stv_{rec}) a 70 °C con diferentes solventes.

t (min)	etanol:agua 0:100		etanol:agua 30:70		etanol:agua 50:50		etanol:agua 70:30		etanol:agua 100:0	
	$Stv_{(i)}$	Stv_{rec}								
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,652	12,538	1,485	28,558	1,184	22,769	0,530	10,192	0,135	2,596
12	0,703	26,058	1,055	48,846	1,119	44,288	0,743	24,481	0,174	5,942
18	0,446	34,635	0,652	61,385	0,832	60,288	0,813	40,115	0,195	9,692
24	0,419	42,692	0,480	70,615	0,670	73,173	0,697	53,519	0,172	13,000
30	0,322	48,885	0,384	78,000	0,484	82,481	0,546	64,019	0,140	15,692
36	0,260	53,885	0,303	83,827	0,337	88,962	0,417	72,038	0,107	17,750
42	0,213	57,981	0,217	88,000	0,236	93,500	0,321	78,212	0,092	19,519
48	0,197	61,769	0,167	91,212	0,155	96,481	0,245	82,923	0,082	21,096
54	0,169	65,019	0,124	93,596	0,095	98,308	0,171	86,212	0,062	22,288
60	0,157	68,038	0,087	95,269	0,065	99,558	0,174	89,558	0,060	23,442

$Stv_{(i)}$ se presenta en (g/100 mL).

Stv_{rec} es el incremento porcentual en la recuperación de Esteviósido con el tiempo.

ANEXO A

Tabla A.11. Recuperación porcentual de Rebaudiósido A (RbA_{rec}) a 30 °C con diferentes solventes.

t (min)	etanol:agua 0:100		etanol:agua 30:70		etanol:agua 50:50		etanol:agua 70:30		etanol:agua 100:0	
	$RbA_{(i)}$	RbA_{rec}								
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,764	3,489	1,378	6,292	1,271	5,804	1,297	5,922	0,185	0,845
12	1,241	9,155	1,941	15,155	1,590	13,064	1,203	11,416	0,215	1,826
18	1,532	16,151	2,085	24,676	1,716	20,900	1,857	19,895	0,195	2,717
24	1,543	23,196	2,253	34,963	1,761	28,941	1,615	27,269	0,173	3,507
30	1,615	30,571	2,299	45,461	1,710	36,749	1,433	33,813	0,145	4,169
36	1,714	38,397	1,504	52,329	1,560	43,872	1,186	39,228	0,120	4,717
42	1,292	44,297	1,181	57,721	1,082	48,813	1,014	43,858	0,113	5,233
48	1,074	49,201	1,047	62,502	0,991	53,338	0,798	47,502	0,099	5,685
54	0,990	53,721	0,891	66,571	0,699	56,530	0,716	50,772	0,071	6,009
60	0,838	57,548	1,008	71,174	0,729	59,858	0,577	53,406	0,068	6,320

$RbA_{(i)}$ se presenta en (g/100 mL).

RbA_{rec} es el incremento porcentual en la recuperación de Rebaudiósido A con el tiempo.

ANEXO A

Tabla A.12. Recuperación porcentual de Rebaudiósido A (RbA_{rec}) a 50 °C con diferentes solventes.

t (min)	etanol:agua 0:100		etanol:agua 30:70		etanol:agua 50:50		etanol:agua 70:30		etanol:agua 100:0	
	$RbA_{(i)}$	RbA_{rec}								
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	1,632	7,452	2,291	10,461	2,188	9,991	1,288	5,881	0,171	0,781
12	2,295	17,932	2,989	24,110	3,177	24,498	2,198	15,918	0,240	1,877
18	2,090	27,475	2,908	37,388	2,908	37,776	2,130	25,644	0,266	3,092
24	1,843	35,890	2,555	49,055	2,389	48,685	1,964	34,612	0,299	4,456
30	1,555	42,991	2,092	58,607	1,984	57,744	1,722	42,475	0,267	5,675
36	1,297	48,913	2,089	68,146	1,661	65,329	1,398	48,858	0,262	6,873
42	1,181	54,306	1,168	73,479	1,277	71,160	1,209	54,379	0,200	7,784
48	0,970	58,735	0,871	77,457	1,039	75,904	0,980	58,854	0,135	8,402
54	0,868	62,699	0,553	79,982	0,802	79,566	0,814	62,571	0,115	8,926
60	0,668	65,749	0,267	81,201	0,544	82,050	0,755	66,018	0,114	9,447

$RbA_{(i)}$ se presenta en (g/100 mL).

RbA_{rec} es el incremento porcentual en la recuperación de Rebaudiósido A con el tiempo.

ANEXO A

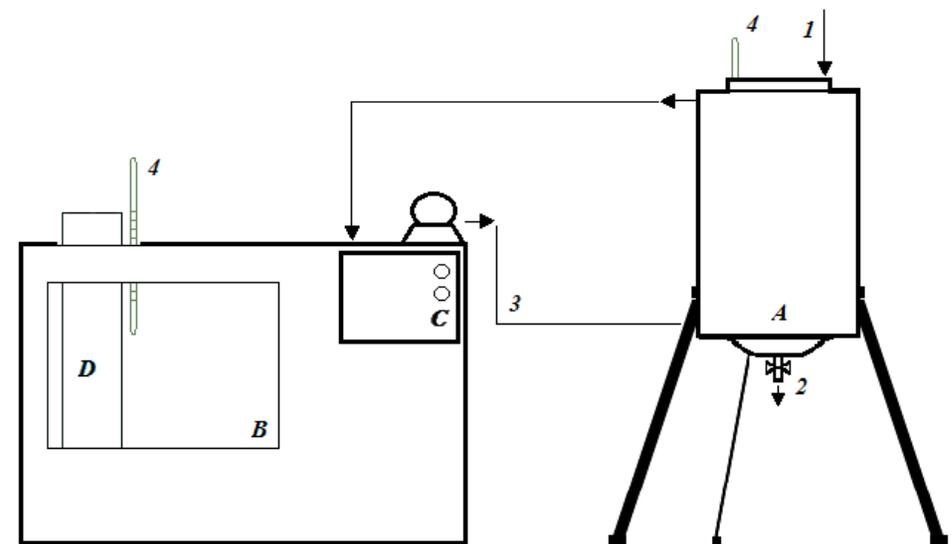
Tabla A.13. Recuperación porcentual de Rebaudiósido A (RbA_{rec}) a 70 °C con diferentes solventes.

t (min)	etanol:agua 0:100		etanol:agua 30:70		etanol:agua 50:50		etanol:agua 70:30		etanol:agua 100:0	
	$RbA_{(i)}$	RbA_{rec}								
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	2,499	11,411	6,080	27,763	4,405	20,114	1,981	9,046	0,511	2,333
12	2,828	24,324	4,310	47,443	4,506	40,689	2,951	22,521	0,586	5,009
18	2,213	34,429	2,659	59,584	3,531	56,813	3,247	37,347	0,638	7,922
24	1,661	42,014	1,944	68,461	2,734	69,297	2,684	49,603	0,537	10,374
30	1,323	48,055	1,527	75,434	1,911	78,023	2,125	59,306	0,429	12,333
36	1,059	52,890	1,187	80,854	1,410	84,461	1,697	67,055	0,329	13,836
42	0,865	56,840	0,856	84,763	0,971	88,895	1,299	72,986	0,277	15,100
48	0,743	60,233	0,671	87,826	0,680	92,000	0,973	77,429	0,248	16,233
54	0,657	63,233	0,447	89,868	0,406	93,854	0,739	80,804	0,187	17,087
60	0,596	65,954	0,321	91,333	0,254	95,014	0,768	84,311	0,183	17,922

$RbA_{(i)}$ se presenta en (g/100 mL).

RbA_{rec} es el incremento porcentual en la recuperación de Rebaudiósido A con el tiempo.

ANEXO B



- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| A. equipo extractor | 1. reposición de solvente |
| B. sistema termostatzado | 2. salida de extracto |
| C. control diferencial de temperatura | 3. circulación de agua de calefacción |
| D. reservorio de solvente | 4. medición de temperatura |

Figura B.1. Equipo percolador de laboratorio para el estudio de la extracción etanólica y acuosa de Esteviósido y Rebaudiósido A



a. palo



b. hoja gruesa



c. hoja fina

Figura B.2. Fracciones granulométricas del lote de partida

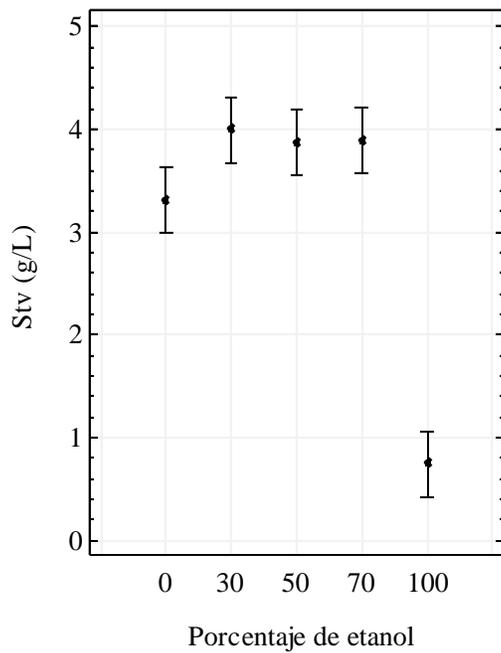


Figura B.3. Stv (g/L) vs. porcentaje de etanol

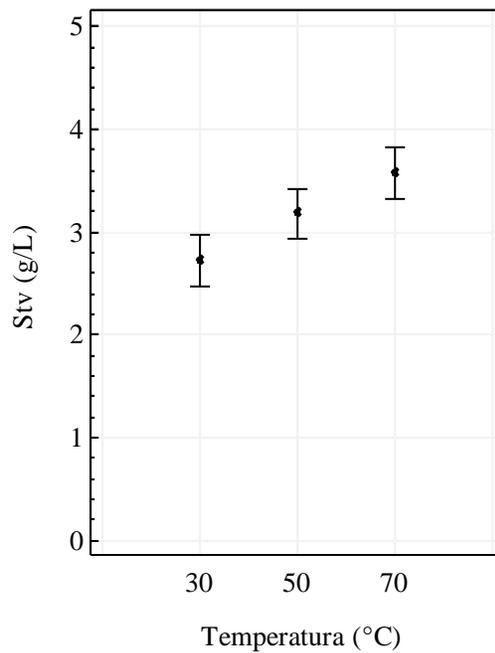


Figura B.4. Stv (g/L) vs. temperatura

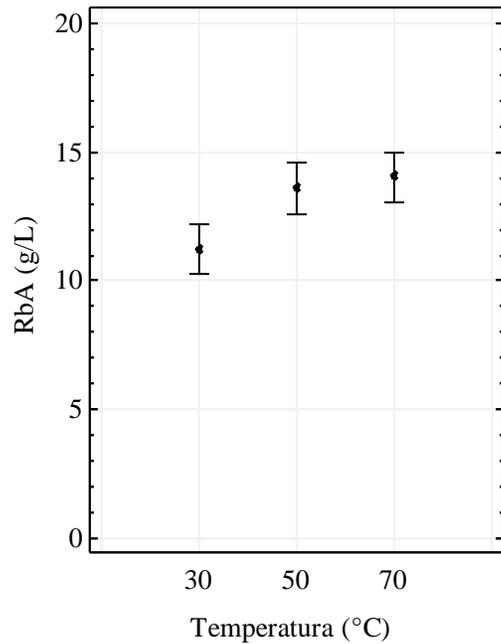


Figura B.5. RbA (g/L) vs. porcentaje de etanol

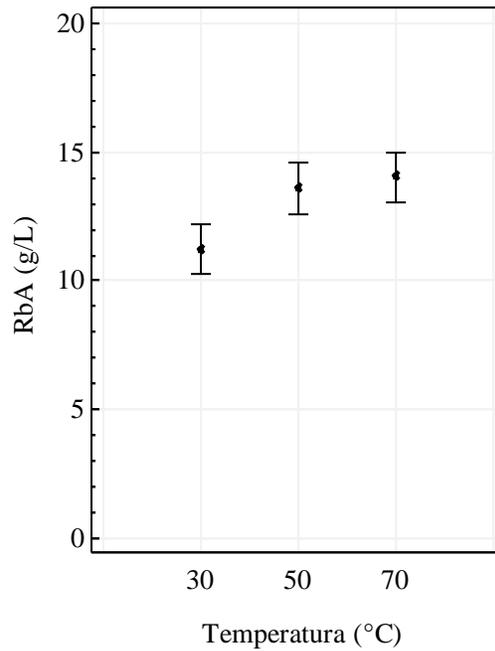


Figura B.6. RbA (g/L) vs. temperatura

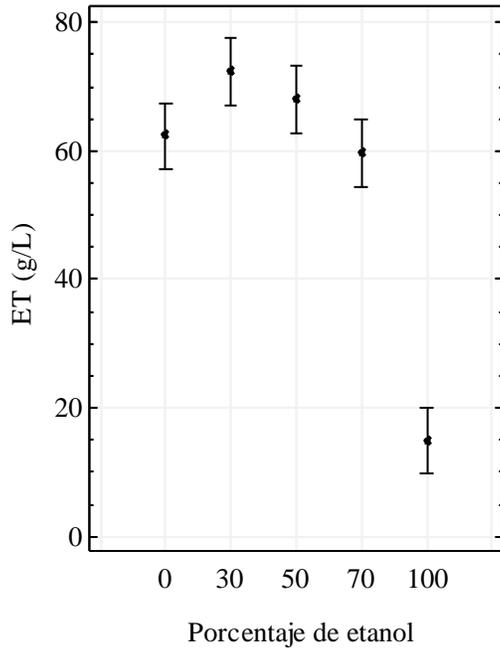


Figura B.7. ET (g/L) vs. porcentaje de etanol

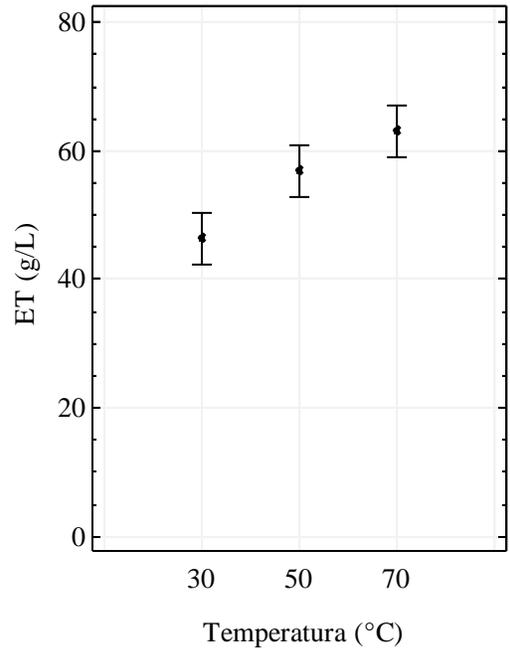


Figura B.8. ET (g/L) vs. temperatura

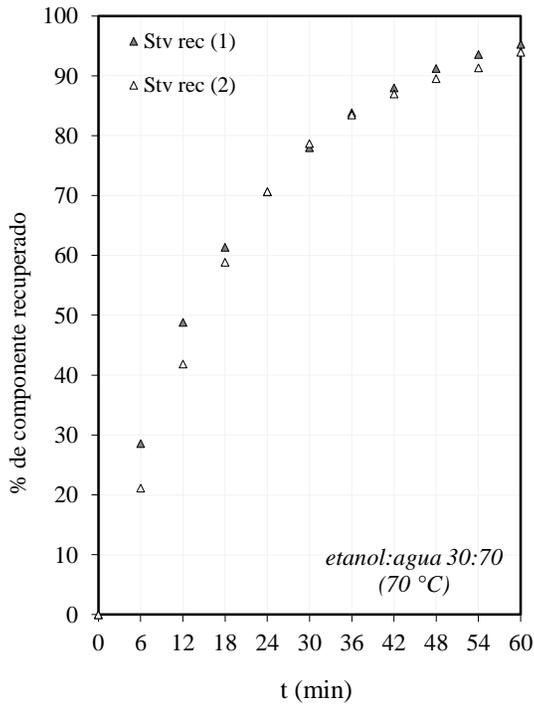


Figura B.9. Stv_{rec} vs. tiempo (min).
Ensayo con repetición.

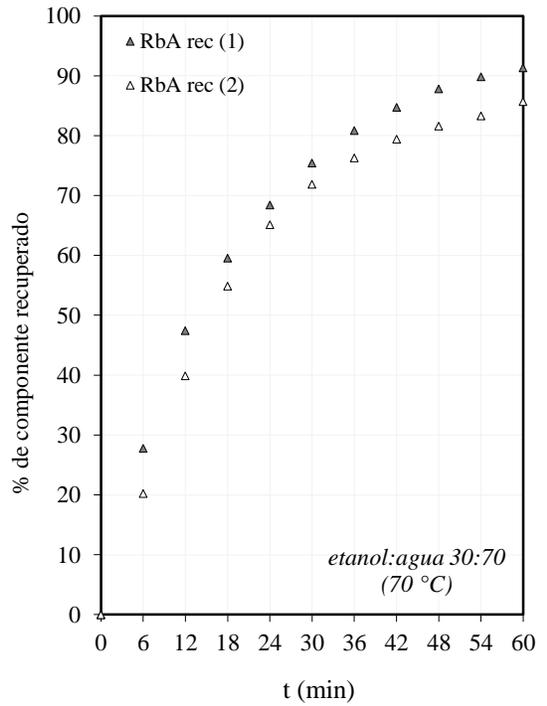


Figura B.10. RbA_{rec} vs. tiempo (min).
Ensayo con repetición

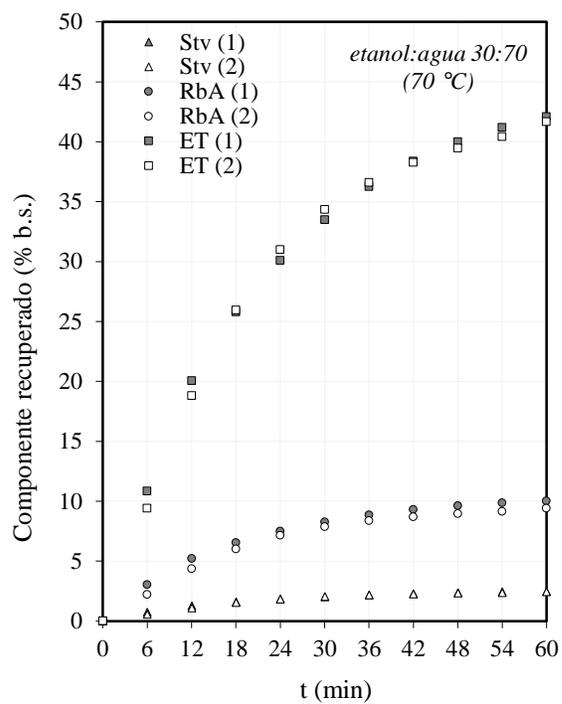


Figura B.10. Ensayo con repetición (70 °C, solvente mixto 30:70)
Componente recuperado de la matriz vegetal en base seca.
Ensayo 1: Stv (1), RbA (1), ET (1).
Ensayo 2: Stv (2), RbA (2), ET (2).

ANEXO C

Ecuaciones:

Polaridad de solventes mixtos. Las propiedades dieléctricas de un solvente mixto como agua y alcohol, pueden aproximarse como el promedio ponderado de las propiedades de los componentes puros (Gennaro, 2003):

$$\mathcal{E}_{mezcla} = \mathcal{E}_{agua} \cdot P_{agua} + \mathcal{E}_{etanol} \cdot P_{etanol}$$

Dónde:

\mathcal{E} = constante dieléctrica del solvente puro en la mezcla.

P = peso (g) del solvente puro en la mezcla.

Pureza. Se expresada como el porcentaje del componente valioso en la materia seca o extracto total:

$$\% Stv = [Stv(j) / ET(j)] \cdot 100$$

$$\% RbA = [RbA(j) / ET(j)] \cdot 100$$

Dónde:

RbA (j)= concentración de Rebaudiósido A en una mezcla (g/1000 mL)

Stv (j)= concentración de Esteviósido en una mezcla (g/1000 mL)

ET (j)= extracto total en una mezcla (g/1000 mL)

Grado de extracción (porcentaje recuperado). Se expresada como el porcentaje del componente extraído en relación al componente presente en la matriz vegetal:

$$Stv\ rec = [Stv\ extraido / Stv\ presente] \cdot 100$$

$$RbA\ rec = [RbA\ extraido / RbA\ presente] \cdot 100$$

Porcentaje extraído en base seca (% b.s.). Se expresada como el porcentaje del componente valioso extraído por cada 100 g de material vegetal en base seca:

$$Stv\ recuperado\ (\% \text{ b.s.}) = [Stv\ (g) / 2] \cdot 100$$

$$RbA\ recuperado\ (\% \text{ b.s.}) = [RbA\ (g) / 2] \cdot 100$$

$$ET\ recuperado\ (\% \text{ b.s.}) = [ET\ (g) / 2] \cdot 100$$

Dónde:

RbA (g)= peso de Rebaudiósido A (g), extraído por cada 200 g de hojas secas molidas.

Stv (g)= peso de Esteviósido (g), extraído por cada 200 g de hojas secas molidas.

ET (g)= peso de extracto total (g), extraído por cada 200 g de hojas secas molidas.