

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA Y TEXTIL**

“ OBTENCION DEL ESTEVIOSIDO A PARTIR DE LA

***Stevia rebaudiana Bertoni*”**

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO QUIMICO

PRESENTADO POR:

RUBEN DARIO ROMAN QUISPETUPA

HUGO EFRAIN RAMIREZ CASTRO

LIMA – PERU

2004

**OBTENCION DEL ESTEVIOSIDO A PARTIR
DE LA *Stevia rebaudiana Bertoni***

**A MIS PADRES, MIS HERMANOS Y A MI NOVIA INGRID
POR TODO EL APOYO BRINDADO EN ESTA PRIMERA
META CONSEGUIDA.**

RUBEN DARIO ROMAN QUISPETUPA

**A DIOS POR SER LA FORTALEZA DE MI VIDA, A MIS
PADRES POR SU PERMANENTE CARIÑO, A MI ESPOSA
LYNN Y A MIS HIJOS ALVARO RODRIGO, LUIS
ENRIQUE Y TANIA CAMILA POR SER MI ILUSION**

HUGO EFRAIN RAMIREZ CASTRO

AGRADECIMIENTOS

ESTIMADOS SRES:

BLGO. JUAN JUSCAMAITA

BLGO. LORENZO SOLIER

ING. KIDO TAKAJACHI

SR. HUGO BAZO

**SIN SU VALIOSA COLABORACION NO HUBIESEMOS
LOGRADO CULMINAR CON ÉXITO LA PRESENTE
TESIS**

RESUMEN

El proceso se basa en el uso de solventes orgánicos y agua tratada, para extraer el Estevióside de las hojas de la *Stevia rebaudiana Bertoni*, empezando entonces con una extracción acuosa y un secado convencional. En esta operación de secado se necesita las condiciones ambientales del medio, por lo que se amerita trabajar en condiciones de altura y en un clima seco, dada las bondades que presenta la rápida evaporación del agua a una menor presión atmosférica, evitando de esta forma el uso de energía mecánica o eléctrica para realizar el secado y por consiguiente un ahorro económico en el proceso.

Luego de la operación de secado, se procede a extraer los componentes anhidros con metanol, obteniendo así una solución metanólica de Estevióside y otros componentes. Dicha solución luego es concentrada para finalmente ser cristalizada, los cuales constituyen una mezcla de glicósidos, entre los que se encuentran el Estevióside, además de resinas y grasas. Finalmente se hace secar dichos cristales y se procede a purificar a los sólidos para obtener el Estevióside.

INDICE

CAPITULO 1: Introducción

CAPITULO 2: LA MATERIA PRIMA - *Stevia rebaudiana Bertoni*

- 2.1 Antecedentes
- 2.2 Clasificación botánica
- 2.3 Descripción Botánica
- 2.4 Características Agronómicas
- 2.5 Cultivo
 - a) Clima
 - b) Suelos
 - c) Preparación del Terreno
 - d) Cosecha
 - e) Rendimiento
- 2.6 Propiedades de la hoja
 - a) Edulcorante
 - b) Medicinal
- 2.7 Contenido edulcorante

CAPITULO 3: EL PRODUCTO-ESTEVIOSIDO

- 3.1 Generalidades
- 3.2 Obtención y características
 - a) Obtención
 - b) Características
- 3.3 Propiedades
 - a) Propiedades físicas
 - b) Propiedades químicas

3.4 Composición

3.5 Especificaciones

3.6 Evaluación de la seguridad para el consumo
del Esteviosido

a) Por su experiencia de uso

b) Por la experiencia científica

CAPITULO 4: DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Ensayo Explorativo

a) Extracción con etanol

b) Purificación por Cromatografía de Columna

c) Extracción con agua y metanol

4.2 Descripción del Desarrollo Experimental

Seleccionado

a) Extracción Acuosa

b) Concentración-Secado

c) Extracción Metanólica

d) Concentración Metanólica

e) Cristalización

f) Secado

g) Recristalización

4.3 Caracterización del Esteviosido

CAPITULO 5: RESULTADOS EN EL PROCESO DE OBTENCION DEL ESTEVIOSIDO

5.1 Operaciones del proceso

a) Secado de las hojas de Stevia

b) Selección de las hojas de Stevia

c) Extracción acuosa

- d) Concentración-Secado
- e) Extracción Metanólica
- f) Concentración de la solución metanólica
- g) Cristalización
- h) Secado de sólidos
- i) Recristalización

Diagrama de Flujo del Proceso

CAPITULO 6: EVALUACIÓN PARA LA OPERACIÓN A NIVEL PILOTO

- 6.1 Etapa de extracción acuosa
- 6.2 Etapa de Concentración-Secado
- 6.3 Etapa de Extracción metanólica
- 6.4 Etapa de Concentración
- 6.5 Etapa de Cristalización
- 6.6 Etapa de Secado de sólidos
- 6.7 Recristalización
- 6.8 Cálculos a nivel piloto
 - a) Balance de materia
 - a.1) En el secado de la materia prima
 - a.2) En la etapa de extracción acuosa
 - a.3) En la etapa de concentración-secado

Diagrama de flujo del proceso

Balance de materia

- b) Balance de Energía
 - b.1) En la etapa de concentración-secado
 - b.2) En la etapa de extracción metanólica
 - b.3) En la etapa de concentración
 - b.4) En la etapa de recuperación de metanol
- 6.9 Costo de procesamiento

- a) Costo primo del producto obtenido
- b) Costo de análisis en la obtención del
Estevióside

CAPITULO 7: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPITULO 8: BIBLIOGRAFIA

CAPITULO 9: APENDICE

Composición de la *Stevia rebaudiana Bertoni*

Productos comerciales a partir de la *Stevia rebaudiana Bertoni*

Estructura Química del Steviol – Glicósidos

Camino sub-celular para la síntesis de un glicósido

Procesamiento industrial del Esteviosido

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Como una necesidad de impulsar la industrialización de productos naturales en nuestro país, el presente trabajo de tesis tiene como objetivo implementar el proceso de obtención de un edulcorante natural no calórico a partir de las hojas de una planta sub tropical americana conocida como hierba dulce o científicamente como *Stevia rebaudiana Bertoni*. Dicho edulcorante contiene un poder edulcorante 300 veces más que el derivado de azúcar de caña, además de no poseer características calóricas. Este edulcorante natural es conocido con el nombre de Esteviosido.

Este estudio tecnológico presenta las ventajas de implementar un proceso auténticamente nacional, aprovechando las condiciones climatológicas de nuestro territorio. Asimismo la materia prima, es decir la Stevia ofrece la posibilidad de sustituir los cultivos de coca de nuestra selva, por una planta capaz de ofrecernos una variedad de beneficios para la salud humana, de la cual se puede obtener un edulcorante natural que no ofrece efectos tóxicos para la salud.

CAPITULO 2

LA MATERIA PRIMA - *Stevia rebaudiana Bertoni*

2.1 ANTECEDENTES

Las poblaciones del Paraguay y zonas geográficas colindantes conocían ya desde tiempos inmemoriales las propiedades edulcorantes de una hierba endulzante a la que denominaban en guaraní “ hierba dulce o “ hierba miel,” la que se consumía especialmente como infusión. Según reseñas históricas esta planta empezó a interesar científicamente a partir de 1899, cuando el botánico Moisés Santiago Bertoni realizó el primer estudio sistemático y la denominó *Eupatorium Rebaudianum* spc, en homenaje al Dr. Ovidio Rebaudi, quien la había considerado previamente. Posteriormente en 1905, Bertoni denominó el género *Stevia* y efectuó su descripción completa, conociéndola desde entonces con la denominación de *Stevia rebaudiana Bertoni*. Los primeros estudios químicos y las posibles aplicaciones industriales también fueron realizados e investigados por Bertoni. Se conoció en 1909 la existencia de dos principios edulcorantes en el extracto de la hoja de la *Stevia* según los estudios realizados por Dietrich, quién estimó el poder edulcorante entre 150 y 300 veces más dulce que la sacarosa. A fines del año 1960, los japoneses se llevaron las semillas de la planta para mejorar el contenido edulcorante de las hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni*. Adicionalmente importaron 1200 toneladas de tierras coloradas desde Paraguay y Misiones(Argentina), provocando una ecología similar a la natural en viveros calefaccionados. Actualmente las semillas de *Stevia rebaudiana Bertoni* de Japón, se han distribuido a Corea, Taiwán, Tailandia, Indonesia, Laos, Malasia, China y Filipinas.

2.2 CLASIFICACION BOTÁNICA

Nombre común	: hierba dulce o kaa – hee
Género	: <i>Stevia</i>
Especie	: <i>Stevia rebaudiana</i>
Orden	: Campanulales
Familia	: Compuestas

En realidad existen más de trescientas variedades de *Stevia* en la selva de Paraguay y Brasil, pero la única variedad que posee principios edulcorantes es la *Stevia rebaudiana Bertoni*.

En el Perú también existen diversas variedades de *Stevia rebaudiana Bertoni*, pero ninguna de estas contienen propiedades edulcorantes (Museo de Historia Natural del Perú). Sin embargo, existen áreas de cultivo en localidades de Cañete, Ucayali y Amazonas. Lugares en donde se han llevado semillas de *Stevia* provenientes del Paraguay, finalmente la Universidad Nacional Agraria La Molina, a través de su Instituto de Biotecnología se encuentra realizando estudios del cultivo de la *Stevia rebaudiana Bertoni* in Vitro (información proporcionada por el Blgo. Juan Juscamaita Morales, docente de la UNALM).

2.3 DESCRIPCION BOTÁNICA

La *Stevia rebaudiana Bertoni* es una planta subfruticosa, con tallo anual, subleñosas, levemente piloso en las extremidades, es ramificada formando múltiples brotes con tendencias a inclinarse, pudiendo alcanzar hasta 80 cm de altura.

La raíz es perenne, fibrosa, filiforme, abundante, formando cepa.

Las hojas son pequeñas, lanceoladas, muy dulces, festoneadas, opuestas en verticilos alternados y sésiles. La parte más ancha de la hoja se encuentra en la mitad de la parte superior. Las flores se hallan dispuestas en capítulos pequeños terminales o asilares, agrupadas en panículas corimbosas, de lóbulos blancos.

El fruto es un aquenio delgado y plumboso. (Fig. N° 2.1).

2.4 CARACTERISTICAS AGRONOMICAS

Es una especie perenne que cultivada con fines comerciales puede llegar a durar de 5 a 6 años, cortando 2,3 ó 4 veces al año dependiendo de la altitud donde se cultive y del riego.

El tallo puede morir todos los años ya sea por cuestiones de ciclo reproductivo, temperatura (helada) u otras razones ambientales. Queda un tallo subterráneo con un sistema de raíz que luego forma capas, emergiendo nuevos brotes en la base del tallo anterior.

Figura N° 2.1: Planta adulta de *Stevia rebaudiana* Bertoni



El tallo principal en el primer año, se transforma en multicaule después del primer ciclo vegetativo, pudiendo existir más de 20 ciclos luego de 3 ó 4 años.

La hoja es la parte con mayor contenido de principio edulcorante y la raíz es la única que no la posee.

La polinización es entomófila, con fecundación cruzada por lo tanto sus semillas poseen gran variabilidad genética. Si se procediera a hacer un cultivo desuniforme, feno y genotípicamente no sería conveniente.

2.5 CULTIVO

a) Clima

La región donde crece naturalmente la *Stevia rebaudiana Bertoni* es subtropical, semi-húmedo con 1400 a 1800 mm de lluvia y temperatura extrema de -6 a 43 °C con un promedio de 24 °C. Soporta medias mínimas de -5 °C, sin mayores problemas, multiplicándose en Japón en áreas donde la temperatura media es de 12 °C. La planta se desarrolla mejor donde la estación de crecimiento es larga, la intensidad de la luz alta, temperaturas tibias, riesgos mínimos de heladas y sin periodos de largas sequías (Fig. N° 2.2)

b) Suelos

La *Stevia rebaudiana Bertoni* crece en un suelo donde el pH esta entre 5,5 y 7,5 siempre que no sean suelos salinos.

En su zona de origen crece con un pH entre 4 y 5. Necesita suelos franco-areno-humíferos. El cultivo de la *Stevia rebaudiana Bertoni* también prospera en suelos flojos, livianos y con mucha materia orgánica. No debe destinarse su cultivo en suelos bajos que retienen mucha humedad como los arcillosos.

c) Preparación del terreno

La preparación del terreno debe hacerse primero con una labor profunda, luego superficial para mantener bien mullida la tierra y dejarla expedita para las labores de limpieza. Hecho esto, se procede a la plantación para la cual se preparan previamente los brotes de la cepa (Fig. N° 2.3).

Se exige una buena preparación del terreno por lo siguiente: La planta posee un sistema radicular moderadamente superficial, cultivo y cosecha intensiva, la planta se mantiene durante varios años en el mismo sitio y además la *Stevia rebaudiana Bertoni* es buena competidora con malezas.

d) Cosecha

La *Stevia rebaudiana Bertoni* está en su máximo rendimiento momentos antes de la floración, es decir apenas comience a emitir botones florales (Fig. N° 2.4). Se cosecha regularmente durante todo el año, dependiendo del clima y del manejo de la plantación. El corte se realiza aproximadamente cada 4 meses, es decir se hacen 3 cortes al año según la experiencia obtenida en el Alto Paraná al norte de Argentina.

e) Rendimiento

Según estudios realizados en Argentina, tomando un promedio de 6 años de cultivo, se puede obtener entre 5500 y 6000 Kg de materia seca por hectárea y por año en la zona norte del país, y entre 3000 a 4000 Kg por hectárea y por año en la zona de Buenos Aires. Se determinó además, que la máxima cantidad de hojas que se puede cosechar ocurre entre el 3er y 4to año de iniciada la plantación, quedándose estacionada su cosecha hasta el 6to año para luego decrecer, momento en el cual se torna no rentable la plantación con fines comerciales (Fig. N° 2.5).

Figura N° 2.2: Hábitat natural de la *Stevia rebaudiana* Bertoni



Figura N° 2.3: Preparación del terreno



Figura N° 2.4 : Epoca de floración de la planta



Figura N° 2.5: Rendimiento de la planta por hectárea



2.6 PROPIEDADES DE LA HOJA

a) Edulcorante

La hoja de la *Stevia rebaudiana Bertoni* posee una mezcla de 8 glicósidos ditérbénicos, dos de los cuales tienen importantes principios edulcorantes estos son: el Esteviosido y el Rebaudiosido A, siendo el primero de ellos el de mayor importancia por tener un principio edulcorante no fermentativo aproximadamente 300 veces más dulce que el proveniente del azúcar de caña o de la remolacha.

En la actualidad se sabe que el Esteviosido es la sustancia natural más dulce extraído de un vegetal que puede ser cultivada comercialmente.

b) Medicinal

La hoja de *Stevia rebaudiana Bertoni* en infusiones como mate o como extracto tiene las siguientes propiedades medicinales:

Acción Hipoglicémica.- Mejora la secreción pancreática, estimulando la secreción de insulina, reduciendo el nivel de azúcar en la sangre de las personas diabéticas (Ovidio Miguel,1966)

Contra la obesidad.- El continuo uso de la hoja de *Stevia rebaudiana Bertoni* en infusiones disminuye la absorción de hidratos de carbono a nivel intestinal, actuando como adelgazante (Von Schmeling,1976)

Cardiotónico.- Se ha comprobado el valor benéfico que tiene la *Stevia rebaudiana Bertoni* para el funcionamiento regular de corazón. Su ingestión constante refuerza el sistema vascular (Von Schmeling,1976)

Acción Digestiva.-Sus propiedades diuréticas y antiácidas lo convierten en un mate digestivo por excelencia, al eliminar a través de las vías urinarias las toxinas acumuladas por mala alimentación (Ibarrola,1976)

Antirreumática.-No solamente regula el nivel del azúcar en la sangre, sino la ingestión frecuente de la hoja del kaa hee alivia los dolores reumáticos (Ibarrola,1976)

Anticaries.-Al no fermentar se le utiliza actualmente en dentífricos y gomas de mascar, ya que protege el esmalte dental al combatir las bacterias que producen las caries.

Combate la ansiedad.- Relaja el sistema nervioso, ideal para personas con bastante actividad cerebral para contrarrestar los ataques de ansiedad que induce a la depresión(Ibarrola,1976)

Efecto Dérmico.-El extracto de la *Stevia rebaudiana Bertoni* tiene la capacidad de revitalizar las células epiteliales, usándose como un limpiador profundo de la piel. Es muy efectivo sobre el acné, la dermatitis, la seborrea capilar, e inclusive se presume ser efectivo contra el cáncer de la piel.

Acción Microbacteriana.-La *Stevia rebaudiana Bertoni* es muy eficaz para controlar el desarrollo de bacterias y otros organismos infecciosos previniendo de cepas gripales insidiosas y atacando bacterias bucales, previniendo las caries dentales.

2.7 CONTENIDO EDULCORANTE

Según estudios realizados en la Universidad Estatal de Maringa en la República de Brasil, se puede extraer industrialmente un promedio de 5% de contenido edulcorante (Esteviosido) a partir de las hojas secas de *Stevia rebaudiana Bertoni* (esto se puede lograr en las variedades silvestres de la planta). Pero en Japón se ha determinado que en variedades mejoradas de la *Stevia rebaudiana Bertoni* se pueden obtener entre 10% a 22% de producto edulcorante con respecto a su peso seco.

Figura N° 2.6: Planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni de Cañete



Figura N° 2.7: Plantación de *Stevia rebaudiana* Bertoni en Cañete



Figura N° 2.8: Planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni de Cañete



CAPITULO 3

EL PRODUCTO - ESTEVIOSIDO

3.1 GENERALIDADES

En 1909 se conoció que existían dos principios edulcorantes en el extracto de hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni* merced a la comunicación efectuada por K. Dietrich, quien además estimó el poder edulcorante en 150 a 300 veces más dulce que la sacarosa. En los siguientes 20 años sólo se registraron menciones de escasa relevancia hasta que en 1931 se realiza en Francia el primer estudio científico importante de edulcorantes de la *Stevia rebaudiana Bertoni*, Al Bredel-R. Iavielle y Pomaret-R. Iavielle puntualizaron que el Esteviosido no era tóxico y que en efecto, era eliminado sin alteración luego de ser administrado oralmente. Posteriormente diversos investigadores, Wood y Col, Mosetigg y Col, aislaron y caracterizaron el Esteviosido mediante la determinación del punto de fusión. Luego publicaron un estudio sobre la aglucona, según la cual el steviol y el isosteviol son ácidos diterpenoides con un esqueleto del ciclo pentano perhidro fenantreno, finalmente en 1963 fijaron las configuraciones de ambos compuestos tal como se les aceptan hasta en la actualidad. Durante la Segunda Guerra Mundial (1941) el doctor Melville en Inglaterra, A. Gattoni en Paraguay (1945) y C. Samaniego en Argentina (1946), elaboraron informes y proyectos para la obtención del Esteviosido y su utilización industrial como edulcorante sustituto del azúcar. Solo Paraguay persistió en los trabajos y en 1966 la Facultad de Medicina de Asunción comunicó que podía usarse como edulcorante para diabéticos, al año siguiente suministró informes al XXIX Congreso de Diabetes realizado en Buenos Aires. En los últimos 20 años se han publicado numerosos trabajos experimentales especialmente en Brasil, EEUU y Japón, que conforman una extensa bibliografía dirigidos a estudiar características biológicas, aspectos metabólicos, permeabilidad de las membranas celulares, toxicidad y desarrollar mejores procesos de extracción, purificación, refinación, características funcionales y usos industriales de los edulcorantes extraídos de la *Stevia rebaudiana Bertoni*. Con muestras experimentales enviadas desde el Paraguay (1967) se iniciaron en Japón, estudios destinados a ponderar la aplicación de los extractos de *Stevia rebaudiana Bertoni* en alimentos y medicamentos en

reemplazo del azúcar. Actualmente se cultiva la *Stevia rebaudiana* Bertoni en Japón con excelentes rendimientos y se ha optimizado los procesos industriales de extracción y refinación. Los edulcorantes obtenidos, el Esteviosido y el Esteviosito con alto contenido de Rebaudiosido A, han sido aprobados para su uso en alimentos y medicamentos como edulcorantes intensos sustitutos del azúcar.

3.2 OBTENCION Y CARACTERISTICAS

a) **Obtención.**-Los edulcorantes derivados de la *Stevia rebaudiana* Bertoni se obtienen por procesos de extracción sólido-líquido.

b) **Características.**-Las características más destacadas del Esteviosido son: Es un polvo blanco cristalino, soluble en agua y en solventes orgánicos. Posee un sabor similar al de la sacarosa sin sabores residuales desagradables. Su poder edulcorante es alto, entre 250 y 300 veces al de la sacarosa.

3.3 PROPIEDADES

a) **Propiedades físicas.**-

- **Solubilidad.**- El Esteviosido es altamente soluble en el agua y solventes orgánicos, ésta solubilidad no es afectada por el pH. El Esteviosido no es higroscópico.
- **Resistencia al calor.**-El Esteviosido tiene una gran resistencia a las altas temperaturas y no sufre cambios en las condiciones habituales de los procesos industriales de alimentos.
- **Color.**-El color característico del Esteviosido es blanco, no acelera el proceso de pardeo, mientras que el azúcar o la glucosa aceleran esta reacción.
- **Osmosis.**-Presenta una acción osmótica más lenta que la de la sacarina.
- **Punto de fusión.**- Los cristales en estado de pureza funden a 238 °C.

- **Actividades ópticas.-** El Esteviosido es levógiro, con un ángulo de rotación específica de 31,8 grados para el producto anhidro.

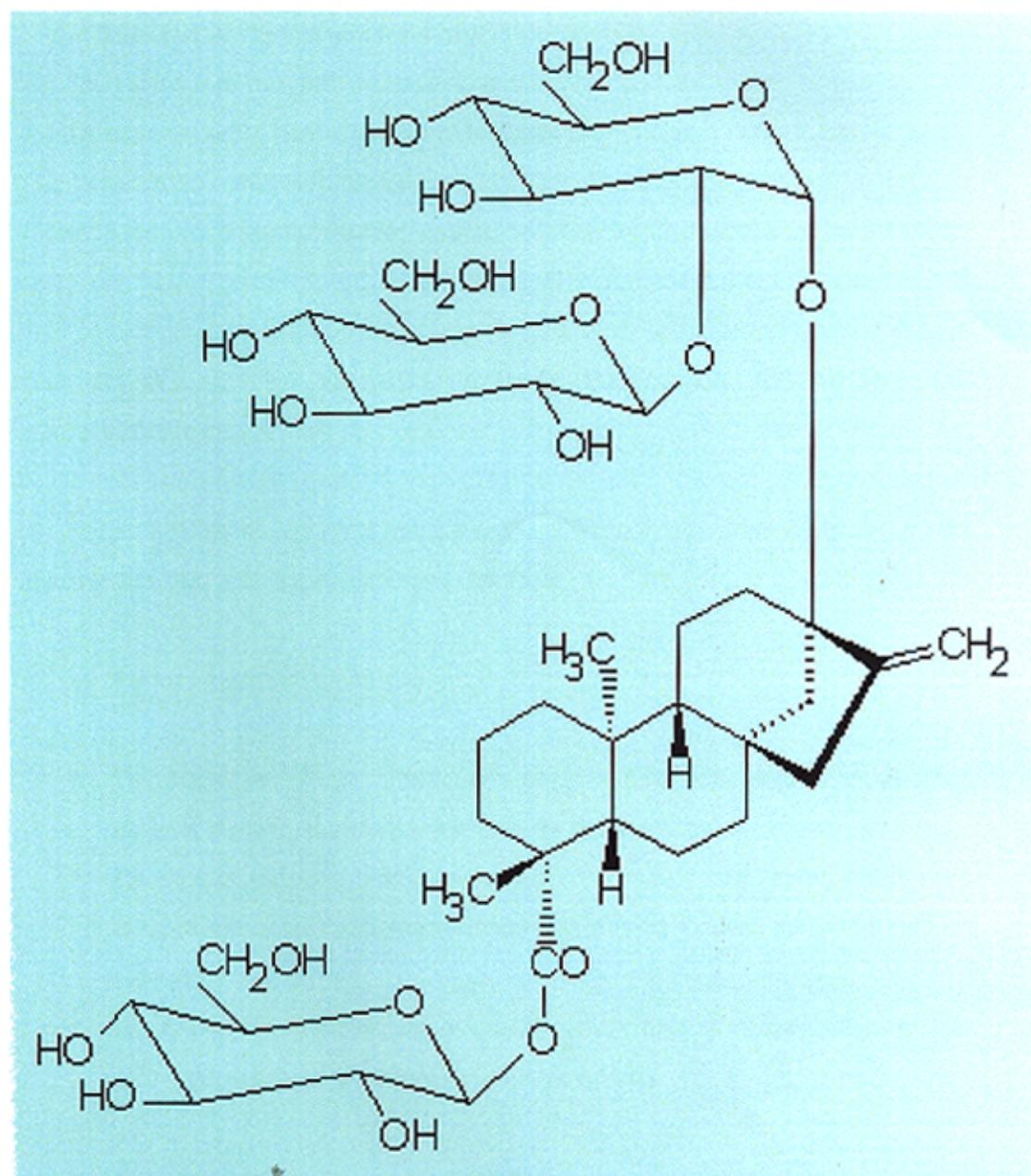
b) Propiedades Químicas.-

- **Influencia de los alimentos.-** El Esteviosido no afecta las propiedades de los alimentos, mientras que casi todos los otros sacáridos influyen en las propiedades de los alimentos.
- **Naturaleza química.-** Su fórmula química contiene un aglucona (stevial) y tres moléculas de glucosa con un peso molecular de 804,80 siendo su fórmula: C₃₈ H₆₀O₁₈ (Fig. N° 3.1).
- **Fermentación.-** Es característica del Esteviosido la no-fermentación.

3.4 COMPOSICION

El producto cristalizado y purificado obtenido a partir del extracto altamente refinado está constituido en su mayor parte por el Esteviosido que es un glucósido diterpeno compuesto por glucosa, soforosa y steviol (diterpeno tetracíclico) contiene además otros productos edulcorantes como el Rebaudiosido A y en menor proporción Rebaudiosido C y dulcósido A . La composición de los edulcorantes obtenidos de la *Stevia rebaudiana Bertoni*, se regulan y controlan mediante cromatogramas realizados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía de capa fina (TLC).

Figura N° 3.1: Estructura del Estevisido



3.5 ESPECIFICACIONES

Según el código alimentario argentino: artículo número 1398 inciso 64,3. El Esteviosido es un polvo blanco, cristalino, inodoro, no higroscópico, no fermentable de sabor dulce, son en soluciones muy diluidas 300 veces más dulce que la sacarosa y muy soluble en agua. El Esteviosido como principio activo fue llamado así por primera vez, de acuerdo con las normas aprobadas en el año de 1931 por "LA UNION INTERNACIONAL DE QUÍMICA EN DINAMARCA".

3.6. EVALUACIÓN DE SEGURIDAD PARA EL CONSUMO DE ESTEVIOSIDO

La inocuidad de los extractos de *Stevia rebaudiana Bertoni* y del Esteviosido han sido confirmado por dos vías.

a) Por su experiencia en uso.-

- Las hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni* han sido usadas en infusión durante cientos de años por los nativos sudamericanos.
- En algunos casos la planta es de cultivo doméstico en Japón, sus hojas y extractos se usan cotidianamente como infusión y como endulzante de los alimentos
- No existe hasta ahora, conocimiento ni evidencia epidemiológicas que informen sobre problemas derivados de su uso.

b) Por la experimentación científica.-

- Numerosos trabajos experimentales informan sobre la alta tasa de seguridad de los edulcorantes obtenidos de las hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni*. En Japón se realizan periódicas reuniones

generales sobre la *Stevia rebaudiana Bertoni*, cuyos informes confirman los resultados de las investigaciones emprendidas.

- Existen publicaciones de las reuniones generales sobre *Stevia rebaudiana Bertoni* de los años 1981 y 1984 realizados en Japón en donde se abordan con rigor las investigaciones y alcances referidas a la seguridad de los edulcorantes derivados de la *Stevia rebaudiana Bertoni*.
- Existen trabajos que se llevaron a cabo con el auspicio del Ministerio de Bienestar y del Ministerio de Agricultura, Bosques y Pesca, apoyados por organizaciones privadas del Japón; los cuales aseguran el uso del Esteviosido en la elaboración de alimentos (aditivo alimenticio) y como edulcorante para consumo humano. Los distintos estudios fueron realizados por investigadores gubernamentales privados en las siguientes universidades y centros especializados de Japón: Universidad de Hokkaido, Universidad de Kush, Universidad de Doshiba y la Universidad de Kobe.

CAPITULO 4

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Debido a no contar con un procedimiento determinado para realizar la extracción y purificación del Esteviosido a partir de las hojas de la *Stevia rebaudiana Bertoni*, se tuvo que experimentar usando solventes polares como el etanol, metanol y agua. Luego de encontrar un procedimiento adecuado se procederá a determinar el diseño experimental del proyecto, además al no contar con información suficiente que nos permitieran identificar dicha sustancia se tuvo que realizar comparaciones con una muestra de Esteviosido referencial usándose para ello la Cromatografía de Capa Fina (TLC) y la Espectroscopia UV.

4.1 ENSAYO EXPLORATIVO

a) Extracción con Etanol

- Se preparan 50g. de hoja seca y se colocan en un soporte de tela para luego proceder a lavarlas con n-hexano, buscando extraer grasas, carotenos y clorofila, obteniéndose así una solución amarillenta.
- Las hojas lavadas con n-hexano son escurridas y luego secadas al medio ambiente para permitir la evaporación del solvente.
- Se hace la extracción del Esteviosido contenido en las hojas con un volumen de etanol, lavando las muestras de 3 a 4 veces, tornándose la solución a un color verde transparente intenso, usando 1,4 l. en promedio de solvente.
- Se repite la operación anterior, preparándose para ello 3 muestras adicionales de hojas con 53, 51, 52 g. respectivamente.
- Las soluciones alcohólicas de extracto de Esteviosido son concentradas en un destilador convencional de 3 litros de capacidad, para separar el alcohol y reducir el volumen de la solución.
- Se hace una segunda concentración en un rotaevaporador luego de haberse reducido el volumen de la solución alcohólica en una primera concentración (hasta 1 litro aproximadamente). El resultado es un

concentrado de Esteviosido de consistencia viscosa y de color verde oscuro, la misma que fue guardada en un recipiente y conservada en frío.

b) Purificación por Cromatografía de Columna

- La purificación se hace por Cromatografía de Columna, para ello se procede a preparar una columna con empaque de yeso (lavado con etanol).
- La cromatografía se desarrolla añadiendo 1 ml. aproximadamente de extracto de Esteviosido usando como fase móvil n-hexano y etanol.
- Se recogió en viales muestras aproximadas de 2ml., a medida que la muestra de extracto avanzaba en la columna cromatográfica, se observó un cambio de coloración por capas (Posible separación de componentes del extracto).
- Las muestras recogidas en viales presentaron las siguientes características: Del vial N° 1 al 3 las muestras fueron incoloras, del vial N° 4 al 6 las muestras cambiaron a un color ámbar, del vial N° 7 al 14 las soluciones se tornaron a un color verde oscuro, del vial N° 15 al 19 las soluciones cambiaron de nuevo al color ámbar; a partir del vial N° 20, las muestras presentaron una coloración ámbar claro y lo más importante estas muestras registraron un sabor muy dulce (ver cuadro N° 3.1).
- Se tomó la muestra del vial N° 32 para realizar una prueba de cromatografía en capa fina para determinar la presencia del Esteviosido, usando como revelador Sulfato de Cerio, luego la muestra fue vista a través de la luz ultravioleta donde se observó:

Cromatografía de Capa Fina

Una huella de color verde que indicaría la presencia de resinas o grasas, otra huella roja que mostraría la presencia de la clorofila y finalmente una huella celeste que indicaría la presencia del Esteviosido.

Cuadro N° 4.1: Resultados de la Cromatografía de Columna

Muestras	Color	Sabor dulce
1-3	Incoloro	no
4-6	ámbar	no
7-14	Verde oscuro	no
15-19	ámbar	no
20-32	Ámbar claro	Sí

C) Extracción con agua y metanol

Debido que el procedimiento anterior era muy lento y otorgaba a la solución de Esteviosido una coloración verdosa producto de la presencia de la clorofila en las hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni*, se optó por cambiar el método de extracción utilizando como solventes agua y metanol.

El procedimiento empleado para este ensayo fue el siguiente:

- Se carga 8,2 g. de hojas secas de *Stevia rebaudiana Bertoni* con 1,2 L de agua destilada.
- Se extrae el Esteviosido durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se filtra la solución acuosa y se obtiene la primera solución de Esteviosido.
- Se procede a concentrar la solución, empleando la vaporización al ambiente ayudado por un medio que amplíe el área de contacto de evaporación, para ello se colocó un material de soporte absorbente que arrastre la solución hacia arriba, dicho material de soporte es previamente colocado en cordeles previamente preparados (Similar a una Cromatografía de Capa Fina).
- Se deja evaporar la solución acuosa al medio ambiente permitiéndose el arrastre del Esteviosido y otros componentes al difundirse sobre el material de soporte, el agua se evapora y los componentes sólidos son retenidos en dicho material, la difusión de la solución acuosa fue satisfactoria hasta la mitad del recorrido del material de soporte.

- Para mejorar la difusión de la solución acuosa y por consiguiente la retención del Esteviosido en el material de soporte, se roció la misma solución acuosa por la parte superior del soporte, de esta forma se logra una mejor difusión de la solución en sentidos contrarios.
- Se deja secar el material de soporte, observándose un cambio de coloración en el material a un color crema, con una formación de capas en su superficie de color verde, como si fuese una cromatografía de capa fina.
- Una vez seco el material de soporte con el Esteviosido concentrado en este, se procede a extraer dicho componente activo con metanol. El resultado fue obtener una solución metanólica de Esteviosido de color verde claro.

Con este método de extracción se evita arrastrar en exceso la clorofila contenida en las hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni*, además se aprovecha la evaporación natural del agua para poder concentrar el Esteviosido en el material de soporte, finalmente se logra obtener una solución metanólica de Esteviosido más clara que la solución etanólica anteriormente obtenida.

4.2 DESCRIPCION DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL SELECCIONADO

Considerando las evaluaciones previas tanto para la separación y purificación del Esteviosido a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni*, se tiene que el uso del etanol como solvente de extracción no es recomendable debido a su mayor capacidad de extracción de clorofila, dificultando de esta forma la separación del Esteviosido. Además la presencia de la clorofila dificulta el uso de la Cromatografía de Columna como método de purificación, de esta manera se elige como primera etapa del proceso la extracción acuosa, seguida de una purificación con metanol, para luego concentrar la solución y cristalizar el Esteviosido.

Así las operaciones a realizarse son descritas a continuación:

a) Extracción Acuosa

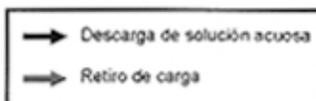
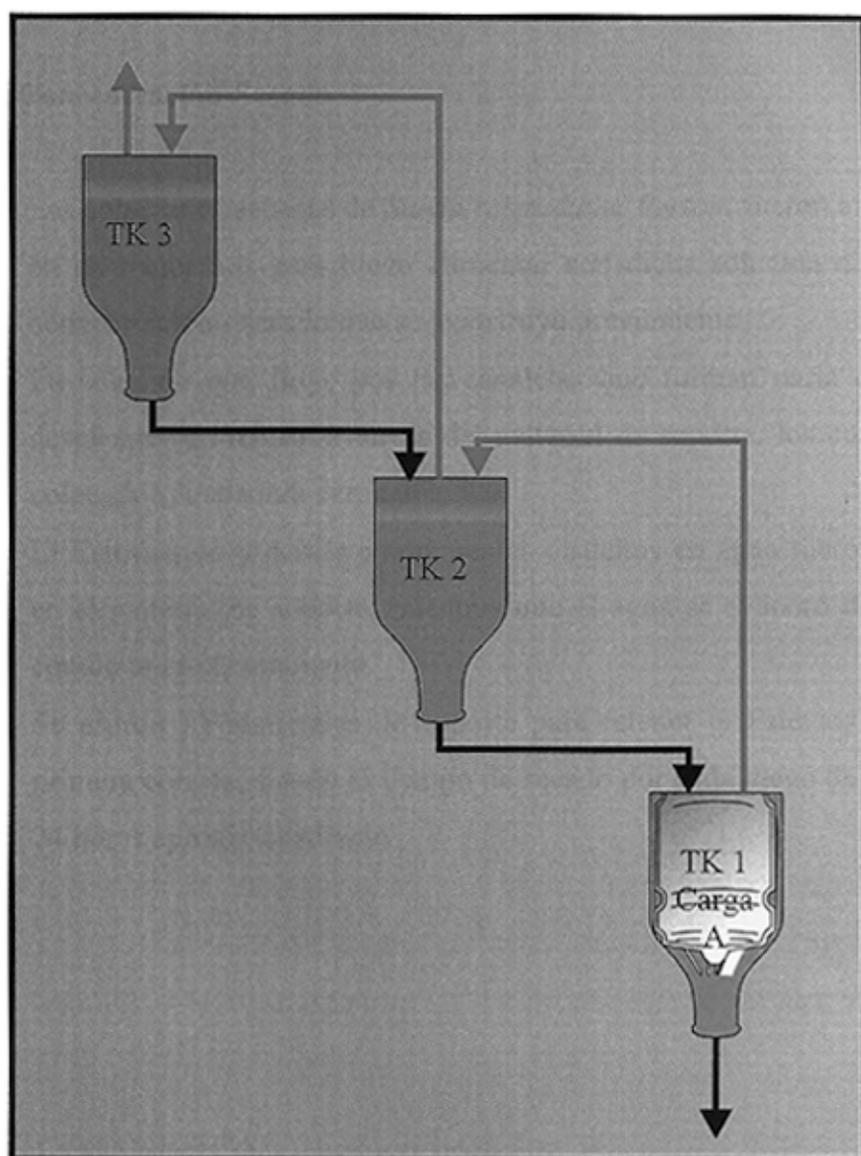
- Se preparan soluciones acuosas de *Stevia rebaudiana Bertoni* en extractores previamente construidos, para ello se sigue la siguiente secuencia de extracción variando el tiempo de extracción en cada tanque (Cuadro N° 4.2 y Fig. N° 4.1).

Cuadro N° 4.2: Algoritmo secuencial para la extracción acuosa

TK N° De Operaciones	1	2	3	Salida de cargas
1	Carga A + Agua pura			
2	Carga B + Solución 2	Carga A + Agua pura		
3	Carga C + Solución 2	Carga B + Solución 2	Carga A + Agua pura	
4	Descarga Solución 2			Descarga A
5	Carga A + Solución 2	Carga C + Solución 3	Carga B + Agua pura	
6	Descarga Solución 2			Descarga B
7	Carga E + Solución 2'	Carga A Solución 3	Carga C Agua pura	
8	Descarga Solución 2'			Descarga C

Figura N° 4.1: Diagrama de Extracción Acuosa

DIAGRAMA DE EXTRACCION ACUOSA



- Se prepara 4 bolsas de tocuyo, con 40 g. de hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni* en las tres primeras bolsas y 30 g. en la cuarta, completando 150 g. de materia prima. El tiempo de extracción en cada tanque fue de 20 minutos, cada tanque tuvo una capacidad de 1,2 L y el solvente de extracción utilizado fue agua destilada.

b) Concentración-Secado

- Las soluciones acuosas de *Stevia rebaudiana Bertoni* fueron almacenadas en un recipiente, para luego alimentar con dicha solución al equipo de concentración - secado que se construyó previamente.
- La solución que fluye por las canaletas que forman parte del equipo, desciende por rebose a través del material de soporte. los cuales fueron colocados de manera vertical.
- El Esteviosido y demás componentes disueltos en agua fueron retenidos en el material de soporte, mientras que el agua se evaporó debido a las condiciones del ambiente.
- Se usaron 12 materiales de soporte para retener el Esteviosido en esta primera corrida, siendo el tiempo de secado por cada juego de 4 soportes, 24 horas aproximadamente.

c) Extracción Metanólica

- Una vez obtenido los materiales de soporte secos con el Esteviosido retenido en estos, se procede a extraer dicho componente con metanol, para ello se realizan dos tipos de extracciones: En frío y en caliente.

c.1) Extracción en frío:

Se lavan los materiales de soporte en un extractor de vidrio, utilizando para ello 400 ml de metanol por cada uno, lavando 5 veces el material con el mismo solvente, en un lapso de tiempo de 3 minutos por cada lavada.

c.2) Extracción en caliente:

Esta vez el material de soporte es lavado con metanol calentado previamente en baño María, a una temperatura promedio de 40 °C, dicho solvente es usado para lavar 3 veces cada material, en el mismo lapso de tiempo que en la extracción en frío.

d) Concentración Metanólica

- La solución metanólica de Esteviosido presentó coloración verde. Para concentrar dicha solución se usó un rotaevaporador, el cual nos permitió obtener una concentración más uniforme.

e) Cristalización *

- La solución concentrada de Esteviosido es cristalizada aprovechando la disminución de temperatura, observándose precipitados de consistencia gelatinosa en el fondo del cristalizador. Para facilitar la operación se colocan los cristalizadores a baja temperatura.

- Una vez conseguida la formación de precipitados en el cristizador, se procede a distribuir el contenido en viales para mejorar la cristalización. Para ello se centrifuga el contenido de los viales buscando hacer más compacto la formación de sólidos, una vez conseguido ello, se busca evacuar el metanol remanente en los viales hasta un punto tal, en que la cantidad de metanol sea mínima.

f) Secado

- Luego de haber logrado la evacuación del metanol de los precipitados presentes en los viales, se procede al secado de los mismos en un desecador, evitando llevarlos a la estufa para evitar que se degraden los otros componentes que acompañan al Esteviosido.

g) Recristalización

- Para mejorar la apariencia de los sólidos obtenidos se procedió a lavarlos con etanol frío, disolviéndolos posteriormente y realizando una nueva cristalización.

El procedimiento descrito se realizó para 7 muestras de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni y a excepción de la primera corrida experimental, en donde los sólidos obtenidos se disolvieron al hacerlos secar en una estufa a 60°C, en el resto se logró obtener sólidos de diferentes coloraciones. (Cuadro N° 3.3).

Cuadro N° 4.3:Resultados de las corridas experimentales realizadas en laboratorio

Condiciones Muestra	W(g) Hoja seca	Tiempo (h) Extracción acuosa	Extracción metanólica		N° de lavadas		W (g)		% W	
			Frío	Caliente	Frío	Caliente	Frío	Caliente	Frío	Caliente
1	150	1,2	√		5		5		3,3	
2	120	6,0	√	√	5	4	4	10	3,3	8,33
3	113	3,3	√	√	6	3	3		2,5	
4	120	3,0	√		4			15		12,5
5	150	6,0	√	√	10	4	4		2,67	
6	120	3,0		√		5		17		14,17
7	150	4,67		√		5		11		7,33

4.3 CARACTERIZACION DEL ESTEVIOSIDO

Para realizar la caracterización del Esteviosido se ha utilizado la técnica de la Cromatografía en Capa Fina (TLC), usando para ello una muestra de Esteviosido patrón de origen comercial como referencia (Fig. N° 4.2), el mismo que presenta una huella de color gris y los contornos de color verde oliva (Fig. N° 5.4, PP). Esta huella patrón nos servirá como indicador para saber si las muestras obtenidas durante el proceso de extracción corresponden al producto deseado, así mientras perdure la presencia de esta huella gris en las placas de aplicación confirmaremos la presencia del Esteviosido. Inclusive con ello se puede determinar el número de extracciones que serán necesarios en las diferentes etapas del proceso, ya que se podrá determinar en forma cualitativa el momento en el cual deja de presenciarse las huellas del Esteviosido.

Figura N ° 3.2: Muestra de Steviosido chino referencial



La metodología usada para realizar la Cromatografía en Capa Fina es la siguiente:

- Emplear placas de dimensiones 2,5 x 7 cm con sílica gel 60G de Merck.
- Colocar en tubos de ensayo 10 ml de solución muestra a analizar, según sea la etapa del proceso.
- Hervir moderadamente hasta concentrar la solución a 0,5 ml aproximadamente (casi a sequedad).
- Terminada la ebullición lavar el tubo con 1 ml de metanol 2 veces y vaciar el contenido a un vial.
- Dejar evaporar el solvente hasta tener 0,5 ml aproximadamente.
- Sembrar gota a gota con un capilar el contenido de las muestras sobre una placa cromatográfica.
- Correr el Cromatograma empleando como solvente de arrastre una solución de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ en la siguiente proporción: 90:65:9, respectivamente.
- Retirar las placas cuando el solvente llegue aproximadamente a 1 cm del extremo superior de la placa, para luego dejarlas secar al ambiente.
- Rociar con un revelador apropiado las placas conteniendo las muestras preparadas, para nuestro trabajo se usaron la Fenilhidracina y el Acido Sulfúrico como reveladores (Fig. N° 3.3).
- Calentar las muestras reveladas, luego de haber dejado que sequen al ambiente a una temperatura de 80 °C.

La preparación de la muestra patrón a partir del Esteviosido referencial de fuente comercial (origen chino) siguió la misma metodología descrita solo que previamente se preparó una solución de esta muestra en una relación de 1:20 en volumen.

Figura N°4.3: Materiales empleados en Cromatografía de capa fina



CAPITULO 5

RESULTADOS EN EL PROCESO DE OBTENCION DEL ESTEVIOSIDO

Luego de haber experimentado extracciones de la hoja seca de *Stevia rebaudiana Bertoni* con solventes como el n- hexano, alcohol etílico y agua destilada para extraer el Esteviosido, se llegó a la conclusión de que sólo era necesario realizar una simple extracción acuosa, dada la gran solubilidad del Esteviosido en este solvente. A continuación se buscó la forma de retener dicho componente en un medio determinado (material de soporte), una vez hecho esto, se procedió a evaporar el agua absorbida por el material de soporte, aprovechando las condiciones ambientales. Luego de obtener el material de soporte seco, se procedió a extraer el Esteviosido utilizando un solvente polar como el metanol a una temperatura recomendable (40 °C), el cual nos permitió obtener el Esteviosido en una solución metanólica la misma que fue concentrada en un rotaevaporador, para finalmente, cristalizar dicha solución obteniéndose de esta forma los primeros sólidos que demostrarían la presencia del Esteviosido, formando parte de una mezcla de glicósidos y algunas resinas.

5.1 OPERACIONES DEL PROCESO

a) Secado de las hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni*.-

Una vez recogidos los tallos con hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni*, se proceden a hacerlas secar al ambiente durante un lapso de 4 a 7 días. Es preferible no secar las hojas en la estufa, dado que podrían degradarse algunos componentes de las hojas.

Tabla de datos N° 4.1: Secado natural de las hojas

Peso total de la hoja de Stevia (g)	Tiempo (h)
891	0
836,5	19,33
823,5	21,56
725	23,49
639,5	43,82
591	46,32
578	47,07
564,5	47,99
556	48,71
432,3	94,71
380	126,2
379	127,87
378	130,87
378	154,87

Figura N° 5.1: Variación del peso de la hoja de *Stevia rebaudiana Bertoni* con respecto al tiempo

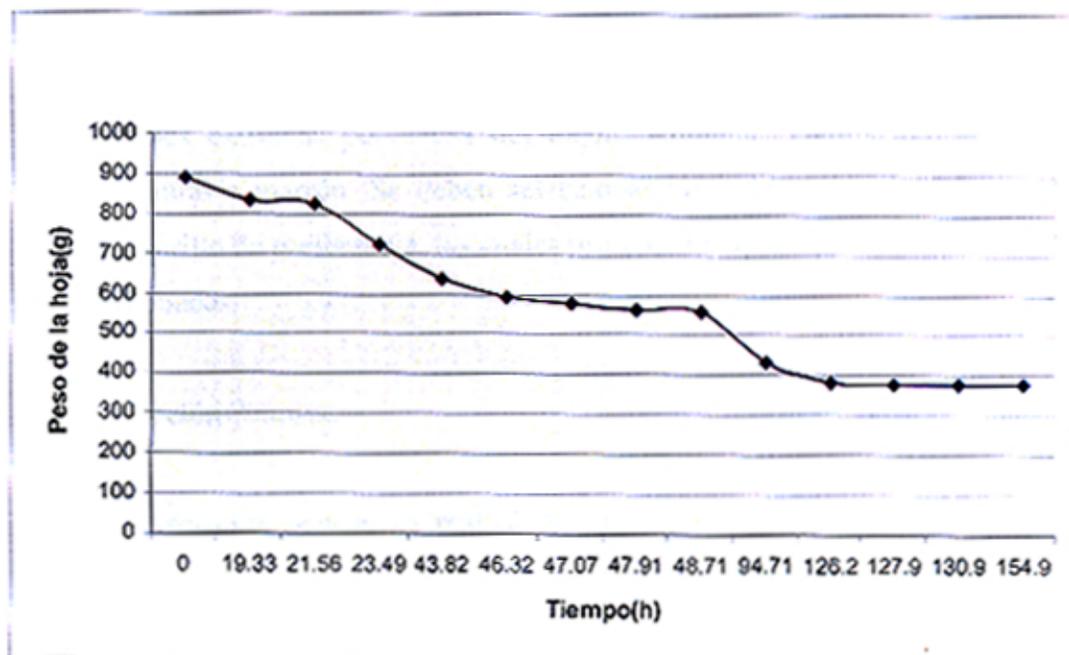


Figura N° 5.2 : Secado de hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni*



b) Selección de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.-

Luego de secar las hojas, se procede a separar aquellas que hayan sufrido oxidaciones extremas por causa del medio ambiente, cambiando su color verde natural a marrón. Se deben seleccionar las hojas secas de coloración verde amarillo de preferencia, las cuales presentan mayor sensación de dulzura al ser probadas.

c) Extracción Acuosa.-

La extracción acuosa se realizó en medio frío y caliente usando agua destilada o desionizada, se optó por este tipo de extracción debido a la buena solubilidad del Esteviosido en el agua y al poco arrastre de clorofila proveniente de las hojas. La extracción se realizó en etapas por lote variando diversos parámetros como la carga de hojas, volumen de agua, tiempo y temperatura de operación (Fig. N° 5.3).

Para la identificación y selección del número de etapas que serían recomendables realizar, se efectuaron dos experimentos considerando el tiempo de extracción y el número de etapas como parámetros de trabajo, la relación carga /volumen de solvente se estableció en 50 g/l, al considerar que este volumen era el requerido para cubrir toda la carga. Así se realizaron las siguientes pruebas:

Figura N° 5.3: Extracción acuosa por etapas



- En un primer experimento se prepararon 6 muestras de solución acuosa de hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni* recogidas cada 8 minutos, usándose para ello 50 gramos de hojas secas en 1 litro de agua destilada. Luego de realizarse la Cromatografía se descubrió que a partir del minuto 24 la extracción del Esteviosido no presentaba cambios significativos.(Fig. N° 5.4, A1-A6)

Cuadro N° 5.1: Resultados en la extracción acuosa-Tiempo de extracción

Tiempo de extracción (min)	Resultados obtenidos en los cromatogramas	Existencia de Esteviosido
8	Presencia de huella naranja (A1)	No
16	Presencia de huella naranja (A2)	No
24	Aparición de huella gris, presencia del Esteviosido (A3)	Si
32	Aparición de huella gris de mayor intensidad (A4)	Si
40	Aparición de huella gris de la misma intensidad a la anterior (A5)	Si
48	Aparición de huella gris de la misma intensidad a la anterior (A6)	Si

- El segundo experimento sirvió para determinar el número de extracciones apropiadas que se deberían realizar en la extracción acuosa, para ello se prepararon soluciones con 50 gramos de hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni* en 1 litro de agua destilada pero esta vez se cambiaron los solventes, recogiéndose 6 muestras cada 10 y 20 minutos respectivamente, obteniéndose como resultado luego de haberse practicado la Cromatografía que el número de extracciones adecuadas fue 4, debido a que luego de observar las siguientes placas cromatográficas, estas disminuían en intensidad de color (color gris de acuerdo a la muestra patrón), indicándose así la menor presencia de Esteviosido en las muestras (Fig. N° 5.5, B1-B6 y Fig. N° 5.5, C1-C6).

**Cuadro N° 5.2: Resultados en la extracción acuosa - N° de etapas
 óptimo Tiempo de extracción = 10 minutos**

Número de etapas	Resultados obtenidos en los cromatogramas	Existencia de Esteviosido
1	Aparición de huellas gris y naranja (B1)	Si
2	Aparición de huellas gris en mayor intensidad y naranja (B2)	Si
3	Aparición de huella gris en mayor cantidad e intensidad acompañada de una huella naranja (B3)	Si
4	Aparición de huella gris de mayor intensidad y sin la presencia de la huella naranja (B4)	Si
5	Aparición de huella gris en menor intensidad y cantidad, acompañada con huellas naranjas (B5)	Si (menor intensidad y cantidad)
6	Aparición solo de huella naranja rodeada de un color verde oliva (B6)	No

Cuadro N° 5.3: Resultados en la extracción acuosa-N° de etapas óptimo
Tiempo de extracción = 20 minutos

Número de etapas	Resultados obtenidos en los cromatogramas	Existencia de Esteviosido
1	Aparición de huellas gris y naranja (B1)	Si
2	Aparición de huellas gris en mayor intensidad y naranja (B2)	Si
3	Aparición de huella gris en mayor cantidad e intensidad acompañada de una huella naranja (B3)	Si
4	Aparición de huella gris de mayor intensidad y sin la presencia de la huella naranja (B4)	Si
5	Aparición de huella gris en menor intensidad y cantidad, acompañada con huellas naranjas (B5)	Si (menor intensidad y cantidad)
6	Aparición solo de huella naranja rodeada de un color verde oliva (B6)	No

Figura 5.4: Huella del producto patrón y cromatografía de la extracción acuosa (Tiempo de extracción)

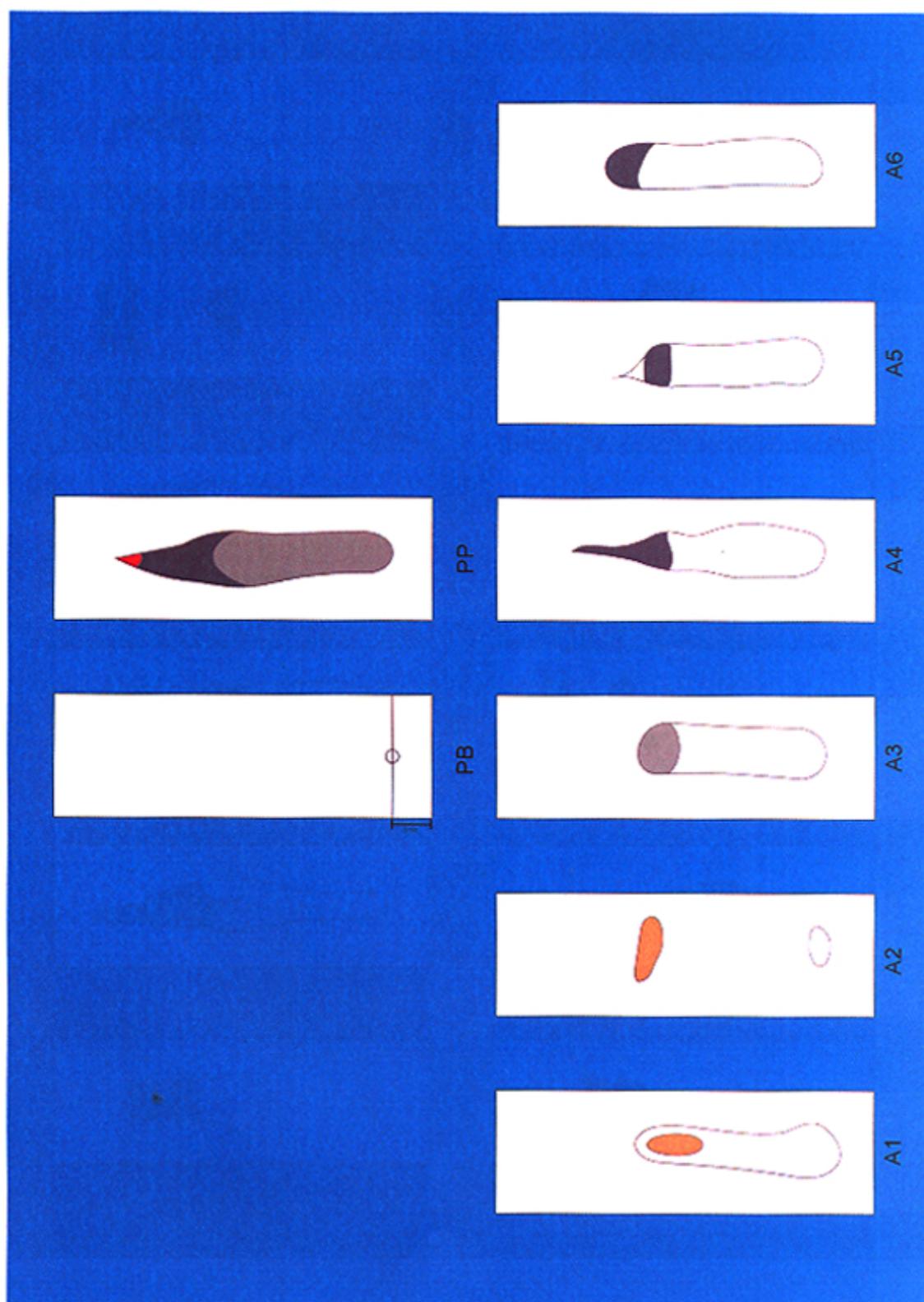
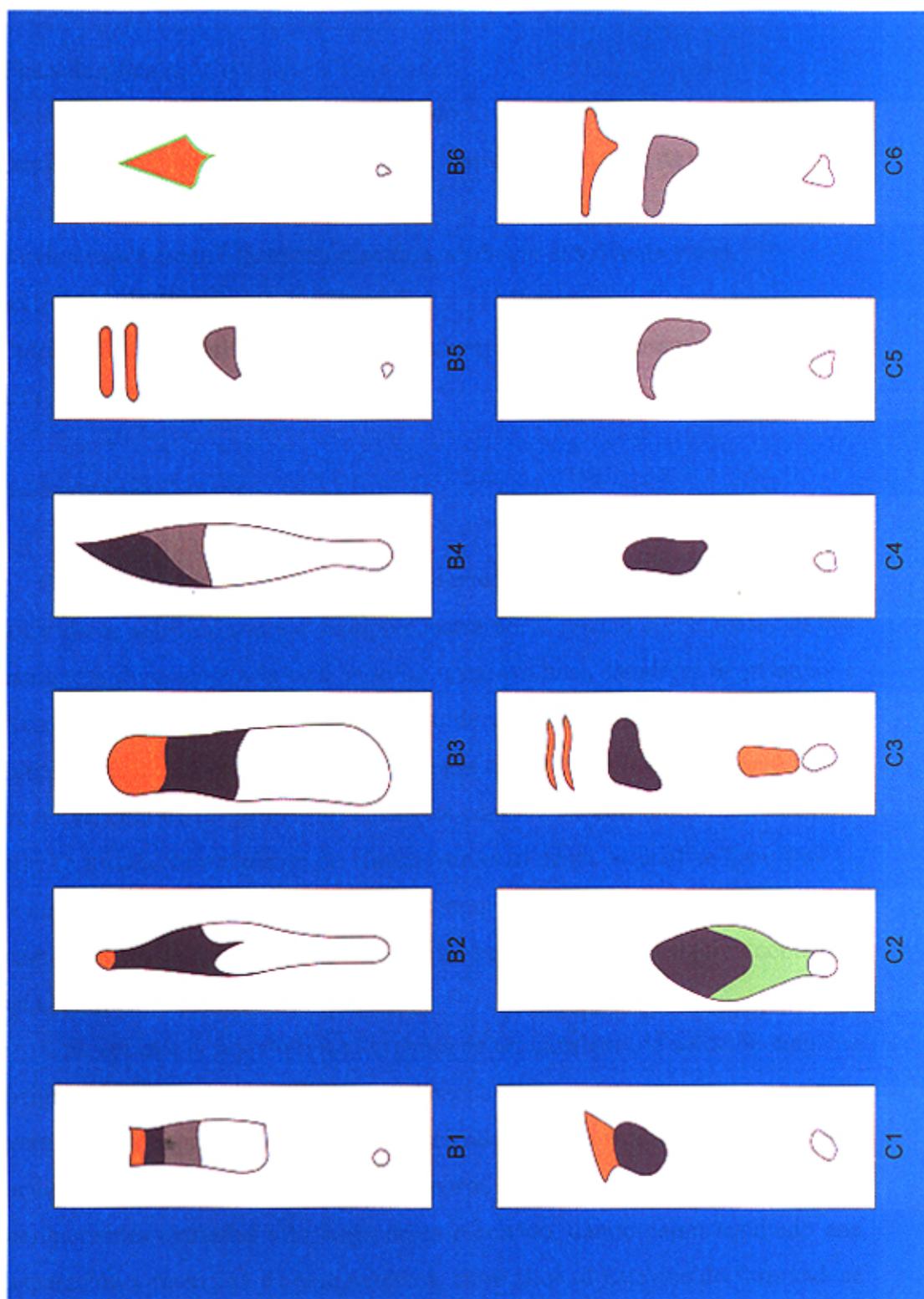


Figura 5.5: Cromatografía en la Extracción acuosa-Nº de etapas óptimo



Terminología de los Cromatogramas

PB: Placa de sílica gel

PP: Huella del producto patrón de Esteviosido.

Ai: Corrida experimental-Extracción acuosa, variando el tiempo de extracción (cada 8 minutos), $i = 1$ al 6.

Bi: Corrida experimental-Extracción acuosa, variando el solvente y con extracciones cada 10 minutos, $i = 1$ al 6.

Ci: Corrida experimental-Extracción acuosa, variando el solvente y con extracciones cada 20 minutos, $i = 1$ al 6.

d) Concentración-Secado.-

Obtenida la solución acuosa de Esteviosido se procedió a concentrar y secar dicha solución sobre el equipo construido, el mismo que consiste en una estructura de madera a la cual se le ha instalado unas canaletas de plástico, a dichas canaletas se le colocó un material de soporte previamente seleccionado (Fig. N° 4.6). Esta operación mixta se logra haciendo fluir la solución a través de un sistema de irrigación por canaletas construidas con tubos de PVC, para ello se instala un recipiente de almacenamiento desde el cual se hace fluir la solución acuosa a través de delgadas mangueras de plástico, aprovechando la energía potencial proporcionada por la altura de la solución líquida contenida en el recipiente.

Una vez que el líquido llega al rebose de las canaletas, la solución empieza irrigar al material de soporte previamente colocados en una disposición vertical a lo largo de las canaletas, iniciándose así la difusión de la solución acuosa a través del material de soporte, el mismo que absorberá los componentes extraídos a lo largo de su recorrido, dando como resultado una separación y retención de componentes, entre ellos el Esteviosido formándose capas muy parecidas a las que se presentan en una cromatografía de capa fina. De acuerdo a lo observado el Esteviosido se concentra en mayor proporción

en la parte inferior del material de soporte, considerándose que la difusión acuosa en dicho material se realiza en forma descendente (Fig. N° 5.7).

Paralelamente a la difusión de la solución acuosa en el material de soporte se lleva a cabo el secado de las mismas, consiguiéndose que se evapore el agua, para ello se aprovecha las condiciones ambientales del medio.

Este método puede ser muy bien adaptado en medios secos y alto andinos, debido a su buena disposición para aprovechar la baja presión atmosférica y baja humedad que presentan dichas zonas geográficas, las cuales favorecerían las condiciones operativas en la operación de secado.

Figura N° 5.6 : Distribución del material de soporte

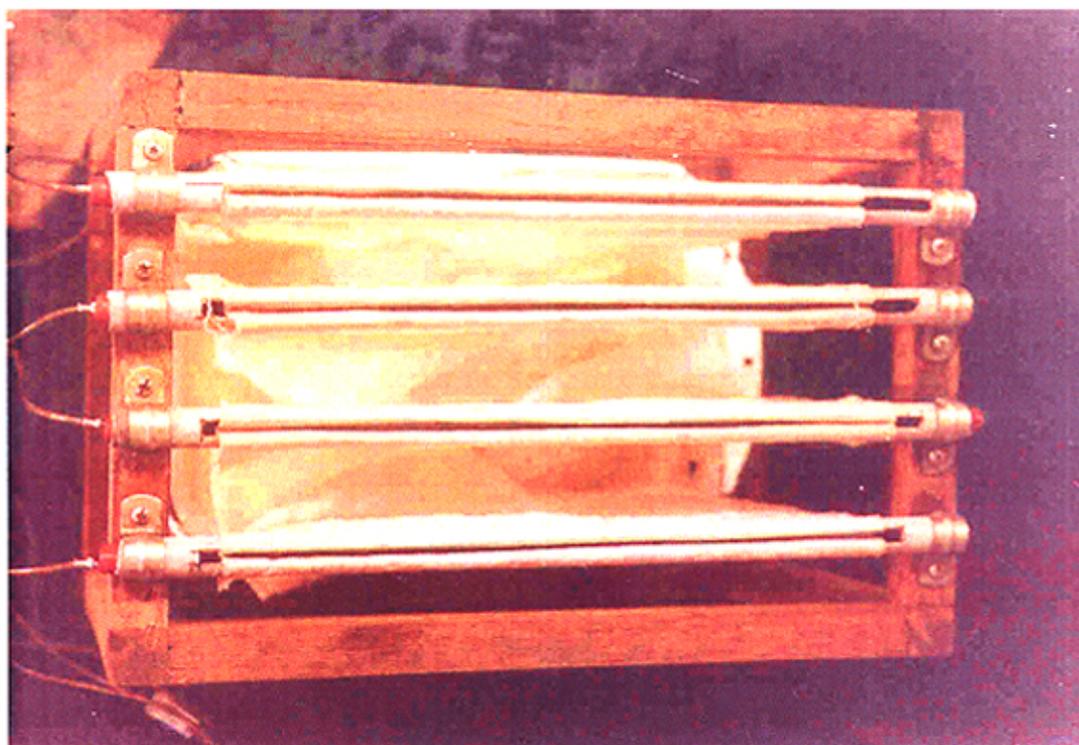


Figura N° 5.7: Equipo de Concentración – Secado



e) Extracción Metanólica.-

Una vez obtenido el material de soporte con el Esteviosido retenido en este, se procede a extraer el Esteviosido con un solvente polar como el metanol, el mismo que presenta ventajas operativas como su bajo punto de ebullición y su bajo poder extractivo de clorofila presente en el material de soporte. La operación se realizó en un extractor de vidrio convencional, que aprovecha la diferencia de nivel para descargar la solución metanólica, en éste se introduce uno por uno los materiales de soporte para luego añadir el metanol y llevar a cabo la extracción de los componentes, de esta forma se obtiene una solución metanólica de Esteviosido de color verde claro y transparente (Fig. N° 5.10).

La extracción metanólica se llevo a cabo a una temperatura promedio de 40 °C, esto debido a los resultados observados en la evaluación preliminar realizada durante el desarrollo experimental en donde se obtuvo una mejor extracción del Esteviosido tanto en lo cualitativo como en lo cuantitativo.

La extracción en caliente es llevada a cabo con metanol calentado previamente en baño maría en un rango de temperatura de 40 a 45 °C, esto para evitar de que el solvente se evapore, dicho metanol luego es utilizado para lavar el material de soporte, obteniendo una mejor extracción del Esteviosido en un menor número de lavadas, esto es entre 3 a 5 lavadas, esto se puede comprobar al verificar sus propiedades organolépticas (sabor dulce del material de soporte luego de haber hecho la extracción) y a la prueba de Cromatografía en TLC realizada en la caracterización.

Al igual que en la extracción acuosa se realizaron dos experimentos para determinar la presencia del Esteviosido en las muestras obtenidas, en el primer experimento se procedió a recoger 5 muestras de solución metanólica cada 5 minutos provenientes del lavado de materiales de soporte con aproximadamente 450 ml de metanol calentado a 40 °C, observándose en dichas muestras la presencia de unos sólidos blanquecinos, los mismos que fueron precipitados y separados vía una centrifugación, obteniendo 2 tipos de muestras una sólida y otra líquida a las cuales se les practicó la correspondiente Cromatografía (Fig. N° 5.8, D1-D5 y Fig. N° 5.8, E1-E5), dando como resultado que la extracción del Esteviosido con el metanol es rápida ya que a los 5 minutos la presencia de las huellas es marcada, manteniéndose constante a lo largo de todas las placas; para corroborar la presencia del Esteviosido en las muestras se realizó la Cromatografía a las soluciones metanólicas sin separar los precipitados formados, obteniéndose una presencia de huellas en todas las placas, pero esta vez la forma de las huellas eran heterogéneas (Fig. N° 5.9, F1-F5).

En el segundo experimento se procedió a recoger 5 muestras de solución metanólica procedente del lavado de un material de soporte, cambiando el solvente y en un lapso de 10 minutos entre cada muestra, al aplicárseles la Cromatografía se observó que hasta la cuarta placa la presencia de la huella de Esteviosido era notoria, concluyéndose con ello que el número de extracciones que deberían realizarse son 3 (Fig. N° 5.9, G1-G5).

Cuadro N° 5.4: Resultados en la extracción metanólica-N° de etapas óptimo, Tiempo de extracción = 10 minutos

Número de etapas	Resultados obtenidos en los cromatogramas	Existencia de Esteviosido
1	Aparición de huellas gris, verde oliva y naranja (G1)	Si
2	Aparición de huellas gris (mayor intensidad), verde oliva y naranja (G2)	Si
3	Aparición de huella gris en la misma intensidad a la anterior acompañada de una huella naranja (G3)	Si
4	Aparición de huella gris de mayor intensidad a la anterior, menor cantidad y acompañada de una huella naranja (G4)	Si (menor intensidad y cantidad)
5	Aparición de huella verde oliva y naranja sin presencia de la huella gris (G5)	No

Figura 5.8: Cromatografía en la Extracción metanólica

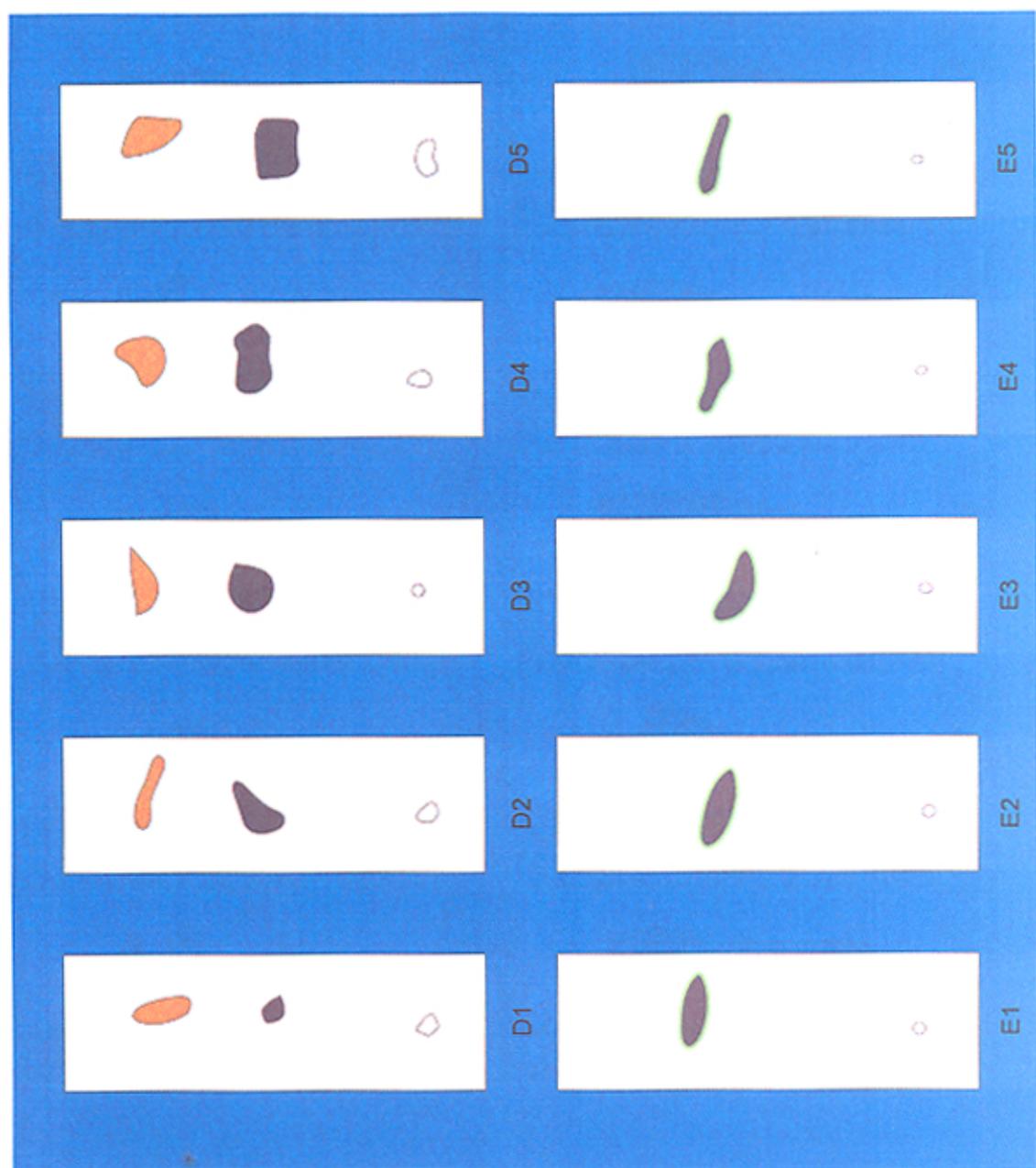
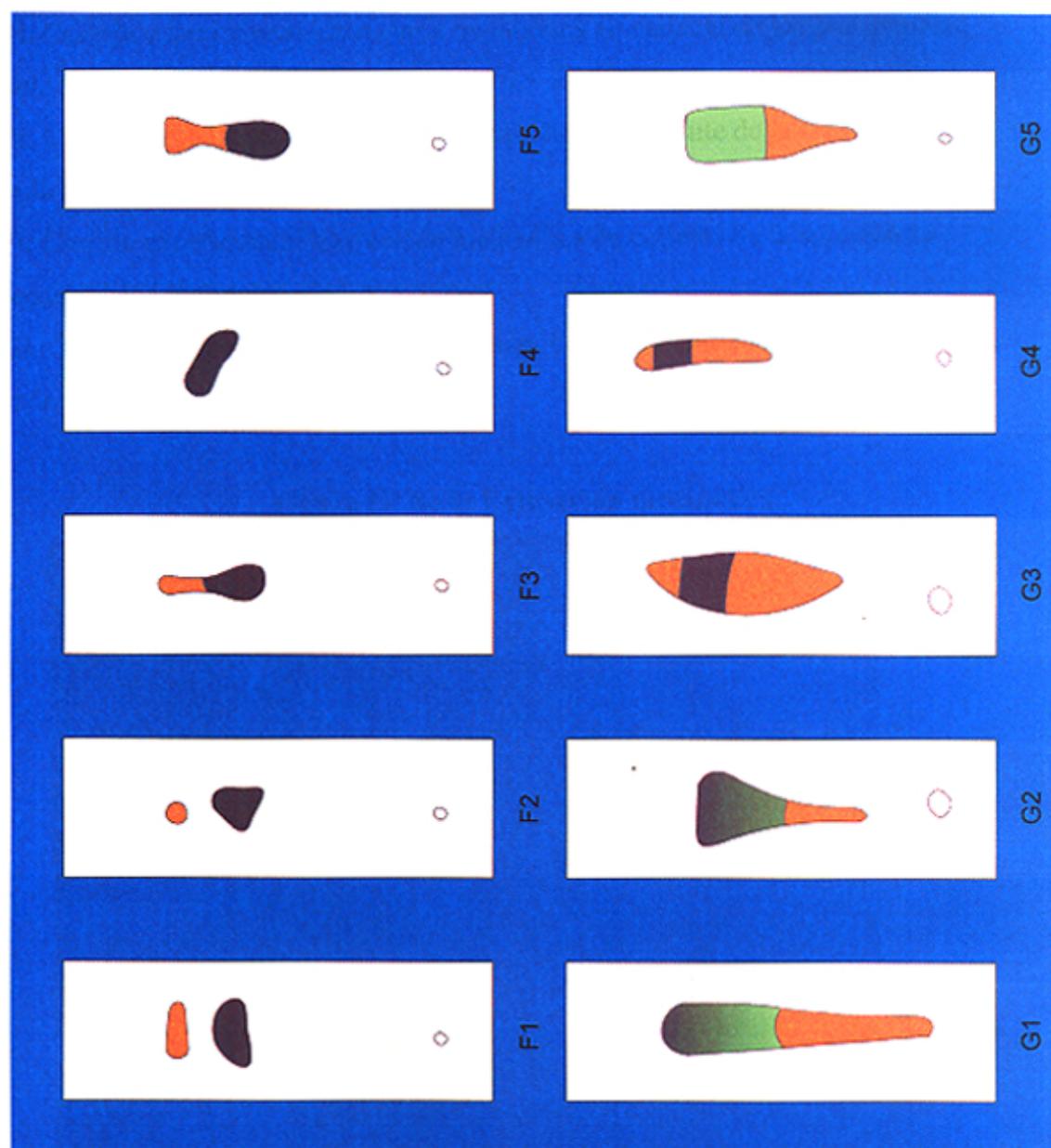


Figura 5.9: Cromatografía en la extracción metanólica



Terminología de los Cromatogramas

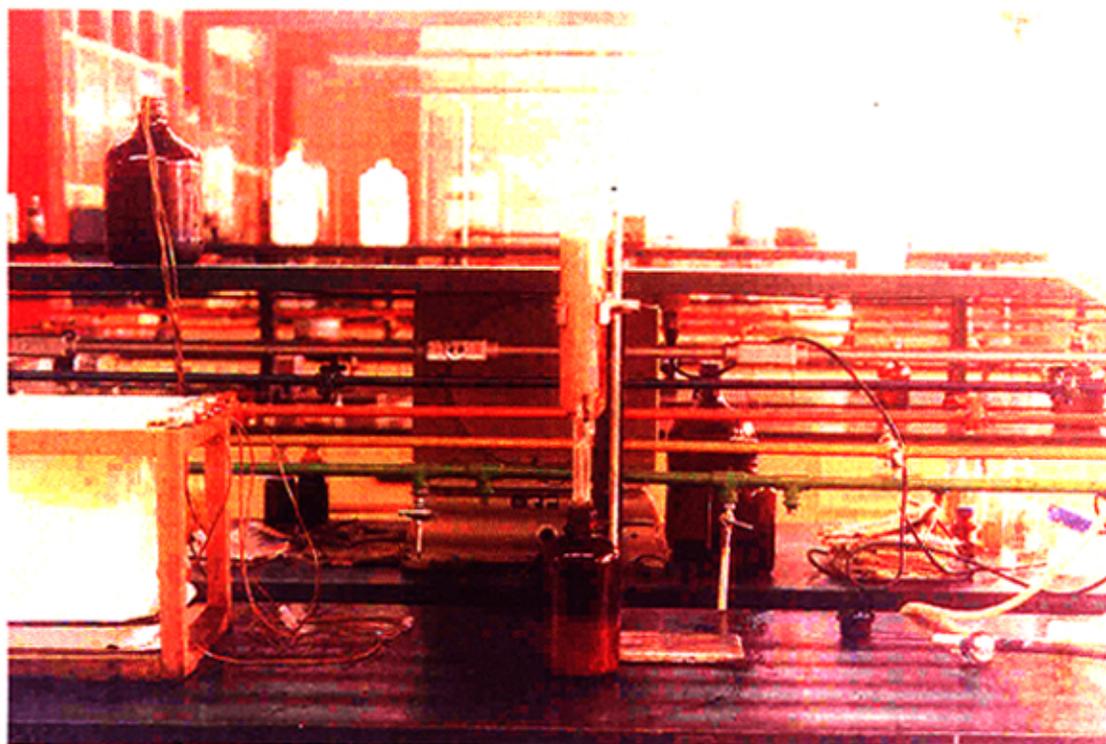
Di: Corrida experimental-Extracción metanólica en caliente de los precipitados, cada 5 minutos, $i = 1$ al 6.

Ei: Corrida experimental-Extracción metanólica en caliente de la fase líquida, cada 5 minutos, $i = 1$ al 6.

Fi: Corrida experimental-Extracción metanólica en caliente de la solución sin separar, cada 5 minutos, $i = 1$ al 5.

Gi: Corrida experimental-Extracción metanólica en caliente, variando el solvente, cada 10 minutos, $i = 1$ al 5

Figura N° 5.10: Extracción metanólica

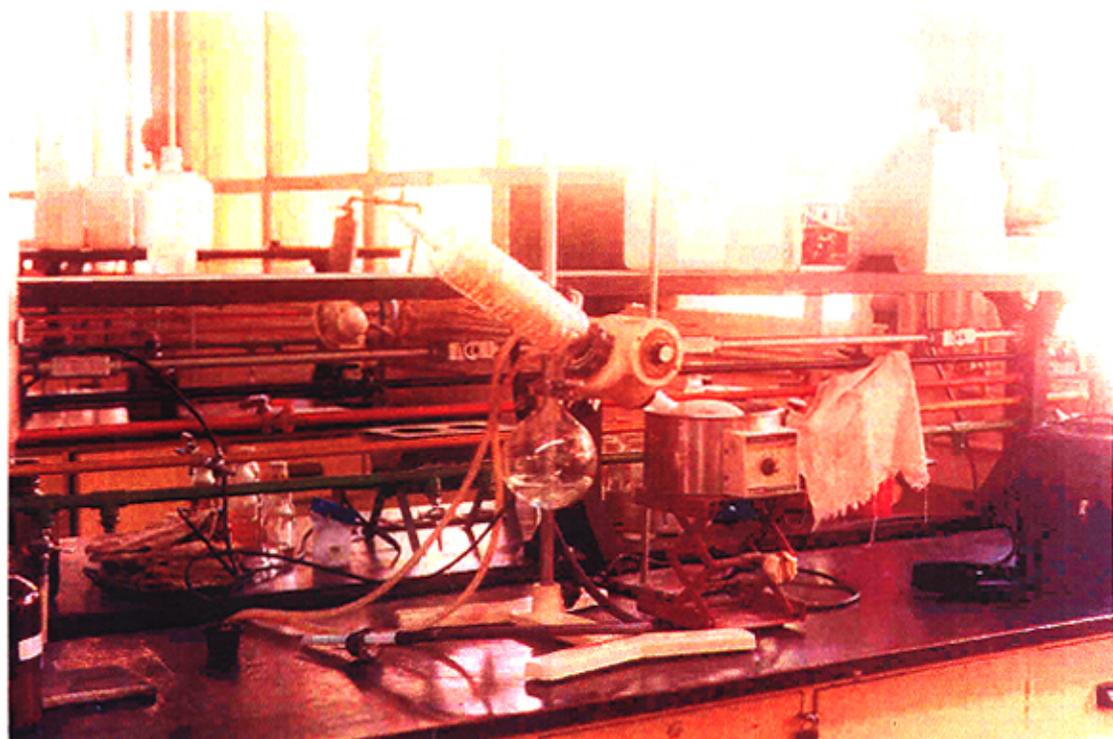


f) Concentración de la solución metanólica.-

Luego de haber conseguido la solución metanólica de Esteviosido el siguiente paso es concentrar dicha solución en un rotaevaporador, equipo que nos permite concentrar la solución de manera más uniforme evaporando el *metanol usado en la extracción*, teniendo la posibilidad de trabajar al vacío reduciendo el punto de ebullición del metanol y por consiguiente el tiempo de concentración, lo cual también nos permitiría evitar la degradación de otros componentes presentes en la solución (Fig. N° 5.11).

Según la experiencia es preferible realizar la concentración de la solución hasta un punto en que se evite el cambio brusco de la coloración verde claro a una más oscura, de lo contrario se produciría la degradación de algunos componentes presentes en la solución, las mismas que impedirían la buena formación de sólidos al momento de realizarse la cristalización y además causarían un oscurecimiento en la coloración de los mismos.

Figura N° 5.11: Concentración de la solución metanólica



g) Cristalización.-

Luego de obtenida la solución concentrada de Esteviosido en metanol se procede a verter dicha solución en un cristalizador disminuyendo la temperatura lentamente, colocando luego el contenido a baja temperatura, el resultado es la formación de precipitados blanquecinos y de aspecto gelatinoso en el fondo del cristalizador los cuales demostrarían la presencia del Esteviosido formando parte de una mezcla de glicósidos y algunas resinas (identificación realizada por TLC) (Fig. N° 5.12)

La formación de precipitados varían de color dependiendo de lo bien que se haya realizado la concentración metanólica, si ésta ha sido muy drástica la coloración se tornará cremosa y hasta oscura, pero si la concentración se llevó a cabo evitando condiciones bruscas de operación, los sólidos precipitados presentarán una coloración blanquesina (Fig. N° 5.13).

Los sólidos precipitados constituyen una mezcla de glicósidos entre ellos el Esteviosido y el Rebaudiosido A, acompañado de otros componentes como grasas y resinas (taninos) que no pudieron ser separados en el transcurso del proceso, estos componentes indeseables impiden la formación compacta de cristales de Esteviosido tal como se debería esperar.

Figura N° 5.12: Obtención de los precipitados de Esteviosido



Figura N° 5.13: Variación del color en los precipitados de Estevioso obtenidos en la etapa de concentración



h) Secado de Sólidos.-

Una vez formado los sólidos precipitados en el cristalizador, se busca evacuar la solución metanólica no saturada, previamente se distribuye el contenido del cristalizador en viales para mejorar la precipitación, luego de haber evacuado la máxima cantidad de solución posible se juntan los precipitados en otros viales para ser luego centrifugados y así poder obtener más compactos nuestros sólidos, finalmente se lleva los sólidos centrifugados a un desecador, obteniendo así los precipitados secos.

Las soluciones no saturadas de metanol son nuevamente concentradas en el rotaevaporador para luego recrystallizar los precipitados que no han podido obtenerse en la primera cristalización (Fig. N° 5.14).

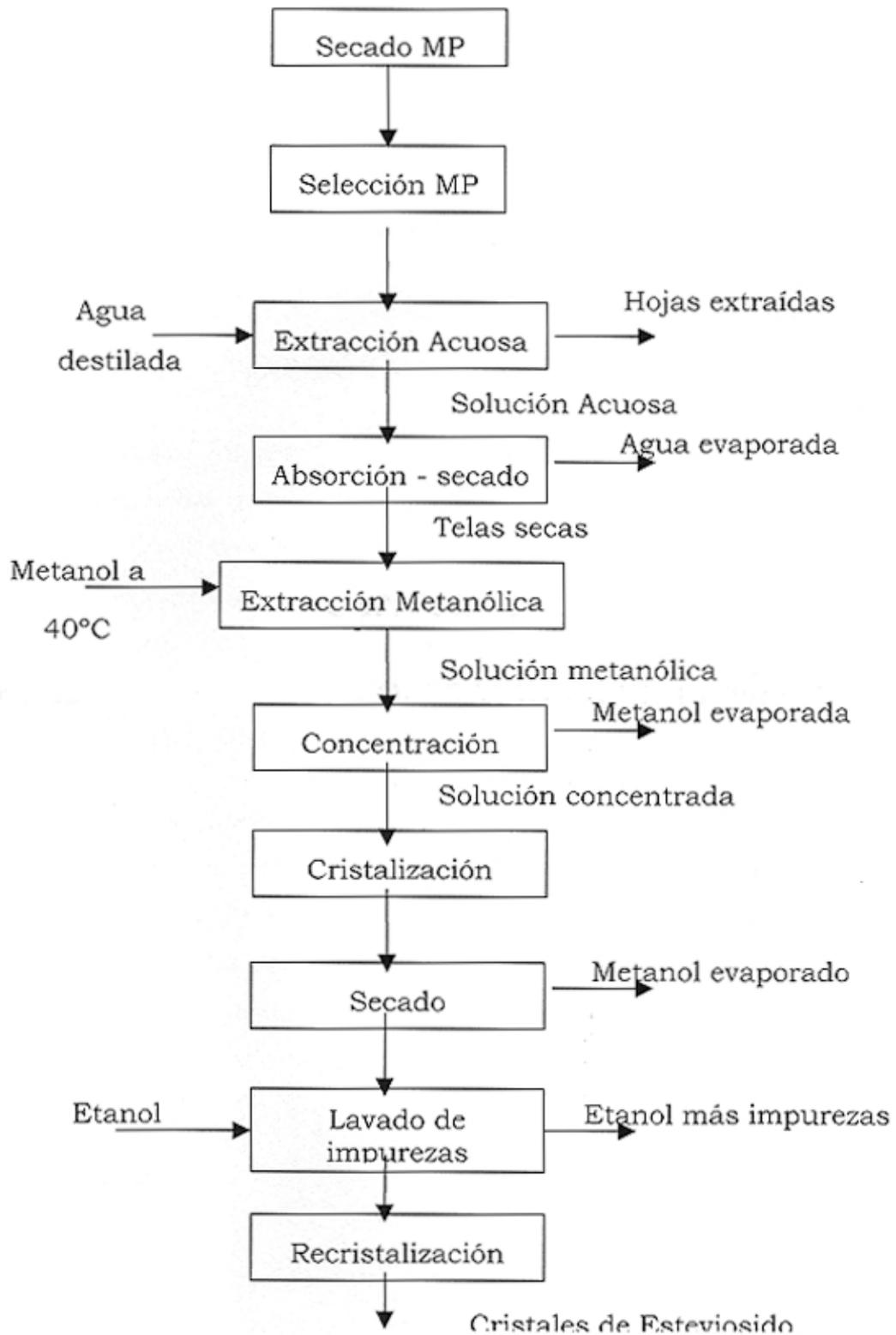
Figura N° 5.14: Extractos de Esteviosido secos



i) Recristalización

Una vez obtenido los extractos de Esteviosido secos se procedió a lavarlos con etanol en frío, disolviendo dichos sólidos bajo un calentamiento previo con dicho solvente, la solución disuelta luego fue recristalizada y nuevamente secada obteniéndose sólidos más claros.

Diagrama de Flujo del Proceso



CAPITULO 6

EVALUACIÓN PARA LA OPERACION A NIVEL PILOTO

Se procedió a hacer un ensayo experimental con 350 g. de hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni* previamente secadas (30% de humedad), los cuales fueron procesadas de acuerdo a la secuencia de operaciones ya desarrollada para la obtención del Esteviosido, siendo las observaciones y resultados los siguientes:

6.1 ETAPA DE EXTRACCIÓN ACUOSA

Se prepararon 7 paquetes de 50 g. de hojas de *Stevia rebaudiana Bertoni* cada uno en bolsas de tocuyo y se colocaron en los extractores con 1 L de agua desionizada en cada tanque, realizándose extracciones de 3 etapas a contracorriente para cada paquete de 50 g. de hojas y un tiempo de 30 minutos para cada etapa.

6.2 ETAPA DE CONCENTRACIÓN – SECADO

Para la Absorción-Secado de la solución acuosa de Esteviosido se usó el equipo experimental preparado en las pruebas de laboratorio (Figura N° 5.6) usándose para ello 24 materiales de soporte previamente tratados (lavados y secos) para cargarlas con la solución de Esteviosido, esta etapa se realizó en tramos, usándose 4 materiales de soporte en cada tramo. Mayores detalles se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro N° 6.1 : Concentración – Secado Experimental a nivel piloto

Número de juego de materiales de soporte	Tiempo de Exposición (L)	Tr/min	Volumen inicial (l)	Volumen final (l)	Volumen de agua evaporada	Temperatura °C
1	2h 20min	13	4,2	3,15	1,05	28
2	3h 40min	14	3,15	2,1	1,05	27
3	5h 13min	13	3,4	1,65	1,75	26
4	3h 56m	13	3,15	1,775	1,375	28
5	5h 16min	12	3,013	1,27	1,743	26
6	48 min	12	1,27	0,7	0,57	27

tr: Tiempo de recorrido de la solución en el material de soporte.

$V_{inicial}$: Volumen inicial de solución acuosa de Esteviosido

V_{final} : Volumen final de solución acuosa de Esteviosido.

Los 700 mL de solución acuosa de Esteviosido que sobraron fueron absorbidos en el sexto juego de material de soporte, ya en un ambiente cerrado y dejándolo de un día para otro.

6.3 ETAPA DE EXTRACCIÓN METANOLICA

Una vez secadas los 24 materiales de soporte conteniendo el Esteviosido y otras impurezas se procedió a lavar los mismos en un extractor cerrado y acondicionado previamente (Figura N° 6.1), para ello se trabajó en 3 lotes de 8 materiales de soporte cada uno, las condiciones en cada lote de extracción fueron las siguientes:

N° de lavadas: 2

Volumen de metanol/lavada = 7 L

Tiempo: 40 minutos de extracción/lavada

Temperatura promedio: 40°C

La solución de Esteviosido que se obtuvo tuvo un color amarillo oscuro y los materiales de soporte a los que se les realizó la extracción no presentaban sensación de dulzura al verificar su propiedad organoléptica (sabor).

6.4 ETAPA DE CONCENTRACION

La solución metanólica a concentrar, previamente era reducida en volumen a través de un destilador convencional, debido al alto volumen a concentrar (aprox. 14 L), luego de reducido el volumen se observó que el cambio de color en la solución era relativamente rápido, oscureciéndose aún más, se trató entonces de no concentrar demasiado la solución metanólica de Esteviosido.

6.5 ETAPA DE CRISTALIZACION

La solución concentrada de Esteviosido era vertida en los cristalizadores, permitiendo que disminuya la temperatura lentamente de 70°C a la temperatura ambiente, para luego llevar dicha solución a la refrigeración.

Las soluciones que se obtenían se juntaban en un cristalizador de mayor tamaño, para así permitir una mejor precipitación de los sólidos, observándose así una solución metanólica no saturada de color marrón y unos sólidos de coloración cremosa, dichos sólidos eran separados de la fase líquida, primero evacuando el líquido y luego distribuyendo la solución remanente en unos tubos de ensayo para que sean centrifugados.

Luego de separar los sólidos del líquido por medio de la centrifugación se observó que estos presentaron una consistencia viscosa y tenían una coloración cremosa.

Figura N° 6.1: Equipo usado en la extracción metanólica



6.6 ETAPA DE SECADO DE SOLIDOS

Los sólidos obtenidos fueron reunidos en determinados recipientes para luego ser llevados a un desecador y proceder a su secado.

6.7 RECRISTALIZACION

Los sólidos secos son disueltos en etanol bajo un calentamiento en baño maría para luego ser recristalizados y obtener unos sólidos más claros y de menor consistencia viscosa.

6.8 CALCULOS A NIVEL PILOTO

a) Balance de materia

a.1) En el secado de la materia prima

Para realizar la curva de secado de la materia prima, se tienen los siguientes datos.

Peso inicial de hojas: 728 g.

Humedad inicial : 80%

Peso final de hojas secas: 216 g.

Volumen de agua evaporada = 512 g.

Humedad Final: x

Balance de materia para el agua

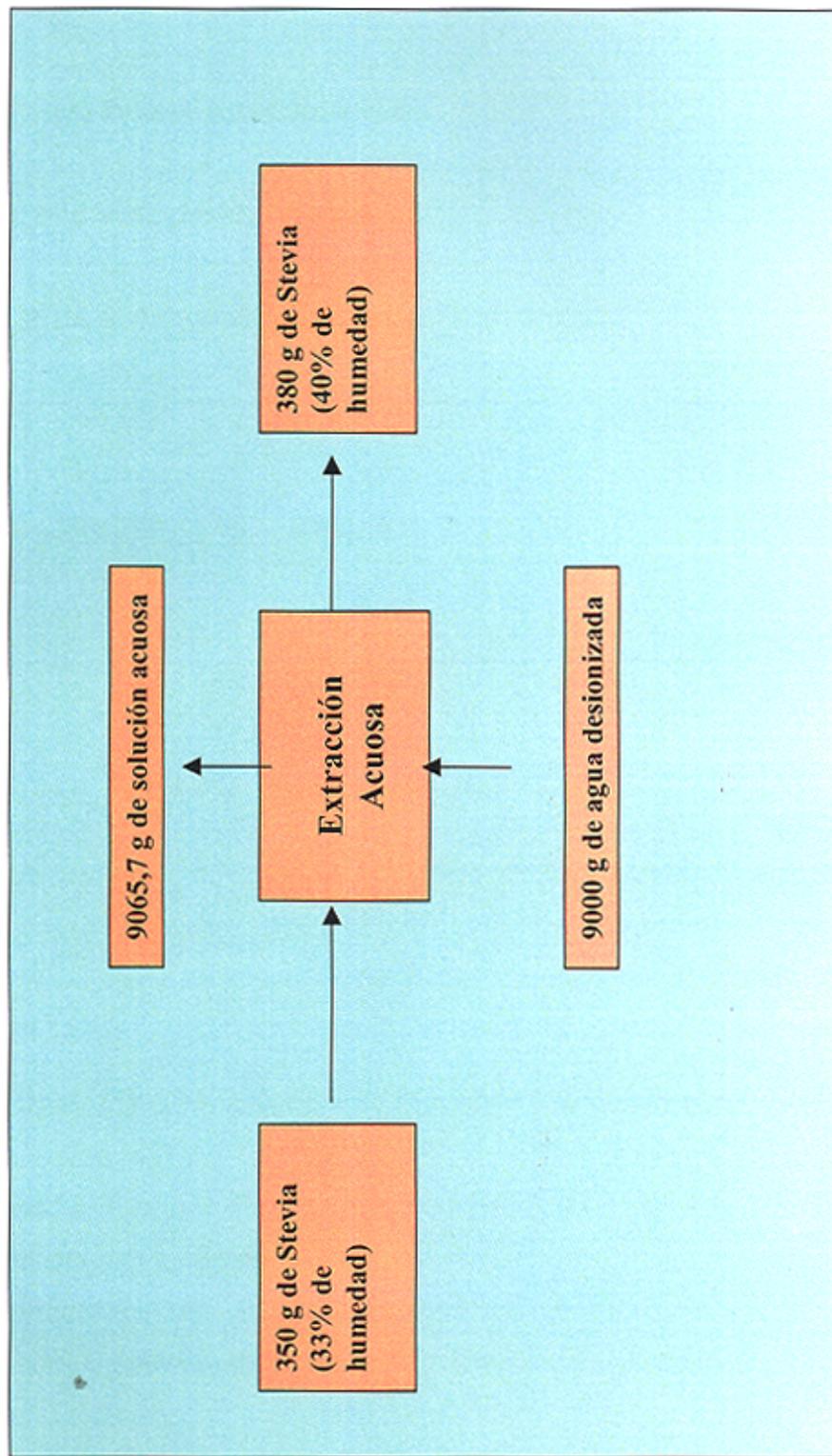
$$0,8 (728) = x (216) + 512$$

$$x = 0,3259$$

Luego el % de humedad final de las hojas de Stevia es 32,59%.

a.2) En la Etapa de Extracción Acuosa

Figura 6.2: Balance de materia – extracción acuosa



a.3) En la etapa de concentración-secado

En esta etapa se tienen los siguientes datos:

Cuadro N° 6.2: Datos de concentración-secado a nivel piloto

# de jgo. De material de soporte	W_1	W_1'	ΔW_1	W_2	W_2'	ΔW_2	W_3	W_3'	ΔW_3	W_4	W_4'	ΔW_4	W_R	
1	44	48	4	40,5	43,5	3	38	40,9	2,9	43	47	4	13,9	
2	42,8	45,0	2,2	46,8	48,2	1,4	40	41,5	1,5	39,8	41,9	2,1	7,2	
3	32,2	33,8	1,6	40,8	45	4,2	37,8	40,3	2,5	38,3	41,2	2,9	11,2	
4	38,5	39,5	1,0	41,5	43,5	2,0	41,2	42,9	1,7	39,2	40,8	1,7	6,4	
5	43,2	45,0	1,8	36,8	41,0	4,2	40,5	42,0	1,5	37,8	40,8	3,0	10,5	
6	37,0	39,0	2,0	39,3	46,0	6,7	38,1	43,9	5,8	37,0	39,0	2,0	16,5	
													W_T	65,7

W_i : peso del material de soporte seco antes de la operación absorción-secado, en g.

W_i' : peso del material de soporte después de la operación absorción-secado, en g.

ΔW_i : variación del peso, en g. Siendo $i = 1,2,3,4$.

W_R : peso de los sólidos retenidos en cada juego de material de soporte, en g.

W_T : peso de los sólidos totales retenidos en los 24 materiales de soporte, en g.

Figura 6.3: Balance de materia, concentración – secado

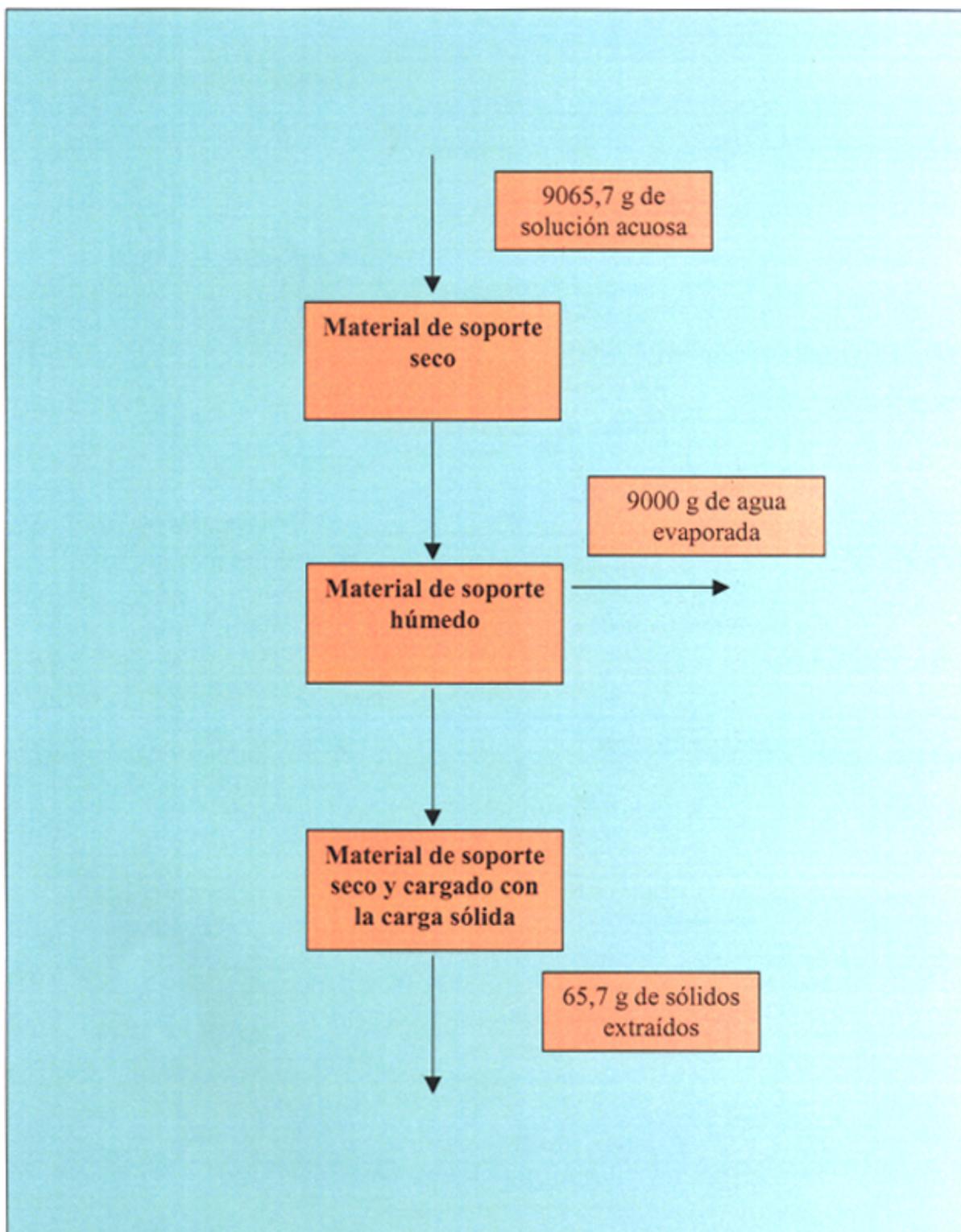
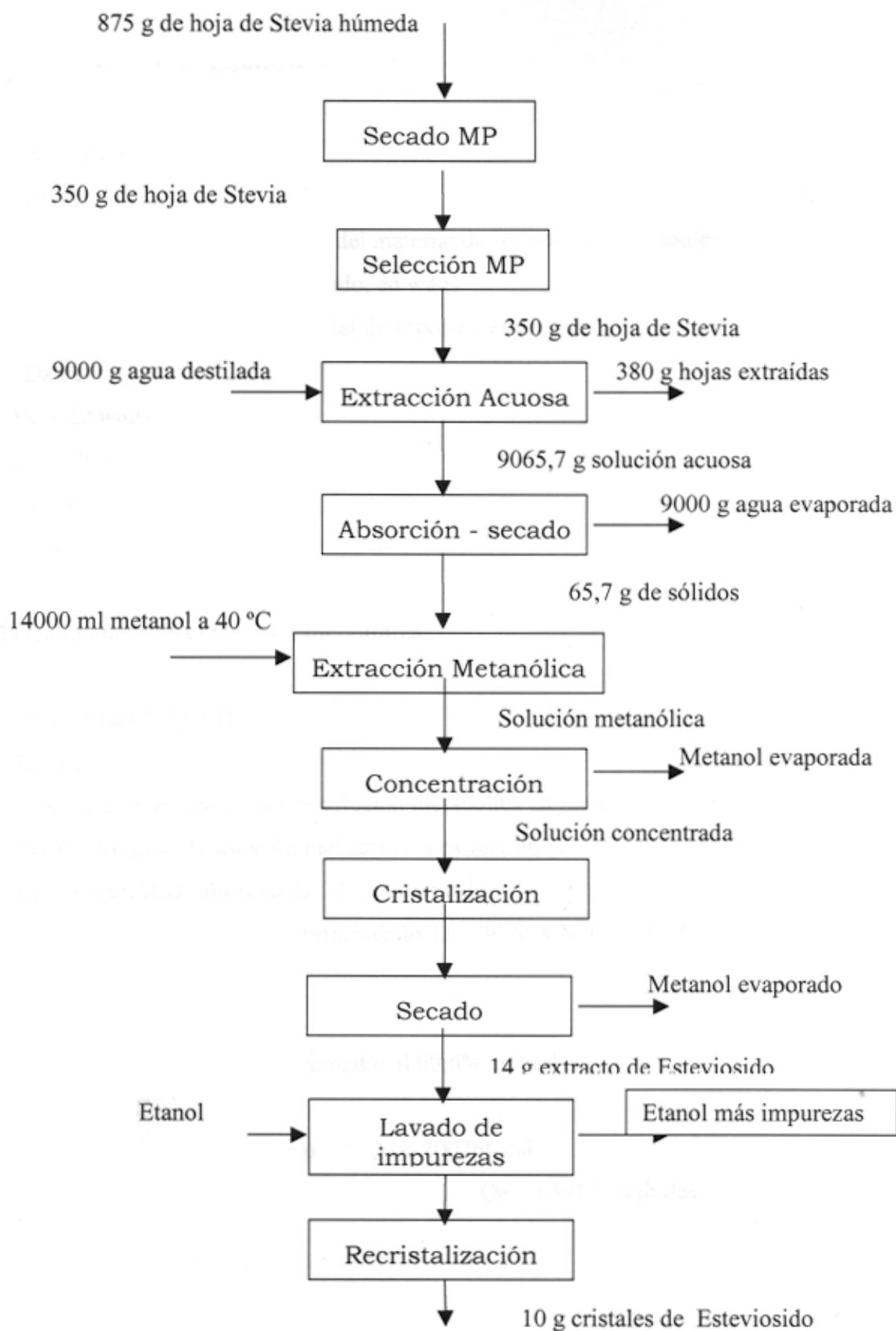


Diagrama de Flujo del Proceso - Balance de materia



b) Balance de energía

b.1) En la etapa de concentración-secado

$$Q_s = P_v * t$$

Donde:

Q_s = Calor usado en el secado del material de soporte en joules

P_v = Potencia del ventilador usado, en watts

t = Tiempo de secado del material de soporte (en segundos)

Datos :

$$P_v = 20 \text{ watts}$$

$$t = 28800 \text{ s}$$

Reemplazando datos:

$$Q_s = 576000 \text{ joules}$$

b.2) En la etapa de extracción metanólica

$$Q_e = M_{sol} * C_p * dT$$

Donde:

Q_e = Calor absorbido por la solución metanólica en joules

M_{sol} = Masa de la solución metanólica a extraer en g.

C_p = Capacidad calorífica del metanol en cal/g °C.

dT = Variación de temperatura, siendo $T_f = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ y la $T_i = 20 \text{ }^\circ\text{C}$

Datos:

$$M_{sol} = 14000 \text{ g}$$

$$C_p = 0,717 \text{ cal/g }^\circ\text{C} \text{ (} C_p \text{ promedio al 69,6\% en mol)}$$

$$dT = 20 \text{ }^\circ\text{C}$$

Reemplazando valores se tiene: $Q_e = 200760 \text{ cal}$

$$Q_e = 839176,8 \text{ joules}$$

b.3) En la etapa de concentración

$$Q_c = M_{sol} * C_p * dT$$

Donde:

Q_c = Calor absorbido por la solución metanólica en joules

M_{sol} = Masa de la solución metanólica a concentrar en g.

C_p = Capacidad calorífica del metanol en cal/g °C

dT = Variación de la temperatura, siendo $T_f = 63$ °C y

$$T_i = 20$$
 °C

Datos:

$M_{sol} = 8750$ g. (Considerando una pérdida del 6,25%)

$C_p = 0,726$ cal/g °C. (al 69,6% en mol y 40°C)

$dT = 43$ °C

Reemplazando datos: $Q_c = 273157,5$ cal.

$$Q_c = 1141798,35 \text{ joules}$$

b.4) En la etapa de recuperación de metanol

$$Q_r = M_{sol} * L_v + M_{sol} * C_p * dT$$

Donde:

Q_r = Calor empleado en la recuperación del metanol en joules

M_{sol} = Masa de la solución metanólica a recuperar en g.

L_v = Calor latente de vaporización del metanol en cal/g.

C_p = Capacidad calorífica del metanol en cal/g.°C.

dT = Variación de la temperatura, siendo $T_f = 63$ °C y

$$T_i = 20$$
°C.

Datos:

$M_{sol} = 8750$ g. (Considerando una pérdida del 6,25%)

$L_v = 262,79$ cal/g.

$C_p = 0,726$ cal/g.°C (al 69,6% en mol y 40°C)

$dT = 43$ °C.

Reemplazando datos: $Q_r = 503098,75 \text{ cal}$

$$Q_r = 2102952,78 \text{ joules}$$

Finalmente la energía total (Q_t) utilizada en el proceso será:

$$Q_t = Q_s + Q_e + Q_c + Q_r$$

Reemplazando valores tenemos:

$$Q_t = 576000 + 839176,8 + 1141798,35 + 2102952,78$$

$$Q_t = 4659927,93 \text{ joules}$$

$$Q_t = 4659,93 \text{ KJ}$$

6.9 COSTO DE PROCESAMIENTO

a) Costo primo del producto obtenido

Costo de manufactura para la obtención del Esteviosido				
Insumos	Unidad	N° de Unid.	Precio/Unidad (S/)	Sub- Total
Hojas de Stevia seca	Gramos	350	0,0087	3,05
Alcohol Metílico comercial	Galones	2	20	40,00
Agua Destilada	Galones	2	2,5	5,00
Material de soporte	Metros	2	5	10,00
Energía consumida	Kw-h	1,29	0,4	0,52
		Total		63,72
		Gramos de producto extraído		10,00
		Costo unitario		5,86

Tipo de cambio: 3,48

Costo de materia prima: 2,5

S/Kg

b) Costo de análisis en la obtención del Esteviosido

Costo de análisis en la caracterización del Esteviosido				
Insumos	Unidad	N° de Unid.	Precio/Unidad (S/)	Sub- Total
Sílica gel	Gramos	100	0,23	23,00
Alcohol Metílico Grado PA	ml	100	0,024	2,40
Alcohol Etílico Grado PA	ml	50	0,05	2,50
Cloroformo	ml	50	0.039	1,95
Acido Sulfúrico (98%)	ml	20	0.028	0,56
Fenilhidracina	ml	20	4,32	86,40
			Total	116,81

Tipo de cambio: 3,48

CAPITULO 7

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- La extracción acuosa del Esteviosido a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana Bertonii* se ve favorecida a temperatura ambiente, debido a que el aumentar la temperatura del agua se estaría extrayendo otras sustancias indeseables que acompañarían al Esteviosido.
- La extracción metanólica del Esteviosido proveniente del material de soporte se ve favorecida al aumentar la temperatura del metanol, no solo en cuanto al aumento de la solubilidad del Esteviosido en metanol, sino que al parecer una mayor temperatura del solvente permite eliminar algunos componentes que acompañaban al Esteviosido, ello se observa al obtener una solución más transparente.
- En la etapa de la concentración metanólica se determinó que el control de la temperatura influye en la calidad de producto.
- El método para secar los materiales de soporte que absorben los componentes contenidos en la solución acuosa, se verían favorecidos si las condiciones ambientales se llevasen a cabo en regiones alto andinas y de escasa humedad, representado ello un ahorro económico para el proceso.

$\Delta H_{\text{vagua}} = 2446,44$ joules/g (a 20°C y 0,023 atm).

$\Delta H_{\text{vagua}} = 2315,59$ joules/g (a 76,67°C y 0,41 atm).

$\Delta H_{\text{vagua}} = 2285,90$ joules/g (a 86,67°C y 0,61 atm).

- La coloración y consistencia de los sólidos obtenidos en la etapa de cristalización dependen directamente de la correcta manipulación que se realiza en las distintas etapas del proceso.

- El tiempo mínimo necesario para la extracción acuosa es de 24 minutos.
- Por encima de los 40 minutos la presencia del Esteviosido en la extracción acuosa es muy pequeña.
- Con la cromatografía de capa fina (TLC) no sólo podemos determinar la presencia del Esteviosido y otros componentes, sino que además se puede determinar de manera cualitativa el momento en el cual dicha presencia aumenta o disminuye.
- De acuerdo a la cromatografía de capa fina (TLC) realizada en el análisis de caracterización del Esteviosido el número óptimo de extracciones para la fase acuosa es 4, mientras que para la extracción metanólica el número de extracciones adecuadas es 3.

RECOMENDACIONES

- En la etapa de la concentración – secado de la solución acuosa es preferible evitar cargar demasiado el material de soporte con los componentes presentes en la *Stevia rebaudiana Bertoni* al momento de irrigarlas con la solución acuosa, debido a que podrían oxidarse los otros componentes orgánicos que acompañan al Esteviosido, como consecuencia de la exposición del material de soporte al medio ambiente, lo cual ocasionaría un cambio en la coloración de nuestro producto, es por ello que se recomienda cambiar permanentemente el material de soporte.
- En la etapa de extracción metanólica se debe tener mucho cuidado al momento de manipular el metanol al hacer el lavado del material de soporte, debido a las consecuencias tóxicas de dicho solvente sobre la salud.

- En la etapa de concentración se recomienda no secar los sólidos obtenidos en la estufa dado a que se degradarían dichos componentes indeseables permitiendo el enmascaramiento o disolución del Esteviosido, haciendo más complicado su separación.

CAPITULO 8

BIBLIOGRAFIA

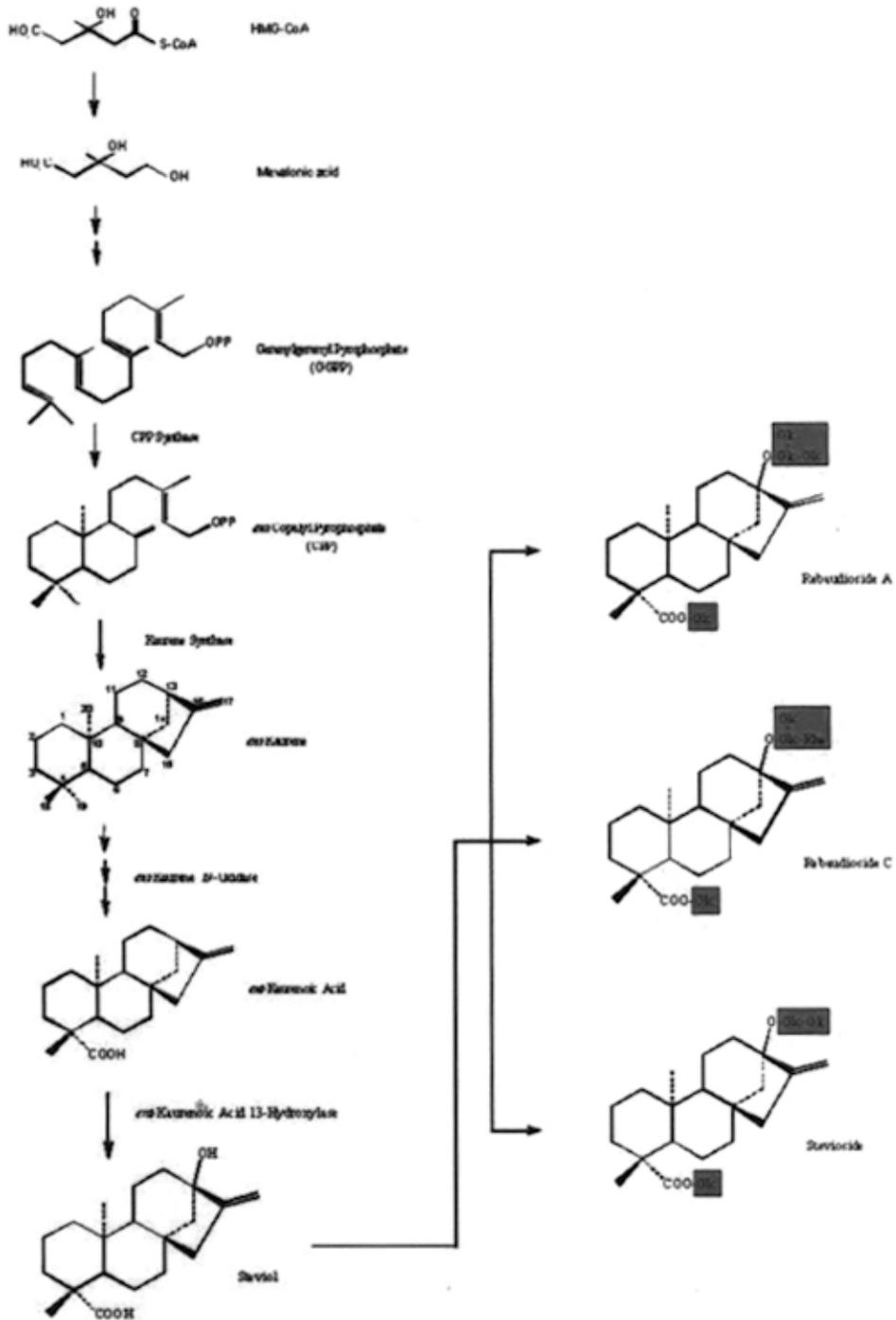
- J. M. SMITH - H.C. SMITH VAN NESS 1980. Introducción a la Termodinámica Química. Editorial Mc Graw Hill. México. Primera edición en español, Apéndices A y C.
- ROBERT H. PERRY – CECIL H. CHILTON 1986. Perry Biblioteca del Ingeniero Químico. Mc Graw Hill. México. Quinta edición (segunda edición en español), Tablas 3-155,3-156,3-172,3-196 y 3-197.
- SECRETARIA GENERAL DE LA ORGANIZACIÓN DE LOS ESTADOS AMERICANOS. 1985. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. “Introducción al Estudio de los Productos Naturales” Monografía N° 30 Washington D.C. 1985, Diterpenoides páginas 89-94.
- HAJIME MIZUKAMI, KEIKO SHIIBA y HIROMU OHASHI. Enzymatic Determination of Stevioside in Stevia rebaudiana, Phytochemistry Vol. 21, N° 8, Faculty of Pharmaceutical Sciences Nagasaki University-Japón, páginas 1927-1930.
- ALEJANDRA ZANON. 2000. Informe Agronómico sobre el cultivo de la Stevia rebaudiana, Revista Agrovisión NOA N° 39 Marzo-Abril/2000 Bs. As-Argentina.
- REVISTA CIENTIFICA. “ Stevia”. Universidad Estadual de Maringa, Maringa-Parana-Brasil.
- INDEX MERCK. Steviosido. Décima primera edición página 1387.
- REVISTA ELECTRONICA CHEMICAL MARKETING REPORT. “Importaciones Aspartame y Sacarina sódica años 1999 – 2000 “.

- DIETRICH K. Apud. Quim. Abs. Pharm. Tentreth, 1909, 50:435-462 Alemania.
- BRIDEL M. y LAVIELLI R. 1931 El principio dulce de las hojas del Ka'a He'ê. Pharm Chin. 14 (3). 99-113.
- SCHMELING, AMARAL, 1967. Edulcorante natural no calórico, Centro de investigación de la Stevia. Vol.XXIX – N 5º, San Paulo.
- WOOD, Jr., H.B., et. al. "Stevioside. I. The structure of the glucose moieties." J. Org. Chem. Washington, 20, 875-883, 1955.
- MOSETTING, E., et.al. "The absolute configuration of steviol and isosteviol." J. Am. Chem. Soc., 85(15), 2305-2309, 1963.
- Mercado – Paraguay puede producir el mejor Ka'a he'e.
www.abc.com.py/rural/kaahee7.htm.
- Redescubriendo la dulzura – Edulcorantes extraídos de la Stevia
[http:// www.inti.gov.ar/ceial](http://www.inti.gov.ar/ceial).
- Edulcorante Natural sin calorías
www.agritotal.com/secciones/mundorganico.c
- Stevia/Stevioside Record
www.jajagroup.com
- The chemistry of the diterpene glycoside sweeteners
[http:// res2.agr.ca/London](http://res2.agr.ca/London)
- El origen del primer edulcorante naturalmente dulce.
www.exponatural.com/ecosweet/contacto.htm

CAPITULO 9

APENDICE

Composición de la *Stevia rebaudiana* Bertoni



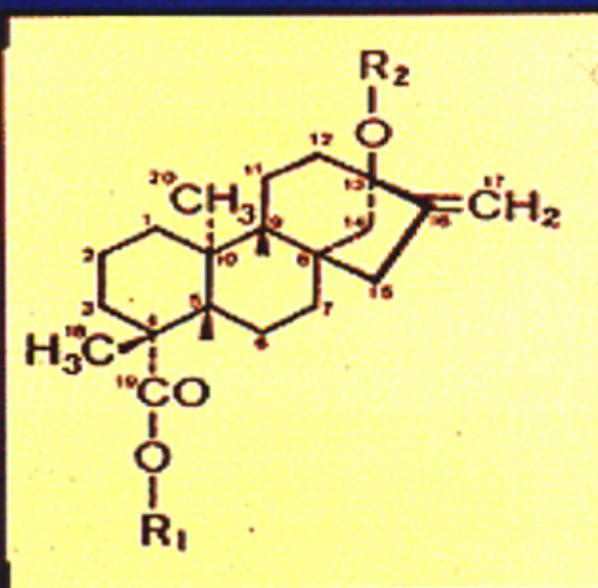
Productos comerciales a partir de la *Stevia rebaudiana* Bertoni

<p><u>Stevia, White 85% Steviosides,</u> <u>0.9 OZ.</u></p>	<p><u>Stevia, White 85% Steviosides 250mg,</u> <u>60 Capsules</u></p>	<p><u>Stevia Balance with Inulin & Chromium,</u> <u>2 Oz</u></p>	<p><u>Stevia Extract Dry White Powder,</u> <u>1 Oz</u></p>
			
<p>\$5.99 US (\$6.656 per oz)</p>	<p>\$6.49 US (\$0.108 per Capsule)</p>	<p>\$7.25 US (\$3.625 per oz)</p>	<p>\$10.29 US (\$10.290 per oz)</p>

<p><u>Stevia Extract Liquid,</u> <u>60 mL.</u></p>	<p><u>Stevia Extract Packets</u> <u>- Dry Powder,</u> <u>100 Packets</u></p>	<p><u>Stevia Extract Packets</u> <u>- Dry Powder,</u> <u>35 Oz</u></p>	<p><u>Stevia Glycerite,</u> <u>2 Oz</u></p>
			
<p>\$10.29 US (\$0.172 per mL)</p>	<p>\$8.99 US (\$0.090 per Packet)</p>	<p>\$38.99 US (\$1.114 per oz)</p>	<p>\$8.79 US (\$4.395 per oz)</p>

Estructura Química de los Steviol-Glycosides

Chemical Structures of the Steviol-Glycosides



Stevioside: R₁ : Glu
R₂ : Glu-Glu

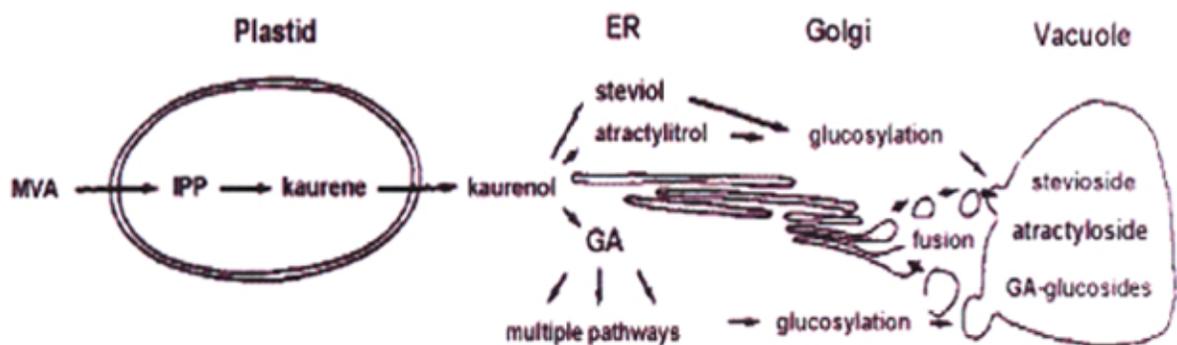
Rebaud A = R₁ : Glu
R₂ : Glu-Glu
|
Glu

Rebaud C = R₁ : Glu
R₂ : Glu-Rha
|
Glu

Dulco A = R₁ : Glu
R₂ : Glu-Rha

Anexo N° 4: Camino Subcelular para la síntesis de un glicósido

Subcellular pathway for glycoside synthesis



Procesamiento Industrial del Esteviosido

Reaction Process

Process of high-purity stevioside separating



Quick Concentrating Technology

Quick concentrating technology to keep
sweetening quality at low-temp

Spray Dry Process
Granulation of stevioside product



Research and Development

Quality Control System