

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



TESIS

“EXTRACCION DE ESTEVIOSIDO POR COLUMNAS DE INTERCAMBIO IONICO A PARTIR DE HOJAS ESTEVIA (*Stevia rebaudiana Bertoni*)”

PRESENTADO POR:

Bach. Janeth Mireya GONZALES CARI

Bach. Saúl Nolberto TEJADA RUIZ

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PUNO – PERU

2010

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

EXTRACION DE ESTEVIÓSIDO POR COLUMNAS DE INTERCAMBIO
IÓNICO A PARTIR DE HOJAS DE ESTEVIA "*Stevia rebaudiana Bertoni*"

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. JANETH MIREYA GONZALES CARI.

Bach. SAUL NOLBERTO TEJADA RUIZ

PARA OPTAR EL TITULO DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE

:


Ing. M.Sc. GENNY ISABEL LUNA MERCADO.

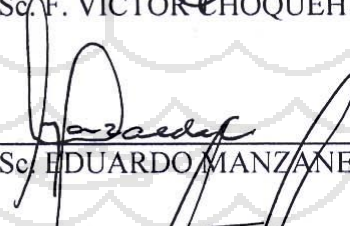
PRIMER MIEMBRO

:


Ing. M.Sc.F. VICTOR CHOQUEHUANCA CACERES.

SEGUNDO MIEMBRO

:


Ing. M.Sc. EDUARDO MANZANEDA CABALA.

DIRECTOR DE TESIS :


Ing. M.Sc. ALEJANDRO COLOMA PAXI.

ASESOR DE TESIS :

Ing. M.Sc. THOMAS ANCCO VIZCARRA.

PUNO

PERÚ

2010


Área: Ingeniería y tecnología

Tema: Propiedades físicas y estructurales

DEDICATORIA

Con mucho cariño y gratitud a mis padres Jorge y Reyna, por su ejemplo de perseverancia, por confiar siempre en mi apoyándome en todas las decisiones que he tomado en la vida, y a mi hermano Darwin por su apoyo incondicional.

Janeth



A nuestro señor , por darme el don de la vida, a mis padres Lucy y Gonzalo , Por su apoyo, respeto, principios y valores y a mis hermanos, por sus diversas formas de apoyo.

Saúl

AGRADECIMIENTOS

- Antes que nada agradecemos a Dios, que está con nosotros en todo momento, por su infinita bondad y porque siempre nos da las fuerzas que necesitamos para seguir adelante.
- Nuestro más sincero agradecimiento y reconocimiento a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por brindarnos sus conocimientos y haber contribuido en nuestra formación profesional.
- A los miembros de jurado de tesis, Ing. M. Sc. Genny Luna Mercado, Ing. M. Sc. Florentino V. Choquehuanca Cáceres, Ing. M. Sc. Eduardo Manzaneda Cábala, por sus consejos y por compartir desinteresadamente sus amplios conocimientos y experiencia.
- A nuestro director de tesis, al Ing. M. Sc. Alejandro Coloma Paxi por sus consejos, orientación y su constante asesoramiento durante la ejecución del presente trabajo.
- Al asesor de tesis Ing. M.Sc. Thomas Ancco Vizcarra, por su apoyo en la realización del trabajo de investigación.
- Al personal administrativo, por las facilidades brindadas en los laboratorios, bibliotecas, para la ejecución del presente trabajo.
- A nuestros padres de familia, por su apoyo incondicional.
- A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización del presente trabajo.

¡GRACIAS A TODOS ELLOS!

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE IMÁGENES

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

RESUMEN

I	INTRODUCCIÓN.....	01
II	FUNDAMENTO TEÓRICO.....	03
2.1	Estevia.....	03
2.1.1	Clasificación.....	04
2.1.2	Propiedades.....	05
2.1.3	Características agronómicas.....	06
2.2	Edulcorantes.....	06
2.2.1	Edulcorantes calóricos.....	07
2.2.2	Edulcorantes no calóricos.....	07
2.2.2.1	Edulcorantes sintéticos.....	07
2.2.2.1.1	Sacarina.....	07
2.2.2.1.2	Ciclamato.....	08
2.2.2.2.3	Aspartamo.....	09
2.2.2.2.4	Acelsufamo – k o acelsufamo.....	09
2.2.2.2.5	Sucralosa.....	10
2.2.2.2.6	Glicol.....	11
2.2.2.2	Edulcorantes naturales.....	12
2.2.2.2.1	Dihidrochalconas.....	12
2.2.2.2.2	Glicirricina amoniaca.....	12
2.2.2.2.3	Esteviosido.....	13

2.2.2.2.4 Taumatina.....	14
2.3 Métodos de extracción del estevióside.....	15
2.3.1 Extracción del estevióside.....	15
2.3.1.1 Extracción con disolventes orgánicos.....	15
2.3.1.2 Extracción acuosa.....	16
2.3.1.3 Co2 presurizado.....	17
2.3.2 Métodos de purificación.....	18
2.3.2.1 Purificación del estevióside con resinas de intercambio iónico.....	18
2.3.2.3 Purificación del estevióside por membranas.....	20
2.4 Características del estevióside.....	22
2.4.1 Características fisicoquímicas del estevióside.....	22
2.4.1.1 Composición.....	22
2.4.1.2 Dulzor.....	24
2.4.1.3 Estabilidad al pH.....	24
2.4.1.4 Sinergismo.....	24
2.4.1.5 Usos.....	24
2.4.1.6 Toxicidad.....	24
2.4.1.7 Metabolismo.....	25
2.4.2 Composición de las hojas de estevia.....	25
2.4.2.1 Toxicidad del estevióside.....	25
2.4.2.2 Poder edulcorante.....	29
2.4.2.3 Determinación del poder edulcorante.....	30
2.4.2.4 El sabor.....	30
2.4.2.5 Fisiología del sabor dulce.....	33
2.4.2.6 Análisis sensorial.....	36
2.4.2.7 Determinación de la concentración.....	38

III MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1 Materiales.....	39
3.1.1 Lugar de ejecución del proyecto.....	39
3.1.2 Materia prima e insumos.....	39
3.1.2.1 Materia prima.....	39
3.1.2.2 Insumos.....	39
3.1.3.1 Materiales.....	40
3.1.3.2 Equipos.....	40
3.1.3.3 Reactivos.....	40
3.1.3.4 Otros.....	41
3.2 Métodos de análisis.....	41
3.2.1. Análisis proximal de las hojas de estevia.....	41
3.2.2. Análisis físico-químico de las muestras.....	43
3.2.3. Determinación de la concentración de esteviósido por espectrofotometría uv.....	44
3.3 Metodología experimental.....	46
3.3.1. Descripción del proceso de extracción de esteviósido de las hojas de estevia.....	46
3.3.1.1 Fase de extracción acuosa del esteviósido.....	46
a) Materia prima.....	46
b) Trituración.....	47
c) Lixiviación.....	47
d) Filtración.....	48
3.3.1.2 Fase de purificación del esteviósido.....	49
a) Precipitación de impurezas.....	49
b) Purificación con resinas de intercambio iónico.....	50
3.3.1.3 Fase deshidratación del extracto purificado.....	52
3.3.2. Descripción de la determinación del poder edulcorante.....	55
3.4 Diseño estadístico experimental.....	56

3.4.1	Fase de extracción acuosa del edulcorante de las hojas de estevia.....	56
3.4.2	Fase de purificación del extracto de las hojas de estevia.....	58
3.4.3	Fase de deshidratación del extracto purificado.....	61
IV	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	62
4.1	Análisis proximal de las hojas de estevia.....	62
4.2	PRIMERA FASE: Estudio de la influencia de la proporción materia prima/solvente, temperatura y tiempo de tratamiento con respecto a la concentración y rendimiento bruto del extracto.....	63
4.2.1	Estudio de la influencia de la proporción materia prima/solvente, temperatura y tiempo con respecto a la concentración en la primera fase	63
4.2.2	Estudio de la influencia de la proporción materia prima/solvente, temperatura y tiempo con respecto al rendimiento en la primera fase.....	66
4.2.2.1	Estudio de la materia prima/solvente, y el tiempo de tratamiento respecto al rendimiento bruto del extracto.....	68
4.2.2.2	Estudio de la temperatura y proporción materia prima solvente respecto al rendimiento bruto del extracto.....	70
4.2.2.3	Estudio del tiempo de tratamiento y la proporción de materia prima/ solvente, respecto al rendimiento bruto del extracto.....	71
4.3	SEGUNDA FASE: Estudio de la influencia del pH y porcentaje de hidróxido de calcio, respecto al rendimiento bruto del esteviósido...	72
4.3.1	Estudio del pH respecto al rendimiento en la segunda fase....	74
4.3.2	Estudio del % de CaOH ₂ respecto al rendimiento en la segunda fase.....	76
4.4	TERCERA FASE: Estudio de la influencia del tipo de deshidratación en el proceso con respecto al rendimiento total del proceso de extracción del esteviósido.....	79
4.5	Determinación del poder edulcorante del esteviósido.....	81
V	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	83
5.1	Conclusiones.....	83
5.2	Recomendaciones.....	84
VI	BIBLIOGRAFÍA.	85

INDICE DE CUADROS

Cuadro N° 01.	Clasificación taxonómica del la Estevia.....	04
Cuadro N° 02.	Características agronómicas de la Estevia.....	06
Cuadro N° 03.	Composición del esteviósido.....	23
Cuadro N° 04.	Composición proximal de las hojas de estevia.....	25
Cuadro N° 05.	Toxicidad de lo edulcorantes.....	28
Cuadro N° 06.	Edulcorantes.....	29
Cuadro N° 07.	Resultados de la absorvancia	44
Cuadro N° 08.	Cinco niveles de un diseño central compuesto (DCCR)...	56
Cuadro N° 09.	Valores extremos de los factores de estudio.....	57
Cuadro N° 10.	Tratamientos de la primera fase.....	58
Cuadro N° 11.	Codificación de los factores de estudio.....	59
Cuadro N° 12	Tratamientos del diseño central compuesto rotatable (DCCR) 2da fase.....	60
Cuadro N° 13	Porcentaje de la Composición Química Proximal de las Hojas de Estevia (<i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>). Y sedimento del extracto.....	62
Cuadro N° 14	Optimización de las variables para la concentración.....	65
Cuadro N° 15	Optimización de las variables para el rendimiento.....	68
Cuadro N° 16	Optimización de las variables en la segunda fase.....	74
Cuadro N° 17	Resultados de la deshidratación.....	79
Cuadro N° 18.	Resultados de la prueba dúo tríó.....	81

INDICE DE IMÁGENES.

Imagen N° 01. <i>Estevia rebaudiana Bertoni</i>	04
Imagen N° 02. Corrección del pH de la muestra.....	43
Imagen N° 03. Espectrofotometro.....	43
Imagen N° 04. Secado solar de estevia.....	47
Imagen N° 05. Horno para el secado de la estevia.....	47
Imagen N° 06. Proceso de lixiviación de las hojas.....	48
Imagen N° 07. Filtrado de las hojas con un paño.....	48
Imagen N° 08. Precipitación de impurezas con Ca (OH) ₂	50
Imagen N° 09. Purificación con columnas de intercambio iónico.....	51
Imagen N° 10. Atomizador de partículas UNI – LIMA.....	53
Imagen N° 11. Esteviosido en polvo.....	54
Imagen N° 12. Muestras a diferente porcentaje de hidróxido de Calcio antes del primer pasaje de resinas de intercambio iónico..	77
Imagen N° 13. Muestras a diferente porcentaje de hidróxido de Calcio después del primer pasaje de resinas de intercambio iónico.....	78

INDICE DE FIGURAS.

Figura N° 01.	Estructura de la sacarina.....	08
Figura N° 02.	Estructura del ciclamato.....	08
Figura N° 03.	Estructura del aspartamo.....	09
Figura N° 04.	Estructura del Acesulfamo - K o Acesulfamo.....	10
Figura N° 05.	Estructura de la sucralosa.....	11
Figura N° 06.	Etan-1,2 –Diol.....	11
Figura N° 07.	Estructura de las dihidrochalconas.....	12
Figura N° 08.	Estructura de la glicirricina.....	13
Figura N° 09.	Estructura molecular del esteviósido.....	14
Figura N° 10.	Principio de la cromatografía del intercambio iónico.....	19
Figura N° 11.	Las células sensitivas de las papilas gustativas perciben los sabores y transmiten esta información al cerebro a través del nervio gustativo.	33
Figura N° 12.	Botón gustativo. Tienen el aspecto de unos cuerpos ovoides pálidos, de 50 a 80 μm de altura y 30 a 50 μm de anchura.....	33
Figura N° 13.	Fijación de una molécula dulce sobre el receptor.....	34
Figura N° 14.	Diagrama de Van Der Walls.....	34
Figura N° 15.	Modelo de Tinti - Nofre y el modelo tripartito de Kier.....	36
Figura N° 16.	Curva estándar del esteviósido.....	45

Figura N° 17.	Flujo del proceso de extracción de esteviósido.....	46
Figura N° 18.	Flujo del proceso de la segunda fase	49
Figura N° 19.	Desionizador AQUATROL.....	51
Figura N° 20.	Flujo del proceso de la tercera fase.....	52
Figura N° 21.	esque ma del atomizador de partículas.....	54
Figura N° 22.	Efectos principales para el rendimiento.....	64
Figura N° 23.	Efectos principales para la concentración.....	67
Figura N° 24.	Diagrama de Pareto.....	68
Figura N° 25.	Efecto de la temperatura y Mp/sol.....	69
Figura N° 26.	Efecto del tiempo y Mp/sol.....	71
Figura N° 27.	Efecto del tiempo y Temperatura.....	72
Figura N° 28.	Diagrama de Pareto para la segunda fase.....	73
Figura N° 29.	Efectos principales del pH e hidróxido.....	74
Figura N° 30.	Comportamiento del pH y % de Ca(OH)₂.....	76
Figura N° 31.	Comparación del rendimiento de ambos métodos de deshidratación.	80
Figura N° 32	Porcentaje de respuestas correctas e incorrectas.....	82

INDICE DE ANEXOS.

ANEXOS	88
ANEXO 01 Cuadro de tratamientos de la primera fase.....	89
ANEXO 02 Factores de estudio primera fase.....	90
ANEXO 03 Tabla de análisis de varianza para la obtención de la concentración.	91
ANEXO 04 Tabla de análisis de varianza para la obtención del rendimiento.....	92
ANEXO 05 Cuadro de tratamientos de la segunda fase.....	93
ANEXO 06 Resultados del rendimiento de la segunda fase.....	94
ANEXO 07 Tabla de análisis de varianza para la determinación del rendimiento.....	95
ANEXO 08 Codificación de valores de DFCR primera fase.....	96
ANEXO 09 Prueba de hipótesis de las medias muestrales.....	99
ANEXO 10 Cartilla de la prueba dúo trío.....	100
ANEXO 11 Resultado de la Prueba Dúo Tríó (170 a 200).....	101
ANEXO 12 Resultado de la Prueba Dúo Tríó (150 a 170).....	102
ANEXO 13 Cartilla del nivel de significancia de la Prueba Dúo Tríó.	103
ANEXO 14 Determinación del tamaño de partícula.....	104
ANEXO 15 Ficha técnicas de las resinas.....	105
ANEXO 16 Tablas de MUNSELL.....	107
Apéndice Fotografías.....	110

RESUMEN

El presente trabajo de investigación denominado extracción de esteviósido por columnas de intercambio iónico a partir de hojas de estevia "*Stevia rebaudiana Bertoni*", se realizó en los laboratorios de la Universidad Nacional del Altiplano, trabajo que tuvo por objetivos, determinar el efecto de la temperatura, porcentaje de materia prima/solvente y tiempo en la concentración y rendimiento bruto del esteviósido en el proceso de extracción, determinar la influencia del pH y el porcentaje de hidróxido de calcio óptimo en el proceso de purificación del esteviósido sobre el rendimiento del extracto purificado, y determinar el mejor método de deshidratación del extracto purificado de las hojas de estevia. Para lo cual el trabajo se dividió en tres fases, en la primera fase se determinó el efecto de la variable materia prima solvente (Mp/Sol.), temperatura (T°), y tiempo de tratamiento (t), se estudió cada variable en un rango de (1/10 - 1/20) para Mp./Sol., ($14^{\circ}\text{C} - 86^{\circ}\text{C}$) de temperatura y (15 minutos - 45 minutos) de tiempo de tratamiento, para la segunda fase se determinó el pH y el porcentaje de hidróxido de calcio óptimo, en el proceso de purificación del esteviósido sobre el rendimiento del extracto purificado en un rango de 8 - 12 y un porcentaje de hidróxido de calcio de 6.5% hasta 13.5% hallando un punto óptimo para cada variable, y para la tercera fase se determinó el mejor método de deshidratación del extracto purificado de las hojas de estevia, factores que afectan al rendimiento. Para el análisis de estas variables se utilizó un diseño central compuesto rotatable (DCCR), para optimizar las variables, en cuanto al mejor método de deshidratación de la solución, se determinó mediante una comparación de medias muestrales. Llegando a la conclusión de que la materia prima solvente sí influye en el rendimiento de la extracción acuosa del esteviósido siendo el óptimo 1/17, la temperatura no ejerce una influencia directa en el rendimiento de la extracción del edulcorante pero esta alcanza un óptimo a 42°C , en cuanto al tiempo de tratamiento se determinó que esta variable sí ejerce una influencia directa en el rendimiento bruto del extracto alcanzando un óptimo en 55 minutos de tratamiento, para la segunda fase se determinó que el pH en la purificación de intercambio iónico sí influye y el valor de pH 10.5 es el óptimo para el extracto crudo a purificar por intercambio iónico, al obtener mayor rendimiento y en cuanto al porcentaje de hidróxido de calcio el óptimo es de 10.5% pero este no afecta de manera significativa al rendimiento mas sí en la eficiencia de las columnas de intercambio iónico. Para la tercera fase de esta investigación, se determinó que no existía una diferencia significativa en el método de deshidratación de las muestras respecto al rendimiento, pero sí en cuanto a la apariencia del producto obteniéndose un polvo crema con un poder edulcorante de 150 - 170 veces más dulce que la sacarosa o azúcar comercial y un rendimiento final de 7.36%.

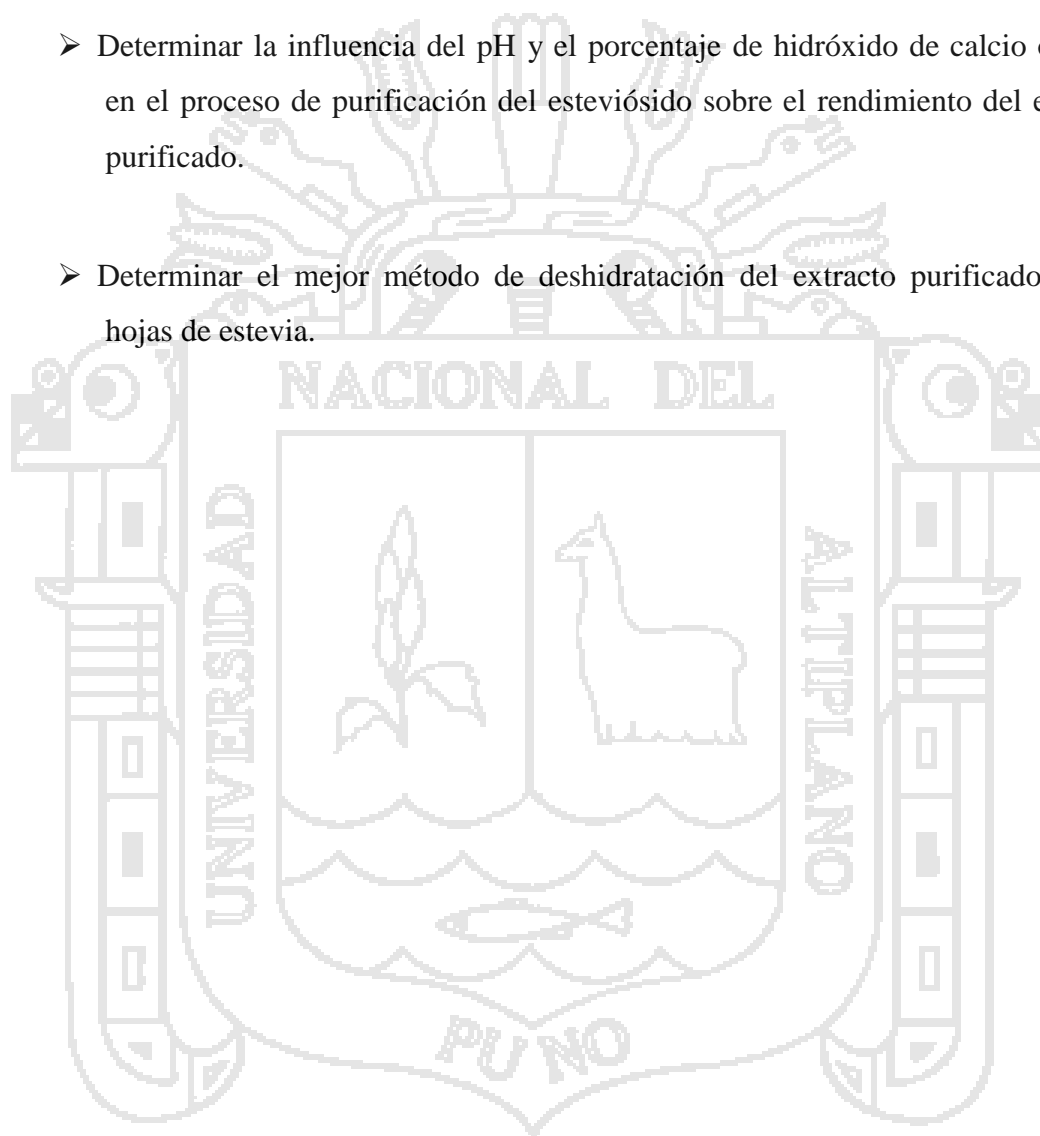
I. INTRODUCCIÓN.

Los productos dulces han sido consumidos por el hombre desde el principio de su historia, la sacarosa o comúnmente llamada azúcar ha sido el edulcorante de mayor consumo, siendo esta causante de muchos trastornos gravísimos al desarrollo y el equilibrio del organismo de los individuos tales como desordenes al metabolismo (obesidad crónica, diabetes y des-calcificación ósea), por otra parte en el departamento de Puno, recientemente se ha estado introduciendo el cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*), pero no existen antecedentes de que el departamento de Puno se hayan realizado estudios acerca de la extracción del esteviósido, que es un edulcorante natural que en sus estados purificados suele ser hasta 300 veces más dulce que el azúcar, y que viene a ser el principio activo de las hojas de estevia, es por ello que nos vemos en la necesidad de desarrollar un método óptimo para la extracción del esteviósido en polvo a partir de hojas de estevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*). Por otro lado el fenómeno social llamado “boom de los productos light” ha hecho que la tendencia a consumir productos de origen natural, sin contraindicaciones médicas, tenga un notorio aumento debido a la atención de los consumidores en el cuidado de su estética y la salud, actualmente las personas que consumen edulcorantes se encuentran en rangos de edad muy amplios (15-65 años) a diferencia de años pasados, es por ello que el presente trabajo de investigación presenta una alternativa natural para la sustitución de edulcorantes sintéticos, los cuales tienen numerosos efectos negativos en la salud de los consumidores.

Asimismo, con este trabajo se presente dar una alternativa para la industrialización de las hojas de estevia, otorgarle valor agregado y obtener de este proceso mayor rentabilidad, además es muy buena alternativa frente al cultivo de la hoja coca por la posibilidad de generar proyectos de extensión agraria con municipios, ONGs, etc como cultivos intensivos exportables.

Por lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta esta situación, se consideró ejecutar el presente trabajo, y para ello nos hemos planteado las siguientes objetivos.

- Determinar el efecto de la temperatura, porcentaje de materia prima solvente y tiempo en la concentración y rendimiento bruto del estevósido en el proceso de extracción.
- Determinar la influencia del pH y el porcentaje de hidróxido de calcio óptimo, en el proceso de purificación del estevósido sobre el rendimiento del extracto purificado.
- Determinar el mejor método de deshidratación del extracto purificado de las hojas de estevia.



II. FUNDAMENTO TEÓRICO.

2.1 ESTEVIÁ.

Rojas (1999), señala que la estevia es una planta natural de clima tropical el cual posee un edulcorante natural y saludable, "esteviósido", presente hasta en 10% extraído de la planta, se caracteriza por su sabor extremadamente dulce, 200 a 300 veces más que el azúcar de caña, pero no provee calorías. Hay indicaciones de que este azúcar completamente saludable ha sido usado por las tribus nativas del Paraguay desde 1887 para endulzar la bebida conocida como "mate". Durante siglos, los guaraníes de Paraguay y Brasil usaron el *ka'a he'ẽ* como edulcorante natural. El naturalista suizo Moisés Bertoni fue el primero en describirla científicamente en el Alto Paraná. Posteriormente, el químico paraguayo Ovidio Rebaudi descubrió en 1900 un glucósido en esta especie vegetal, de allí su nombre: Rebaudiana Bertoni.

Zanon (2000), define a la planta de la siguiente manera, “*Stevia Rebaudiana* es un arbusto perenne, que alcanza los 90 cm de altura. Las hojas, lanceoladas o elípticas y dentadas, son alternas, simples, de color verde oscuro brillante y superficie rugosa, a veces algo vellosas, de hasta 5 cm de largo por 2 cm de ancho. Los tallos son pubescentes y rectos, ramificándose sólo después del primer ciclo vegetativo, con tendencia a inclinarse. Las raíces son mayormente superficiales, aunque una sección engrosada se hunde a mayor profundidad; son fibrosas, filiformes y perennes, y son la única parte de la planta en la que no se presentan los esteviósidos, las flores se hallan dispuestas en capítulos pequeños, terminales o axilares y agrupadas en panículas corimbosas, de lóbulos blancos. El fruto es un aquenio delgado y plumoso, los rendimientos en esteviósidos y rabinósidos entre los distintos cultivos son muy pronunciados, alcanzando incluso proporciones de 5:1, y siendo la **Estevia peruana**, hoy día, la de mejor calidad y la de mayor rentabilidad con hasta 4 cosechas anuales.”



Imagen N° 01. *Stevia Rebaudiana*
Bertoni

2.1.1 CLASIFICACIÓN.

Zanon (2000), Señala la siguiente clasificación taxonómica:

Cuadro N° 01. *Clasificación taxonómica del la Estevia.*

División.	Magnoliophyta
Clase.	Magnoliopsida
Sub. Clase.	Asteridae
Orden.	Asterales
Familia.	Asteraceae
Genero.	Stevia
Especie.	Rebaudiana
Nombre científicos.	<i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni
Nombres comunes.	Hoja dulce de Paraguay, hee de kaa, ca un yupi, Azucacaa, Eira caa, capim doce, herba doce y estevia.

Fuente: Zanon (2000).

2.1.2 PROPIEDADES.

Cramer - Ikan (1987), indica que las hojas contienen básicamente esteviósido y rebaudiósido A, siendo éste último más dulce y con menor sabor residual amargo que el esteviósido, pero se encuentra en menor concentración; el rebaudiósido E es tan dulce como el esteviósido y, el rebaudiósido D es tan dulce como el rebaudiósido A.

Brandle (2001), dice que el propósito de estos glicósidos en la planta de la estevia no está todavía claro, por su alta concentración en la hoja y la conservación dentro de la especie indicaría que, en cierto tiempo, su presencia fue una ventaja significativa; algunos investigadores aseguran que actuaban para rechazar ciertos insectos y especulan otros que es un medio para controlar los niveles de ácido giberálico.

Brandle (2001), indica que la estevia alcanza una madurez fisiológica (las células llegan a su máximo crecimiento) en un periodo vegetativo de 3 meses y empieza a mostrar indicios de madurez organoléptica, donde las hojas presentan un mayor dulzor.

Tanaka (1982), indica que la óptima cosecha de las hojas para la extracción del edulcorante es antes de la floración.

Brandle (2001), indica que una vez que la estevia entra en la etapa de floración las concentraciones de glicósidos iniciales disminuye. Por lo cual es recomendable trabajar con hojas cosechadas antes de la floración, a fin de optimizar la extracción.

2.1.3 CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS.

Rodríguez (1998), señala en su artículo las características agronómicas de la Estevia.

Cuadro N° 02. *Características agronómicas de la Estevia.*

CARACTERÍSTICAS	MEDIDA.
Altura de planta.	1.00 m.
Longitud de hoja	6.3 cm.
Peso de hoja verde por Planta	20 gr.
Tiempo de vida	6 – 8 años
Rendimiento promedio en hoja seca	8,000 Kg/ Ha/año
Reacción a enfermedades.	Tolerancia a hongos

Fuente: Rodríguez (1998).

2.2 EDULCORANTES.

Vázquez *et al.* (2005), define a un edulcorante como la sustancia que proporciona a un alimento un gusto dulce. Además de la sacarosa (el azúcar normal), son de uso corriente como edulcorante la sacarina, aspartame, ciclamato, taumatina, pero su naturaleza química nada tiene que ver con los azúcares naturales.

Vázquez *et al.* (2005), menciona que los edulcorantes pueden ser de dos tipos, no calóricos, como la sacarina, ciclamatos, etc., que no aportan calorías, y calóricos como la fructosa, el sorbitol, etc., que sí lo hacen, aunque menos que la glucosa. Respecto de los edulcorantes sintéticos, hay estudios que demuestran que son nocivos para la salud. La variedad de edulcorantes tiene incidencia diferente en enfermedades como la diabetes. Conviene siempre leer la composición de los edulcorantes que están en el mercado, ya que casi siempre suelen ser mezclas de varios productos, y así saber lo que estamos tomando.

2.2.1 EDULCORANTES CALÓRICOS.

Multon (2006), define a los edulcorantes calóricos a aquellas sustancias de sabor dulce que aportan calorías al organismo, entre las más destacadas tenemos a la sacarosa, también está el manitol, y la fructosa.

2.2.2 EDULCORANTES NO CALÓRICOS.

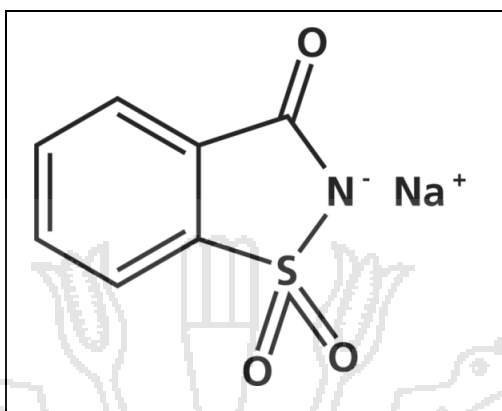
Multon (2006), define a los edulcorantes no calóricos a aquellas sustancias dulces que no tienen un valor energético, o que no aportan calorías a el organismo, tales como el ciclamato, sacarina, esteviósido, entre estos podemos destacar a los edulcorantes de origen vegetal o edulcorantes naturales, y a los de origen sintético.

2.2.2.1 EDULCORANTES SINTÉTICOS.

2.2.2.1.1 SACARINA.

Multon (2006), define a la sacarina como uno de los más antiguos edulcorantes, fue descubierto en 1879 por Ira Remsem y Constantine Fahlberg de la Universidad Johns Hopkins, químicamente es una imida o-sulfobenzoica. Denominado en la industria alimentaria con las siglas E-954, actualmente se obtiene mediante síntesis química del tolueno o de otros derivados del petróleo. La sacarina es aproximadamente 300 veces más dulce que el azúcar, no obstante, el uso de la sacarina está prohibido en algunos países como Canadá, y en Estados Unidos se planteó su prohibición en 1977, pero las campañas de las empresas afectadas y de algunas asociaciones, entre ellas las de diabéticos, motivaron que se dictara una moratoria a la prohibición.

Figura N° 01. Estructura de la
sacarina.

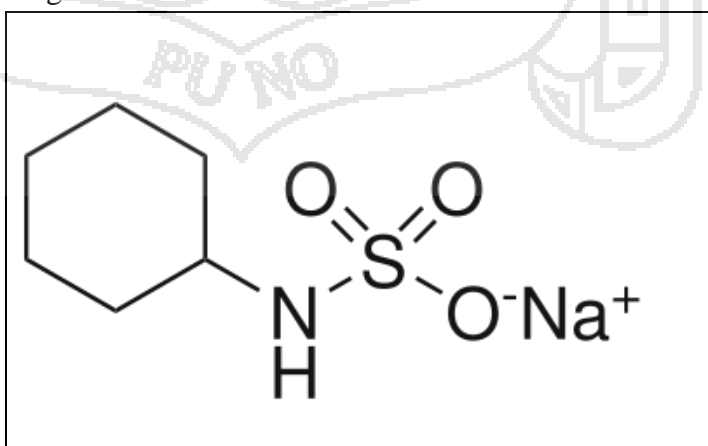


Fuente: Multon (2006).

2.2.2.1.2 CICLAMATO.

Multon (2006), define al ciclamato de cómo un edulcorante artificial de alta potencia, y su nombre común del ciclohexilsulfamato, denominado en la industria alimenticia con las siglas E 952, el ciclamato es un edulcorante no calórico descubierto en 1940 por Audrieth y Sveda, que ha sido considerado hasta cincuenta veces más dulce que otros endulzantes bajos en calorías, el ciclamato se obtiene a partir de del cicloexamina derivada del benceno, procedente del alquitrán de hulla o del petróleo.

Figura N° 02. Estructura del ciclamato.

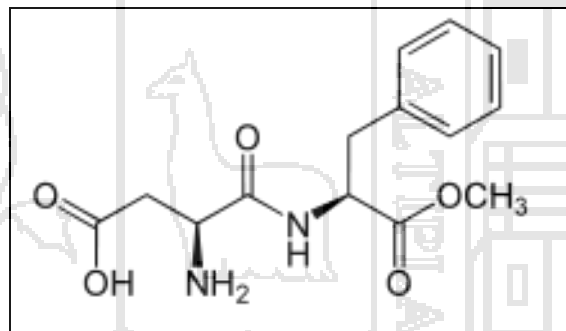


Fuente: Multon (2006).

2.2.2.1.3 ASPARTAMO.

Multon (2006), menciona que el aspartamo es un edulcorante no calórico descubierto fortuitamente en 1965 por los hermanos J.M. Schlatter / Searle, el aspartamo es un polvo blanco e inodoro, unas 150 - 200 veces más dulce que el azúcar, que se emplea en numerosos alimentos en todo el mundo, denominado en la industria alimenticia con las siglas E 951, el aspartamo es estable cuando se encuentra seco o congelado, pero se descompone y pierde su poder edulcorante, con el transcurso del tiempo, cuando se conserva en líquidos a temperaturas superiores a 30°C, el aspartamo se obtiene por síntesis química y enzimática a partir de dos aminoácidos; el ácido L- Aspártico y la L- fenilalanina.

Figura N° 03. Estructura del aspartamo.



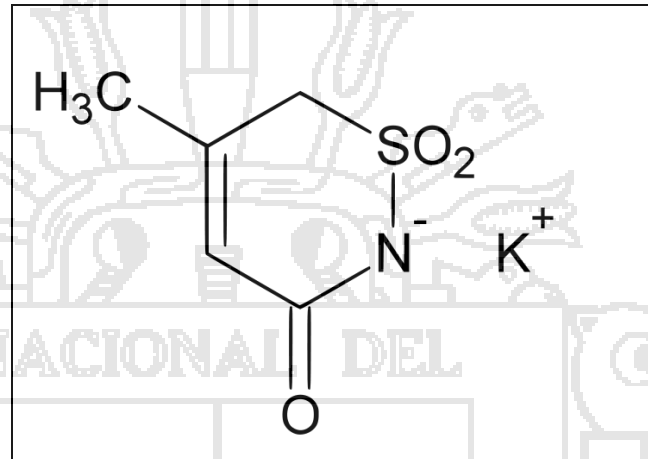
Fuente: Multon (2006).

2.2.2.1.4 ACELSUFAMO – K O ACELSUFAMO.

Multon (2006), define al Acesulfamo-k como un compuesto químico relativamente sencillo cuyo peso molecular es de 201 gr./mol., fue descubierto fortuitamente por Clauss y Jensen en 1967. Es aproximadamente 130 - 200 veces más dulce que el azúcar, con una gran estabilidad ante los tratamientos tecnológicos y durante el almacenamiento, su denominación en la industria alimenticia es con las siglas E 950, su uso se autorizó en Inglaterra en 1983; desde entonces se ha autorizado en Alemania, Italia, Francia, Estados Unidos en otros países, y está incluida

dentro de la nueva lista de aditivos autorizados de la Unión Europea, el Acesulfamo- K o Acesulfamo se obtiene por síntesis posible, entre otros, a partir de dos materia primas, el Fluorosulfoilisocinato y el ester butílico del ácido acetoacético.

Figura N° 04. Estructura del Acesulfamo - K o Acesulfamo

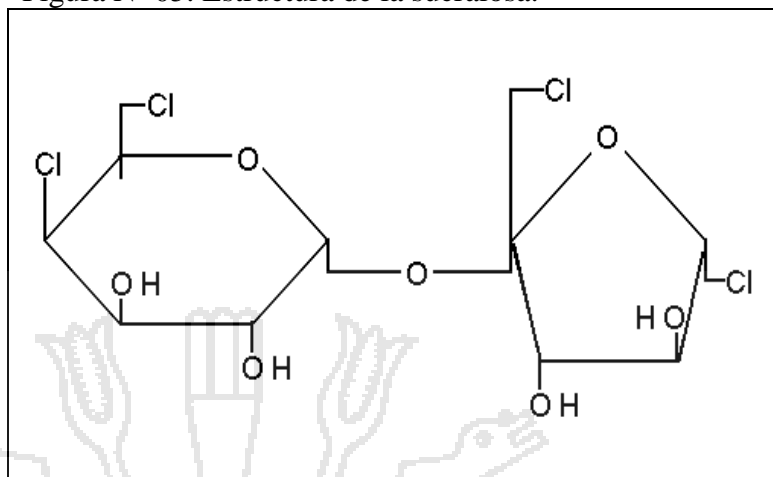


Fuente: Multon (2006).

2.2.2.1.5 SUCRALOSA.

Multon (2006), hace referencia a la sucralosa como un polvo cristalino blanco, no higroscópico, cuya estabilidad es de muchos años en condiciones de almacenamiento apropiadas (atmósfera seca y refrigerada), tiene una estabilidad a la temperatura en un rango muy amplio (hasta 230° C), la sucralosa *tiene un sabor azucarado* muy similar al del azúcar o sacarosa sin resabio o regusto amargo y no es más que débilmente metabolizable. La denominación de la sucralosa en la industria alimentaria es con las siglas E955, fue descubierta en el año 1979 por Hough de Tate y Lyle y tiene un poder edulcorante de 400-600 veces más dulce que la sacarosa, la sucralosa tiene un peso molecular de 397, y se obtiene a partir de la sacarosa por fijación de una molécula de cloro sobre el grupo hidroxilo y modificación de la configuración tipo gluco combinándola en tipo galacto.

Figura N° 05. Estructura de la sucralosa.

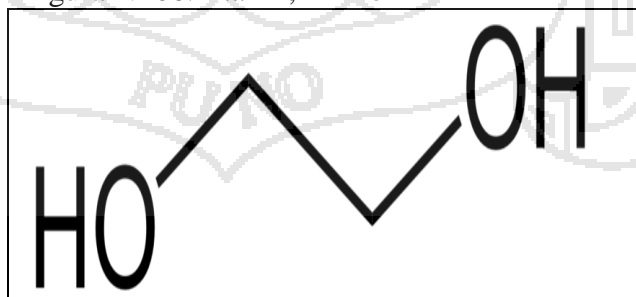


Fuente: Multon (2006).

2.2.2.1.6 GLICOL.

Rodriguez (1998), describe al glicol como un diol sencillo cuya fórmula es $(HO-CH_2CH_2-OH)$ se denomina sistemáticamente etan-1,2-diol, nombre que también se emplea para cualquier polioli. Su nombre deriva del griego *glicos* (dulce) y se refiere al sabor dulce de esta sustancia. Por esta propiedad ha sido utilizado en acciones fraudulentas intentando incrementar la dulzura del vino sin que el aditivo fuera reconocido por los análisis que buscaban azúcares añadidos. Sin embargo está demostrado que el glicol es tóxico y produce disfunción renal.

Figura N° 06. Etan-1,2 –Diol



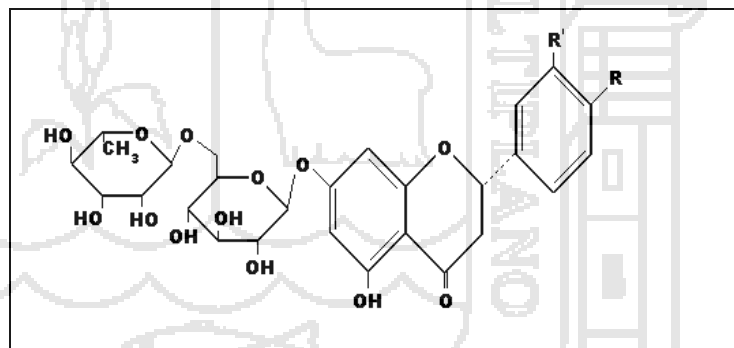
Fuente: Rodriguez (1998).

2.2.2.2 EDULCORANTES NATURALES.

2.2.2.2.1 DIHIDROCHALCONAS.

Multon (2006), menciona que este edulcorante fue descubierto en 1974 – 1978 por Horowitz y Gentili, y Dupaigne 1977, siendo este un edulcorante semi-sintético que se obtiene a partir de las flavonas de la naranja y del pomelo, especialmente de la naranja contenida en la parte blanda de la pared del pomelo, la obtención de este edulcorante es porque los glucósidos ha pasado a chalconas por acción de un álcali, seguido de una precipitación ácida, después a dihidrochalconas por hidrogenación catalítica, tiene un poder edulcorante de 1500 – 2000, es un polvo blanco cristalino, inodoro poco soluble en agua (1.2 g/l.), la estabilidad de este edulcorante es muy buena a pH neutro pero se degrada fácilmente en un pH ácido.

Figura N° 07. Estructura de las dihidrochalconas.



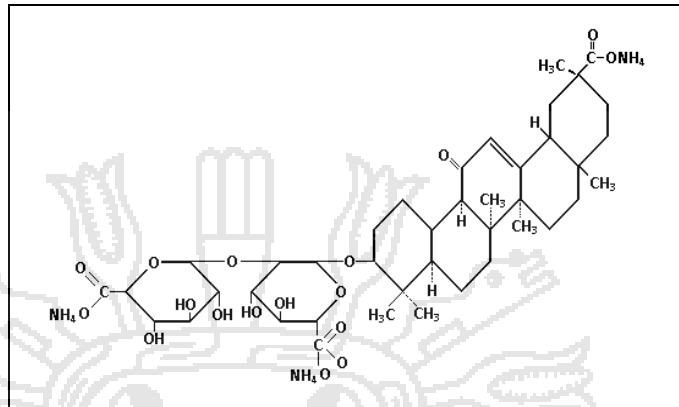
Fuente: Multon (2006).

2.2.2.2.2 GLICIRRICINA AMONICAL.

Multon (2006), define a este edulcorante como sal amoniacal de ácido Glicirrónico muy antiguamente conocida, principal edulcorante contenido en el rizoma del regaliz, este edulcorante se obtiene a partir de las raíces del regaliz, sales mixtas de calcio y potasio, tiene un poder edulcorante de 50 – 100, es un polvo blanco, soluble en agua, estable en disolución hasta 105° C pero se precipita a pH inferior a 4.5, tiene un sabor ligeramente

mentolado, con un retorsabor a regaliz lo que hace que su uso sea limitado.

Figura N° 08. Estructura de la glicirricina.



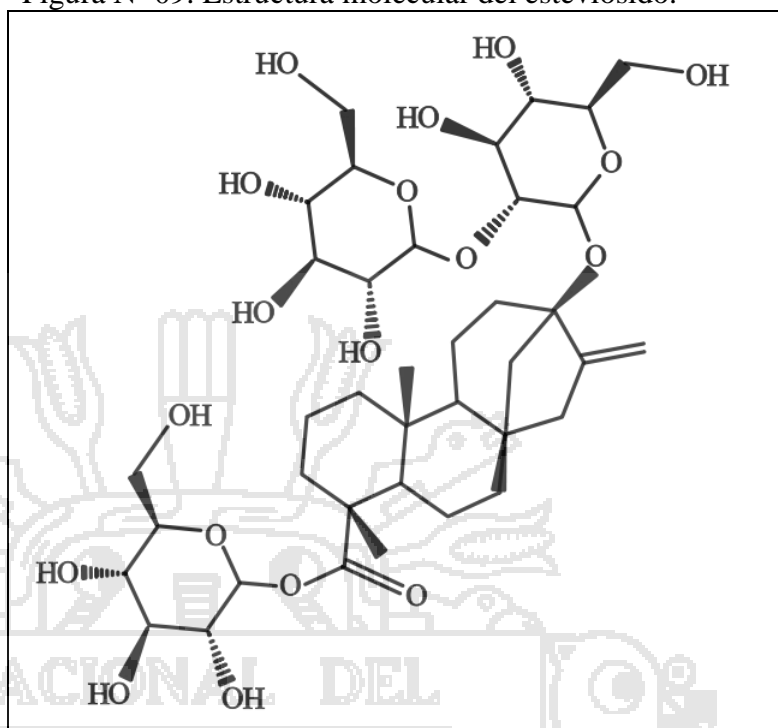
Fuente: Multon (2006).

2.2.2.2.3 ESTEVIOSIDO.

Multon (2006), define a este edulcorante como un glúcido di-terpénico, fue descubierto por Moises Bertoni en 1900 y aislado por Bridel y Laview en Paris 1931, es un polvo cristalino blanco, higroscópico de un sabor azucarado de buena calidad con un poco de resabio amargo, tiene un poder edulcorante de 250 – 300, y es estable en un rango amplio de pH (3 – 10), también es estable en un rango amplio de temperatura, se obtiene por ultrafiltración y diferentes métodos cromatográficos.

Gutiérrez (1999), menciona que el esteviósido es un edulcorante natural no calórico que se obtiene a partir de las hojas de estevia rebaudiana Bertoni, este es un glúcido diterpénico de peso molecular 804.80 y formula molecular C₃₈H₆₀O₁₈. Es un polvo blanco, cristalino e higroscópico, 250-300 veces más dulce que la sacarosa, pero tiene retrogusto amargo y desagradable.

Figura N° 09. Estructura molecular del esteviósido.



Fuente: Multon (2006).

2.2.2.2.4 TAUMATINA.

Multon (2006), hace referencia a este edulcorante como una proteína que se obtiene de una planta muy fácil de cultivar (Sudán, Togo, China, Zaire) el *thamatococcus danielli* de la familia de las marantaceas se obtiene por ultrafiltración y diferentes métodos cromatográficos, el poder edulcorante de esta proteína es de 1500 – 2000, son estables hasta una temperatura de 100°C siendo estas una proteína, el calor las degrada, también son estables en un rango de (3.2 – 8), la taumatina es un aditivo multifuncional capaz de enmascarar el amargor, intensificar, mejorar/modificar el sabor, por lo que realmente actúa como un sabor en sí misma, la percepción retardada del dulzor; dicha percepción dura mucho tiempo y deja un regusto a regaliz si se usa en altas dosis, así también el metabolizado por el organismo es como cualquier otra proteína alimentaria.

2.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ESTEVIÓSIDO.

Bertoni (1905) citado por Díaz et al. (1999), indican que el contenido promedio de esteviósido en las hojas varía de 6%-18% según la zona o el país donde se siembre, mientras que el rebaudiósido A de 2%-3%, los demás glicósidos se encuentran en menores cantidades, de tal manera que sumados no presentan el 1%.

Phillips (1989) citado por Brandle (2001), indica que un proceso general de extracción consta de cuatro pasos: extracción acuosa o por solvente, precipitación o coagulación con filtración, intercambio iónico y secado. Algunos de estos procesos podrían resumirse, de acuerdo al medio de extracción.

Para entender mejor este proceso debemos de diferenciar a la extracción del edulcorante (*esteviósido, Rebaudiósido y demás glicósidos*) de las hojas, de la purificación del extracto de hojas de estevia.

2.3.1 EXTRACCIÓN DEL ESTEVIÓSIDO.

2.3.1.1 Extracción con disolventes orgánicos.

La extracción del esteviósido se puede realizar empleando disolventes orgánicos, como el metanol, alcoholes aromáticos, dióxido y alcoholes de 4-8 átomos de carbono.

Según Tanaka (1982), la extracción metanólica se lleva a cabo sobre un gramo de hojas secas con 30 ml de metanol. Se juntan ambos extractos, se concentra al vacío 50 ml, luego se realiza la purificación y finalmente el secado.

López Y Peña (2005), mencionan el método descrito por Dobberstein en 1982, donde la extracción se realiza poniendo en contacto las hojas de estevia finamente trituradas con el solvente a temperatura ambiente o a altas temperaturas, la proporción del solvente es de 10 a 60 litros por 1 kilogramo de hojas. En este proceso se remueven las impurezas de baja polaridad (se recomienda como primer solvente el uso del líquido haloalqueno bajo, o preferiblemente el cloroformo), luego se realiza una

segunda extracción con un solvente de alta polaridad preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbón, como el metanol, la extracción es similar a la primera pero aquí se obtienen los glucósidos, el extracto es introducido a una columna cromatografía con fase estacionaria a base de sílica para capturar los glucósidos. Luego se introduce en la columna un solvente de polaridad mayor al primer solvente utilizado, pero con una polaridad menor al segundo (se puede usar 1-propanol), con el fin de enjuagar y capturar los glucósidos adheridos a las fase estacionaria.

2.3.1.2 Extracción acuosa.

Al realizar una extracción acuosa se elimina la necesidad de recuperar el disolvente y se evita la manipulación de sustancias toxicas, además que puede abaratar considerablemente el proceso de obtención del esteviósido.

Cernadas y Pryluka (1985), indican un método de extracción acuosa de esteviósido, este proceso consta fundamentalmente de una primera operación de extracción acuosa y concentración del extracto, seguida de varias etapas de purificación (defecación con CaOH_2 y paso a través de resinas de intercambio iónico), precipitación del esteviósido por adición de metanol y finalmente secado.

Gutiérrez (1999), indica que los valores de pH superiores a 12, el esteviósido pierde dulzor y se desestabiliza debido a que en la solución interactúan los radicales OH^- del hidróxido de calcio CaOH_2 , por otro lado menciona también que el proceso de precipitación continúa después de que la muestra es centrifugada, esto vuelve a enturbiar al muestra y dificulta la siguiente etapa de purificación cromatografía de las muestras.

López y Peña (2005), menciona el método descrito por Kienle en 1982, “*Separación cromatografía en fase gaseosa*” donde en este método utiliza el gas de dióxido de carbono para remover sustancias no deseadas (cutículas de cera, clorofila y otros pigmentos), con el fin de mejorar el sabor, ya sea de las hojas, del extracto o de los cristales de estevia, el dióxido de carbono es llevado a condiciones súper críticas (presión arriba de 73 bar y temperatura superior a 31°C), para ser conducido a un recipiente que contiene el material a tratar. Al terminar el proceso de extracción el gas es separado del recipiente y se lleva a presiones por debajo de 72 bar., y a temperaturas entre 25 a 50°C con el fin de regenerar el dióxido de carbono. El gas regenerado es enfriado hasta la temperatura de licuefacción para ser retornado al inicio del proceso donde nuevamente es llevado a las condiciones súper críticas.

2.3.1.3 CO₂ presurizado.

Kienle (1989) citado por Pásquel et al. (1999), estudio un método para eliminar los componentes responsables del sabor amargo, el cual se basa en la extracción con gas súper-crítico (CO₂ de preferencia). Así, Pasquel et al. (1999) estudiaron la extracción utilizando CO₂ presurizado, señalando que puede considerarse un proceso de extracción integral de dos etapas: en la primera etapa se extraen parte de los compuestos responsables del sabor amargo y en la segunda etapa se realiza la extracción de los glicósidos. Este proceso considera primero el pre-tratamiento de las hojas de estevia con CO₂ presurizado, seguido de la extracción de los glicósidos por mezclas presurizadas de CO₂/etanol, CO₂/agua, y CO₂/etanol/agua.

2.3.2 MÉTODOS DE PURIFICACIÓN.

López D, y Peña G. (2005) hace referencia a los siguientes métodos de purificación del esteviósido.

2.3.2.1 Purificación del esteviósido con resinas de intercambio iónico.

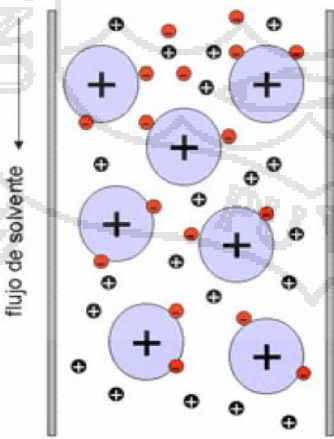
Payzant (1999), citado por López D, y Peña G. (2005), hace referencia a la purificación con resinas de intercambio iónico método que tiene como objeto obtener los principales glucósidos de la planta (esteviósido, rebaudiósido A) libre de otras sustancias, con el fin de tener un producto final con un mejor sabor; el proceso comienza cuando las hojas de estevia son mezcladas con agua, la temperatura puede oscilar entre la temperatura ambiente y 65°C. Luego se pasa por un proceso de filtración para obtener un extracto acuoso, el cual es tratado con hidróxido de calcio (también se puede usar óxido de calcio, carbonato de calcio, u otras sales básicas de calcio) para conseguir un precipitado remueven ácidos orgánicos, sales inorgánicas, fenol, sustancias derivadas del aparato fotosintético, proteínas, aminoácidos, entre otros, el precipitado es tratado con resinas de intercambio iónico de ácido fuerte, luego con resinas de intercambio iónico de base débil, el tratamiento con estas resinas puede repetirse varias veces hasta obtenerse la calidad deseada, a partir del producto obtenido con un nivel de pureza de 70% (70% combinación de glucósidos, 25% polisacáridos, 5% aceites) continua con el proceso patentado de Payzant (1999); que busca obtener un nivel de pureza mayor, el producto entonces es disuelto en agua y aplicado a una columna de resina 1 Pulg. De diámetro que contiene resina Amberlite XAD-7. La resina es enjuagada con metanol para obtener los glucósidos y una mínima parte de otras sustancias, que fueron abstraídos. Este líquido es calentado para eliminar el metanol y obtener un producto con 95 % de glucósidos.

Soto y Valdós (2002), menciona que la cromatografía de intercambio iónico con resinas de intercambio iónico, es un proceso por el cual los iones de una sustancia se concentran en una superficie como resultado de la atracción electrostática en los lugares cargados de las superficies. Los intercambiadores iónicos forman un grupo de materiales muy heterogéneo, cuya única característica común es que contienen una carga eléctrica fija capaz de enlazar a iones de carga opuesta. El tratamiento de una disolución con un intercambiador iónico se puede llevar a cabo mediante dos configuraciones distintas, en discontinuo o en columna. El intercambio iónico en columna es la que se emplea más a menudo. El intercambiador se coloca en el interior de una columna vertical, a través de la cual fluye la disolución a tratar.

El proceso global consta de las siguientes etapas:

- Empaquetamiento de la columna.
- Etapa de carga.
- Etapa de regeneración.

Figura N° 10. Principio de la cromatografía del intercambio iónico.

	<p>Las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz sólida cargada, y son retenidas.</p> <p>Las partículas cargadas positivamente se rechazan por la matriz sólida cargada positivamente y son efluídas.</p> <p>La elución de partículas cargadas negativamente se consigue cambiando el pH del solvente hasta igualarlo hasta su punto isoeléctrico o hasta invertir su carga neta.</p>
---	---

Fuente: Soto y Valdós (2002).

Soto y Valdós (2002), describe que en el proceso de extracción de esteviósido: “50 gr. de hojas secas de *Stevia rebaudiana* partidas se dejaron macerar a temperatura ambiente durante 24 horas en 700 ml de agua destilada más 2.5 gr. de carbonato de calcio. Se eliminaron las hojas por filtración, se agregó 5 gr. de hidróxido de calcio y se dejó actuar durante 30 minutos. El extracto se llevó a pH aproximadamente 8 por pasaje de dióxido de carbono. El eluido se pasó sucesivamente por resinas de intercambio catiónica (R2) y aniónica (R3) y finalmente por una columna de carbón activado granulada. Se obtuvo así una solución incolora que se concentró por evaporación al vacío”, con rendimiento alrededor de 5% sobre la base de las hojas secas, en el proceso utiliza agua y alcohol etílico como solventes, lo cual es importante teniendo en cuenta el uso alimentario del producto obtenido.

Harris (1992), menciona que las resinas que para que el intercambio iónico se lleve a cabo, se requiere tener una muestra de pH suficientemente alto (dentro de su rango), con la finalidad de crear enlaces iónicos fuertes, por otro lado a pH cercanos a la neutralidad las resinas de intercambio iónico alcanzan su máxima eficiencia.

2.3.2.2 Purificación del esteviósido por membranas.

Método descrito por Kutowski (1999): “*Extracción del esteviósido por membranas*”, el proceso comienza con la trituración o molienda de las hojas, una vez que las hojas de estevia son trituradas, se les adiciona el solvente a una temperatura entre 2 y 6° C, a esta temperatura la extracción de compuestos indeseables con elevado peso molecular (lípidos) es menor que a más altas temperaturas, la relación de peso hoja/agua es de 0.05, a muy poca cantidad de hojas aumenta la extracción de compuestos indeseables y a demasiada cantidad de hojas, disminuye la extracción disminuye la extracción de compuestos indeseables de las hojas, una vez mencionado esto el extracto está listo para

pasar por una serie de filtros en donde se remueven algunos pigmentos, materiales de alto peso molecular y material particulado que se puede generar en la tributación, posteriormente a este vienen los procesos de ultrafiltración y nano filtración, en los cuales se obtiene un permeado conteniendo esteviosido y rebaudiósido, para reducir el consumo de agua se puede realizar una recirculación que incluyan filtros (membrana convencional de osmosis inversa) para purificar el fluido, la porosidad de las membranas son modificadas, características que se utiliza para capturar los componentes dulces y deja pasar los componentes no deseados que producen retrogusto, la última fase del proceso consiste en la evaporación de agua que se consigue con un atomizador y una estufa de secado, formándose en esta última fase del proceso los cristales de esteviósido.

Cheng et al. (1985), indican que la adición de Ca (OH)_2 tiene la función de precipitar las impurezas, dentro de estas, colorantes, gomas y otras sustancias impuras; y el paso del extracto a través de resinas de intercambio iónico remueve completamente el color de este. Si en los procesos antes mencionados no se obtiene un producto con sabor aceptable se aplican otros tratamientos tales como modificaciones enzimáticas o químicas pero el producto resultante no podría llamarse natural. Esta situación disminuiría significativamente su valor desde el punto de vista de la comercialización del producto. También refiere que paso del extracto a través de las resinas de intercambio iónico remueve completamente el color de este y requiere parámetros exactos para su acción, como pH de ingreso, temperatura y caudal de ingreso y salida del exacto.

2.4 CARACTERÍSTICAS DEL ESTEVIÓSIDO.

Según el código alimentario argentino (CAA), en su artículo N° 1398 inc. 64.3 (resol. 10 1, 22/02/93), define al esteviosido como: “polvo blanco cristalino, inodoro, higroscópico, no fermentescible, de sabor dulce aun en soluciones muy diluidas, 300 veces más dulce que la sacarosa muy soluble en agua”.

Soto y Valdos (2002), mencionan que entre las propiedades físico-químicas deseables del esteviosido para la elaboración de alimentos podemos destacar:

2.4.1 CARACTERÍSTICAS FISIQUÍMICAS DEL ESTEVIÓSIDO.

2.4.1.1 Composición.

Pureza:	mín 90% como esteviosidos totales.
Esteviosido:	mín 50%.
Rebaudiosido A:	mín 30%.
Rebaudiosido B:	no detectable.
Dulcósidos A:	no detectable.
Steviolviósidos:	no detectables.
Esteviol e isoesteviol:	no detectables

Pasquel *et al.* (1999), hace referencia a que el extracto de las hojas de estevia tiene una composición de diferentes glúcidos, siendo el de más importancia el esteviosido, por ser el componente mayoritario de este análisis.

Cuadro N° 03. Composición del esteviósido.

Clase	Sustancia (% W/W máximo obtenido)
Glucósidos diterpénicos	Dulcósidos A; esteviósido (0.04); esteviósido (7.0); rebaudiósido A (1.43); rebaudiósido B (0.44); rebaudiósido C(0.4);rebaudiósido D(0.03); rebaudiósido E (0.03).
Diterpenos labdánicos	Jhanol (0.0063); austroinulina (0.06); 6-0-acetilaustroinulina (0.15).
Triterpenos.	Acetato de B-amirina (-); lupeol (-)
Esteroides.	B-sitosterol (-); estigmasterol (-).
Glicósidos flavonoides	Rutina (0.0073); centaureidina (-); quercitrina
Taninos	No identificados
Aceites volátiles	Porcentaje másico total 0.12%
Alcano	Octano-3ol (0.0011)
Alcoholes	Alcohol benzílico (0.00129).
Monoterpenos	Canfor (0.0017); 1.8-cineol (0.00084); p-cymeno (0.00084); geraniol(0.0016); linalol (0.0067); limoneno (0.0012); oxido de linalol (0.0055), α -pineno (0.00048); β - pineno(0.0023); λ -terpineno(0.00024); terpinen-4-ol (0.0012) α - terpineol (0.0054)
Sesquiterpenos	Λ -candineno (0.0036); s- sandineno (0.0012); α -cnadinol (0.0017); tert-candinol (0.0028); α -colocoreno (0.0012); oxido de aciofileno (0.0019); α -cubebeno (0.00012); α elemeno (0.0006); nerolidol (0.031); trans- β -farneseno (0.0054); α -humuleno (0.0029); β -selineno (0.0026).

Fuente Pasquel et al (1999).

2.4.1.2 Dulzor.

El edulcorante que se obtiene es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa a una concentración de sacarosa del 0,4% y 110 veces más dulce que la sacarosa a una concentración de sacarosa del 10%. **Estabilidad térmica**

2.4.1.3 Estabilidad térmica.

Presenta estabilidad térmica a temperaturas normales de procesamiento de los alimentos.

2.4.1.4 Estabilidad al pH.

Es estable en un rango amplio de pH: de 3 a 9 aún a 100°C. Por encima de pH 9 se produce una rápida pérdida del dulzor. En bebidas gasificadas que incluyen en su composición ácido cítrico y fosfórico, se reportan pérdidas del 36% y 17% respectivamente cuando se almacena a 37°C.

2.4.1.5 Sinergismo.

Con aspartame, sacarosa, glucosa, fructosa y sacarina.

2.4.1.6 Usos.

En gomas de mascar, caramelos, pre-mezclas de tortas, bebidas de bajo contenido calórico, salsas, pickles, productos medicinales y de higiene bucal.

2.4.1.7 Toxicidad.

Se considera que es un edulcorante aparentemente seguro ya que existe la evidencia de su uso durante varias centurias tanto en el empleo de la hoja como de los extractos crudos y no se observan evidencias de toxicidad aguda y sub aguda.

2.4.1.8 Metabolismo.

No hay evidencia que el esteviósido se metabolice en el hombre por medio de las enzimas digestivas a esteviol y glucosa (el esteviol inhibe la fosforilación oxidativa *in vitro*)

2.4.2 COMPOSICIÓN DE LAS HOJAS DE ESTEVIA.

Manish y Rema (2006), realizó un estudio donde analiza las hojas de estevia, la composición proximal de las hojas, en ellas se analiza en contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl (1976), cuyo factor de conversión para determinar el contenido de proteínas es 6.25%, el contenido de grasas fue determinado por el método soxhlet, los datos obtenidos de este estudio se emplearon en el ramo de la medicina para determinar si el consumo de las hojas de estevia propiamente dicha tiene efectos nocivo sobre la salud.

Cuadro N° 04. Composición proximal de las hojas de estevia

Composición.	Porcentaje.
Proteína	20.42 ± 0.57
Grasas	4.34 ± 0.02
Carbohidratos	35.20 ± 0 1.26
Fibra	26.88 ± 0.55
Cenizas	13.12 ± 0.31

Fuente: Manish y Rema (2006)

2.4.3 TOXICIDAD DEL ESTEVIÓSIDO.

Rodríguez (1998), menciona que diversos estudios toxicológicos de glicósidos de la estevia, demuestran que no producen efectos desfavorables en la salud, tampoco tiene efectos cancerígenos; por ello han sido incorporados en el Código Alimentario Argentino y recientemente aceptados y permitidos como suplementos dietéticos por la Food and Drug Administration de E.E.U.U. (FDA), quedando así posicionados como

productos de productos basados en Ciclamatos, sacarinas, y como excelente competidor del aspartame.

La toxicidad de la Estevia y sus glicósidos se han estudiado desde distintos puntos de vista, obteniéndose hasta ahora para todos ellos efectos negativos; no se han encontrado ninguna anormalidad en el peso, ingesta de alimentos, características de Células y membranas, uso de enzimas o cromosomas, efectos de nacimiento, en general sin ningún efecto colateral. A principios de 1990 se realizaron los primeros estudios realizados por Rebaudí, estos confirmaron la seguridad de la estevia. Posteriormente se han estudios sobre los principales aspectos toxicológicos de la estevia y el esteviósido:

- kohda (1976), toxicidad aguda. Determinaron una DL₅₀ de 34g/Kg de extracto de estevia concentrado con 50% de esteviósido, para el consumo humano. Resultados de estos estudios de toxicidad no predicen ningún riesgo potencial para la población humana por la ingesta del extracto de estevia y sus componentes.
- Yamada *et al* 1984 citados por Kinghorn y Soejarto (1985), Toxicidad crónica – carcinogénica. estudios de toxicidad crónica por la ingesta de extracto de estevia realizados en Japón, afirman que la variación en la dosis aplicada no influye en el crecimiento, en la apariencia en general, en los exámenes hematológicos y bioquímicos de la sangre, peso de órganos y observaciones microscópicas y macroscópicas. Resultados de estos estudios sustentas la seguridad del extracto de estevia en la alimentación humana.
- Oliveira *et al.* (1981) citados por Kinghorn y Soejarto (1985), habla sobre el efecto en la producción. Estudios realizados en Japón y en Brasil concluyen que la administración que el extracto acuoso de estevia como esteviósido no afectan al apetito sexual y a la fertilidad, tanto en machos como hembras, no afectando tampoco las características de los órganos reproductivos de los animales.

- Procinska *et al.* 1978 citados por Kinghorn y Soejarto (1985), Potencial mutagénico. Extractos y compuestos puros (esteviósido, rebaudiósido A – E y esteviolbiosido) de las hojas de estevia fueron intensamente estudiados en sus actividades mutagénicas. Utilizando *Salmonella thypimurium* o *escherichia colli*, todos esos materiales fueron reportados como no, mutagénicas en laboratorios de Japón y Estados Unidos, estudios de mutagenicidad realizados con cepas de recombinación deficientes de *bacillus subtilis* también muestran que muchas de estas sustancias son inocuas.
- Gutiérrez (1999), hace referencia a estudios de metabolismo, que no hay evidencias que el esteviósido se metabolice en el organismo humano por medio de las encimas digestivas a esteviol o glucosa (el esteviol inhibe la fosforilación oxidativa *in vitro*) sin embargo Hutabca (1997) citado por Geuns *et al.* (2003), indican que las bacterias del colom y del secum degradan el esteviósido a esteviol, *in vitro*; así también señala que esto no ocurre *in vivo*, por las condiciones anaerobias del colon humano.

Cuadro N° 05. Toxicidad de lo edulcorantes.

EDULCORANTE	EFECTOS EN EL CUERPO HUMANO
Aspartame.	En personas incapaces de metabolizar la Fenilalanina se produce en desorden metabólico fenilcetonúrico. También pueden tener problemas personas con enfermedades avanzadas en el hígado, y en mujeres embarazadas con niveles altos de fenilalanina en la sangre. Entre algunas de las sintomatologías que se le atribuyen están: convulsiones, coma, tumores cerebrales, ceguera.
Sacarina.	En países como en Canadá se encuentra prohibido por haber causado cáncer a la vejiga en animales de laboratorio. Todavía se requiere una advertencia en sus empaques, que su uso puede ser peligroso para la salud y que se ha establecido a la sacarina como causante de cáncer en animales de laboratorio. También se le atribuye la capacidad de provocar cáncer en los descendientes de quienes la consumen.
Ciclamato.	Está en estudio si el ciclamato o su producto de metabolización, la CICLOEXILAMINA, tienen efectos adversos sobre la presión sanguínea, también pueden causar daños genéticos o atrofia testicular, se ha demostrado que no es cancerígeno pero que es co-cancerígeno es decir que puede aumentar las probabilidades de ocurrencia. En el ser humano, interfiere con la síntesis de las hormonas tiroideas, y puede producir alergias, dañar los espermatozoides y los testículos. La OMS considera que tiene efectos cancerígenos y mutágenos, razón por la cual, fueron prohibidos desde 1970, en Estados Unidos, Japón, Gran Bretaña y Francia. Además, su consumo está desaconsejado en niños y embarazadas.
Sucralosa.	Es un edulcorante derivado del azúcar común, no se transforma en el organismo, es a calórico. No provoca caries dentales. Este edulcorante fue testeado durante 10 años, y si bien fue aprobado como “seguro”, se sacrificaron brutalmente más de 12.800 animales en los laboratorios donde se probó, al igual que sucedió con los demás edulcorantes, que posteriormente, sólo cuando fueron empleados en humanos, demostraron poseer propiedades dañinas.

Fuente: Wong (1995)

2.4.4 PODER EDULCORANTE.

Baduí y Wong. (1995), mencionan que todos los azúcares poseen la característica de tener sabor dulce y su poder edulcorante es diferente en cada caso. La intensidad de la dulzura de los azúcares puede variar debido a muchas causas, como la temperatura, la concentración y la presencia de otros compuestos. Existen muchas teorías que explican el fenómeno de la dulzura, pero la más aceptada, considera que esta sensación se produce como un fenómeno que ocurre debido a la facilidad que tienen los hidroxilos de formar puentes de hidrógeno entre la molécula estimulante y el sitio receptor sensor de la boca. En esta teoría se considera que la molécula dulce tiene dos átomos electronegativos, A y B, uno de los cuales está unido a un Hidrógeno en forma de AH, y donde el receptor tiene una estructura similar, de tal forma que la interacción se efectúa en forma inversa, en donde AH es el donador del protón y B el aceptor. No es necesario que la molécula tenga un carbono anomérico libre para producir dulzura ya que la sacarosa, al ser un azúcar no reductor es dulce.

Cuadro N° 06. Edulcorantes.

NOMBRE.	poder edulcorante sacarosa = 1
Sorbitol.	0.5
Xilitol.	1.0
Ciclamato.	40
Sacarina.	450
Aspartame.	200
Aselsufame-K.	200
Esteviósido.	300
Glicirrina.	50
Taumatina talina	2000

Fuente: Badui y wong (1995).

2.4.5 DETERMINACIÓN DEL PODER EDULCORANTE.

Para determinar el poder edulcorante del esteviósido antes debemos de conocer los siguientes conceptos.

5.6.1 El sabor.

Cohn y Georg (1914), el sabor es la impresión que nos causa un alimento u otra sustancia, y está determinado principalmente por sensaciones químicas detectadas por el gusto (paladar) así como por el olfato (olor). El 80% de lo que se detecta como sabor es procedente de la sensación de olor. El nervio trigémino es el encargado de detectar las sustancias irritantes que entran por la boca o garganta, puede determinar en ocasiones el sabor. El sabor de los alimentos es una preocupación de los cocineros, así como un reto científico para la industria alimentaria. Los saborizantes y los condimentos, sean naturales (especies) o artificiales (números E), se emplean para resaltar o modificar los sabores.

Kier (1972), *existen cinco sabores básicos e los alimentos, siendo el dulce es uno los únicos sabores que es aceptado de manera global por todas las culturas y etnias de la tierra como uno de los sabores más placenteros. Se detecta principalmente en las papilas gustativas de la punta de la lengua. Los alimentos que poseen un alto contenido de carbohidratos son percibidos dulces y los saborizantes artificiales de proporcionar el sabor dulce se denominan edulcorantes. Los alimentos dulces suelen formar parte dentro de la alimentación humana de los postres y de los desayunos.*

Nofre y Tinti (1996), se sabe que ciertos compuestos químicos tales como los aldehídos y las cetonas son percibidos por la lengua como sustancias dulces. Lo mismo se puede decir con las sustancias que poseen carbohidratos, se perciben con cierto grado de dulzura. La sacarosa (azúcar común) es el ejemplo prototípico

de sustancia dulce, pero existen otras como la fructosa. Algunos aminoácidos se perciben dulces: los más dulces son la alanina, la glicina, y la serina. Algunos aminoácidos se perciben en una mezcla de sabor amargo y dulce.

Shallenberger (1963), algunas especies producen glucósidos que son muchas veces más dulces que el azúcar. Un ejemplo claro es el ácido glicirrízico que es un compuesto 30 veces más dulce que la sacarosa. Otro ejemplo es el esteviósido exportado de América del sur de la planta *Stevia rebaudiana* que puede llegar a ser 250 veces más dulce que la sacarosa. Otro edulcorante potente pueden ser ciertas proteínas como la taumatina encontrado en África occidental, la lisozima encontrada en los huevos de pollo. Los compuestos orgánicos presentan propiedades de sabor dulce, un ejemplo es el cloruro de berilio (BeCl_2) y el acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) que era ya empleada como edulcorante por los aristocráticos romanos, contribuyendo en gran medida al envenenamiento por plomo, se elaboraba el sapa que se hacía cociendo vino avinagrado en cacerolas de plomo.

Tinti, Nofre, y Claude (1991), muchos compuestos sintéticos se conocen como dulces, por ejemplo el cloroformo, el nitrobenzono, el glicol. En 2005 se determinaron cinco sustancias sintéticas: sacarina, ciclamato, aspartame, Aselsufamo potasio, sucralosa, alíame, y neotame. Algunas de estas sustancias fueron retiradas del mercado durante los años 1990s

Mahecha (1985), el gusto o sabor básico de un alimento puede ser ácido, dulce, salado, amargo, o bien puede haber una combinación de dos o más de estos. Esta propiedad es detectada por la lengua.

Hay personas que pueden percibir con mucha agudeza un determinado gusto, pero para otros su percepción es pobre o nula; por lo cual es necesario determinar que sabores básicos puede detectar cada juez para poder participar en la prueba.

Mahecha (1985), esta propiedad de los alimentos (sabor) es muy compleja, ya que combina tres propiedades: olor, aroma, y gusto; por lo tanto su medición y apreciación son más complejas que las de cada propiedad por separado.

El sabor es lo que diferencia un alimento de otro, ya que si se prueba un alimento con los ojos cerrados y la nariz tapada, solamente se podrá juzgar si es dulce, salado, amargo o ácido. En cambio, en cuanto se perciba el olor, se podrá decir de qué alimento se trata. El sabor es una propiedad química, ya que involucra la detección de estímulos disueltos en agua aceite o saliva por las papilas gustativas, localizadas en la superficie de la lengua, así como en la mucosa del paladar y el área de la garganta. Estas papilas se dividen en 4 grupos, cada uno sensible a los cuatro sabores o gustos:

- **PAPILASIFORMES:** Localizadas en la punta de la lengua sensible al sabor dulce.
- **FUNGIFORMES:** Localizada en los laterales inferiores de la lengua, detectan el sabor salado.
- **CORALIFORMES:** Localizadas en los laterales posteriores de la lengua, sensible al sabor ácido.
- **CALICIFORMES:** Localizadas en la parte posterior de la cavidad bucal detectan sabor amargo.

Figura N° 11. Las células sensitivas de las papilas gustativas perciben los sabores y transmiten esta información al cerebro a través del nervio gustativo.

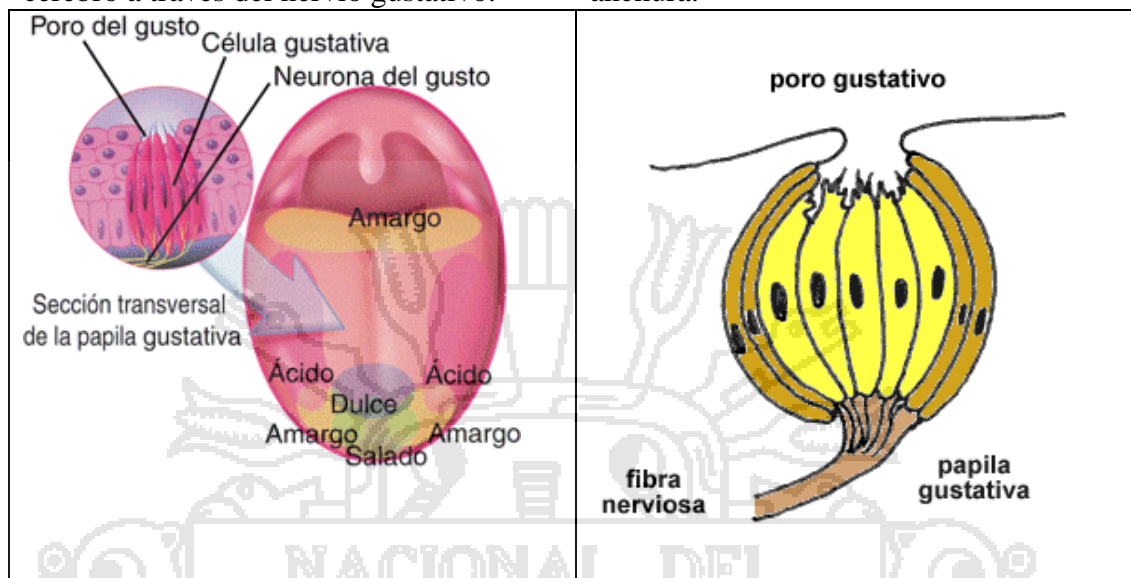


Figura N° 12. Botón gustativo. Tienen el aspecto de unos cuerpos ovoides pálidos, de 50 a 80 μm de altura y 30 a 50 μm de anchura.

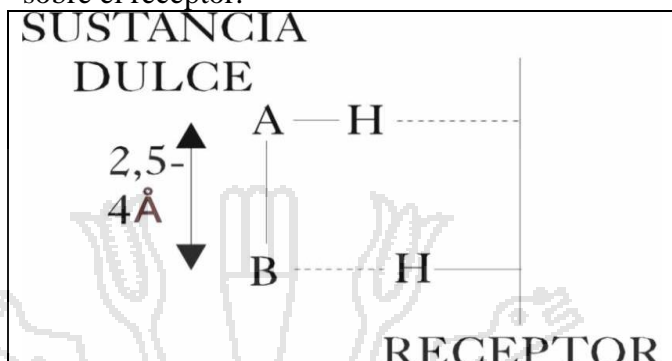
FUENTE; Nofre y Tinti (1996)

5.6.2 Fisiología del sabor dulce

Multon (2006), menciona que las células sensoriales del sabor dulce, en número de medio millar se encuentran agrupadas entre 50 a 60 en los botones gustativos agrupados asimismo de pocas unidades a varios centenares de las papilas gustativas de la lengua.

Heraud y Roux (1976), menciona que existe una enorme especificidad, de tal forma que el diseño de una molécula de sabor dulce, implica una interacción entre un protón débilmente ácido, como puede ser el de un grupo OH, el de una amida o imida, o el adyacente a un grupo nitro, que lo active, con una base de Lewis, que incluso podría ser un sistema con electrones π , un núcleo bencénico o un aceptor de protones a una distancia entre 2,5Å y 4Å, incluso hasta 5,4Å. En este caso, los terminales de las papilas gustativas ofrecen a aquellos grupos dos posiciones, una donadora e protones (A-H) y otra de base de Lewis (B), complementarias.

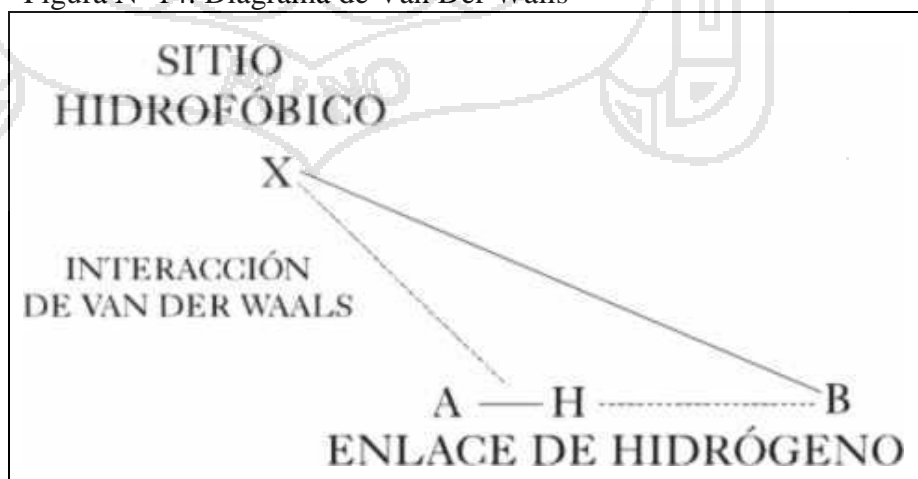
Figura N° 13. Fijación de una molécula dulce sobre el receptor.



FUENTE: Heraud y Roux (1976)

Kier (1972), menciona que existe una enorme especificidad, de tal forma que el diseño de una molécula de sabor dulce, implica una interacción entre un protón débilmente ácido, como puede ser el de un grupo OH, el de una amida o imida, o el adyacente a un grupo nitro, que lo active, con una base de Lewis, que incluso podría ser un sistema con electrones π , un núcleo bencénico o un aceptor de protones a una distancia entre 2,5 y 4 Å, incluso hasta 5,4 Å. En este caso, los terminales de las papilas gustativas ofrecen a aquellos grupos dos posiciones, una donadora de protones (A-H) y otra de base de Lewis (B), complementarias.

Figura N° 14. Diagrama de Van Der Waals



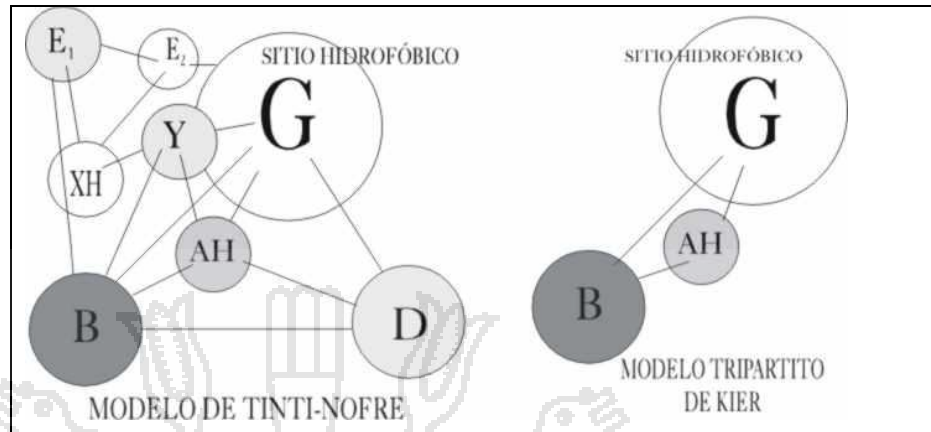
FUENTE: Kier (1972)

Nofre y Tinti (1996), *menciona que algunas veces* se produce una interacción de Van der Waals a través de dipolos reforzada por grupos próximos que la activa y la orientan en una conformación tal que coincide con los grupos del receptor. En nuestra lengua fundamentalmente están situados en la punta que es donde mejor se percibe dicho sabor. La disposición podría ser un triángulo escaleno tal como se indica en el dibujo (Teoría tripartita de Kier), en la que la sustancia X hidrofóbica correspondería a la B de Shallenberger.

Nofre y Tinti (1996), *menciona que la* introducción del grupo hidrofóbico que modifica las energías de hidratación, explica la especificidad conformacional del sabor dulce en algunas moléculas

Nofre y Tinti (1996), dice que hasta incluso se puede complicar más por activación de las posiciones dadoras o receptoras por grupos dispuestos en una determinada geometría espacial, como indica el modelo Tinti-Nofre de 1991. Este modelo postula hasta ocho lugares de interacción retomando los AH...B de Shallenberger e incluyendo el X de Kier como grupo hidrofóbico G, pero completándolo con otros cinco, de los que el D (podría ser un grupo saturado de carácter ácido), tiene un papel importante, mientras que los otros cuatro, más alejados E₁, E₂ XH e Y, simplemente modifican aumentando o disminuyendo el carácter dulce.

Figura N° 15. modelo de Tinti - Nofre y el modelo tripartito de Kier



FUENTE: Tinti – Nofre (1996)

Multon (2006), dice que por este modo se llegó a diseñar y justificar por qué el ácido sucónico tiene un poder edulcorante 200.000 veces superior a la sacarosa. Actualmente se construyen por simulación computacional modelos de receptores idóneos para explicar este sabor. La especificidad es tan grande, que si la distancia disminuye, la polarización varía, y el cerebro interpreta un sabor opuesto; el amargo. Es más dado que deben coincidir los grupos en determinadas posiciones espaciales, puede ocurrir que un compuesto con isomería óptica dextrógira, produzca una sensación dulce, mientras que el isómero levógiro lo tenga amargo, por ejemplo la l-fenilalanina es amarga mientras que la d-fenilalanina es dulce.

5.6.3 Análisis sensorial.

Anzaldúa (1994), define al análisis sensorial o evaluación sensorial como el análisis de alimentos y otros materiales por medio de los sentidos. La palabra sensorial se deriva del latín *sensus*, que quiere decir sentido. La evaluación sensorial es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos químicos, físicos, microbiológicos, etc. Este tipo de análisis tiene la ventaja de que la persona que efectúa las mediciones lleva

consigo sus propios instrumentos de análisis, o sea sus cinco sentidos; por otro lado define tres pasos importantes para realizar el análisis sensorial.

A. Organización y formato de las pruebas.

El proceso de análisis se realizara llevando a cabo una prueba **dúo trío**, que nos permite en este caso determinar el poder edulcorante del esteviósido.

B. Proceso sensorial.

Anzaldua (1994), hace referencia a la capacidad y sensibilidad puesto que esto aumentan con un entrenamiento de los jueces que participaran en el proceso de análisis sensorial, por lo que los criterios de selección no deben ser excesivamente rigurosos, por otro lado todos los jueces deben ser asesorados e instruidos sobre cuestiones prácticas generales acerca de la prueba.

C. Cuestionario o formulario de la prueba.

En la prueba de análisis sensorial para determinar el poder edulcorante del esteviósido, los jueces tendrán tres muestras una de ellas será la muestra patrón (R), y las otras dos muestras estarán codificadas, que serán las muestras que se desean comparar con la muestra patrón (R), la labor del juez será de identificar la muestra que sea igual a la muestra patrón (R), esta información se describirá en las cartillas que tendrán los jueces pruebas descritas por Anzaldua (1994).

2.4.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION POR ESPECTROFOTOMETRIA.

Alcázar (2002), menciona que la espectrofotometría es una técnica de análisis que permite identificar o cuantificar sustancias, a través de la determinación o medición del espectro de absorción de energía y de la cantidad de esta absorbida por la sustancia (interacción de materia y energía en forma de radiación).

Matissek, Schenepel y Steiner (1988), describen en su libro sobre análisis de los alimentos, a la ley de de “*Bourguer-Lambert- Beer*”, como la variación de la intensidad de luz transmitida por una muestra con el espesor de ella o con la concentración de la sustancia, para materiales translúcidos. Estas relaciones *permiten hallar la concentración de una especie química a partir de la medida de la intensidad de luz absorbida por la muestra.*

Esta ley se puede expresar en términos de potencia de luz o de intensidad de luz, asumiendo luz monocromática, como:

$$T_{\lambda}=I_t = \frac{10^{-e_{\lambda}.b.c}}{I_0}$$

Donde:

T_{λ} es la transparencia de la muestra en longitud de onda λ .

I_t , es la intensidad de la luz transmitida por la muestra.

I_0 , es la intensidad de la luz que incide sobre la muestra y que proviene de la fuente.

e_{λ} es el coeficiente de absortividad molar en unidades de $M^{-3} \cdot cm^{-1}$.

b , es la longitud de la trayectoria del haz de luz a través de la muestra o el espesor de la celda en cm o lo que se conoce como paso óptico.

C , es la concentración de moléculas absorbentes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.5 MATERIALES.

3.1.3 LUGAR DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO.

El presente trabajo de investigación se realizó en la ciudad de Puno del departamento de Puno a 3825 msnm, en las instalaciones de la Universidad Nacional del Altiplano.

- Laboratorio de Ingeniería de la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano (UNA)- Puno.
- Laboratorio de Investigación y Medio Ambiente de la Universidad Nacional del Altiplano (UNA)-Puno.
- Laboratorio INDA de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) de la ciudad de Lima.
- Laboratorio de Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de Universidad Nacional de Ingeniería UNI de la ciudad de Lima.

3.1.4 MATERIA PRIMA E INSUMOS.

3.1.2.3 MATERIA PRIMA.

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron hojas secas trituradas de estevia, las cuales fueron traídas desde Caranavi – Bolivia, ya que estas recién se están produciendo en las zonas tropicales de nuestro departamento.

3.1.2.4 INSUMOS.

Los insumos que se utilizaron son los siguientes.

- Carbonato de calcio.
- Hidróxido de calcio (Ca_2OH).
- Agua destilada.
- Alcohol etílico.

3.1.3.5 MATERIALES.

- Matraces.
- Vasos de precipitados.
- Varillas de vidrio.
- Probetas.
- Lunas de reloj.
- Erlenmeyer.
- Equipo soxhlet.
- Balones.

3.1.3.6 EQUIPOS.

- Desionizador con resinas de intercambio iónico (AQUATROL).
- Bomba de vacío.
- Destilador de agua.
- Agitador.
- Cocinas.
- Termómetro.
- Estufa.
- Espectrofotómetro.
- Balanza analítica.
- pH-metro.
- Refrigeradora.
- Autoclave.
- Centrifugadora.
- Molino.
- Filtros de carbón activado.

3.1.3.7 REACTIVOS.

- Acido clorhídrico al 10%.
- Solución de hidróxido de sodio al 50%.

3.1.3.8 OTROS.

- Papel aluminio.
- Cinta masking.
- Fibra de vidrio.
- Bolsas de polietileno.
- Ollas de acero inoxidable.

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.2.4. ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS HOJAS DE ESTEVIA.

A. Determinación de humedad.- Se realizó por desecación en una estufa a 65°C con una muestra de 5 gramos, hasta lograr peso constante durante 12 horas, la determinación de humedad se hizo por diferencia de peso entre el peso inicial y el peso final, obteniéndose el porcentaje de humedad (AOAC, 1993).

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{Gr. de muestra.}} \times 100$$

B. Determinación de proteína total.- Se determinó por el método semimicro kjedahl, usando el factor de 6.25 para convertir el nitrógeno a proteína total. El procedimiento comprende 3 fases: digestión, destilación y titulación. Se peso 0.1 gr. De muestra, se lleva a un balón Kjeldahl, se agrega 2.5 ml. De ácido sulfúrico y se coloca en una cocina de digestión hasta que quede cristalizado. La muestra digerida se agrega NaOH, e inmediatamente se conecta el vapor para que se produzca la destilación, se coloca el refrigerador y se recibe destilado en el erlenmeyer con contenido de ácido bórico mas indicadores de pH; la destilación termina cuando hay un viraje de color, luego se procede a la titulación con HCL. Se anoto el gasto y se promedio a hacer los cálculos con la siguiente formula.

$$\% N = \frac{ml\ HCl \times normalidad \times Meq \times N_2}{Gr\ de\ muestra.} \times 100$$

F= factor de conversión (6.25)

C. Determinación de grasa.- Se determinó mediante el método de soxhlet, para lo cual se peso 2 gr. De muestra, se empaqueta en un papel filtro Whatman N°2 se coloca el paquete en el cuerpo del aparato soxhlet, debe ser destarado libre de humedad (anotando peso) y luego agregar el hexano, seguidamente se conecta a una fuente de calor, al calentarse se evapora y asciende a la parte superior, allí se condensa por refrigeración y cae sobre la muestra, regresando al balón por sifón. Se evapora el hexano remanente en el balón wen una estufa a 60°C y enfría en una campana. Los cálculos se realizaron con la siguiente formula.

$$\%grasa = \frac{(peso\ de\ balon\ +\ grasa) - (peso\ de\ valon\ vacio)}{peso\ de\ muestra.} \times 100$$

D. Determinación de cenizas.- Se realizó por 30 minutos de calcinación, después de esto se retira el crisol y deja enfriar, con el disgregador se rompe las partículas incineradas en forma uniforme e introducir nuevamente el crisol, transcurrido el tiempo se saca el crisol y dejar enfriar a temperatura ambiente, colocar en un desecador y luego pesar. El porcentaje de cenizas de determina de la siguiente manera (AOAC,

$$\%cenizas = \frac{(peso\ del\ crisol\ +\ cenizas) - (peso\ del\ crisol\ vacio)}{peso\ de\ muestra.} \times 100$$

3.2.5. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LAS MUESTRAS.

Determinación del valor del pH.- Se tomó 10 ml. de la muestra, seguidamente se procede a introducir el electrodo y leer inmediatamente el valor en el potenciómetro previamente calibrado con solución buffer.



Imagen N° 02. Corrección del pH de la muestra.



Imagen N° 03. Espectrofotómetro.

Absorvancia y Transmitancia.- Se determinó por espectrofotometría, a una longitud de onda de 210 nm.

Sólidos soluble.- Se cuantificó con el refractómetro Carl zeiss.

Concentración.- La determinación de la concentración de esteviósido se realizó por el método de espectrofotometría UV a 210 nm. (Nikolo et al. 1994, citados por Pasquel et al 1999), la concentración del esteviósido durante el desarrollo de la investigación fue expresada en mg. de esteviósido/ml de solución, en base a la curva de calibración, realizada con un esteviósido al 97 % de pureza (ver metodología 3.2.3).

Rendimiento de extracción.- Se cuantificó el rendimiento como porcentaje del producto obtenido referido al peso inicial de la materia prima.

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{(\text{peso del esteviósido})}{(\text{peso de las hojas de estevia})} \times 100$$

3.2.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTEVIÓSIDO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV.

Materiales y reactivos:

Solución estándar de esteviósido. Preparar 6 soluciones entre 0.016 y 0.1 mg/ml. de esteviósido.

Procedimiento:

Preparación de la curva estándar. Se realizó la curva de calibración de equipamiento con 6 puntos de una muestra comercial de esteviósido 95% diluido en agua, en las concentraciones seleccionadas (0.016, 0.032, 0.049, 0.065, 0.082 mg/ml). Haciendo una regresión lineal entre las concentraciones utilizadas y las absorbancias observadas, obteniendo la siguiente correlación:

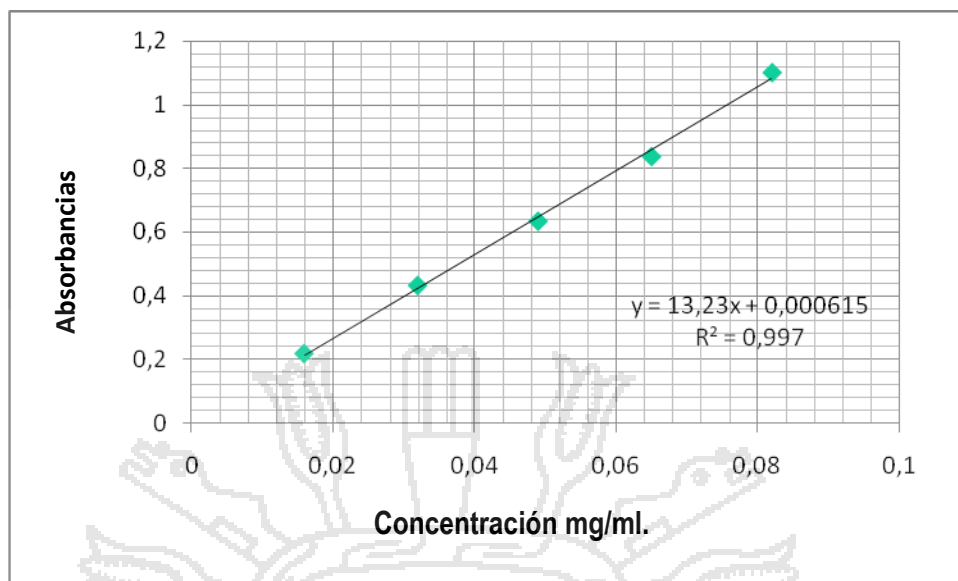
CURVA ESTÁNDAR DEL ESTEVIÓSIDO

Para la determinación de la curva estándar del esteviósido se realizó con los datos siguientes.

Cuadro N° 07. Resultados de la absorbancia.

Concentración	Absorvancia
0.01641	0.219
0.03282	0.433
0.04924	0.635
0.06565	0.838
0.08200	1.102

Figura N° 16. Curva estándar del esteviósido.



Donde:

◆ absorvancia — Lineal (absorvancia)

Los valores de concentración de esteviósido y absorvancia para la curva estándar de esteviósido fueron analizados por medio de una regresión lineal, la cual proporciono una línea recta con pendiente positiva, cuya ecuación es la siguiente $Y = aX + b$, donde Y es el valor de la absorvancia y X es la concentración de esteviósido (mg de esteviósido / ml de solución).

$$A = 13.236$$

$$B = -0.000615$$

El coeficiente de correlación fue de $R^2 = 0.997$

$$\text{Concentración} = \frac{\text{absorvancia} + 0.000615}{13.2364432}$$

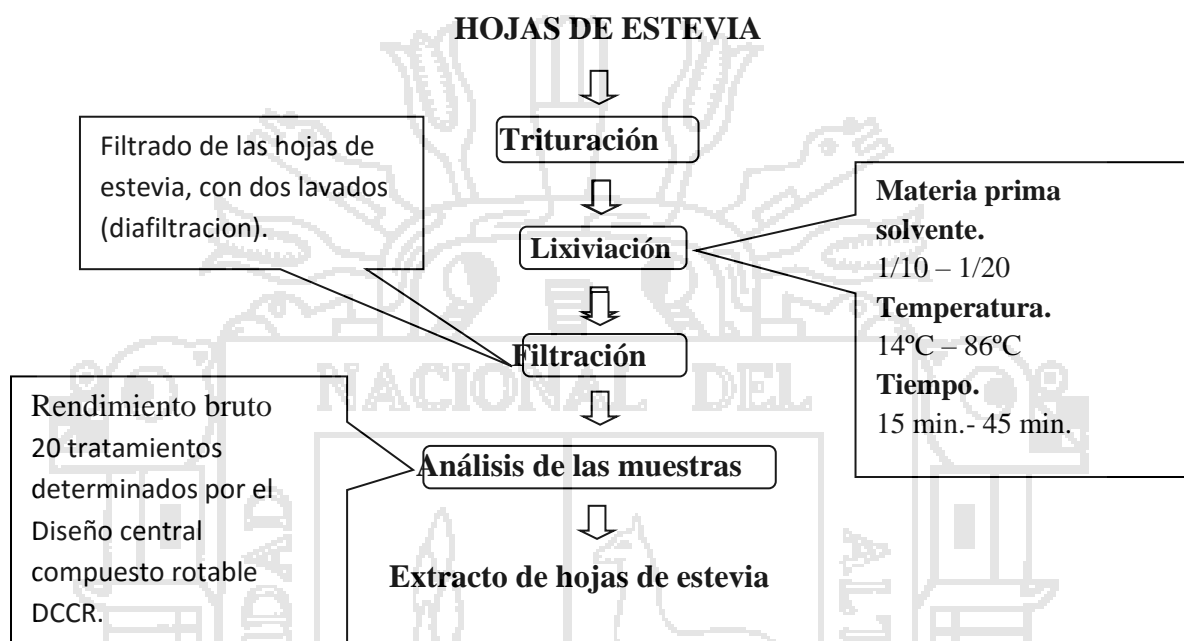
Análisis de muestra. Se realizó la espectrofotometría de las diferentes muestras de cada uno de los diferentes tratamientos estudiados según el plan experimental de manera que se determina su absorvancia a la longitud de onda seleccionada (210 nm).

3.7 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.3.3. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ESTEVIÓSIDO DE LAS HOJAS DE ESTEVIA.

3.3.1.4 FASE DE EXTRACCIÓN ACUOSA DEL ESTEVIÓSIDO.

Figura N° 17. Flujo del proceso de la primera fase.



Fuente: Elaboración propia (2009)

a) MATERIA PRIMA.

Para realizar el presente trabajo de investigación se utilizó como materia prima hojas de estevia, las cuales fueron secadas a la sombra Imagen N°04, también pueden ser secadas en cámaras de desecación como se muestra en la Imagen N°05, con una humedad aproximada de 6-10%.

Imagen N° 04. Secado solar de

Imagen N° 05. Horno para el

estevia.



secado de la estevia.

**b) TRITURACIÓN.**

Después de secadas, las hojas de estevia son trituradas en un molino de disco de uso manual, a fin de que estas incrementen su área de contacto.

c) LIXIVIACIÓN.

Es en esta etapa del proceso donde las hojas fueron mezcladas con un solvente que en este caso agua y donde se evalúa la proporción materia prima/solvente, temperatura y tiempo de tratamiento como se muestra en la Figura N°04.

De acuerdo a la bibliografía, debe de agregarse 5% de carbonato de calcio respecto a la materia seca para mejorar el proceso de extracción del edulcorante de las hojas.

Imagen N° 06. Proceso de
lixiviación de las hojas



d) **FILTRACIÓN.**

Se realizó utilizando un paño de trama fina con la finalidad de retener partículas mayores, el sólido es lavado con agua, para ser otra vez filtrado, donde el agua del lavado se reincorpora al extracto, este proceso se repite por 2 veces, para finalmente pasar por un filtro de carbón activado, es en esta etapa donde se evalúa el efecto que ejerce la temperatura, tiempo y proporción materia prima solvente en el rendimiento bruto del extracto.

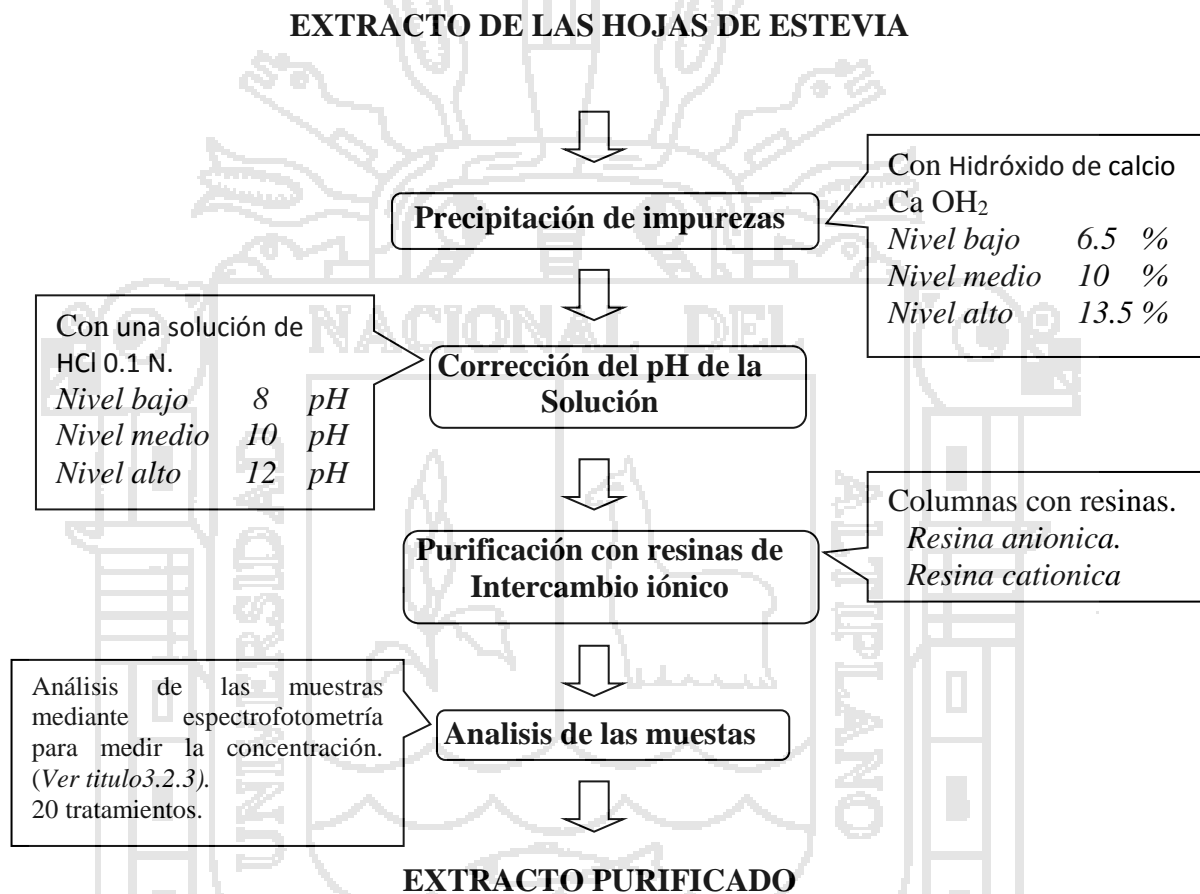
Imagen N° 07. Filtrado de las hojas con un paño de trama fina.



3.3.1.5 FASE DE PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ESTEVIA.

Esta fase se desarrolló con las características de la muestra representativa de la primera fase aquella con la que se obtiene un mayor rendimiento.

Figura N° 18. Flujo del proceso de la segunda fase.



Fuente: Elaboración propia(2009).

a) Precipitación de impurezas.

La precipitación de impurezas se realizó con hidróxido de calcio, en esta etapa se evaluó a tres diferentes concentraciones durante toda una noche, con la finalidad de remover sustancias de elevado peso molecular como se observa en la Imagen N°08, donde esta se centrifuga obteniendo el sobrenadante que luego es purificado y el sedimento del extracto es desechado.

Imagen N° 08. Precipitación de impurezas con
 $\text{Ca}(\text{OH})_2$



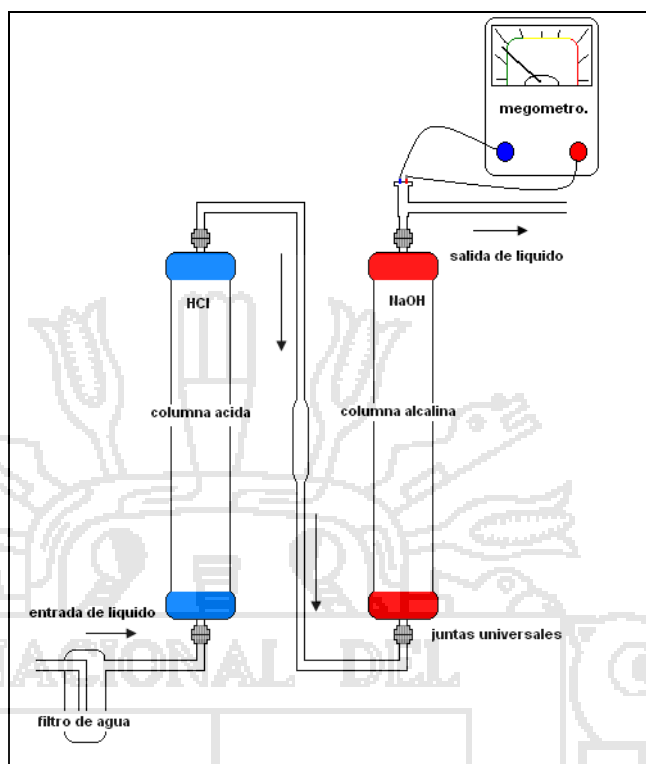
b) **Purificación con resinas de intercambio iónico.**

En esta etapa del proceso se evaluó el efecto de la concentración de hidróxido de calcio y pH de la solución antes de ingresar a las columnas de intercambio iónico, el pH es corregido antes de ingresar a las columnas con HCl 0.1 N.

El extracto obtenido del proceso anterior se purificó en las columnas de intercambio iónico, pasando primero por la columna aniónica que contiene resinas ácidas, donde quedan retenidas las sales y compuestos alcalinos, para luego pasar por la columna catiónica que contiene resinas alcalinas, donde quedan retenidos compuestos ácidos, obteniendo así una muestra cristalina.

Las resinas de intercambio iónico fueron regeneradas de acuerdo a las especificaciones técnicas (ANEXON°13).

Figura N° 19. Desionizador AQUATROL.



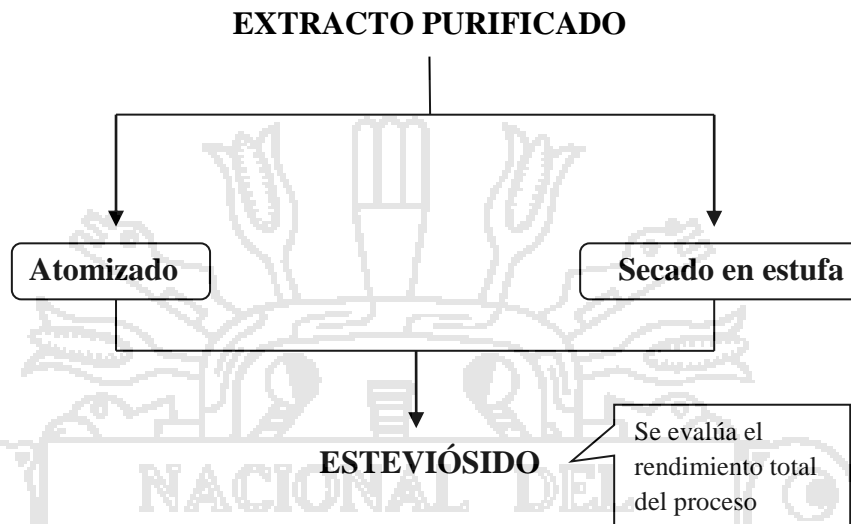
Fuente: Elaboracion propia.

Imagen N° 09. Purificación con columnas de intercambio iónico



3.3.1.6 FASE DE DESHIDRATACIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ESTEVIA.

Figura N° 20. Flujo del proceso de la tercera fase.



Fuente: Elaboración propia (2009).

En esta fase del proceso se analizó el rendimiento total del proceso, por dos tipos de deshidratación, una deshidratación por atomización y otra en una estufa, la evaluación es por una comparación de las medias muestrales, el rendimiento total del proceso está dado por la siguiente formula.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso total de muestra deshidratada}}{\text{peso de las hojas de estevia}} \times 100$$

a) Secado por atomización.

Una vez purificado el extracto de hojas de estevia por medio de las columnas de intercambio iónico en la segunda fase del proceso, se obtuvo una solución color transparente y con una concentración aproximada de 0.059 gr de esteviosido por ml de solución.

La primera prueba se realizó en el equipo atomizador de la planta piloto del INDA (Instituto Nacional de Investigación Agraria) de la Universidad Nacional Agraria la Molina, para dicha prueba se utilizó un encapsulante (maltodextrina 300 gr por cada 10 litros de muestra), se obtuvo al final del proceso 280 gramos de producto (90% maltodextrina 10% esteviósido aproximadamente), esto pudo deberse a que el equipo era muy grande para tan poca materia prima, por lo que se descartó el uso de este equipo.

La segunda prueba se realizó en un equipo atomizador del laboratorio de operaciones unitaria de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Ingeniería UNI, y para esta prueba se concentro la muestra a 7°BRIX de acuerdo a las especificaciones del equipo para evitar el problema del resultado anterior. Cabe resaltar que en este proceso no se utilizo encapsulante.

Imagen N° 10. Atomizador de partículas UNI-LIMA

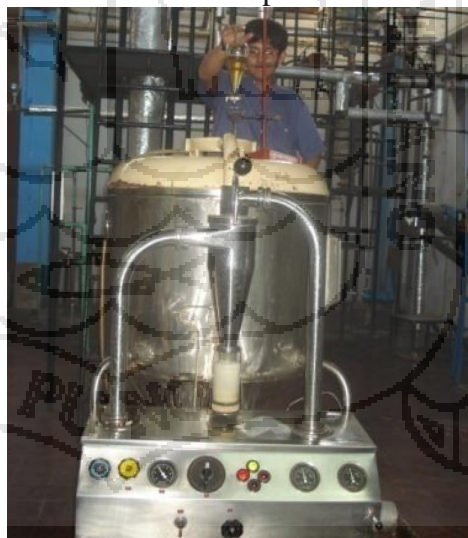


Imagen N° 11. Esteviosido en polvo.



Figura N° 21. Esquema general del atomizador de partículas



Fuente: Elaboración propia.

a) Secado en estufa.

Este proceso se realizó en una estufa convencional a una temperatura de 60°C durante 48 horas, donde las muestras fueron colocadas en crisoles de porcelana, obteniendo al final de este proceso cristales sólidos color ámbar de sabor dulce y amargo características del esteviósido.

3.3.4. DESCRIPCIÓN DE LA DETERMINACIÓN DEL PODER

EDULCORANTE.

En esta fase del proceso analizamos el poder edulcorante del extracto de hojas de Estevia, mediante una prueba de comparación de dos muestras (dúo trío) tal como lo describe Ureña et al. (1999).

Preparación de las muestras.

Se hace una comparación con la sacarosa industrial que varía desde 150 veces hasta 250 veces en proporción de la sacarosa.

Muestra patrón.

Se pesó 1 gr. de esteviósido y se disuelven 2 litro de agua.

Muestras a analizar.

Se disolvió en dos litros de agua sacarosa en proporciones que oscilan entre 150 hasta 300, es decir un gramo de esteviósido y, 150, 170, 190, 220, 250 gramos de sacarosa para cada muestra.

Procedimiento de la prueba dúo trío.

Se colocó las muestras en tres vasos codificados (una muestra patrón y dos muestras con diferente concentración de azúcar), se presentaron los jueces, las cuales analizaron y determinaron cual es la muestra parecida a la muestra patrón, Para esta prueba se requiere un mínimo de 10 jueces según Larmond (1977), citado por Anzaldua Morales (1994).

3.8 DISEÑO ESTADÍSTICO EXPERIMENTAL.

3.4.4 FASE DE EXTRACCIÓN DEL EDULCORANTE DE LAS HOJAS DE ESTEVIA.

En esta fase se utilizó el diseño central compuesto rotatable (DCCR), ya que permite evaluar directamente la curvatura de un modelo y a partir de ella optimizar el diseño factorial.

Cuadro N°08. Cinco niveles de un diseño central compuesto (DCC)

Nivel codificado (X1)	Denominación
<u>$-\alpha$</u>	Nivel mínimo
-1	Nivel bajo
0	Nivel medio
+1	Nivel alto
<u>$+\alpha$</u>	Nivel máximo

Fuente: Ibáñez, (2005).

El número de tratamientos es igual a:

$$N = 2^p + 2p + c$$

Donde:

N = Número de tratamientos.

C = constituye el número de puntos centrales.

p = número de factores de estudio.

Factores en estudio para la determinación del rendimiento en la extracción de esteviósido en la primera fase

Factores (mínimo y máximo)

- Proporción de la materia prima/ solvente 6.5 - 23.5 (gr/ml)
- Temperatura -10 - 110 °C
- Tiempo 5 - 55 min

Variables de Respuesta

- Concentración (gr./ml.)
- Rendimiento (%)

Cuadro N° 09. Valores extremos de los factores de estudio.

Nivel codificado (x1)	denominación	Factores de estudio		
		Proporción de la materia prima/ solvente (gr/ml)	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
- α	Nivel mínimo	6.5	-10	5
-1	Nivel bajo	10	14	15
0	Nivel medio	15	50	30
+1	Nivel alto	20	86	45
+ α	Nivel máximo	23.5	110	55

Fuente: Elaboración propia (2009)

Matriz de Diseño

En el Cuadro N° 3, se muestra el número de tratamientos evaluados para determinar los parámetros de lixiviación (mp/sol, tiempo y temperatura), el resultado de los ensayos experimentales se muestra en el Anexo N°1.

Cuadro N° 10. Tratamientos de la primera fase.

CUADRO DE TRATAMIENTOS			
N° de tratamientos	Mp./sol. Gr/ml.	Temperatura (T°) (C°)	Tiempo (t) Min.
1	10	14	15
2	20	14	15
3	10	86	15
4	20	86	15
5	10	14	45
6	20	14	45
7	10	86	45
8	20	86	45
9	6.5	50	30
10	23.5	50	30
11	15	-10	30
12	15	110	30
13	15	50	5
14	15	50	55
15	15	50	30
16	15	50	30
17	15	50	30
18	15	50	30
19	15	50	30
20	15	50	30

Fuente: Elaboración propia (2009)

3.4.5 FASE DE PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE ESTEVIA.

En esta fase también se utilizó el diseño central compuesto rotatable (DCCR), ya que en esta fase se quiere optimizar el proceso.

En esta fase las muestras fueron tratadas con diferentes concentración de hidróxido de calcio (CaOH), en base a lo recomendado (10% de CaOH), tomando las siguientes concentraciones con 6 puntos centrales.

Factores en estudio para la determinación del rendimiento en la extracción de esteviósido en la segunda fase

Factores	Niveles (mínimo y máximo)
- pH	7.1- 12.8
- CaOH	5 -15 %

Variables de Respuesta

- Concentración (gr. /ml.)
- Rendimiento (%)

Cuadro N° 11. Codificación de los factores de estudio.

Nivel codificado (x1)	denominación	Factores de estudio	
		pH	CaOH ₂
- α	Nivel mínimo	7.1	5
-1	Nivel bajo	8	6.5
0	Nivel medio	10	10
+1	Nivel alto	12	13.5
+ α	Nivel máximo	12.8	15

Fuente: Elaboración propia (2009)

Matriz de Diseño

En el Cuadro N° 12, se muestra el número de tratamientos evaluados para determinar los parámetros de purificación (% de hidróxido de calcio y pH), donde el resultado de los ensayos experimentales se muestra en el Anexo N° 02.

Cuadro N° 12. Tratamiento del
diseño.

T tratamientos	Factores reales	
	hidróxido	pH
1	6.5	8
2	13.5	8
3	6.5	12
4	13.5	12
5	5.05025	10
6	14.9497	10
7	10	7.17157
8	10	12.8284
11	10	10
12	10	10
13	10	10
14	10	10

Fuente: Elaboración propia (2009)

Siendo el modelo matemático:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{12} X_1 X_2$$

Donde:

Y = Variable de respuesta (rendimiento)

b = Coeficiente de regresión lineal.

X₁ = Variable de estudio (hidróxido de calcio).

X₂ = Variable de estudio (pH).

3.4.6 FASE DE DESHIDRATACIÓN DEL EXTRACTO PURIFICADO DE LAS HOJAS DE ESTEVIA.

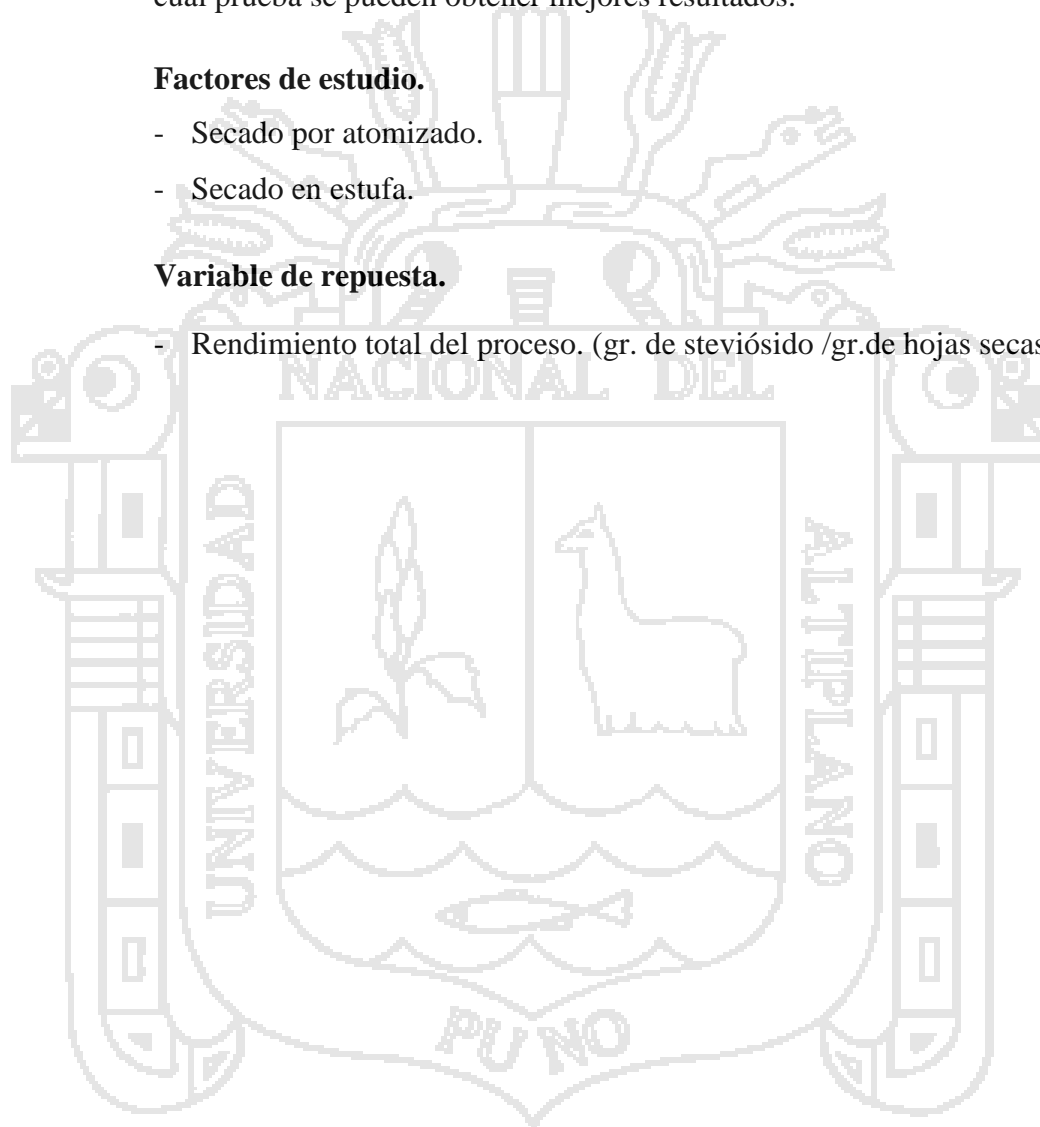
Para la tercera fase del proceso, se analizó los resultados obtenidos por ambos métodos por una comparación de medias muestrales, para establecer si existe una diferencia significativa de ambas pruebas, y determinar con cual prueba se pueden obtener mejores resultados.

Factores de estudio.

- Secado por atomizado.
- Secado en estufa.

Variable de repuesta.

- Rendimiento total del proceso. (gr. de steviósido /gr.de hojas secas).



IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.6 ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS HOJAS DE ESTEVIA.

En el Cuadro N° 13, se presentan los datos de la composición química proximal de las hojas de estevia, dichas características se determinaron de acuerdo a la metodología antes mencionada.

Cuadro N° 13. Porcentaje de la composición química proximal de las hojas de estevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) y sedimento del extracto.

Componentes	Porcentaje en base húmeda%.	Porcentaje en base seca%.	Sedimento del extracto%.
Humedad	6.39	0	0
Proteínas	13.15	14.05	8.06
Grasa	13.40	14.4	10.68
Cenizas	8.03	8.20	57.38
Fibra	11.52	12.3	6.19
Carbohidratos	47.51	51.04	17.69

Fuente: Elaboración propia (2009)

De los resultados obtenidos se puede observar que las hojas de estevia presentan una humedad de 6.39 %, proteínas 13.15%, grasas.13.40%, cenizas, 8.03 % fibra11.52% y de carbohidratos 47.51%.

Realizando una comparación existe una diferencia entre los valores obtenidos con respecto a la composición química proximal de las hojas de estevia determinada por Manish y Rema (2006), donde las hojas de estevia contienen (proteínas 20.42%, carbohidratos 35.20%, cenizas 13.12%, grasas 4.34%), y podemos observar que presentan variaciones bien marcadas, esto puede deberse a la variedad de la planta, condiciones de cultivo, edad fisiológica de la planta y manejo post cosecha, por lo cual es recomendable trabajar con hojas cosechadas antes de la floración tal como lo menciona Brandle (2001) puesto que la información en cuanto a valores del análisis

proximal son escasos, podemos concluir que el porcentaje de proteínas, grasa, cenizas y carbohidratos pueden variar de acuerdo a los factores antes mencionados por Branble (2001).

Así mismo se puede observar en el Cuadro N°13, el contenido de carbohidratos es elevado, Cramer e Ikan (1987), hace referencia que una gran parte de los carbohidratos presentes en las hojas son esteviósido y Rabonósidos, esto podría corroborarse puesto que el contenido de carbohidratos presentes en las hojas de estevia es bastante elevado.

En el Cuadro N°13, también se presenta los datos de la composición química proximal del sedimento del extracto de las hojas de estevia que es desechada en el proceso de precipitación de impurezas, y como podemos observar el contenido de cenizas es bastante alto, esto debido a que en el proceso de lixiviación, y precipitación se les añadió carbonato de calcio, e hidróxido de calcio, respectivamente cabe destacar que los compuestos antes mencionados son inocuos en pequeñas cantidades, entonces podemos decir que este sedimento se podría usar como un componente de los alimentos balanceados para animales de corral, utilizando así el gran contenido de calcio y de proteínas que contienen.

4.7 PRIMERA FASE: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA PROPORCIÓN MATERIA PRIMA/SOLVENTE, TEMPERATURA Y TIEMPO DE TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN Y RENDIMIENTO BRUTO DEL EXTRACTO.

4.2.1 Estudio de la influencia de la proporción materia prima/solvente, temperatura y tiempo con respecto a la concentración en la primera fase.

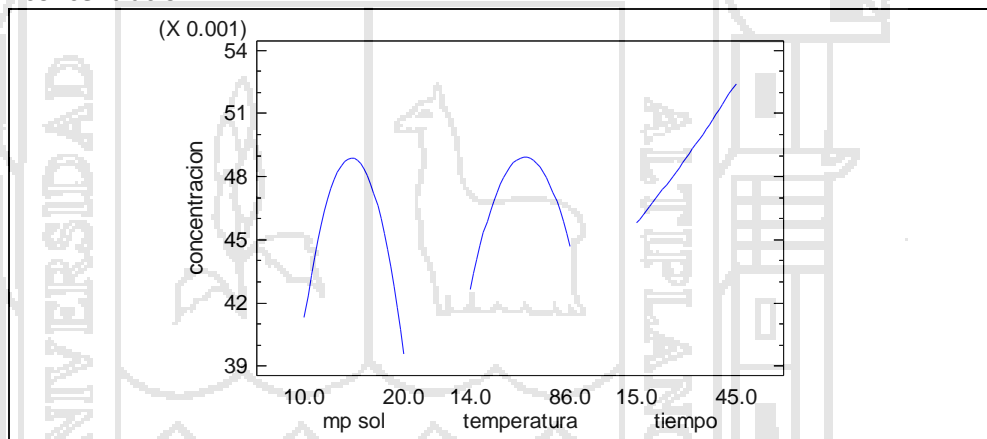
Los resultados de la primera fase se presentan en el Anexo N°1 y en el Anexo N°3 se presenta el análisis de varianza respecto a la concentración del extracto, podemos decir entonces que solo la variable tiempo (C) tiene significancia respecto al rendimiento, observando de esta manera un comportamiento ascendente, esto quiere decir que conforme pase más tiempo de tratamiento mayor será la concentración de esteviosido, lo que

quiere decir que esta si esta variable cambia, afecta de manera directa a la concentración del extracto.

Por otro lado las variables materia prima solvente (A), y temperatura (B), no tienen significancia, lo que quiere decir que el incremento o decremento de estas variables no afectan de manera significativa a la concentración de estevioso del extracto, lo mismo sucede con la combinación de las variables (AB), (AC), (BC), y (CC) lo que quiere decir que una combinación de estas no afectan significativamente a la concentración.

El efecto cuadrático (AA), y (BB), es altamente significativo, podemos decir entonces que la combinación cuadrática de estas variables afecta de manera significativa a la variable de respuesta de concentración.

Figura N° 22. Efectos principales de las variables de estudio respecto a la concentración.



Fuente: Elaboración propia (2009)

En la Figura N° 22 se presenta el comportamiento de las variables de estudio, donde podemos observar que a medida que incrementa la relación materia prima/solvente, incrementa la concentración hasta llegar a un punto de 1/14 a 1/15 y luego disminuye, al respecto Kutowi (1999) indica que muy poca cantidad de agua disminuye la extracción de compuestos endulzantes y que demasiada cantidad de agua aumenta la extracción de compuestos endulzantes, por otro lado Rojas (1999) indica que las hojas de estevia podrían tener un concentración hasta de 10 % pero sin embargo Brandle (2001) menciona que la cantidad de estevioso presentes en las

hojas pueden variar por diversos factores como variedad de la planta, condiciones de cultivo y manejo post cosecha.

También podemos observar el comportamiento de la temperatura que a medida que incrementa la temperatura se incrementa la concentración hasta llegar a un punto /de 40 a 50°C y luego disminuye la concentración, por otro lado el tiempo tiene un comportamiento ascendente, a medida que se incrementa el tiempo se incrementa la concentración hasta llegar a un máximo de 55 min.

Cuadro N° 14. Optimización de las variables de esturio respecto a la concentración.

Valor óptimo = 0.05537 gr/ml.			
Factor	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo para la concentración</i>
Materia prima/solvente	6.59104	23.409	14.3986
Temperatura	-10.5445	110.545	44.5499
Tiempo	4.77311	55.2269	55.2269

Fuente: Elaboración propia.

Por tanto los resultados según el Cuadro N°14 (cuadro de optimización de las variables), podemos decir que en proporción materia prima 1/14, temperatura de 44.5°C y un tiempo de tratamiento de 55 minutos son las variables optimas para la extracción para obtener una mayor concentración.

Estos resultados no necesariamente nos indican que a mayor concentración hay un mayor rendimiento, puesto que la concentración varia por el factor de dilución estudiados (materia prima /solvente), al respecto no hay bibliografía que sustente este comportamiento, de ahí se considera trabajar con las variables optimas respecto al rendimiento.

4.2.2 Estudio de la influencia de la proporción materia prima/solvente, temperatura y tiempo con respecto al rendimiento en la primera fase.

Los resultados del rendimiento en la primera fase (ver Anexo N°2 y N°4) se presenta el análisis de varianza donde se puede observar la variable A (materia prima/ solvente) y C (tiempo), tienen efectos significativos con respecto al rendimiento, lo cual nos indica que el incremento o decremento de estas variables afecta significativamente al rendimiento.

Por otra parte la variable B (temperatura), no presenta significancia para el proceso, es por ello que si variamos la temperatura, el rendimiento no se verá afectado de manera significativa.

Las interacciones AB, AC y BC, resultaron ser no significativo para el proceso de extracción, entonces podemos decir que las combinaciones de las variables materia prima solvente (A), tiempo (B), y temperatura(C), no afectan de manera significativa al rendimiento.

Los efectos cuadráticos materia prima solvente (AA), resulto ser altamente significativo para el rendimiento, al igual que la temperatura (BB), sin embargo el tiempo (CC) resulto ser no significativo, esto quiere decir que las interacciones A^2 , B^2 , afectan al rendimiento de manera significativa.

Estos resultados se pueden apreciar de mejor manera en el diagrama de Pareto Figura N° 23.

De acuerdo a la tabla ANOVA (ver anexo 4), el estadístico R^2 explica el 88,78 % de nuestros tratamientos, eso quiere decir que nuestro modelo estadístico se ajusta de manera satisfactoria con nuestros resultados, y mediante la pruebas de falta de ajuste la P value = 0.30 es mayor que $\alpha=0.05$ por lo que se concluye que el modelo estadístico se ajusta adecuadamente, siendo el modelo matemático:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento \%} = & -9.35421 + 1.4695 \times X + 0.0876086 \times Y + 0.0517227 \times Z - \\ & 0.041395 \times X^2 - 0.00148773 \times X \times Y - 0.000617495 \times X \times Z - \\ & 0.00051935 \times Y^2 - 0.000354721 \times Z \times Y + 0.0000332797 \times Z^2 \end{aligned}$$

Donde:

- X_1 mp sol.
- Y_1 temperatura.
- Z_1 tiempo

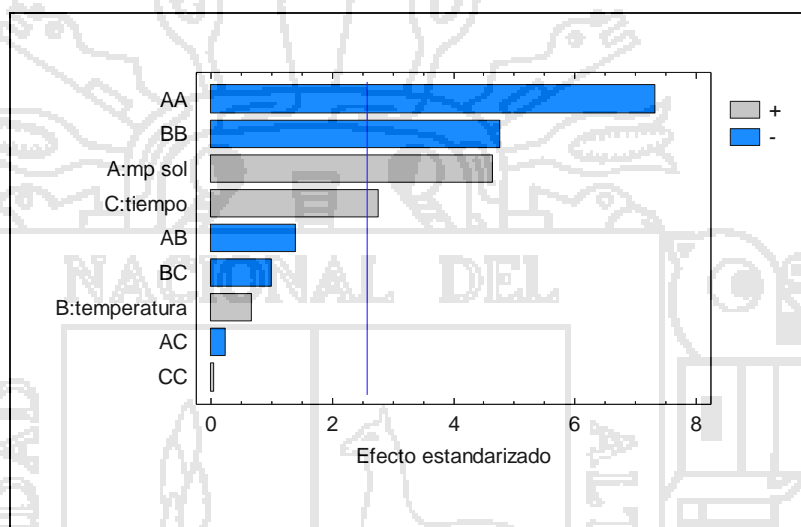


Figura N° 23. Diagrama de Pareto.

En la Figura N° 24 se presenta la grafica de efectos principales para el rendimiento, donde se puede observar el grado de relación que existe entre las variables de estudio respecto al rendimiento, donde se puede observar que a medida que se incrementa la relación de materia prima solvente el rendimiento aumenta, hasta alcanzar un pico de 1/17 en materia prima/solvente, luego de esto el rendimiento disminuye, de igual manera se comporta la variable temperatura, donde alcanza un optimo de rendimiento en el punto 42°C, por otra parte el comportamiento de la variable tiempo tiene una trayectoria ascendente.

El comportamiento de estas variables se explica mucho mejor en las Figuras N°25, N°26 y N°27.

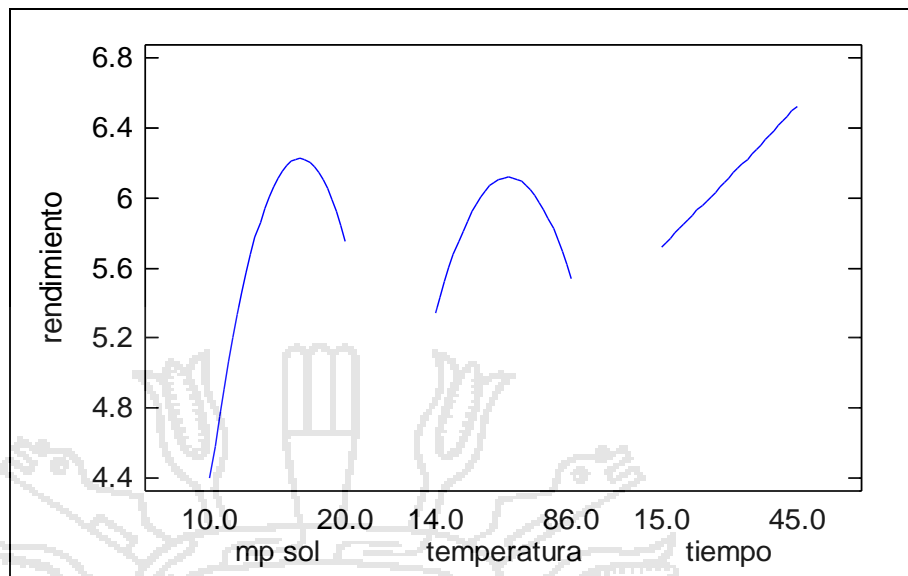


Figura N° 24. Grafica de efectos principales para el rendimiento.

Cuadro N° 15. Optimización de las variables para el rendimiento.

Valor óptimo = 6.927 %

Factor	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo para el rendimiento</i>
Materia prima/ Solvente	6.59104	23.409	16.5879
temperatura	-10.5445	110.545	41.7318
Tiempo	4.77311	55.2269	55.2269

FUENTE: Elaboración propia (2009)

4.2.2.4 Estudio de la materia prima/solvente, y el tiempo de tratamiento respecto al rendimiento bruto del extracto.

En la Figura N° 25 se puede observar que a bajas y a muy elevadas proporciones de materia prima/solvente disminuye el rendimiento, al respecto Kutowi (1999), indica que esto podría deberse a que muy poca cantidad de agua disminuye la extracción de los compuestos endulzantes y demasiada cantidad de agua aumenta la extracción de componentes indeseables.

Por tanto los resultados según el Cuadro N°15 (cuadro de optimización de las variables), en cuanto a la relación materia prima/solvente alcanza su punto óptimo en 1/16.5, para obtener un mayor rendimiento de estevósido, por otra parte López y Peña (2005) recomienda trabajar con disoluciones de materia prima/solvente de 1/10, así mismo en él y trabajo de Álvarez y Couto (1984) y Goto (1997) citados por López y Peña (2005), hacen referencia a la proporción de materia prima solvente, y mencionan que esta debe estar comprendida entre 1/10 y 1/ 60, pero el método que el emplea para extraer el estevósido de las hojas y luego purificarlas es el descrito por Kutowi (1999) “*extracción del estevósido por membranas*”.

Por otra parte Soto y Valdós (2002), hacen referencia que para la extracción de estevósido, la proporción debe ser de 50 gr. de hojas en 700 ml de agua (1/14 Mp/sol), en el cual se obtuvo un rendimiento promedio de 5%.

Realizando una comparación de resultados podemos concluir que la relación materia prima/solvente obtenida en el presente trabajo se encuentran comprendido en los rangos descritos por los autores antes mencionados.

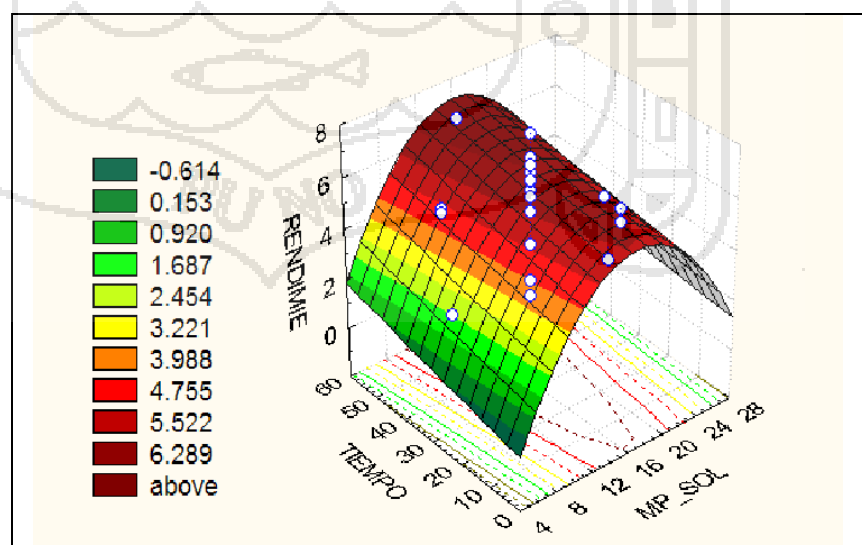


Figura N° 25. Efecto del tiempo y Mp/sol.

4.2.2.5 Estudio de la temperatura y proporción materia prima solvente respecto al rendimiento bruto del extracto.

En la Figura N° 26 se puede observar que a medida que se incrementa la temperatura, se incrementa el rendimiento, la temperatura puede llegar a un óptimo comprendido en un rango de 40°C a 60°C y luego esta disminuye, también se puede observar que las muestras que fueron tratadas a muy bajas temperaturas como -10 °C y muy altas temperaturas como 110 °C presentan un decremento en el rendimiento, esto puede deberse a que a muy bajas temperaturas no se disuelven los glúcidos, y a muy altas temperaturas se extraen sustancias no deseadas, al respecto Kutowi, (1999) argumenta que el incremento de la temperatura genera una extracción excesiva de sustancias no deseadas las cuales hay que remover en los procesos siguientes.

Por tanto los resultados según el Cuadro N°15 (cuadro de optimización de las variables), en cuanto a la temperatura alcanza su punto óptimo en 42°C, al respecto Payzant (1999) citado por López y Peña (2005), recomienda trabajar con temperaturas entre ambiente y 60°C, por otro lado, Kinle (1982) citado por Pasquel *et al.* (1999) hace referencia al método de purificación con CO₂, también recomienda que para la purificación del extracto, las temperaturas deben ser superiores a 31°C dato que se aproxima a nuestro óptimo de proceso (42°C).

Realizando una comparación de resultados podemos concluir que la temperatura óptima de tratamiento de 42 °C está comprendida en los rangos que sugieren Payzant (1999) y Kienle (1982).

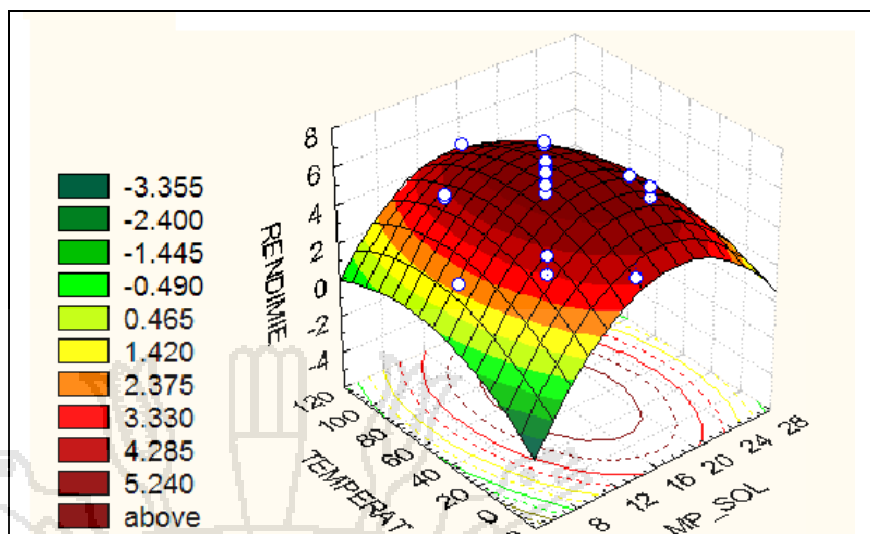


Figura N° 26 Efecto de la temperatura y Mp/sol.

4.2.2.6 Estudio del tiempo de tratamiento y la proporción de materia prima/ solvente, respecto al rendimiento bruto del extracto.

Observando lo gráficos de contornos N°26 se puede afirmar que la variable tiempo, está lejos de un punto óptimo, pero estaríamos hablando del mejor tratamiento, en la combinación de 55 minutos. Como se puede observar el tiempo es directamente proporcional al rendimiento, es decir que a mayor tiempo de extracción (lixiviación) se incrementa el rendimiento.

Por lo tanto los resultados según el cuadro, N°15 donde se presenta un cuadro de optimización de las variables, el tiempo alcanza su punto óptimo en 55 min, para obtener un mayor rendimiento de esteviósido de 6.92%. Por otra parte López y Peña (2005) utilizando el método de extracción descrito por Kutowi (1999) mencionan que el tiempo de extracción del esteviósido dura 4 horas aproximadamente, dato que coincide con el comportamiento de nuestra variable de estudio.

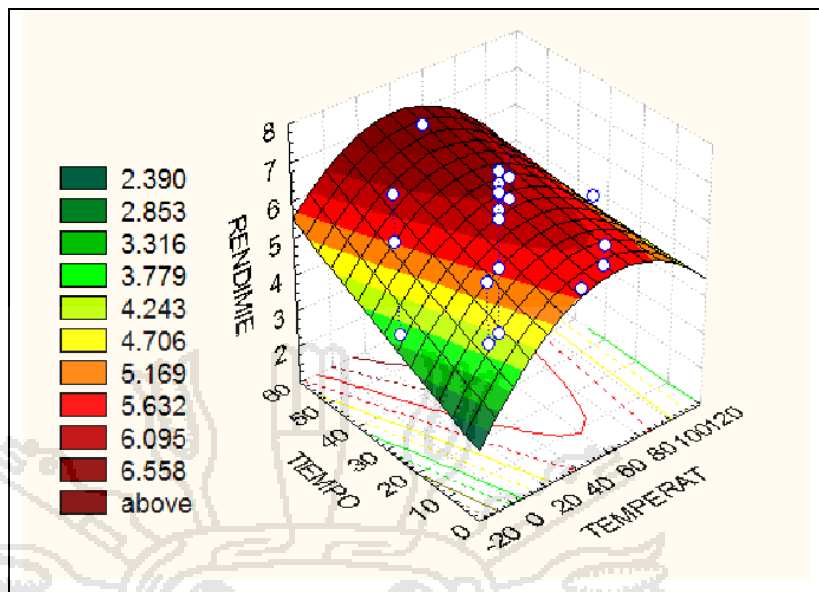


Figura N°27 Efecto del tiempo y Temperatura.

4.8 SEGUNDA FASE: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL PH Y PORCENTAJE DE HIDRÓXIDO DE CALCIO, RESPECTO AL RENDIMIENTO BRUTO DEL ESTEVIÓSIDO.

Los resultados de la segunda fase (ver anexo N°6 y N°7) se presentan el análisis de varianza (ANOVA) para el rendimiento, donde podemos observar que:

El pH (B) resultó ser altamente significativo para el proceso, al igual que su efecto cuadrático (BB), lo que quiere decir que el incremento o decremento de estas variables afecta de manera directa al rendimiento del proceso de purificación del extracto de las hojas de estevia, esto se puede observar claramente en el diagrama de Pareto Figura N°28.

La variable CaOH_2 (A), resultó ser no significativo, lo que quiere decir que el incremento y/o decremento de esta variable no ejerce un cambio significativo en el rendimiento del proceso de purificación del extracto, pero su efecto cuadrático (AA) resultó ser altamente significativo al rendimiento del extracto purificado, si bien es cierto que el cambio de esta variable por sí sola no ejerce un cambio significativo, la combinación de esta sí afecta de manera significativa al rendimiento del proceso y de las resinas de intercambio iónico.

De acuerdo al ANOVA, el estadístico R^2 explica el 90.73 % de los resultados, lo que quiere decir que nuestro modelo estadístico explica el 90.73% de los resultados obtenidos, y mediante las pruebas de falta de ajuste la P value = 0.177 es mayor que $\alpha = 0.05$ por lo que se concluye que el modelo se ajusta adecuadamente, siendo el modelo matemático:

$$\text{Rendimiento} = -14.2911 + 0.738426 \times X + 3.36273 \times Y - 0.0284703 \times X^2 - 0.0132455 \times X \times Y - 0.152477 \times Y^2$$

Donde

X = porcentaje de hidróxido de CaHO_2

Y = pH de la solución.

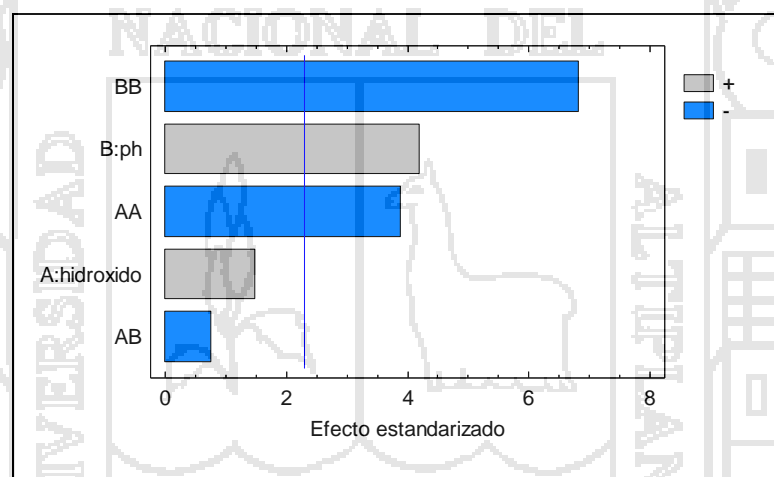


Figura N° 28. Diagrama de Pareto para la segunda fase.

En la Figura N°29 se presenta el comportamiento que sigue la proporción de hidróxido de calcio, y el pH en función al rendimiento, donde se puede observar que a pH extremos hay un decremento en el rendimiento, y a pH cercanos a 10 no se presentan disminuciones de concentración lo que coincide por lo descrito por Multon (2006) y Pasquel et al. (1999), donde los mejores resultados para la purificación y rendimiento se encuentran en un rango de 9- 11 de CaOH_2 y a un pH de 10 a 11 aproximadamente.

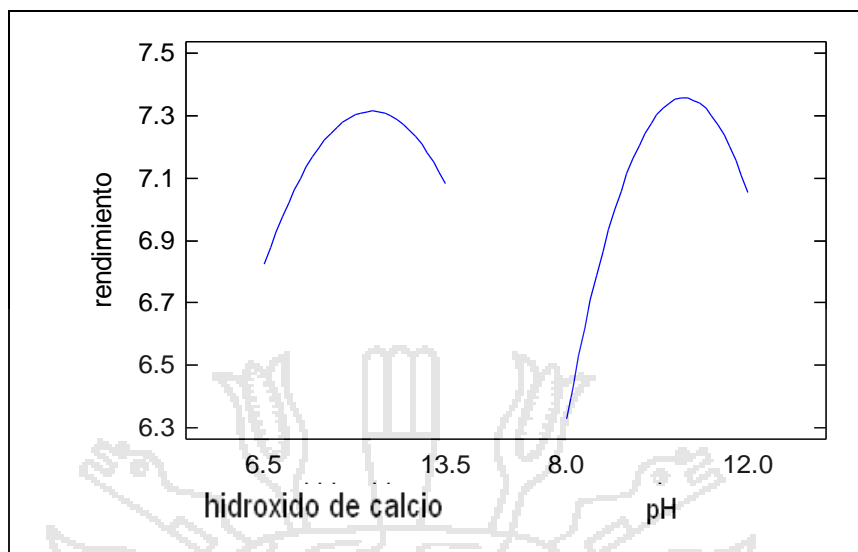


Figura N° 29. Grafica de efectos principales del pH e hidróxido.

Cuadro N°16 Optimización de las variables de estudio en la segunda fase respecto al rendimiento.

Valor óptimo = 7.36215%

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Hidróxido	5.05025	14.9497	10.5075
pH	7.17157	12.8284	10.5702

Fuente: Elaboración propia (2009).

4.3.1 Estudio del pH respecto al rendimiento en la segunda fase.

En esta etapa de estudio, se evaluó el pH del extracto antes de ingresar a las columnas de intercambio iónico en la etapa de purificación, donde estos resultados se pueden apreciar mejor en la superficie de respuesta en la Figura N° 30, donde observamos que el ingreso de la muestra a pH bajos (6.5- 8.5) y a pH muy elevados como (12.5- 13.5), hay un decremento en el rendimiento, al respecto Pasquel (1999) refiere que el esteviósido es estable a un rango amplio de pH hasta 9, y que a pH superiores de este su dulzor disminuye, por otra parte Multon (2006), menciona que el esteviósido es estable en un rango amplio de pH (3-10), así mismo también Gutiérrez (1999), indica que la disminución del dulzor a pH encima de 12 podría deberse a que los radicales OH^- de la solución de soda interactúan con los

glúcidos del extracto de las hojas provocando de esta manera la desnaturalización de los compuestos dulces.

Por otra parte se puede observar que las muestras tratadas con un pH de 10 aproximadamente, presentan un alto rendimiento, estas muestras antes de corregir el pH tenían un pH de 12.5, resultante del tratamiento con hidróxido de calcio, las cuales fueron corregidas hasta llegar a un pH de 10.5 antes de ingresar a las columnas de intercambio iónico, y saliendo de las resinas con un pH de 8 aproximadamente, al respecto Soto y Valdós (2002), menciona que se trabaja con un pH aproximadamente 8 por pasaje de dióxido de carbono antes de ser pasadas por resinas de intercambio catiónica y aniónica, por otra parte las especificaciones técnicas de las resinas IONAC ASB2 y C-267 (ANEXO N°15), indican que estas tienen un rango de acción de pH 0-14.

Por otro lado Harris (1992) indica que para dar lugar al intercambio iónico se requiere un pH suficientemente alto dentro de su rango para que se formen fuertes enlaces iónicos a este nivel y que a pH cercanos a la neutralidad las columnas alcanzan su máxima eficiencia, esto explica porque las columnas de intercambio alcanzaron una máxima eficiencia cuando las muestras fueron tratadas a un pH de 10.5 ya que esta es un valor alta dentro de su rango de acción.

Por lo tanto de los resultados obtenidos podemos decir que el pH influye en el rendimiento, al respecto Cheng et al (1985), indica que el paso del extracto a través de las resinas de intercambio iónico requiere parámetros exactos para su acción, como pH de ingreso.

Así mismo según el Cuadro, N°16 el pH de 10.5 es el óptimo para el extracto a purificar por intercambio iónico, para alcanzar un óptimo de rendimiento de 7.36%.

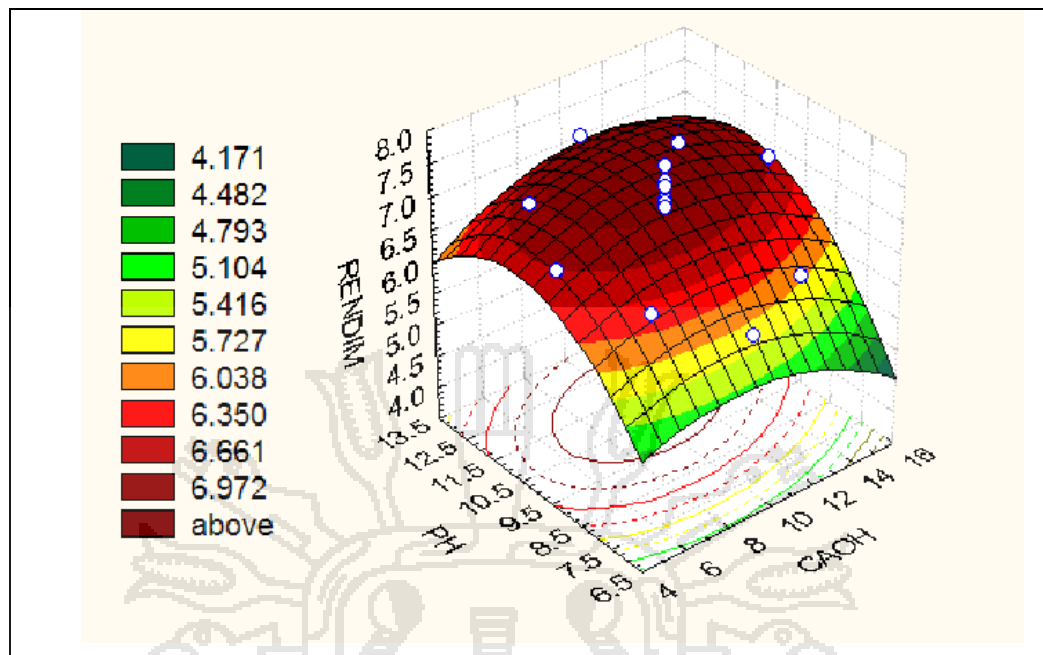


Figura N° 30. Comportamiento del pH y % de Ca(OH)_2

4.3.1 Estudio del % de Ca(OH)_2 respecto al rendimiento en la segunda fase.

En la Figura N°30, se observa de mejor manera la influencia del porcentaje de hidróxido de calcio Ca(OH)_2 utilizado donde alcanza un óptimo de rendimiento de 10.5%, por otro lado según los datos estadísticos de la tabla ANOVA (ver Anexo 05), el porcentaje de hidróxido de calcio no presenta significancia en el rendimiento, pero sin embargo esta influye bastante en el grado de clarificación de las muestras.

Como podemos observar en la Imagen N° 12 el grado de clarificación o precipitación que siguieron tres diferentes tratamientos con diferentes concentraciones de hidróxido de calcio (5%, 10%, y 15%), obteniendo así diferencias marcadas en la coloración de la solución, si observamos el tratamiento con 5% de hidróxido de calcio, esta presenta una muestra turbia de coloración oscura (color Olive Brow (4/4) según las tablas MUNSSELL 2.5 Y) ya que no precipito la mayor cantidad de impurezas, sin embargo los tratamiento con 10% y 15% de Ca(OH)_2 obtuvieron mejores resultados, al respecto Cheng et al. (1985), indica que la adición

de CaOH_2 tiene la función de precipitar las impurezas, dentro de estas colorantes, gomas y en general partículas en suspensión

Así mismo las muestras que fueron tratadas con bajas concentraciones de CaOH_2 (5%) llegan a saturar la columna catiónica ya que presentan una coloración oscura (ver Imagen N°12), debido a la cantidad de impurezas que contienen, es por esta razón que un inadecuado ingreso de la muestra clarificada a las columnas de intercambio iónico no logra purificar del todo la muestra dando como resultado una muestra de color olive yellow 6/8 (ver imagen N°13), (según las tablas de MUNSELL ver Anexo N°16), al respecto Cheng et al (1985), indica que el paso del extracto a través de las resinas de intercambio iónico remueve completamente el color de este y requiere parámetros exactos para su acción.

5% de Ca(OH)_2	10% de Ca(OH)_2	15% de Ca(OH)_2
Marrón oliva 4/4	Amarillo oliva 8/8	Amarillo oliva 8/6



Imagen N° 12. Muestras a diferente porcentaje de hidróxido de Calcio antes del primer pasaje de resinas de intercambio iónico.

De igual manera podemos observar en la Imagen N°13, el resultado de las muestras pasadas por la primera columna de resina catiónica, donde se observa que la muestra tratada con 5% de CaOH_2 presentan una coloración oscura, siendo esta difícil de remover en la segunda columna de intercambio dando como resultado una muestra ligeramente amarilla mas no cristalina, lo cual indica que esta muestra no fue clarificada correctamente, al respecto Cheng et al (1985), indica que para la

remoción del color se requiere parámetros exactos para la eficiencia de las columnas de intercambio iónico.

Sin embargo las muestras que fueron tratadas con 10 y 15 %, presentaron los mejores resultados dando una coloración ligeramente amarilla (imagen N°13) que son removidas en el segundo pasaje de resinas dando como resultado una muestra cristalina, al respecto Soto y Valdós (2002) utiliza una proporción de hidróxido de calcio Ca(OH)_2 de 10% respecto a la materia seca, por tanto los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran los datos del autor antes mencionado.

5% de Ca(OH)_2
Amarillo 4/4

10% de Ca(OH)_2
Amarillo 8/6

15% de Ca(OH)_2
Amarillo palido 4/8

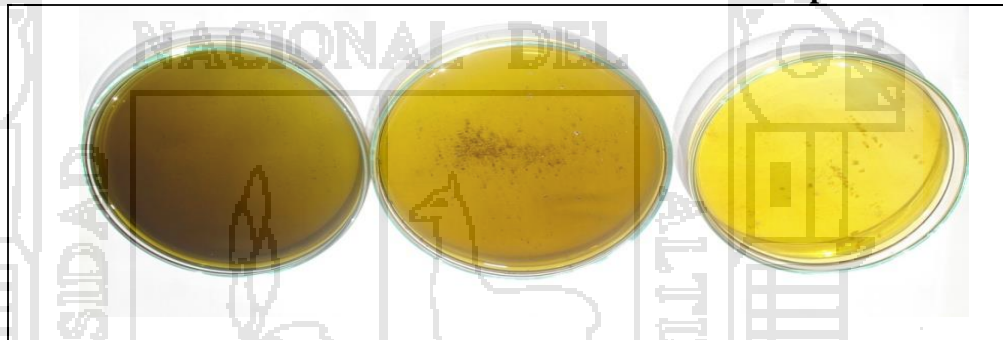


Imagen N° 13. Muestras a diferente porcentaje de hidróxido de Calcio después del primer pasaje de resinas de intercambio iónico.

4.9 TERCERA FASE: Estudio de la influencia del tipo de deshidratación en el proceso con respecto al rendimiento total del proceso de extracción del esteviósido.

Cuadro N° 17 Resultados de la deshidratación.

	% Rendimiento total	Apariencia de la muestra
<u>Secado por atomización</u>	7.48 %	Polvo fino, color crema altamente higroscópico.
<u>Secado en estufa</u>	7.61%	Esteviósido solido, apariencia de un cristal Color ámbar.

FUENTE: elaboración propia (2009)

En el cuadro N° 17 se presenta los resultados de la deshidratación, donde podemos comparar el rendimiento total del proceso por un análisis de medias muestrales, para la deshidratación por atomización se realizo con 2 observaciones obteniendo una media de 7.48 y una desviación estándar de 1.0. Para la deshidratación por medio de una estufa, se realizo con 3 observaciones, obteniendo una media de 7.61 y una desviación estándar de 1.0, el estadístico t calculado es igual a -0.13. Puesto que el valor- Valor-P = 0.908462 es mayor que $\alpha = 0.05$, entonces concluimos que no existe una diferencia significativa en los tipos de secado estudiados.

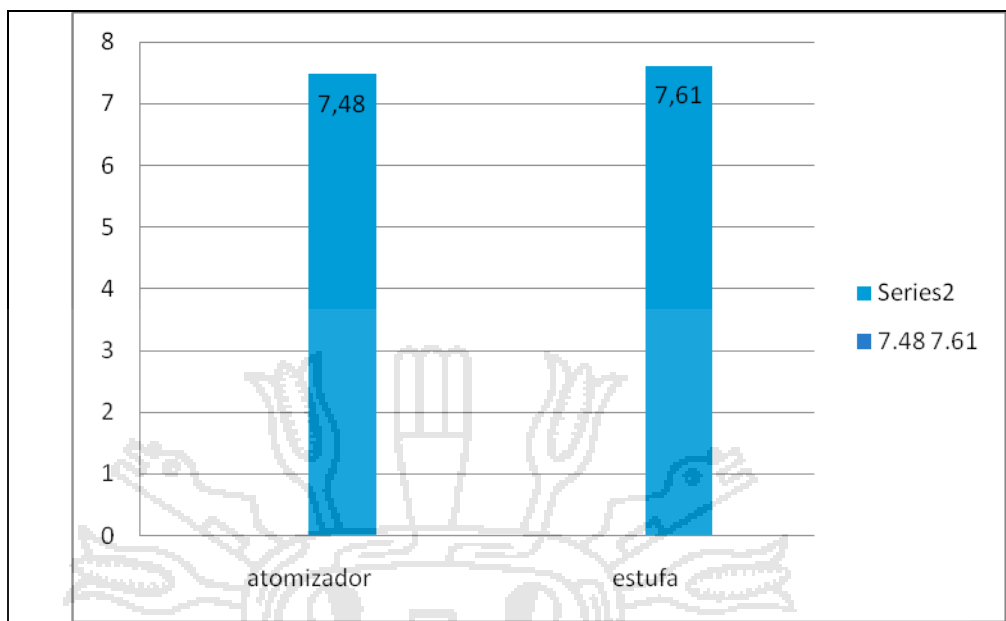


Figura N° 31. Comparación del rendimiento de ambos métodos de deshidratación.

En la Figura N° 31 se puede observar mejor que el tipo de deshidratación no presenta un efecto significativo en cuanto al rendimiento, lo cual se considera otros aspectos como la apariencia del producto final, obteniendo mejores resultados la muestra tratada por atomización como se puede observar en el Cuadro N°17, al respecto kutowi (1999), recomienda concentrar la muestra en una estufa o túnel de secado y terminar de deshidratar la muestra en un atomizador de partículas.

Por lo tanto los resultados finales dan un rendimiento de 7.5 % de esteviósido respecto a la materia seca, al respecto Soto y Valdoz (2002), al realizar la extracción del esteviósido por el método que se empleó como base en esta investigación, obtuvo un rendimiento aproximadamente de 5 %, sin embargo Wood et al. (1955), citados por Cernadas y Pryluka (1985), aislaron el esteviósido de las hojas de estevia obteniendo un rendimiento de 7%, siendo este último un valor semejando al que obtuvimos en la presente investigación.

Así mismo Bertoni (1905), citado por Díaz et al. (1999), refiere que el contenido de esteviósido promedio en la hojas varía de 6% a 18%, según la zona o país del que provenga las hojas.

Entonces podemos decir que el rendimiento está en función a la variedad de la estevia, época de cosecha, humedad de las hojas (para esta investigación se utilizó hojas con 6.39 % de humedad), al respecto Brandle (2001), refiere que las concentraciones de glicósidos iniciales se dan en mayor porcentaje en hojas cosechadas antes de la floración de la planta, por otro lado Rojas (1999), señala que el esteviósido presente en las hojas de estevia se encuentra hasta en un 10% de extraído de la planta, por otra parte también Zanon (2000) menciona que la estevia peruana hoy en día es la de mejor calidad y mayor rentabilidad hasta con 4 cosechas anuales.

Para ambos tipos de secado (secado con atomizador y secado en estufa), se debe retirar el producto rápidamente en un envase hermético ya que el esteviósido es bastante higroscópico tal como lo define Multon (2006).

Se observó que en el secado por atomización hubo pérdidas del producto final puesto que el extracto seco quedó adherido en los conductos del equipo, pero también esto llega a ser despreciable cuando se maneja grandes volúmenes.

4.10 DETERMINACIÓN DEL PODER EDULCORANTE DEL ESTEVIÓSIDO.

La determinación del poder edulcorante del esteviósido, está dada por una prueba de análisis discriminativo de dos muestras (prueba dúo trío), tal como lo menciona Ureña, Arrigo y Guirón (1999).

La prueba se realizó con muestras en un rango de 150 a 200 veces de equivalencia con la sacarosa, los resultados de esta prueba (dúo trío) fueron registrados en una cartilla para su análisis (*ver anexo N° 11 y N° 12*).

Cuadro N° 18. Resultados de la prueba dúo trío.

Relación 1 gr. estevia = x gr. sacarosa	RESPUESTAS CORRECTAS	RESPUESTAS INCORRECTAS	SIGNIFICANCIA
150	13	2	1%
170	15	0	0.1%
200	10	0	0%

FUENTE: elaboración propia (2009)

En el Cuadro N° 17 se muestran los resultados del poder edulcorante del esteviosido obtenido, siendo este de un poder edulcorante equivalente de 150 a 170 veces más dulce que la sacarosa industrial, esta prueba que se realizó con 15 jueces semientrenados, con un nivel de confianza de 99% y con un margen de error de 1% de acuerdo a la tabla de valoración (*ver Anexo N° 13*), de estas pruebas indican que solo 2 jueces semientrenados (13.33%) tuvieron una respuesta diferente entonces podemos decir que el 86.67 % de jueces semientrenados, coinciden en que la solución de sacarosa de 150 veces más dulce que la sacarosa o azúcar.

Al respecto, Multon (2006) refiere que el esteviosido es de 250 a 300 más dulce que la sacarosa al igual que Badui y Wong (1995), siendo que nuestro esteviosido es mucho menos dulce (150 – 170 aprox.) de lo que mencionan nuestros autores, podemos asumir que eso podría deberse a que el extracto presenta un porcentaje de impurezas de 30% tal como lo menciona Paizant (1999) citado por López y Peña (2005), y lo detalla Pasquel et al. (1999) (*ver cuadro N° 03*).

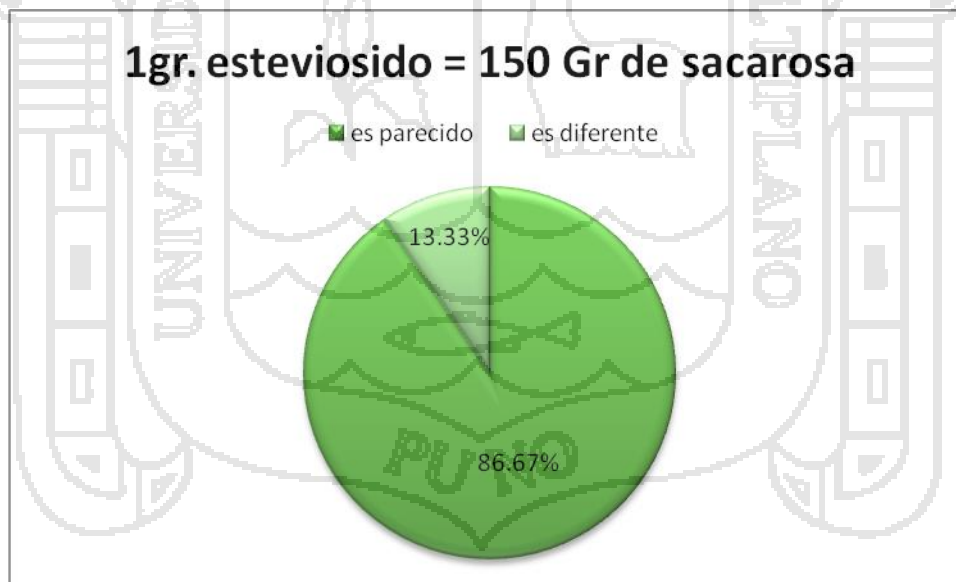


Figura N° 32. Porcentaje de respuestas correctas e incorrectas.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1 Conclusiones.

Del presente trabajo podemos concluir lo siguiente:

- La relación de materia prima/solvente y tiempo influye de manera significativa en el rendimiento, donde el punto óptimo de extracción es de 1/16.5 y 55 min, mientras que la variable temperatura no influye de manera significativa al proceso de extracción del esteviósido, pero para obtener un máximo rendimiento su punto óptimo de 42 °C.
- Del estudio de la influencia del pH en la purificación de intercambio iónico se concluye que este sí influye y el valor de pH 10.5 es el óptimo para el extracto crudo a purificar por intercambio iónico, al obtener mayor rendimiento y en cuanto al porcentaje de hidróxido de calcio el óptimo es de 10.5% pero este no afecta de manera significativa al rendimiento mas sí en la eficiencia de las columnas de intercambio iónico.
- El tipo de deshidratación no tiene un efecto significativo en cuanto al rendimiento total del proceso de extracción, pero sí influye en cuanto a la apariencia del producto final siendo la mejor muestra tratada por el proceso de atomización y obteniendo un rendimiento final de 7.36%.

5.2 Recomendaciones.

- Para posteriores investigaciones acerca del tema considerar al tamaño de partícula de las hojas de estevia como una variable de estudio.
- Para hacer más eficiente el proceso de obtención del esteviosido de las hojas de estevia es recomendable combinar ambos métodos, el secado por medio de la estufa con flujo de aire en contra corriente para concentrar la solución, y para secar de manera definitiva y obtener el esteviósido en polvo se debe utilizar el atomizador de partículas.
- Realizar investigaciones de vida en anaquel de las hojas de estevia, y productos endulzados con esteviósido.
- Realizar estudios de evaluación sensorial del extracto de las hojas de estevia.
- Se considera relevante el estudio para la instalación de una planta procesadora de esteviósido en polvo a partir de *Stevia rebaudiana* Bertoni en el Perú.
- Promover el cultivo de estevia, como una alternativa económica y rentable en el departamento de Puno

VI. BIBLIOGRAFÍA.

- Alcázar J. 2002, diccionario técnico de industrias alimentarias, segunda edición Universidad Nacional de San Antonio Abat del Cuzco Perú
- Anzaldúa, A. 1994, “La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica”. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España.
- Badui Dergal, Salvador Wong, D. 1995, *Química de los alimentos*, editorial Acribia Zaragoza. España. P- 158-218.
- Brandle J. 2001, estevia, edulcorante natural, j. plant sci. vol 72: 1263-1266.
- Bridel, M y Lavielle, R 1931. Le principe a saveur sucre du Ka'a He'e (Stevia rebaudiana Bert.).III Propriétés du stevioside. Jour Pharmac Chim. París – Francia.
- Cernadas R., y Pryluka M., 1985, “un método de obtención de esteviósido a partir de hojas de estevia *Stevia Rebaudiana bertonii*” revista agroquímica tecnología de los alimentos vol (25)2 611-615 Buenos Aires Argentina.
- Código Alimentario Argentino, 1993, esteviosido CAA. 64.3 resolución 101.22.93
- Cohn, Georg (1914). *Die Organischen Geschmackstoffe*. Berlin: F. Siemenroth.
- Crammer, B. & Ikan, R. 1987: Progress in chemistry and properties of rebaudioside; Developements in Sweeteners 3 (Hrsg. Grenby, TH.) Elsevier Applied Science, New York, p 45-81
- Cheng T., Chang C., y Chang W. 1985 “a study on the purification of esteviosides with the use ion of eschange resins” Abstract FSTA Journal of Chinesse agricultura chemical society vol 73, 178-190.
- Díaz R. Nuñez, M. Ladron, C. Quintana, M. Y Ynchaustegui, J. 1999 evaluación del mercado japonés de edulcorantes no calóricos como destino de la estevia y el yacon producidos en el Perú, tesis de maestría en administración ESAN Lima Perú.
- Geuns J., Mallieros R., Morales V., Decuypere E., Copernolle F., y Buyse J., 2003 “metabolism of estevioside by chickens” journal agricultural food chemistry. Vol 51: 1905 – 1101.
- Gutiérrez A. 1999, redescubrimiento de la dulzura. Edulcorantes extraídos de la Stevia. CEIAL-INTI (p3) Misiones Argentina.
- Harris D. 1992, *análisis químico cualitativo*. Grupo editorial iberoamericana - México

- Heraud G. Roux E. 1976 acquisition récentes relatives aux substances edulcorantes. *in: applications à la diététique du diabete*. Journe de diabétologie. Flamorion Génova-Italia 1976, pp. 169-185..
- Kinghorn A. y Soejarto D. 1985, "el estad actual del esteviósido como agente dulcificante para uso humano" editorial la investigación económica y medicinal de la planta. La prensa académica P(1+52). Londres, parís.
- Kohda, H, 1976. New sweet diterpene glucosides from Stevia rebaudiana Bert.. Phytochemistry Pergamon Press. England.
- Kutowy O. 1999, "Extraction of sweet compounds from Stevia Rebaudiana Bertoni" World intellectual property organization international publication numbe: WO 00/49895.
- L. Kier 1972. *Journal of Pharmaceutical Science*. Vol. 61. pp. 1394.
- López D, y peña G. 2005, "plan estratégico para la creación de una empresa dedicada a la comercialización de edulcorante a base de estevia. Pontificia universidad javeriana de Bogotá – Colombia.
- Mahecha La Torre, 1985 Gabriela "La Evaluación Sensorial en el Control de la Calidad de Alimentos Procesados". Editorial Carrera 7ª edición Bogotá Colombia 1985.
- Manish T. y Rema S. 2006, Preliminary estudes on Stevia Rebaudiana leaves: proximal composition, mineral analysis ans phytochemical screening, food biotechnology laboratory, post gradúate departamento of home sience Vallabh vidynagar Gujarat-India, pp 321-325.
- Matissek R, Schenepel F, Steiner G, 1988 Análisis de los alimentos (fundamentos, métodos, aplicaciones) editorial Acribia Zaragoza España.
- Multon Louis J, 2006 aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Segunda edición editorial Acribia Zaragoza España.
- Nofre C, Tinti JM (1996). «Sweetness reception in man: the multipoint attachment theory» *Food Chemistry*. Vol. 56. pp. 263–274.
- P. Vázquez, M. Martínez, A. Blanco, C. López 2005 Alimentación y nutrición- 2B: Pág. 258. Publicado por Ediciones Díaz de Santos, 2005, Madrid España.

- Pasquel, A; Marques, M. y Meireles, A.1999, extracción de la estevia (*S.R.B.*) usando CO₂ presurizado. Revista conocimiento. Vol. 5 (1): 107-118. Universidad nacional de la Amazonía peruana. Iquitos. Perú.
- Rodríguez P. 1998, yerba dulce (*Estevia Rebaudiana B.*), técnicas de producción, secretaria de la producción de Salta Argentina Pág. 14.
- Rojas S. 1999 *estevia poderoso dulce natural cero calorías, componente ideal en dieta para diabéticos*, Agro Enfoque serie N°153 diciembre del 2006. Pág. 13.
- Rojas S. 1999, Agro Enfoque año XIV N°106, revista para el desarrollo agropecuario agroindustrial y agro exportador, vol. 14, - c.2.
- Schwebel R. 2000. Stevia, el edulcorante natural con cero calorías. Artículo de investigación. México D.C. México.
- Shallenberger RS (1963). «Hydrogen bonding and the varying sweetness of the sugars» *Journal of Food Science*. Vol. 28. pp. 584–589.
- Soto E., y Del Valdos S. 2002, Extracción de los principios edulcorantes de la estevia (*stevia Rebaudiana B.*) “Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos” Buenos Aires Argentina Vol. 20: 5-9.
- Tanaka O. 1982, “steviol glicosides: new natural sweeteners” *trent anal chem* vol I (11): 246-248
- Tinti, Jean-Marie & Nofre, Claude (1991). Why does a sweetener taste sweet? A new model. In D.E. Walters, F.T Orthoefer & G.E. DuBois (Eds.), *Sweeteners: Discovery, Molecular Design, and Chemoreception*, ACS Symposium Series 450, pp. 209–213. Washington, DC: American Chemical Society.
- Ureña P. Arrigo H. Guirón M. 1999, Evaluación sensorial de los alimentos, Editorial Agraria Universidad Nacional Agraria la Molina Lima Perú, pp. 58-76.
- Wong, D. 1995. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia Zaragoza. España.
- Yokoyama y Sugiyama 1990. “Clarification of aqueous extract from stevia leaves using of magnesia adsorbente” abstract journal Japanese society of food science and technology vol. 37 (11): 899-905.
- Zanon A. 2000. El cultivo del Ka heê (*Estevia Rebaudiana B.*) Consultora agro-estevia Buenos Aires Argentina Pág.16 -20.



ANEXO N° 1. Cuadro de tratamientos de la primera fase

Mp./sol. gr/ml.	Temperatur a °C	Tiempo. min.	Repeticiones de la absorvancia			PROMEDIO
			R1	R2	R3	
1/10	14	15	0.435	0.44	0.434	0.43633333
1/20	14	15	0.461	0.464	0.465	0.46333333
1/10	86	15	0.528	0.531	0.532	0.53033333
1/20	86	15	0.429	0.404	0.407	0.41333333
1/10	14	45	0.583	0.575	0.611	0.58966667
1/20	14	45	0.537	0.529	0.527	0.53100000
1/10	86	45	0.547	0.558	0.56	0.55500000
1/20	86	45	0.432	0.432	0.431	0.43166667
1/6.5	50	30	0.259	0.261	0.262	0.26066667
1/23.5	50	30	0.329	0.33	0.33	0.32966667
1/15	-10.5	30	0.331	0.339	0.332	0.33400000
1/15	110	30	0.5	0.494	0.495	0.49633333
1/15	50	4.7	0.518	0.517	0.524	0.51966667
1/15	50	55	0.716	0.718	0.72	0.71800000
1/15	50	30	0.688	0.689	0.689	0.68866667
1/15	50	30	0.733	0.724	0.72	0.72566667
1/15	50	30	0.601	0.599	0.6	0.60000000
1/15	50	30	0.647	0.651	0.649	0.64900000
1/15	50	30	0.568	0.574	0.568	0.57000000
1/15	50	30	0.656	0.651	0.653	0.65333333

ANEXO N° 2. Factores de estudio primera fase.

Factores reales.			Resultados.		
Mp./sol. gr/ml.	Temperatura °C	Tiempo. min.	Promedio de absorvancia.	Concentración. gr/ml.	Rendimiento. %
1/10	14	15	0.43633333	0.03301101	3.30110081
1/20	14	15	0.46333333	0.03505083	5.25762465
1/10	86	15	0.53033333	0.04011261	4.01126137
1/20	86	15	0.41333333	0.03127338	4.69100717
1/10	14	45	0.58966667	0.04459519	4.45951875
1/20	14	45	0.53100000	0.04016298	6.02444696
1/10	86	45	0.55500000	0.04197616	4.19761556
1/20	86	45	0.43166667	0.03265845	4.89876691
1/6.5	50	30	0.26066667	0.01973957	1.62851434
1/23.5	50	30	0.32966667	0.02495245	4.17953512
1/15	-10.5	30	0.33400000	0.02527983	3.15997843
1/15	110	30	0.49633333	0.03754395	4.69299348
1/15	50	4.7	0.51966667	0.03930676	4.91334472
1/15	50	55	0.71800000	0.05429064	6.78633026
1/15	50	30	0.68866667	0.05207454	6.50931727
1/15	50	30	0.72566667	0.05486985	6.85873138
1/15	50	30	0.60000000	0.04537586	5.67198256
1/15	50	30	0.64900000	0.04907776	6.13472016
1/15	50	30	0.57000000	0.04310939	5.38867382
1/15	50	30	0.65333333	0.04940514	6.17564254

ANEXO N° 3. Tabla de análisis de varianza para la obtención de la concentración.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:mp sol	0.0000101813	1	0.0000101813	0.55	0.4906 NS
B:temperatura	0.0000140219	1	0.0000140219	0.76	0.4228 NS
C:tiempo	0.00014948	1	0.00014948	8.12	0.0359 *
AA	0.0010212	1	0.0010212	55.46	0.0007 **
AB	0.0000311167	1	0.0000311167	1.69	0.2503 NS
AC	0.00000604872	1	0.00000604872	0.33	0.5914 NS
BB	0.000391179	1	0.000391179	21.25	0.0058 **
BC	0.0000226427	1	0.0000226427	1.23	0.3179 NS
CC	7.9298E-7	1	7.9298E-7	0.04	0.8438 NS
Falta de ajuste	0.00021359	5	0.000042718	2.32	0.1885
Error puro	0.000092063	5	0.0000184126		
Total (corr.)	0.00187034	19			

$R^2 = 83.6579 \%$

** $P < 0.01$

* $0.01 < P < 0.05$

NS $P > 0.05$

GL. Grados de libertad

COEFICIENTE DE REGRESIÓN.

Coeficiente	Estimado
Constante	-0.0594934
A:mp sol	0.0108155
B:temperatura	0.000687394
C:tiempo	0.000487283
AA	-0.000336437
AB	-0.0000109476
AC	-0.0000115842
BB	-0.0000040167
BC	-0.0000031129
CC	0.00000104169

La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Concentración} = -0.0594934 + 0.0108155 X + 0.000687394Y + 0.000487283Z - 0.000336437 X^2 - 0.0000109476*XY - 0.0000115842*XZ - 0.0000040167* Y^2 - 0.0000031129*YZ + 0.00000104169* Z^2$$

Donde:

X = materia prima /solvente, Y = temperatura, Z = tiempo

CUADRO DE OPTIMIZACION

Valor óptimo = 0.055 gr de esteviósido/ml de solución.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
mp sol	6.59104	23.409	14.3986
Temperatura	-10.5445	110.545	44.5499
Tiempo	4.77311	55.2269	55.2269

ANEXO N° 4. Tabla de análisis de varianza para la obtención del rendimiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:mp sol	6.19796	1	6.19796	21.54	0.0056 **
B:temperatura	0.130566	1	0.130566	0.45	0.5304 NS
C:tiempo	2.194	1	2.194	7.63	0.0398 *
AA	15.4341	1	15.4341	53.65	0.0007 **
AB	0.573697	1	0.573697	1.99	0.2170 NS
AC	0.0171585	1	0.0171585	0.06	0.8168 NS
BB	6.52887	1	6.52887	22.69	0.0050 **
BC	0.29353	1	0.29353	1.02	0.3588 NS
CC	0.000808029	1	0.000808029	0.00	0.9598 NS
Falta de ajuste	2.34734	5	0.469469	1.63	0.3021 NS
Error puro	1.43848	5	0.287697		
Total (corr.)	33.7449	19			

R² = 88.781 %

CV = 26.91%

**P < 0.01

*0.01 < P < 0.05

NS P > 0.05

GL. Grados de libertad

COEFICIENTE DE REGRESIÓN PARA RENDIMIENTO

Coeficiente	Estimado
Constante	-9.34645
A:mp sol	1.46828
B:temperatura	0.0875361
C:tiempo	0.0516798
AA	-0.0413607
AB	-0.0014865
AC	-0.000616983
BB	-0.00051892
BC	-0.000354427
CC	0.0000332521

La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{rendimiento} = -9.34645 + 1.46828 * X + 0.0875361 * Y + 0.0516798 * Z - 0.0413607 * X^2 - 0.0014865 * XY - 0.000616983 * YZ - 0.00051892 * Y^2 - 0.000354427 * XZ + 0.0000332521 * Z^2$$

Donde:

X = materia prima /solvente

Y = temperatura

Z = tiempo

CUADRO DE OPTIMIZACIÓN.

Valor óptimo = 6.92%

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
mp /sol	6.59104	23.409	16.5879
temperatura	-10.5445	110.545	41.7318
Tiempo	4.77311	55.2269	55.2269

ANEXO N° 5. Cuadro de tratamientos de la segunda fase

Porcentaje de CaOH ₂ gr.	pH	Repeticiones de absorvancia			Promedio	Concentración Gr./ml
		R1	R2	R3		
6.5	8	0.521	0.522	0.635	0.559333	0.04233845
13.5	8	0.6	0.605	0.603	0.602667	0.04561495
6.5	12	0.622	0.629	0.63	0.627000	0.04745484
13.5	12	0.635	0.633	0.634	0.634000	0.04798412
5	10	0.642	0.643	0.646	0.643667	0.04871503
15	10	0.681	0.681	0.675	0.679000	0.05138664
10	7.1	0.543	0.546	0.546	0.545000	0.04125468
10	12.8	0.673	0.688	0.665	0.675333	0.0511094
10	10	0.718	0.719	0.717	0.718000	0.0543355
10	10	0.728	0.721	0.72	0.723000	0.05471356
10	10	0.743	0.746	0.745	0.744667	0.05635181
10	10	0.71	0.714	0.703	0.709000	0.05365499
10	10	0.689	0.685	0.688	0.687333	0.05201674
10	10	0.705	0.705	0.708	0.706000	0.05342816

ANEXO N° 6. Resultados del rendimiento de la segunda fase.

Factores reales		Resultados
Porcentaje de CaOH ₂ gr.	pH	Rendimiento %
6.5	8	5.7105715
13.5	8	6.15250174
6.5	12	6.40066256
13.5	12	6.47205129
5	10	6.57063573
15	10	6.93097884
10	7.1	5.56439458
10	12.8	6.89358475
10	10	7.32871606
10	10	7.37970801
10	10	7.60067312
10	10	7.23693055
10	10	7.01596543
10	10	7.20633538



ANEXO N° 7. Tabla de análisis de varianza para la determinación del rendimiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:hidróxido	0.131026	1	0.131026	3.43	0.1234 NS
B:ph	1.04543	1	1.04543	27.34	0.0034 **
AA	0.898208	1	0.898208	23.49	0.0047 **
AB	0.0343871	1	0.0343871	0.90	0.3865 NS
BB	2.74694	1	2.74694	71.84	0.0004 **
Falta de ajuste	0.282346	3	0.0941153	2.46	0.1777
Error puro	0.191185	5	0.0382371		
Total (corr.)	5.10817	13			

R²= 90.7299 %

CV 9.28%

**P < 0.01

*0.01 < P < 0.05

NS P > 0.05

GL. Grados de libertad

COEFICIENTE DE REGRESIÓN

Coeficiente	Estimado
Constante	-14.2782
A:hidroxido	0.737761
B:ph	3.35971
AA	-0.0284446
AB	-0.0132336
BB	-0.152339

La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Rendimiento \%} = -14.2782 + 0.737761 * X + 3.35971 * Y - 0.0284446 * X^2 - 0.0132336 * XY - 0.152339 * Y^2$$

Donde:

X = % de CaOH₂

Y = pH

CUADRO DE OPTIMIZACION

Valor óptimo = 7.36215

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Hidróxido	5.05025	14.9497	10.5075
pH	7.17157	12.8284	10.5702

ANEXO N° 8. Codificación de valores de DFCR primera fase

Nivel codificado (x1)	Denominación
<u>-α</u>	Nivel mínimo
-1	Nivel bajo
0	Nivel medio
+1	Nivel alto
<u>+α</u>	Nivel máximo

Fuente: Ibáñez, (2005).

El número de tratamientos es igual a:

$$N = 2^p + 2p + C$$

Donde:

N = Número de tratamientos.

C = constituye el número de puntos centrales.

p = numero de factores de estudio.

Entonces tenemos: $N = 2^3 + 2(3) + 6$

N = 20 tratamientos.

Codificación de los valores del diseño central compuesto en la primera fase.

Para determinar el centro del diseño usaremos la siguiente formula

$$\sum_j^o = \frac{\sum_j^{max} + \sum_j^{min}}{2}$$

- Para el factor Proporción de la materia prima/ solvente (gr/ml).

$$\sum_j^o = \frac{10 + 20}{2} = 15$$

- Para el factor temperatura (T°).

$$\sum_j^o = \frac{86 + 14}{2} = 50$$

- Para el factor tiempo (minutos).

$$\sum_j^o = \frac{15 + 45}{2} = 30$$

Ecuación decodificada.

- **Para el factor Proporción de la materia prima/ solvente (gr/ml).**

Nivel mínimo

$$\text{Sí: } \bar{X} = \frac{20 + 10}{2} = 15 \quad \text{y} \quad \Delta X = \frac{20 - 10}{2} = 5$$

$$\text{Para: } (-1.682) \Rightarrow -1.682 = \frac{A - \bar{X}}{\Delta X} = \frac{A - 15}{5} = 23.41$$

$$\text{Para: } (+1.682) \Rightarrow +1.682 = \frac{A - \bar{X}}{\Delta X} = \frac{A - 15}{2} = 6.59$$

- **Para el factor temperatura (T°).**

$$\text{Sí: } \bar{X} = \frac{86 + 14}{2} = 50 \quad \text{y} \quad \Delta X = \frac{86 - 14}{2} = 36$$

$$\text{Para: } (-1.682) \Rightarrow -1.682 = \frac{A - \bar{X}}{\Delta X} = \frac{A - 50}{36} = -10.55$$

$$\text{Para: } (+1.682) \Rightarrow +1.682 = \frac{A - \bar{X}}{\Delta X} = \frac{A - 50}{36} = 110.55$$

- **Para el factor tiempo (min.).**

$$\text{Sí: } \bar{X} = \frac{45 + 15}{2} = 30 \quad \text{y} \quad \Delta X = \frac{45 - 15}{2} = 15$$

$$\text{Para: } (+1.682) \Rightarrow +1.682 = \frac{A - \bar{X}}{\Delta X} = \frac{A - 30}{15} = 4.77$$

$$\text{Para: } (-1.682) \Rightarrow -1.682 = \frac{A - \bar{X}}{\Delta X} = \frac{A - 30}{15} = 55.23$$

CODIFICACIÓN DE VALORES DE DFCR SEGUNDA FASE

Entonces tenemos: $N = 2^2 + 2(2) + 6 = 14$ *tratamientos*.

Codificación de los valores del diseño central compuesto en la segunda fase.

Para determinar el centro del diseño usaremos la siguiente formula

$$\bar{\sum}_j^o = \frac{\sum_j^{max} + \sum_j^{min}}{2}$$

- Para el factor hidróxido de calcio CaOH_2 %

$$\bar{\sum}_j^o = \frac{13.5 + 6.5}{2} = 10$$

- Para el factor pH.

$$\bar{\sum}_j^o = \frac{12 + 8}{2} = 10$$

Ecuación decodificada.

Para factor pH:

$$\text{Sí: } \bar{X} = \frac{12 + 8}{2} = 10 \quad \text{y} \quad \Delta X = \frac{12 - 8}{2} = 2$$

$$\text{Para: } (-1.414) \Rightarrow +1.414 = \frac{A - \bar{X}}{\Delta X} = \frac{A - 10}{2} = 12.82$$

$$\text{Para: } (+1.414) \Rightarrow -1.414 = \frac{A - \bar{X}}{\Delta X} = \frac{A - 10}{2} = 7.17$$

Para factor hidróxido de calcio:

$$\text{Sí: } \bar{X} = \frac{13.5 + 6.5}{2} = 10 \quad \text{y} \quad \Delta X = \frac{13.5 - 6.5}{2} = 3.5$$

$$\text{Para: } (-1.414) \Rightarrow -1.414 = \frac{B - \bar{X}}{\Delta X} = \frac{B - 10}{3.5} = 5.05$$

$$\text{Para: } (+1.414) \Rightarrow +1.414 = \frac{B - \bar{X}}{\Delta X} = \frac{B - 10}{3.5} = 14.94$$

ANEXO N° 9. Prueba de hipótesis de las medias muestrales.**MEDIAS MUESTRALES**

- Media del secado por atomización. 7.48
- Media del secado en estufa 7.61
- Desviaciones estándar muestrales 1.0 y 1.0

TAMAÑOS DE MUESTRA.

- Media del secado por atomización. 2 repeticiones.
- Media del secado en estufa 3 repeticiones.

Intervalos de confianza del 95.0% para la diferencia entre medias: -0.13 ± 4.30265 $[-4.43265; 4.17265]$

Hipótesis Nula:

- Diferencia entre medias = 0.0, no existe diferencia en el tipo de tratamiento.
- Hipótesis alternativa: la diferencia entre las medias no es igual existe diferencia marcada en el tipo de tratamiento.

Estadístico t calculado = -0.13

Valor-P = 0.908462

No rechazar la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.

ANEXO N° 10. Cartilla de la prueba dúo trío.**Prueba dúo trío.****Ficha de análisis sensorial.****Objetivo:**

Determinar el poder edulcorante de extracto de hojas de estevia, para usarlo como sustituto de la sacarosa industrial.

Poder edulcorante del extracto de hojas de ESTEVIA.

Nombre: _____
fecha: ____/____/2009

Ante usted hay una muestra de referencia marcada con “R” y otras dos muestras marcadas con claves.

Pruebe las dos muestras que se le presentan y marque con una “X” la muestra más parecida a la muestra patrón “R”.

Muestra. A ().

Muestra. B ().

Observaciones:

ANEXO N° 11. Resultado de la Prueba Dúo Trió (170 a 200).

Muestra A = Equivale a 200 veces más dulce que la sacarosa.

Muestra B = Equivale a 170 veces más dulce que la sacarosa.

Panelista	Resultado de la Prueba Duo Trio (170 a 200)
1	B
2	B
3	B
4	B
5	B
6	B
7	B
8	B
9	B
10	B
11	B
12	B
13	B
14	B
15	B

RESULTADOS: 13 panelistas indicaron en sus observaciones que ambas muestras A y B son ligeramente más dulces que la muestra patrón, pero la que más se aproximaba era la muestra B, y 2 panelistas indicaron que la muestra B era igual a la patrón.

ANEXO N° 12. Resultado de la Prueba Dúo Trió (150 a 170).

Muestra A = Equivale a 150 veces más dulce que la sacarosa.

Muestra B = Equivale a 170 veces mas dulce que la sacarosa.

Panelista	Resultado de la Prueba Duo Trio (200 a 250)
1	B
2	A
3	B
4	B
5	B
6	B
7	B
8	B
9	B
10	B
11	B
12	A
13	B
14	B
15	B

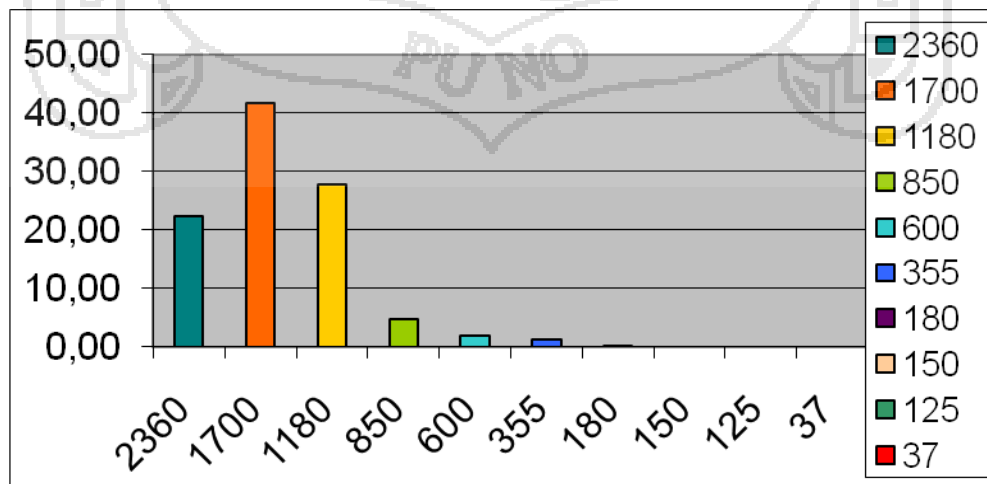
RESULTADOS: 13 panelistas indicaron en sus observaciones que la muestra B era igual a la muestra patrón. Y dos panelistas indicaron que la muestra B era la más parecida a la muestra patrón.

ANEXO N° 13. Cartilla del nivel de significancia de la Prueba Dúo Trió.

Número de respuestas correctas necesarias para establecer diferencia significativa.			
Número de jueces.	Nivel de significancia.		
	95:1 nivel 5%	99:1 Nivel 1%	999:1 Nivel 0.1%
6	6	-	-
8	7	8	-
10	9	10	-
12	10	11	-
14	11	12	14
16	13	14	15
18	14	15	17
20	15	16	18
25	18	20	22
30	21	23	25
35	24	26	28
40	27	29	32
45	30	32	35
50	33	35	38
60	38	41	44
70	44	46	50
80	50	52	56
90	55	58	62
100	60	63	67
200	113	116	121

ANEXO N° 14. Determinación del tamaño de partícula de las hojas de estevia trituradas.

ANALISIS DEL TAMAÑO DE PARTICULA										
ESTEBIA 2										
Molienda: sin molienda										
Lote: 260809										
Fecha análisis: 03/02/09 26/08/09										
U.S Sieve	Micron Size	Wt grams	Over Sieve %	% less than	log dia	log dia	wt * log dia	log dia - log Dgw	wt(log dia - log Dgw)^2	
8	2360	22.00	22.32	77.68	2815.95	3.45	75.89	0.19	0.80	
12	1700	41.00	41.59	36.09	2003.00	3.30	135.37	0.04	0.07	
16	1180	27.43	27.83	8.27	1416.33	3.15	86.44	-0.11	0.32	
20	850	4.75	4.82	3.45	1001.50	3.00	14.25	-0.26	0.32	
30	600	1.93	1.96	1.49	714.14	2.85	5.51	-0.41	0.32	
45	355	1.21	1.23	0.26	461.52	2.66	3.22	-0.60	0.43	
80	180	0.26	0.26	0.00	252.78	2.40	0.62	-0.86	0.19	
100	150	0.00	0.00	0.00	164.32	2.22	0.00	-1.04	0.00	
120	125	0.00	0.00	0.00	136.93	2.14	0.00	-1.12	0.00	
Plato	37	0.00	0.00	0.00	68.01	1.83	0.00	-1.43	0.00	
Summation		98.58	100.00				321.31		2.45	
Particle Size, Dgw			1817		Surface Area (cm ²) / gram			26.7		
Standard Dev., Sgw			1.44		Particles / gram				228	



ANEXO N° 15.Ficha técnicas de las resinas.



IONAC C 267

IONAC C 267 is a premium grade strongly acidic, gel-type cation exchange resin , based on styrene-DVB copolymer. IONAC C 267 is especially suited for the cation removal step in high purity water applications. These heterodispersed resin beads are chemically and osmotically very stable when compared to standard cation exchange resins. IONAC C 267 is produced to meet the requirements of paragraph 173.25 of the Food Additives Regulations of the F.D.A. IONAC C 267 is also available in sodium form (IONAC C-249).

IONAC C 267 applications:
deminerlization, mixed bed / condensate polishing

Physical and chemical properties		US Units		International Units	
Ionic form as shipped		H ⁺		H ⁺	
Screen size	> 90%	US mesh	16-50	mm	0.3-1.2
Uniformity coefficient		max.	1.6	max.	1.6
Shipping weight		lbs/ft ³	50.0	g/l	800
Density				g/ml	1.25
Water retention		% weight	49 - 54	%	49 - 54
Total capacity, min.		kgr CaCO ₃ / ft ³	41.5	eq/l	1.9
Volume change	H ⁺ >> Na ⁺	max. %	-7	max. %	-7
Stability	temperature range	°F	14 - 280	°C	-10 - 140
	pH range		0 - 14		0 - 14
Storability	of product	min years	2	min. years	2
	temperature range	°F	43 - 104	°C	1 - 40

MSDS: Material Safety Data Sheets are available for all Sybron/Bayer products. The MSDS contain pertinent information that may be required to ensure safe handling and use of our products. It is recommended that copies of MSDS be obtained by calling 1-800-678-0020 or 1-800-662-2927.

Contact Us:
Sybron Chemicals Inc.
A Bayer Company
Birmingham Road
Birmingham, NJ 08011
Phone: 1-800-678-0020
Fax: 609-894-8641

www.ionexchange.com

Contact Us:
Sybron Chemicals Inc.
A Bayer Company
100 Bayer Road
Pittsburgh, PA 15205
Phone: 1-800-662-2927
Fax: 412-777-4109

www.ionexchange.com



IONAC ASB 2

IONAC ASB 2 is a premium grade strongly basic, gel-type 2 anion exchange resin, based on styrene-DVB copolymer. IONAC ASB 2 is characterized by high operating capacity and outstanding regeneration efficiency. These heterodispersed resin beads are chemically and osmotically very stable when compared to standard anion exchange resins. IONAC ASB 2 is generally used for waters in which silica and carbon dioxide content do not exceed 25% of the total anions. For higher silica feed waters, a Type 1 anion exchange resin, such as IONAC ASB 1P is recommended.

IONAC ASB 2 applications:
demineralization, mixed bed, dealcalization

Physical and chemical properties

		US Units		International Units	
Ionic form as shipped			Cl ⁻		Cl ⁻
Screen size	> 90%	US mesh	16-50	mm	0.3-1.2
Uniformity coefficient		max.	1.6	max.	1.6
Shipping weight		lbs/ft ³	44.0	g/l	705
Density				g/ml	1.1
Water retention		% weight	39 - 44	%	39 - 44
Total capacity, min.		kgr CaCO ₃ / ft ³	30.6	eq/l	1.4
Volume change	OH ⁻ >> Cl ⁻	max. %	-15	max. %	-15
Stability	temperature range	°F	14 - 170	°C	-10 - 77
	pH range		0 - 14		0 - 14
Storability	of product	min years	2	min. years	2
	temperature range	°F	43 - 104	°C	1 - 40

MSDS: Material Safety Data Sheets are available for all Sybron/Bayer products. The MSDS contain pertinent information that may be required to ensure safe handling and use of our products. It is recommended that copies of MSDS be obtained by calling 1-800-878-0020 or 1-800-882-2827.

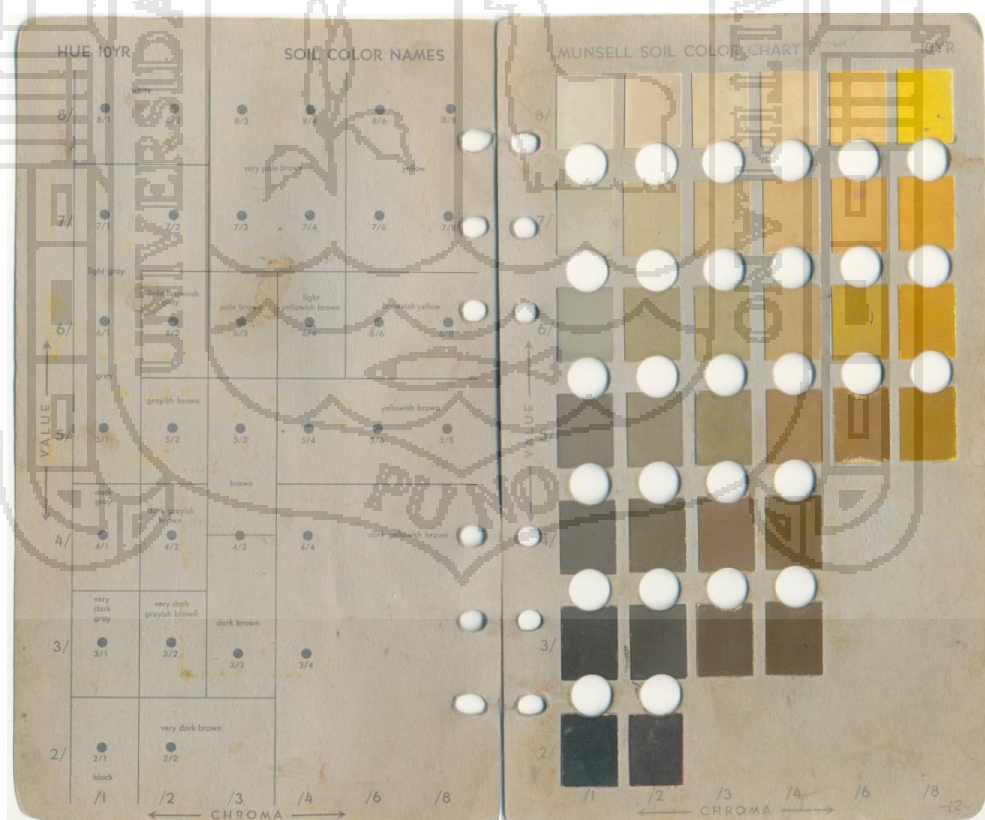
Contact Us:

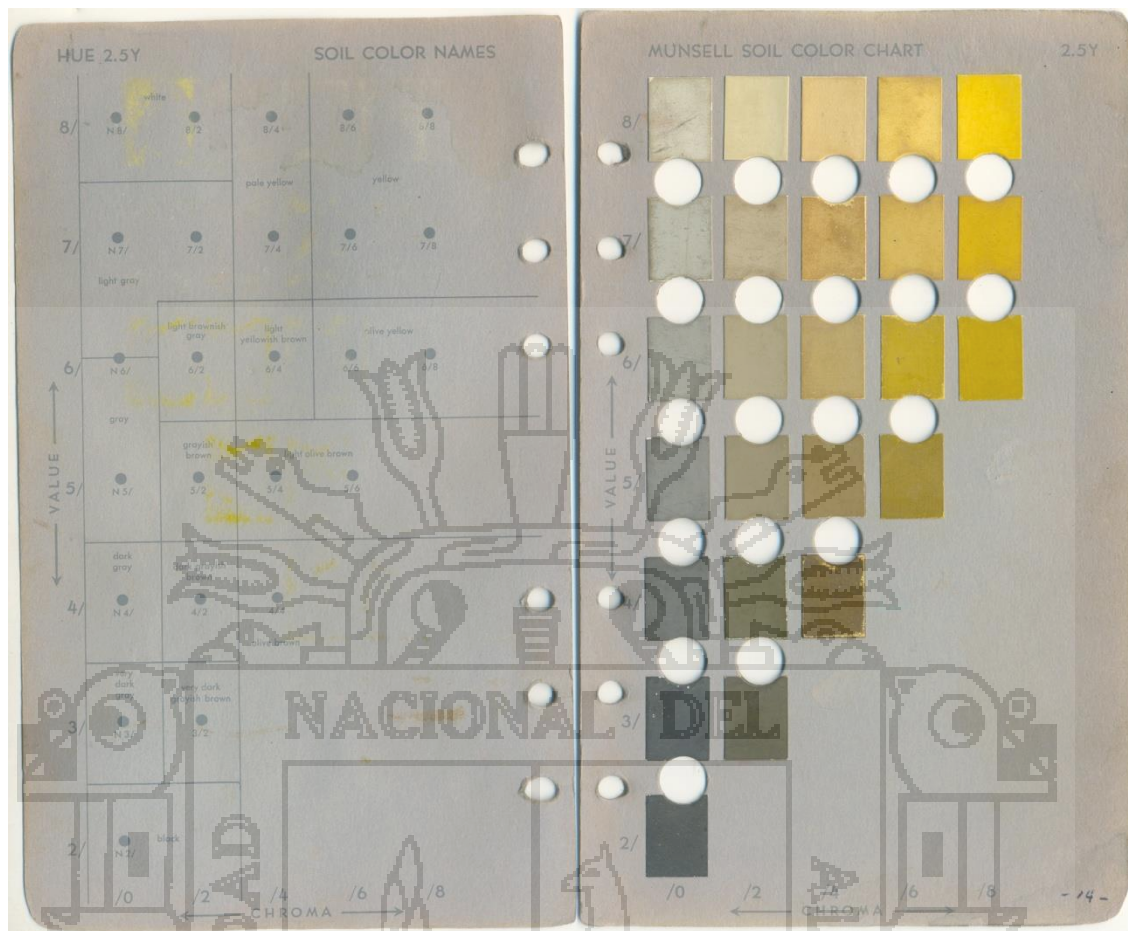
Baker Filtration
4306 West 190th Street
Torrance, CA 90504

Phone: 800-310-6569
Fax: 310-406.3001

www.bakerfiltration.com

ANEXO N° 16. Tablas de MUNSELL.







Apéndices

FOTOGRAFÍAS TOMADAS DURANTE EL PROCESO DE INVESTIGACIÓN.**Fotografía N° 1. Lixiviación de las muestras.****Fotografía N° 2. Control de la temperatura.****Fotografía N° 3. Agitación de la muestra.**

Fotografía N° 4. Proceso de filtración de la muestra.



Fotografía N° 5. Proceso de día filtración con agua destilada.



Fotografía N° 6. Regeneración de resinas con ácido clorhídrico y soda cáustica.



Fotografía N° 7. Purificación con resinas de intercambio iónico.



Fotografía N° 8. Desionizador de intercambio iónico.



Fotografía N° 9. Diferentes tratamientos de las hojas.



Fotografía N° 10. Muestras purificadas.



Fotografía N° 11. Ingreso de la muestra al atomizador de partículas.



Fotografía N° 12. Salida de muestra seca del atomizador de partículas en el laboratorio de la universidad nacional de ingeniería (UNI-LIMA)



Fotografía N° 13. Proceso de determinación del tamaño de partículas en la planta de alimentos balanceados de la Universidad Nacional Agraria la Molina UNALM – LIMA



Fotografía N° 14. Determinación del poder edulcorante mediante análisis sensorial.



Prueba de análisis sensorial en los módulos de cata.

Fotografía N° 15. Determinación del color

