

**ESTUDIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO DE
GLUCÓSIDOS A PARTIR DE STEVIA REBAUDIANA**

IVAN DARIO LUNA SANTANDER

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2017

**ESTUDIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO DE
GLUCÓSIDOS A PARTIR DE STEVIA REBAUDIANA**

IVAN DARIO LUNA SANTANDER

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
Ingeniero Químico**

Director

Prof. CARLOS JESÚS MUVDI NOVA

Ingeniero Químico, M.Sc., Ph. D. en Ingeniería de procesos

Codirectora

Prof. BEATRIZ TORRESTIANA SANCHEZ

Ingeniera **Bioquímica, M.Sc., Ph. D. en Ingeniería Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2017

A mis padres, que con su ejemplo, guía, motivación y amor incondicional, me impulsaron a alcanzar mis logros.

Mis amigos de la universidad que hicieron estos años los mejores.

Ivan Darío Luna Santander

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Industrial de Santander**, mi *alma máter*, por contribuir en mi formación profesional.

Al profesor **Carlos Jesús Muvdi Nova**, por su dedicación, consejos y constante e incondicional apoyo, fundamental para el desarrollo de este proyecto y mi formación.

A la profesora **Beatriz Torrestiana Sánchez**, por permitirme la posibilidad de realizar la pasantía en su laboratorio y brindarme su total y constante apoyo.

Al **Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA)** por el apoyo brindado en la fase experimental que realice en el mismo.

A la **Unidad de Investigación de desarrollo de alimentos (UNIDA)** por su grato recibimiento y acogida.

A todos los profesores y estudiantes de la UNIDA, amigos y familias Mexicanas (Rafael, Fidji y Alma) que contribuyeron a que mi pasantía en México fuera una experiencia inolvidable.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16 <u>13</u>
1. OBJETIVOS	22 <u>19</u>
1.1. GENERAL.....	22 <u>19</u>
1.2. ESPECÍFICOS.....	22 <u>19</u>
2.1. Fase preliminar: Caracterización de hoja de <i>Stevia</i>	24 <u>21</u>
2.2. Fase 1: Planteamiento de metodología de extracción para cuantificar los glucósidos de la hoja de <i>Stevia</i>	24 <u>21</u>
2.3. Fase 2: Evaluación de la influencia de la temperatura y el tiempo sobre los rendimientos de extracción.	25 <u>22</u>
2.4. Fase 3: Propuesta de un diseño conceptual para el escalamiento del proceso de extracción.....	25 <u>22</u>
2.5. Métodos experimentales	26 <u>23</u>
3.1. Caracterización de la hoja de <i>Stevia</i>	28 <u>25</u>
3.2. Planteamiento de una estrategia metodológica para la cuantificación de los glucósidos presentes en la hoja seca de <i>Stevia</i>	29 <u>26</u>
3.3. Evaluación de la influencia de la temperatura y el tiempo sobre los rendimientos de extracción.	33 <u>30</u>
3.4. Propuesta de un diseño conceptual para el escalamiento del proceso de extracción.	34 <u>31</u>

Pág.

Tabla 1. Técnicas de extracción utilizadas por diversos autores para la extracción de glucósidos de *Stevia*191616

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Tabla 2. Factores de escala y números adimensionales empleados para el escalamiento del tanque agitado262323

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Tabla 3. Análisis proximal de la hoja seca de *Stevia Rebaudiana*.....282525

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Tabla 4. Porcentaje de extracción de glucósidos de *Stevia* a temperatura ambiente, 15 min, relación 1/20 (g hoja seca/ ml de agua), asistido con ultrasonido con diferentes solvente.322929

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Tabla 5. Efecto de la temperatura en la extracción de glucósidos a una relación hoja seca/ agua de 1/20 (g de hoja seca/ ml de agua), agitación a 100 r.p.m. y agua como solvente.....333030

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Estructura molecular de los principales glucósidos de las hojas de *Stevia Rebaudiana*161313

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Figura 2. Diagrama metodológico.....232020

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Figura 3. Proporciones para dimensionamiento de un tanque agitador.....272424

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Figura 4. Distribución de tamaño de partícula de las muestras de hoja seca molina de *Stevia*.....282525

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Figura 5. Extracción de glucósidos de hoja seca de *Stevia Rebaudiana* vs tiempo, en la primera etapa de extracción, a una relación 1/20 y 1/100 (g hoja seca/agua), temperatura ambiente, asistido con ultrasonido.....302727

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Figura 6. Relación entre el porcentaje de extracción de glucósidos de hoja seca de *Stevia Rebaudiana*, a distintas relaciones de hoja seca/agua, temperatura ambiente, tiempo de 15 min y asistido con ultrasonido. En función de: (a) etapas de extracción, (b) Extracción total.....312828

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Figura 7. Estrategia metodológica para la cuantificación de glucósidos de *Stevia*.
.....333030

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

Figura 8. Prueba de velocidad de separación en el fondo y la superficie, luego de una agitación de 15 min a 100 rpm a una relación 1/20 g de hoja/ ml de agua.

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Figura 9. Dimensiones de tanque de agitación para la extracción de glucósidos de hoja seca de *Stevia*. Para una relación g de hoja/ ml de agua de 1/20, temperatura ambiente y con solvente agua.363333

Código de campo cambiado

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Código de campo cambiado

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO DE GLUCÓSIDOS A PARTIR DE STEVIA REBAUDIANA*

AUTOR: Ivan Darío Luna Santander**

PALABRAS CLAVE: Glucósidos de *Stevia*, Extracción Sólido-Líquido, *Stevia Rebaudiana*, Escalamiento.

DESCRIPCIÓN:

De la hoja de *Stevia Rebaudiana* se obtiene un extracto natural sin contenido calórico, el cual contiene una serie de sustancias denominadas glucósidos, caracterizados por presentar sabor dulce entre 200 y 300 veces mayor al de la sacarosa. Actualmente, la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) del Instituto Tecnológico de Veracruz (ITV), México, evalúa la extracción convencional sólido-líquido para la obtención de los glucósidos de la hoja de *Stevia Rebaudiana*. Sin embargo, no tienen una metodología para determinar el contenido total de los glucósidos presentes en la hoja seca y no existen reportes claros de las condiciones adecuadas para la extracción. Por lo que es necesario estudiar el proceso de extracción sólido-líquido de glucósidos a partir de *Stevia Rebaudiana* y la influencia de las variables de proceso en los rendimientos de extracción.

Por lo tanto, se planteó una metodología de extracción para determinar el contenido de glucósidos presentes en la hoja de *Stevia*, mejorando el proceso utilizado por la UNIDA del ITV, encontrándose un contenido promedio de 23,14% p/p (g de glucósido extraído/100 g de hoja seca). También se evaluó experimentalmente la influencia de las variables temperatura y tiempo sobre los rendimientos de extracción de glucósidos presentes en la hoja de *Stevia*, alcanzándose un rendimiento de extracción de 63,93% (g glucósidos extraídos en la hoja seca/ g de glucósidos totales en la hoja seca). Lo anterior a una temperatura de 30 °C, bajo agitación magnética durante 15 min. Por último, se propuso un diseño conceptual para el escalamiento del proceso de extracción del laboratorio de Bioprocesos de la UNIDA del ITV, a través de un método basado en la similitud, para una solución de 0,015 m³ (con un factor de escala de 75), utilizando un agitador mecánico tipo Rushton.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ingenierías Físico-Química. Escuela de Ingeniería Química. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Director: Carlos Jesús Muvdi Nova. Ingeniero Químico, M.Sc., Ph.D. Unidad de Investigación en Desarrollo de Alimentos. Codirector: Beatriz Torrestiana Sánchez. Ingeniera Bioquímica, M.Sc., Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE PROCESS OF SOLID-LIQUID EXTRACTION OF GLYCOSIDES FROM STEVIA REBAUDIANA*

AUTHOR: Ivan Darío Luna Santander**

Con formato: Español (Colombia)

KEYWORDS: *Stevia Glycosides*, solid-liquid extraction, *Stevia Rebaudiana*, Scaling.

DESCRIPTION:

From *Stevia Rebaudiana* leaves obtains a natural extract without caloric content, which contains a series of substances called glycosides, characterized by having a sweet taste, 200 to 300 times greater than the sucrose. Currently, *Unidad de Investigación en Desarrollo de Alimentos (UNIDA)* of the *Instituto tecnologico de Veracruz (ITV)*, Mexico, evaluates the conventional solid-liquid extraction to obtain the glycosides from the *Stevia Rebaudiana* leaf. However, they do not have a methodology to determine the total content of the glycosides in the dry leaf and there are no clear reports of the conditions suitable for the extraction. Therefore, it is necessary to study the solid-liquid extraction process of glycosides from *Stevia Rebaudiana* and the influence of the process variables on the extraction yields.

Therefore, an extraction methodology was used to determine the content of glycosides present in *Stevia* leaf, improving the process used by UNIDA, with an average content of 23.14% w/w (g of extracted glucoside/ 100 g dry leaf). The influence of the variables like: temperature and time, on the glycoside extraction yields in the *Stevia* leaf was also evaluated experimentally, reaching an extraction yield of 63.93% (g glucosides extracted in the dry leaf / g of total glycosides in the dry leaf), at a temperature of 30 °C, under magnetic stirring for 15 min. Finally, a conceptual design was proposed for the scaling of the extraction process of the UNIDA Bioprocess Laboratory, using a scaling method based in similarity for a 0.015 m³ solution (with a scale factor of 75), using a Rushton mechanical stirrer.

*Undergraduated Proyect

**Physical and Chemical Engineering's Faculty. School of Chemical Engineering. Food Science and Technology Research Center. Advisor: Carlos Jesús Muvdi Nova, Chemical Engineer, M.Sc., Ph.D. Investigation Unit of Food Research and Development. Codirector: Beatriz Torrestiana Sánchez. Biochemical Engineer, M.Sc., Ph.D.

PRESENTACIÓN DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN UNIDA DEL ITV.

En el Instituto Tecnológico de Veracruz, México, se encuentra la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (UNIDA) la cual es un centro de investigación donde se realizan trabajos y desarrollo de alto nivel en las áreas de alimentos y biotecnología. En éste se encuentra el Laboratorio de Bioprocesos dirigido por la Doctora Beatriz Torrestiana Sanchez [1] quien fue la tutora del proyecto durante la estancia.

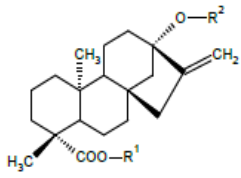
La Doctora Beatriz Torrestina posee Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM) y Doctorado en Ingeniería Química de la *Université Laval*, Quebec, Canadá. Su interés en investigación se centra en la ingeniería de bioprocesos para la producción de metabolitos de interés comercial. Esto incluye la ingeniería de procesos de separación por membranas aplicados a: la recuperación, concentración y purificación de productos biológicos, la clarificación y concentración de extractos de plantas y jugos de frutas, la esterilización y producción de emulsiones nutricionales, la purificación y tratamiento de aguas y la separación y purificación de biocombustibles [2].



INTRODUCCIÓN

La *Stevia Rebaudiana* también conocida como "Ka'a He'e" o "Yerba dulce" es un arbusto de la familia Asteráceas, nativa de la sierra de Amambay en Paraguay y el estado de *Mato Grosso di Sul* en Brasil [3]. De sus hojas se extrae una serie de moléculas denominadas glucósidos, caracterizados por presentar sabor dulce, entre 200 y 300 veces mayor al de la sacarosa [4]. Dicho extracto es natural y libre de colesterol, constituido por ocho glucósidos; steviolbiosido, rebaudiósido B, rebaudiósido E, rebaudiósido F, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido C y dulcósido. Todos tienen en común una aglicona denominada *Steviol*, pero su constituyente glucosídico asociado difiere, tal como se muestra en la Figura 1. Los glucósidos principales son: esteviósido (4-13%, peso seco), rebaudiósido A (2 – 4%, peso seco), rebaudiósido C (1 – 2%, peso seco) y dulcósido A (0,4 – 0,7%, peso seco) (Periche, Castelló & Hereida, 2015), de los cuales los dos primeros dan el efecto endulzante con sabor amargo [5].

Figura 1. Estructura molecular de los principales glucósidos de las hojas de *Stevia Rebaudiana* [5].



Compuesto	R ¹	R ²
Steviol	H	H
Steviolbiosido	H	β-Glc-β-Glc(2-1)
Steviósido	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2-1)
Rebaudiósido A	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2-1) β-Glc(3-1)
Rebaudiósido B	H	β-Glc-β-Glc(2-1) β-Glc(3-1)
Rebaudiósido C	β-Glc	β-Glc-β-Rha(2-1) β-Glc(3-1)
Rebaudiósido E	β-Glc-β-Glc(2-1)	β-Glc-β-Glc(2-1)
Rebaudiósido F	β-Glc	β-Glc-β-Xll(2-1) β-Glc(3-1)
Dulcósido A	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2-1)

El extracto de la hoja es un endulzante natural sin contenido calórico, de allí su importancia, con propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antivirales, antihipertensivas, antihiperlipémicas y antitumorales [6,7]. Igualmente, estudios toxicológicos han mostrado que no tiene efectos mutagénicos, teratogénicos, cancerígenos y tampoco se han observado reacciones alérgicas con su uso [3]. Esto muestra la ventaja de la *Stevia* sobre otros endulzantes, lo que la convierte en el sustituto más adecuado de la sacarosa [3] y edulcorantes sintéticos utilizados en pacientes con enfermedades relacionadas al metabolismo del azúcar [8]. Esto generó un aumento en la demanda a una tasa del 10% al 20% anual [9], por lo cual, su cultivo se ha expandido alrededor del mundo, principalmente en China, Paraguay, Kenia, Estados Unidos, Vietnam, Brasil y México [9].

En la extracción de compuestos a partir de las hojas de *Stevia* existen procesos clásicos y novedosos como: adición de un agente quelante seguido de una cristalización [10], extracción con agua seguido de centrifugación y tratamiento con hidróxido de calcio [11], intercambio iónico para remover las impurezas del extracto de *Stevia* seguido de adición de metanol [12], adsorción con adsorbentes poliméricos [13], floculación junto con una precipitación, ultrafiltración y separación por membranas, extracción asistida con microondas y separación por medio de fluidos supercríticos [6,14,15]. Varios de los procesos nombrados toman demasiado tiempo, son complejos y costosos. El reto consiste en obtener el mayor porcentaje de extracción al aplicar aquel que a condiciones controladas requiera menor gasto energético y de recursos.

Actualmente, la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) del Instituto Tecnológico de Veracruz (ITV), México, evalúa la extracción convencional sólido-líquido para la obtención de los compuestos endulzantes de la hoja de *Stevia Rebaudiana*, sin embargo, no existen reportes claros de las condiciones adecuadas para la extracción. El proceso evaluado presenta inconvenientes como la retención de una cantidad importante de glucósidos (Esteviósidos y Rebaudiósido A) en las hojas gastadas durante la primera etapa de extracción,

teniendo un porcentaje de extracción aproximado del 80% [16]. En la Tabla 1 se muestran varios trabajos realizados, la técnica que emplearon y las condiciones en las que trabajaron, evidenciando la variedad de condiciones que se han investigado.

Adicionalmente, no se tiene definido un método para la cuantificación de glucósidos totales en la hoja de *Stevia*. Se ha considerado que la mayor extracción de glucósidos se obtiene por el método convencional asistido por ultrasonido [16]. Esto es importante para definir el rendimiento total del proceso de extracción. Por lo tanto, se requiere una alternativa económica para la extracción de glucósidos, que tome poco tiempo, minimice los recursos humanos y la exposición al medio ambiente, [7,16]. Con la intención de llevar la extracción a una escala industrial, es necesario estudiar y proponer un método para cuantificar el contenido total de los glucósidos presentes en la hoja seca y mejorar la eficiencia del proceso de extracción que se usa actualmente, junto con un diseño conceptual para su escalamiento. Por lo tanto, se consideró el proceso trabajado en la UNIDA y aquellos reportados por la literatura, tales como: extracción sólido - líquido, extracción convencional asistida con ultrasonido o microondas, entre otros. Estos permiten a determinadas condiciones un alto rendimiento en la extracción, aumentando la eficiencia global.

Varios autores han comparado las técnicas de intensificación con respecto a las técnicas convencionales, determinando que independientemente del método empleado para extraer los glucósidos de la *Stevia*, una mayor cantidad de solvente aumenta el intercambio de materia y mejora el rendimiento de la extracción [18]. También se determinó que la presión no genera un efecto importante en la concentración de los glucósidos y que el aumento de la temperatura beneficia el rendimiento de extracción [19].

Tabla 1. Técnicas de extracción utilizadas por diversos autores para la extracción de glucósidos de *Stevia* [16].

Autor	Técnicas de extracción	Variables de estudio
Pasquel <i>et al.</i> (2000)	Extracción convencional (1 h, 25 – 30 °C) Extracción por fluidos supercríticos	Presión 120 y 200 bar Temperatura 16,30 y 45 °C Tiempo residencia 12 h
Alupului & Lavric (2009)	Ultrasonido (T= 26°C; t= 10,15, 20 min) Maceración (T= 26°C; t=12 y 24 h) Infusión (T= 40°C; t=10min)	Mezcla de solventes (etanol/agua)
Erkucuk <i>et al.</i> (2009)	Extracción por fluidos supercríticos	Presión 150 a 350 bar Temperatura 40 a 80 °C Solventes (CO ₂ /Etanol/Agua)
Jaitak <i>et al.</i> (2009)	Extracción convencional t=12 h Ultrasonido t= 30 min Microondas t=30 a 5 min	Temperatura: 100 °C Mezcla de solventes (etanol/agua) Relación planta/agua: 1/100
Lui <i>et al.</i> (2010)	Ultrasonido Extracción convencional T=100°C; t= 2h	Temperatura 40,50,60,70 y 80 °C Potencia 20,440, 60 y 100 W. Tiempo 10 – 60 min Relación planta agua 1/10

Revisando la literatura, se determina que de la extracción convencional asistida con ultrasonido y la asistida con microondas, esta última fue quien tuvo mayor recuperación, sin embargo, el uso de temperatura mayor, mayor potencia y mayor tiempo provoca la degradación de los compuestos de interés, disminuyendo los rendimientos de extracción [20]. También se demostró que el proceso por ultrasonido presenta una mayor velocidad de extracción y alcanzó su máximo después de 20 min, obteniendo una cantidad similar en el porcentaje de extracción que con maceración y el método convencional a 24 h [7, 18]. Se encontró que los mejores solventes son el agua y los alcoholes metanol y etanol, lo anterior dado que los glucósidos contienen grupos hidroxilo que le confieren gran solubilidad en estos solventes [18]. En cuanto a la relación g hoja seca/ml de agua, los valores

empleados por diferentes estudios varían entre 1/10 y 1/100 [7, 20, 21]. Además, se determinó que un tamaño de hoja de 0,315 mm de diámetro generaba un rendimiento mayor de extracción para los glucósidos en comparación con un diámetro de 6,3 mm [18]. Estudios realizados por Ortiz (2014) concluyeron que la absorbancia se ve afectada directamente a pH mayor de 7, esto debido a la oxidación de los compuestos fenólicos, lo que otorga cierta coloración indeseable, sin embargo, el pH no altera el proceso de extracción [16]. En cuanto la agitación, se comprobó que no tuvo efecto sobre la concentración de glucósidos y los sólidos totales disueltos, sin embargo, es necesario aplicarla en ausencia del ultrasonido, para suspender los sólidos en el solvente [16]. La temperatura favorece la extracción de los glucósidos de *Stevia*, en la literatura el rango utilizado varía de 25°C a 100°C [16, 18, 20].

Dada la gran variedad de resultados presentados en la literatura, fue necesario realizar un estudio sobre el efecto de las principales variables que influyen en el proceso, como: temperatura, tipo de solvente, etapas de extracción, asistencia con ultrasonido y relación hoja/solvente, con el fin de obtener el conjunto de condiciones que generen la mayor eficiencia en la extracción.

Cabe agregar la necesidad de realizar una caracterización previa de la hoja de *Stevia*, debido a que se pretende realizar una extracción mayoritaria de glucósidos con bajo nivel de impurezas tales como: lípidos, proteínas, pigmentos, etc. Por lo que una caracterización de la hoja seca, daría una idea y un punto de partida acerca de los compuestos con los cuales se trabajará.

Ahora bien, con el fin de efectuar una mayor extracción del extracto de la hoja seca de *Stevia*, es necesario realizar un escalamiento del proceso. Para esto, existen diferentes métodos basados en: análisis dimensional, similitud, relaciones empíricas y modelos [22]. En la literatura consultada, el método empleado para el escalamiento de un proceso de extracción sólido-líquido está basado en la similitud [23, 25]. Este escalamiento se basa en que dos sistemas son similares si

existe similitud geométrica, cinemática y dinámica. La similitud geométrica implica conservar factores o relaciones de escala, la similitud cinemática establece que en ambos sistemas las partículas recorran trayectorias geoméricamente semejantes por lapsos de tiempo que se corresponden, y para existir una similitud dinámica, deben igualarse entre los sistemas la relación de fuerzas restauradoras a aquellas de oposición [22, 26].

En la práctica, este proceso de extracción puede realizarse en un tanque de agitación, para asegurar la mezcla y suspensión de los sólidos en el líquido [27]. Para el escalamiento, existe la dificultad para lograr que se cumplan a la vez las similitudes necesarias, sin embargo, es suficiente con determinar algunos de los parámetros más importantes para realizarlo [26]. McCabe *et al.* (2007) y Moss (2004) determinan que es suficiente con mantener los factores de escala, el Reynolds, el Freud y el número de potencia para asegurar condiciones hidrodinámicas similares en el escalamiento de tanques agitados.

1. OBJETIVOS

1.1. General

Estudiar el proceso de extracción sólido-líquido de glucósidos a partir de *Stevia Rebaudiana* y la influencia de las variables de proceso en los rendimientos de extracción.

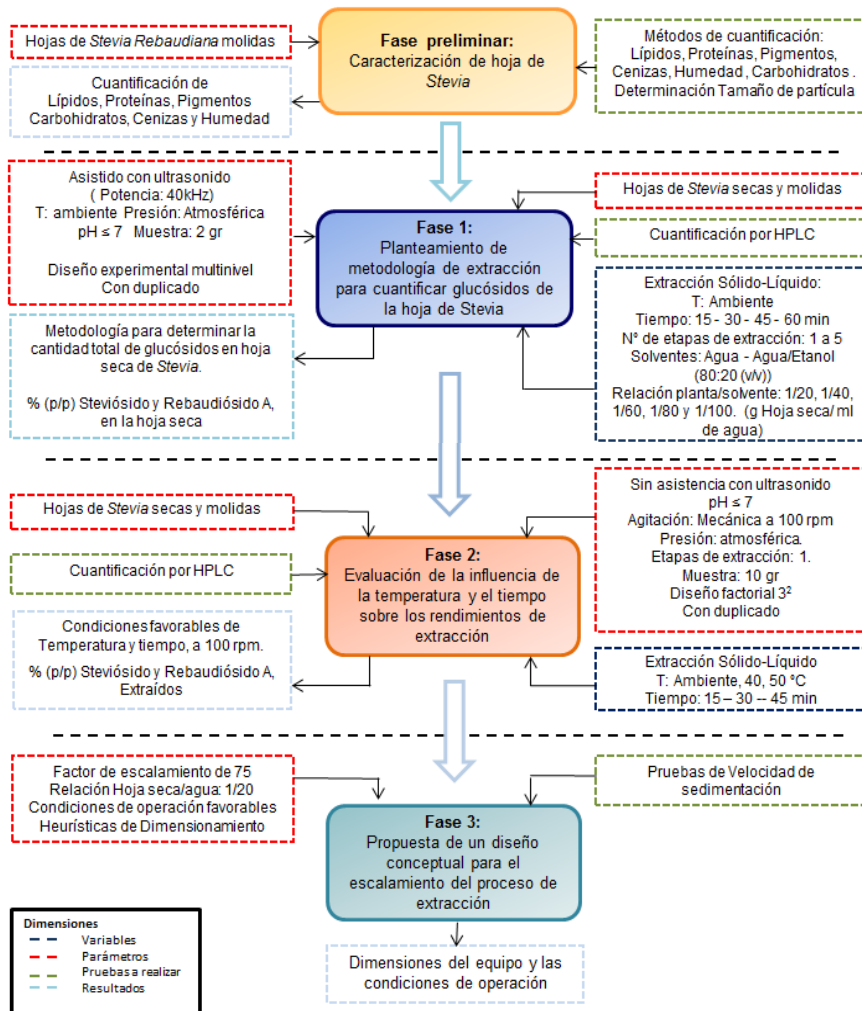
1.2. Específicos

- Plantear una metodología de extracción para determinar los glucósidos presentes en la hoja de *Stevia*.
- Evaluar experimentalmente la influencia de la temperatura y el tiempo sobre los rendimientos de extracción de glucósidos presentes en la hoja de *Stevia*.
- Proponer un diseño conceptual para el escalamiento del proceso de extracción del laboratorio de Bioprocesos del grupo UNIDA del ITV.

2. METODOLOGÍA

En la Figura 2 se muestra el diagrama metodológico, donde se presentan las fases desarrolladas en este proyecto.

Figura 2. Diagrama metodológico.



2.1. Fase preliminar: Caracterización de hoja de *Stevia*.

Buscó caracterizar la hoja de *Stevia Rebaudiana* obtenidas del sur del estado de Veracruz por medio de un análisis proximal, con el fin de verificar la composición y calidad de las hojas con que se trabajaron, para tener un punto de comparación respecto a otros trabajos.

2.2. Fase 1: Planteamiento de metodología de extracción para cuantificar los glucósidos de la hoja de *Stevia*.

Para la cuantificación de los glucósidos, la hoja seca de *Stevia* se redujo a polvo a través de un proceso de molienda (molino pulverizador de cuchilla marca Glen Creston, con una malla de 1 mm), con el fin de aumentar el área de contacto entre la hoja y el solvente. Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización de la distribución de tamaño de partícula de la hoja seca molida.

Se planteó una estrategia con base en una revisión bibliográfica de los principios de extracción sólido-líquido y la relación entre los factores influyentes en la extracción de glucósidos, tales como: relación g de hoja seca/ml de agua, etapas de extracción, tiempo de extracción y tipo de solvente. Cada uno de los anteriores factores con distintos niveles [4, 7, 16, 28]. Para la relación g de hoja/ml de agua se manejaron cinco niveles; 1/20, 1/40, 1/60, 1/80 y 1/100, con el fin de estimar la relación que mayor porcentaje de extracción genere y dado también que en la literatura no se encuentra una relación común; los valores en la literatura consultada varían entre 1/10 a 1/100 [7, 16, 28]. Las etapas de extracción se realizaron consecutivamente hasta que el porcentaje de glucósidos extraídos fuera menor del 1% de lo extraído por la etapa anterior. Para el tiempo de extracción, se tomaron muestras cada 15 min durante una hora, con el fin de estimar la cinética de extracción y asegurar la extracción completa de los glucósidos. Para el tipo de solvente, se empleó: agua y agua/etanol (20% v/v), dado que han que en esta fase, las extracciones se realizaron asistidas con ultrasonido, dado que ello influye positivamente en la extracción de compuestos orgánicos [29, 30].

Cabe resaltar que las pruebas se realizaron a pH 7, presión atmosférica, utilizando 2 g de muestra y por duplicado.

2.3. Fase 2: Evaluación de la influencia de la temperatura y el tiempo sobre los rendimientos de extracción.

En esta fase se analizó el efecto de la temperatura y el tiempo sobre la extracción de glucósidos de *Stevia Rebaudiana* en una etapa de extracción, y agitación mecánica. Los niveles de evaluación para la temperatura se estimaron de manera que fueran cercanos a la temperatura ambiente, por lo que los valores fueron: 30, 40 y 50 °C. Las pruebas se realizaron durante 45 min, tomando muestras cada 15 min. La agitación mecánica se llevó a cabo a 100 r.p.m.; condición establecida por el grupo de investigación teniendo en cuenta su implementación en la industria. Cabe resaltar que las pruebas se realizaron a pH 7, presión atmosférica, una muestra de 10 g, por duplicado y la relación hoja seca/agua y tipo de solvente utilizados fueron los que mejor resultado dieron en la Fase 1.

2.4. Fase 3: Propuesta de un diseño conceptual para el escalamiento del proceso de extracción.

En esta última fase, se propuso el escalamiento del proceso de extracción de glucósidos a un volumen de 0,015 m³, aplicando un factor de escala de 75, con base a los experimentos realizados en el laboratorio de bioprocesos del grupo UNIDA. En general, se realizó el diseño de un tanque de agitación con dos salidas ubicadas estratégicamente, una para disponer de la solución rica en glucósidos y otra para drenar parte de la solución restante.

En la Figura 3, se muestran las proporciones estimadas en la literatura para el dimensionamiento de un tanque agitador en relación al diámetro del tanque, además, se emplearon relaciones y condiciones establecidas para el diseño, determinadas por ASME (2015), Moss (2004), entre otros.

Por otra parte, con el fin de obtener condiciones hidrodinámicas similares entre el montaje realizado en el laboratorio y el proceso escalado, se determinaron los factores de escala y números adimensionales mostrados en la Tabla 2.

Se observó la necesidad de realizar una prueba para determinar la velocidad de separación, tal como se explica en la metodología de velocidad de separación de las partículas en suspensión, ya que durante después de la agitación y durante la separación una fracción de las partículas suspendidas en el líquido precipitan y mientras que otras flotan.

La formación de las fases toma un tiempo y cada una ocupa un volumen dentro del tanque, siendo parámetros a tener en cuenta para el diseño del tanque de agitación. Con el volumen que ocupa la fase precipitada y la fase flotante, junto con el diámetro del tanque, se puede calcular la altura que ocupan en el tanque, por consiguiente, se permite determinar la altura de la desembocadura de salida del líquido rico en glucósidos, además, con el tiempo en que se forman las fases y el tiempo de agitación de 15 min, se estima el tiempo que conlleva la operación del tanque.

Tabla 2. Factores de escala y números adimensionales empleados para el escalamiento del tanque agitado [27, 24].

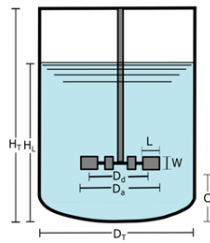
$\frac{D_a}{D_T}$	$\frac{\text{Diametro de agitador}}{\text{Diametro del tanque}}$	$Re = \frac{D_r^2 N \rho}{\mu}$	$\frac{\text{Fuerzas de inercia}}{\text{Fuerzas de viscosidad}}$
$\frac{H_L}{D_T}$	$\frac{\text{Altura del liquido}}{\text{Diametro del tanque}}$	$Fr = \frac{N^2 D_T}{g}$	$\frac{\text{Fuerzas de inercia}}{\text{Fuerzas de gravedad}}$
$\frac{C}{D_T}$	$\frac{\text{Altura del agitador}}{\text{Diametro del tanque}}$	$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D_a^5}$	<i>Coficiente de resistencia del agitador en el fluido</i>

2.5. Métodos experimentales

Cuantificación de glucósidos

Para el análisis de la concentración de glucósidos, se siguió el procedimiento reportado por Ortiz (2014) utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en un equipo Waters 600 a una longitud de onda de 210 mm, con un

Figura 3. Proporciones para dimensionamiento de un tanque agitador [27, 31, 32].



Donde:

$$\frac{H_T}{D_T} = 1,2 \quad \frac{H_L}{D_T} = 1 \quad 0,3 < \frac{C}{D_T} < 0,5$$

$$0,3 < \frac{C}{D_T} < 0,5 \quad \frac{W}{D_a} = 0,25 \quad 0,25 < \frac{L}{D_a} < 0,3$$

líquido, se siguió la teoría y práctica descrita por Martín *et al.*(2011), en la cual estima realizar una prueba en una probeta graduada de vidrio, haciéndole seguimiento al tiempo en que fases se forman generando una altura tanto en la parte inferior como superior de la probeta, hasta que se alcanza un punto de estabilización aproximadamente a los 2 min. Los resultados se grafican como Altura en función del tiempo, y de la parte lineal se obtiene la tasa de cambio por regresión; tasa que representa la velocidad de sedimentación de las partículas en suspensión [33].

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Caracterización de la hoja de *Stevia*.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la caracterización del lote de hojas de *Stevia Rebaudiana* utilizado en este trabajo junto con lo reportado por algunos autores. En ella se observa similitud con la mayoría de los valores reportados por los autores, sin embargo, se presentan variaciones en los porcentajes incluso entre los autores consultados. Dichas variaciones son debidas a la variedad de *Stevia* utilizada, las condiciones de crecimiento y las técnicas de cultivo utilizadas [34].

Tabla 3. Análisis proximal de la hoja seca de *Stevia Rebaudiana*.

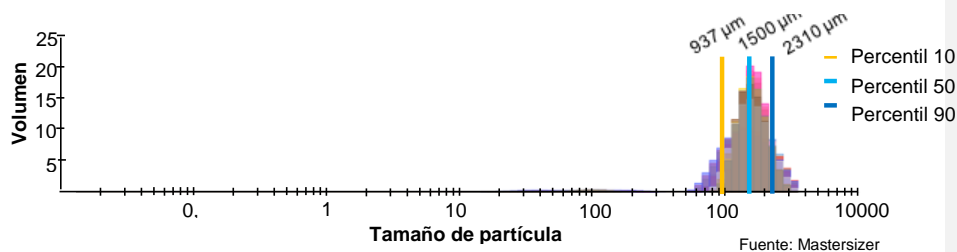
	Presente trabajo	Lemus-Mondaca et al. (2015)	Mohammed et al. (2014)	Abou-Arab et al. (2010)
Proteína (%)	3,66 ± 0,16**	8,03 ± 0,15	13,68 ± 1,68	11,41 ± 0,19
Grasas (%)	3,98 ± 0,02*	6,57 ± 0,58	6,13 ± 0,63	3,73 ± 0,29
Carbohidratos (%)	69,62 ± 0,05*	72,96 ± 0,53	63,10 ± 1,20	61,93 ± 6,6
Cenizas (%)	7,36 ± 0,22*	12,41 ± 0,23	12,06 ± 1,33	7,41 ± 0,14
Fibra Cruda (%)	5,88 ± 1,62*	12,09 ± 0,22	5,03 ± 0,16	15,52 ± 0,19
Humedad (%)	9,50 ± 0,04*	6,85 ± 0,08	10,73 ± 1,33	5,37 ± 1,12

Porcentajes en base seca *Desviación estándar +Base seca

Fuente: Autor.

En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización de la distribución de tamaño de partícula después de realizada la molienda. En ésta se puede observar que el 90% de las partículas tiene un diámetro menor a 2310 µm y que el tamaño de partícula medio fue de 1500 µm.

Figura 4. Distribución de tamaño de partícula de las muestras de hoja seca molina de *Stevia*.

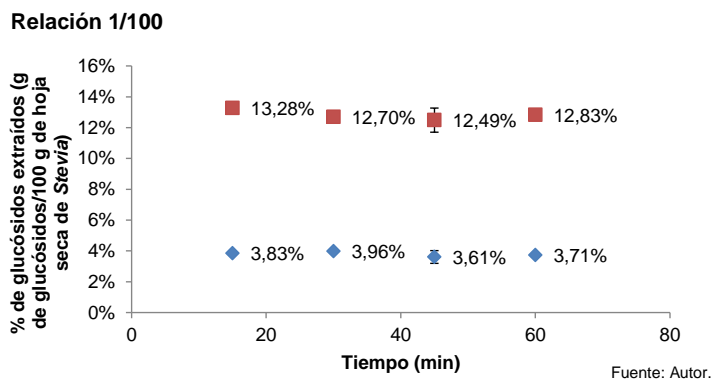
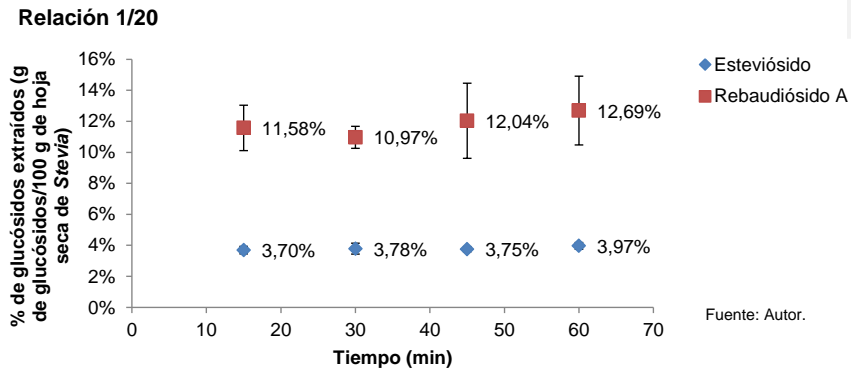


3.2. Planteamiento de una estrategia metodológica para la cuantificación de los glucósidos presentes en la hoja seca de *Stevia*.

Tal como se muestra en la metodología para cuantificación de los glucósidos presentes en la hoja seca de *Stevia*, se planteó una estrategia con base a una revisión bibliográfica de los principios de extracción sólido-líquido y la relación entre los distintos factores nombrados; relación hoja seca/agua, tipo de solvente, número de etapas y asistencia con ultrasonido.

En la Figura 5 se presenta la influencia del tiempo en la extracción de los glucósidos de *Stevia* en la primera etapa de extracción para la relación, g de hojas seca/ml de agua más diluida (1/100) y la más concentrada (1/20), de lo cual se observa que ambas alcanzan la máxima extracción a los 15 min. Para las relaciones intermedias: 1/40, 1/60 y 1/80, también se alcanzó el equilibrio de extracción a los 15 min. Estudios realizados por otros autores, estiman que el tiempo óptimo para la extracción de glucósidos empleando agua como solvente y asistido por ultrasonido se encuentra entre 10 min y 32 min [7, 28, 35]. La variación en el tiempo de extracción entre los estudios consultados se debe a diferentes factores, entre ellos, la diferencia del tamaño de partícula de la hoja seca de *Stevia* molida con que se trabajó; los autores consultados trabajaron con tamaños de 1 mm y 4 mm, mientras que en este trabajo se tiene un tamaño de partícula aproximado de 1,5 mm. Otro factor influyente es el tipo de cultivo usado, se observó que en los distintos estudios consultados se trabajó un cultivo de *Stevia Rebaudiana* de diferente origen, esto conlleva a que el contenido de glucósidos sea distinto y que la estructura de la hoja molida cambie, lo que genera variaciones en los tiempos de extracción [34, 36, 37]. A pesar de estas diferencias en el tiempo de extracción entre un estudio y otro, este tiempo para la extracción de glucósidos de *Stevia* asistida con ultrasonido no sobrepasaría los 32 min.

Figura 5. Extracción de glucósidos de hoja seca de *Stevia Rebaudiana* vs tiempo, en la primera etapa de extracción, a una relación 1/20 y 1/100 (g hoja seca/agua), temperatura ambiente, asistido con ultrasonido.

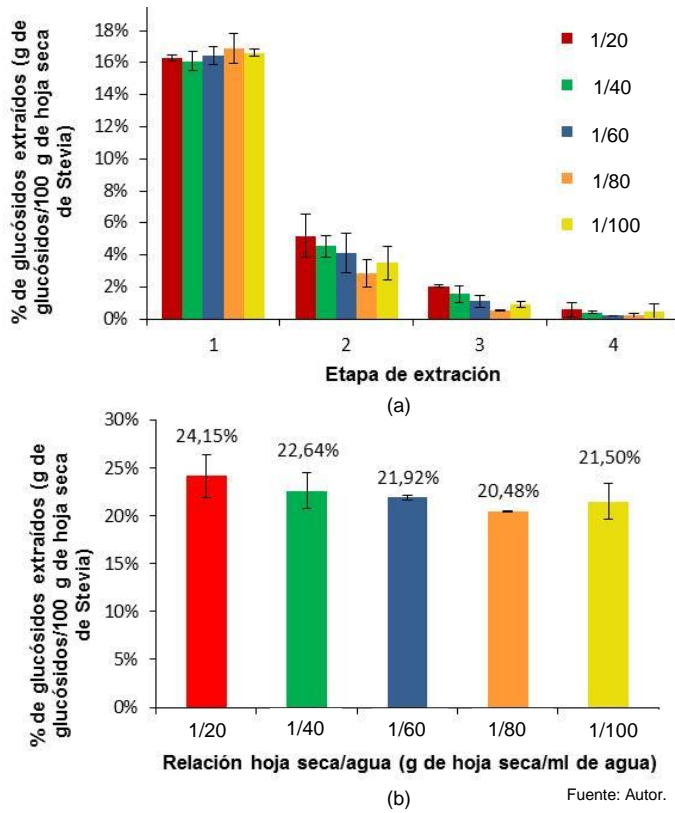


A partir de estos resultados se estimó un tiempo de 15 min para la extracción de glucósidos en agua, a temperatura ambiente y asistida con ultrasonido. Posteriormente, se procedió a determinar la relación entre la extracción de glucósidos, con las siguientes variables: relación hoja seca/agua (gr de hoja seca/ml de agua) y el número de etapas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6. En la Figura 6(a) se observa que de una etapa a la siguiente se disminuye el porcentaje de extracción de glucósidos, independientemente de la relación hoja seca/agua. De la etapa 1 a la 2 se redujo en promedio 4,3 veces la extracción de glucósidos, de la etapa 2 a la 3 se redujo en promedio 3,6 veces y por último de la etapa 3 a la 4 la reducción fue de 3,3 veces. Dichas reducciones

en la extracción de una etapa a otra es debido al empobrecimiento de los glucósidos en la hoja seca luego de cada etapa de extracción.

En la Figura 6 (b) se observa que entre las distintas relaciones de hoja seca/agua trabajadas se extrajeron entre un 20,48% y un 24,15% (gr de glucósidos/gr de hoja seca) de glucósidos, luego de realizar las cuatro etapas de extracción, con

Figura 6. Relación entre el porcentaje de extracción de glucósidos de hoja seca de *Stevia Rebaudiana*, a distintas relaciones de hoja seca/agua, temperatura ambiente, tiempo de 15 min y asistido con ultrasonido. En función de: (a) etapas de extracción, (b) Extracción total.



desviaciones tales que las diferencias en los valores de extracción no son relevantes entre ellos. Ahora bien, considerando el requerimiento de agua en la extracción, la relación 1/20 es la mejor por requerir menor cantidad de agua para la extracción.

En la Tabla 4 se muestra la relación entre el tipo de solvente y el porcentaje de extracción de glucósidos. Los solventes utilizados fueron: agua y una mezcla al 20% (v/v) de agua y etanol. Se observa que la extracción total de los glucósidos entre los dos tipos de solvente no cambia mucho, aunque se estimaba que al agregar un porcentaje de alcohol ayudaría en la extracción [20, 28]. Se considera que los factores como el tamaño de partícula y el tipo de cultivo utilizado influyeron en la obtención de estos resultados [36]. Por lo tanto, se considera trabajar con agua como solvente para la extracción de la *Stevia*.

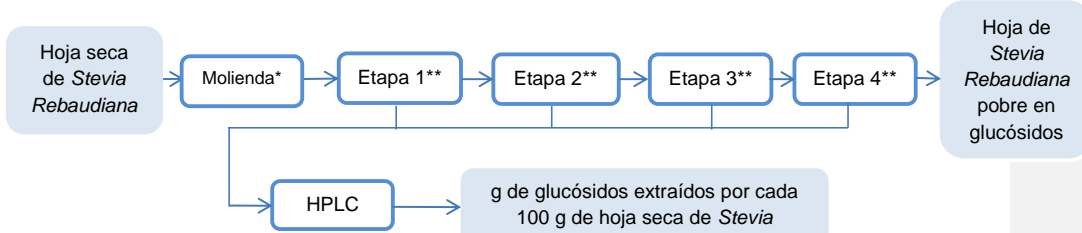
Tabla 4. Porcentaje de extracción de glucósidos de *Stevia* a temperatura ambiente, 15 min, relación 1/20 (g hoja seca/ ml de agua), asistido con ultrasonido con diferentes solvente.

Solvente		Agua		Agua-Etanol al 20% (v/v)	
		Esteviósido	Rebaudiósido A	Esteviósido	Rebaudiósido A
Etapa	1 ^{ra}	3,70% ± 0,24%*	11,58% ± 1,46%	4,42% ± 0,52%	11,88% ± 1,27%
	2 ^{da}	1,30% ± 0,33%	3,89% ± 1,02%	1,20% ± 0,20%	3,55% ± 0,14%
	3 ^{ra}	0,54% ± 0,03%	1,53% ± 0,06%	0,37% ± 0,10%	1,08% ± 0,20%
	4 ^{ta}	0,19% ± 0,10%	0,41% ± 0,52%	0,26% ± 0,03%	0,79% ± 0,1%
Total		5,73% ± 0,64%	17,49% ± 0,09%	6,25% ± 0,59%	17,29% ± 1,42%
Total Glucósidos		23,14% ± 0,66%		23,54% ± 0,83%	

*Desviación estándar %; (g de glucósido/ 100g de hoja seca de *Stevia*) Fuente: Autor.

En la Figura 7 se muestra el esquema de la metodología de extracción propuesta con el fin de lograr la cuantificación de la mayoría de los glucósidos presentes en la hoja seca de *Stevia Rebaudiana*. Cabe resaltar que esta propuesta es aplicada actualmente en el laboratorio de Bioprocesos de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (UNIDA).

Figura 7. Estrategia metodológica para la cuantificación de glucósidos de *Stevia*.



*Molino de cuchillas con malla de 1 mm. ** Condiciones: solvente agua, tiempo de 15 min, temperatura ambiente, asistido con ultrasonido, relación hoja seca/agua 1/20 (g de hoja seca/ml de agua) y cuantificación por HPLC.
Fuente: Autor.

3.3. Evaluación de la influencia de la temperatura y el tiempo sobre los rendimientos de extracción.

Las pruebas se realizaron por un tiempo de 45 min, donde los resultados no presentaron cambios en el tiempo de extracción luego de los 15 min, al igual que en la Fase 1. Este comportamiento se debió al tamaño de partícula utilizado 1500 μm y el tipo de *Stevia* empleado [34, 37], por lo tanto, se decide presentar en la Tabla 5 los resultados de la extracción de glucósido promedio, a las temperaturas y condiciones establecidas.

Tabla 5. Efecto de la temperatura en la extracción de glucósidos a una relación hoja seca/ agua de 1/20 (g de hoja seca/ ml de agua), agitación a 100 r.p.m. y agua como solvente.

Temperatura	Extracción de esteviósido (g de esteviósido/ g de hoja seca)	Extracción de rebaudiósido A (g de rebaudiósido A / g de hoja seca)	Extracción total de glucósidos (g de glucósidos / g de hoja seca)
30 °C	3,29% \pm 0,16%	12,15% \pm 0,17%	15,44% \pm 0,86%
40 °C	3,24% \pm 0,06%	11,98% \pm 0,22%	15,27% \pm 0,52%
50 °C	3,30% \pm 0,07%	12,16% \pm 0,19%	16,81% \pm 0,55%

Fuente: Autor.

En la Tabla 5 se observa que entre los 30 °C y 50 °C el incremento fue de 8,17%, lo que indica que en el rango evaluado, no se presenta un efecto importante de la temperatura durante la extracción, siendo el porcentaje de extracción de glucósidos de 15,44 g de glucósidos/100 g de hoja seca. En la literatura consultada se determina que la temperatura tiene un efecto significativo en la

extracción convencional para valores entre 75 °C y 100 °C [21, 28] . Se considera que algunas variables como el tiempo de extracción y el tamaño de partícula fueron más influyentes que la temperatura, en el rango trabajado; ya que para el tiempo se emplearon 15 min, siendo mayor que el utilizado en Jentzer *et al.* (2015) donde se empleó 7 min y el tamaño de partícula de 1,5 mm, fue pequeño a comparación de Alupului & Lavric (2009), quienes utilizaron un tamaño de 4 mm. Otros estudios realizados para la extracción convencional reportan tiempos entre 12 h y 24 h [20, 28], pero al contrario de este trabajo, no realizaron seguimiento de la extracción. Se estima que la mejor temperatura de extracción es 30 °C (temperatura ambiente), ya que no se requeriría un sistema de calentamiento, a un tiempo de 15 min.

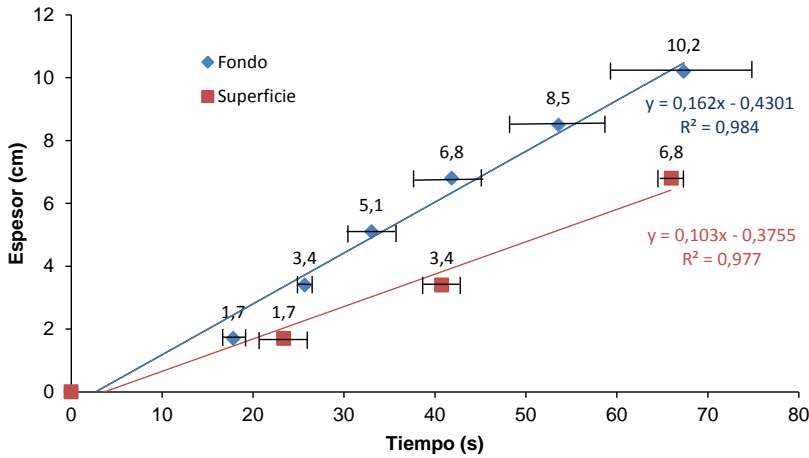
Teniendo en cuenta la ecuación (1) para determinar el rendimiento de la extracción y los resultados de la Fase 1 y 2, se determinó un rendimiento de extracción de 63,93% (g glucósidos extraídos en la hoja seca/ g de glucósidos totales en la hoja seca). Es importante indicar que Ortiz (2014) reporta un rendimiento del 80% ya que consideró para el contenido teórico solo lo extraído en una etapa de extracción asistida con ultrasonido, aspecto que disminuye el valor para los glucósidos totales; teniendo en cuenta el criterio utilizado por Ortiz (2014) el rendimiento para el presente trabajo sería de 93,26%. Esto muestra la mejora implementada en la metodología de cuantificación al considerar cuatro etapas asistidas con ultrasonido.

$$\% \eta = \frac{\text{Glucósidos extraídos}}{\text{Glucósidos totales cuantificados en la hoja seca}} \times 100 \quad (1)$$

3.4. Propuesta de un diseño conceptual para el escalamiento del proceso de extracción.

Para realizar el escalamiento del proceso de extracción de glucósidos en un tanque agitado, se realizó una prueba para determinar el tiempo que toma la separación de las fases del fondo y la superficie. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Figura 8. Prueba de velocidad de separación en el fondo y la superficie, luego de una agitación de 15 min a 100 rpm a una relación 1/20 g de hoja/ ml de agua.



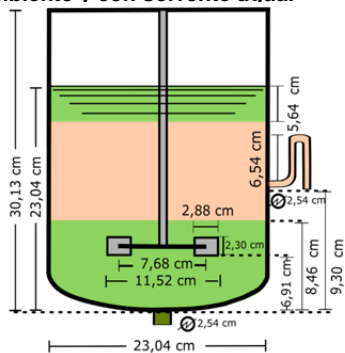
En la Figura 8 se presentan también las ecuaciones respectivas obtenidas por medio de regresión lineal de las dos series de puntos experimentales, en donde la pendiente representa la velocidad de separación en el fondo y la superficie, con valores de 0,17 cm/s y 0,12 cm/s, respectivamente; esto muestra la similitud entre los dos frentes de separación.

Se encontró que la *Stevia* suspendida en el agua se reparte entre los fondos y la superficie en una proporción en volumen de 3:2, después de 2 min de separación. Esta proporción es útil para determinar la altura que tendrán los sedimentos que se acomodan tanto en el fondo como la superficie del tanque de extracción. Por lo tanto, para un volumen de 0,015 m³, la *Stevia* ubicada en el fondo tendrán un volumen de 0,004 m³ y aquella ubicada en la superficie tendrá un volumen de 0,003 m³. El tiempo de operación (agitación + separación) sería de 17 min.

Teniendo en cuenta las proporciones para el diseño de un tanque de agitación, las dimensiones del montaje en el laboratorio de bioprocesos de la UNIDA, la prueba de velocidad de separación de fases, parámetros de similitud y consideraciones

realizadas, se obtuvieron las dimensiones del tanque de agitación mostradas en la Figura 9, donde también se indica la distribución de la altura de las fases en el tanque.

Figura 9. Dimensiones de tanque de agitación para la extracción de glucósidos de hoja seca de *Stevia*. Para una relación g de hoja/ ml de agua de 1/20, temperatura ambiente y con solvente agua.



Parámetros de similitud:

$$Re = 10885,12$$

$$Fr = 0,02$$

$$Np = 5,46$$

- Fase de *Stevia*
- Fase de solución rica en glucósidos

Fuente: Autor.

Los cálculos se basaron a partir de los números adimensionales mostrados en la Tabla 2. Se determinó que la agitación se encuentra en régimen turbulento, dado que el $Re > 10^4$ y también que el número de Freud puede despreciarse debido a que no hay efecto de vórtice a las revoluciones empleadas (evidenciado durante la experimentación).

Para este tipo de mezclas es necesario un agitador en el que predomine el flujo axial [25]. Con base a la literatura, el agitador que cumple con los requerimientos de flujo axial y agitación a bajas revoluciones, 100 rpm, es el agitador de turbina tipo Ruston. Las dimensiones de éste se muestran en la Figura 9. En cuanto a las r.p.m. de agitación, éstas se fijaron según condición establecida por el grupo de investigación teniendo en cuenta la actual escala y su implementación en la industria.

La potencia requerida por el agitador se determinó a partir de la relación del número de Potencia y el Reynolds [38], donde, para un agitador de turbina

Rushton y un Reynolds de 10885,2 el número de potencia tiene un valor aproximado de 5,46 (Figura 1, Bates, Fondy & Corpstein, 1963)), determinando que la potencia requerida por el agitador es de 0,5 W/m³.

En la Figura 9, se muestra la salida a una altura de 9,3 cm (Considerando un factor de 1,1 respecto la altura alcanzada por la fase del fondo de la *Stevia*), de manera que se genere efecto sifón que permita una recuperación rápida de extracto. Estos dos criterios se realizaron con el fin de evitar que el extracto de hoja húmeda de *Stevia* saliera junto con la solución rica en glucósidos. También se estimó una salida en la parte inferior de 2,54 cm del tanque agitador, para poder drenar parte de la solución retenida en el tanque. Con el objetivo de evitar la salida del sedimento en la fase de extracción y remover la biomasa retenida luego del proceso, se recomienda incluir una malla removible (mesh 18 – equivalente a 1 mm) dentro del tanque agitador para cada una de las salidas.

Con base a correlaciones presentadas por ASME(2015) se determinó un espesor de las paredes del tanque de 0,76 cm. En cuanto al material, se consideró como el más apropiado el acero inoxidable AISI 316 [39]; ya que se asegura la inocuidad del proceso, alta resistencia a la corrosión.

4. CONCLUSIONES

- Se planteó una metodología de extracción para cuantificar glucósidos presentes en la hoja de *Stevia*, mejorando el proceso utilizado por la UNIDA del ITV, encontrándose un contenido promedio de 23,14% p/p (g de glucósido extraído/100 g de hoja seca). La extracción para la cuantificación consiste en una molienda de la hoja seca hasta un tamaño de partícula promedio de 1,5 mm, realizar 4 etapas de extracción utilizando agua como solvente, a una relación hoja seca/agua de 1/20 (g de hoja seca/ml de agua), a temperatura ambiente y asistido con ultrasonido durante 15 min.
- Se evaluó experimentalmente la influencia de las variables temperatura y tiempo sobre los rendimientos de extracción de glucósidos presentes en la hoja de *Stevia*, alcanzándose un rendimiento de extracción de 63,93% (g glucósidos extraídos en la hoja seca/ g de glucósidos totales en la hoja seca). Las condiciones de extracción consiste en una molienda de la hoja seca hasta un tamaño de partícula promedio de 1,5 mm, a una relación hoja seca/agua 1/20 (g de hoja seca/ml de agua), a una temperatura de 30 °C, bajo agitación magnética durante 15 min.
- Se propuso un diseño conceptual para el escalamiento del proceso de extracción del laboratorio de Bioprocesos de la UNIDA del ITV, a través de un método basado en la similitud, para una solución de 0,015 m³ (con un factor de escala de 75), utilizando un agitador mecánico tipo Rushton de 0,11 m de diámetro, junto con un diámetro para el tanque de 0,23 m, con una altura de 0,30 m, que se opera a una potencia de 0,5 /m³, temperatura ambiente, solvente agua, relación planta agua 1/20 (g de hoja/ ml de agua), en un tiempo 17 min (considerando agitación y separación).

- Finalmente, se realizó con éxito la pasantía en el Instituto Tecnológico de Veracruz, México, donde por medio de las condiciones estudiadas se logró mejorar la eficiencia del proceso de extracción sólido-líquido de los glucósidos de *Stevia*, el cual es implementado en la actualidad por la UNIDA. Igualmente, el diseño propuesto está siendo considerado para su implementación en el marco de un proyecto de Maestría.

5. RECOMENDACIONES

- ✓ Estudiar la cinética de extracción a tiempos menores de 15 min, a las condiciones establecidas en este trabajo, con el objetivo de considerar tiempos menores de extracción.
- ✓ Realizar pruebas de extracción de glucósidos para tamaños de partícula más grande, con el objetivo de facilitar la posterior separación del extracto.
- ✓ Ajustar las condiciones de extracción considerando la agitación mecánica para el escalado.
- ✓ Evaluar la ultrafiltración como etapa de clarificación de los extractos obtenidos.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] I. T. VERACRUZ ADMINISTRACIÓN. U.N.I.D.A. [En línea]. Veracruz. 2010. [Recuperado en 12 junio 2017]. Disponible en: <http://www.itver.edu.mx/html/administracion/subacad/unida.html>.
- [2] INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ. Dra. beatriz torrestiana sánchez. [En línea]. Veracruz. 2017. [Recuperado en 12 junio 2017]. Disponible en: http://unida.itver.edu.mx/?page_id=45.
- [3] YILDIZ, Ece; TAG, Ozgur y YESIL, Ozlem. Subcritical water extraction of steviol glycosides from Stevia rebaudiana leaves and characterization of the raffinate phase. The Journal of Supercritical Fluids, 2014, vol. 95, p. 422-430.
- [4] PURI, Munish, *et al.* Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from Stevia rebaudiana leaves. Food Chemistry, 2012, vol. 132, no 3, p. 1113-1120.
- [5] KOVYLYAEVA, G., *et al.* Glycosides from Stevia rebaudiana. Chemistry of Natural Compounds, 2007, vol. 43, no 1, p. 81-85.
- [6] PURI, Munish; SHARMA, Deepika y BARROW, Colin J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. Trends in biotechnology, 2012, vol. 30, no 1, p. 37-44.
- [7] LIU, Jie; LI, Jin-wei y TANG, Jian. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from Stevia rebaudiana Bertoni and identification of extracts. Food and bioproducts processing, 2010, vol. 88, no 2, p. 215-221.
- [8] SALVADOR-REYES, Rebeca; SOTELO, Medali y PAUCAR, Luz. Estudio de la Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) como edulcorante natural y su uso en

- beneficio de la salud. Scientia Agropecuaria, 2014, vol. 5, no 3, p. 157-163.
- [9] MORINI, Thiago. la stevia conquista el mundo del dulce. [En línea]. [Recuperado en 12 junio 2017] Disponible en: http://economia.elpais.com/economia/2015/08/13/actualidad/1439464536_243785.html.
- [10] KUMAR, Sampath. Method for recovery of stevioside. U.S. Patent No 4,599,403, 8 Jul. 1986.
- [11] GIOVANETTO. R. Method for the recovery of steviosides from plant raw material. United States Patente 4892938, 1990.
- [12] PAYZANT J.; LAIDER J. y IPPOLITO R. Method of extracting selected sweet glycosides from Stevia Rebaudiana, United States Patente 5962678, 1999.
- [13] SHI, Rongfu, et al. Synthesis of bifunctional polymeric adsorbent and its application in purification of Stevia glycosides. Reactive and Functional Polymers, 2002, vol. 50, no 2, p. 107-116.
- [14] ROY, Anirban y DE, Sirshendu. Extraction of steviol glycosides using novel cellulose acetate phthalate (CAP)-Polyacrylonitrile blend membranes. Journal of Food Engineering, 2014, vol. 126, p. 7-16.
- [15] PERICHE, Angela, et al. Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in Stevia rebaudiana leaves. Food chemistry, 2015, vol. 172, p. 1-6.
- [16] ORTIZ, Levi. Extracción y purificación de glucósidos de Stevia (Stevia rebaudiana). Trabajo de grado para obtener el título en maestría en ciencias en ingeniería bioquímica, Veracruz: Instituto Tecnológico de Veracruz. UNIDA, 2014, 137 p.

- [17] ORTIZ, Levi. Extracción y purificación de glucósidos de Stevia (Stevia rebaudiana). Trabajo de grado para obtener el título en maestría en ciencias en ingeniería bioquímica, Veracruz: Instituto Tecnológico de Veracruz. UNIDA, 2014, 137 p.
- [18] ALUPULUI, Ani y LAVRIC, Vasile. Ultrasound extraction of active principles with hypoglycaemic activity from medicinal plants. Chem. Eng. Transact, 2008, vol. 14, p. 83-90.
- [19] ERKUCUK, A.; AKGUN, I. y YESIL-CELIK TAS, O. Supercritical CO₂ extraction of glycosides from Stevia rebaudiana leaves: Identification and optimization. The Journal of Supercritical Fluids, 2009, vol. 51, no 1, p. 29-35.
- [20] JAITAK, Vikas; BANDNA, Bikram Singh y KAUL, V. K. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from Stevia rebaudiana (Bertoni). Phytochemical Analysis, 2009, vol. 20, no 3, p. 240-245.
- [21] JENTZER, Jean-Baptiste, et al. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. Food chemistry, 2015, vol. 166, p. 561-567.
- [22] RUIZ A. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante. Trabajo de grado para obtener el título de Doctorado en Ingeniería, Medellín: Universidad Nacional de Colombia Vede Medellín, Facultad de minas, Escuela de procesos y energía, 2009, 175 p..
- [23] TREYBAL R. Mass-Transfer Operation, Singapore: McGraww-Hill, 1981, (McGraw-hill chemical engineering series). ISBN 0-07-066615-6
- [24] JIMÉNEZ, Martín Berzosa y CÓRDOBA, Manuel Enrique. Determinación de modelos para evaluar el consumo de potencia en tanques agitados para soluciones pseudoplásticas. Journal of Tropical Engineering, 2011, vol. 20, no

1-2.

- [25] RAMÍREZ, Agustín, *et al.* AGITACION Y MEZCLADO STIRRING AND MIXING. *Naturaleza y Tecnología*, 2012, vol. 4, no 1.
- [26] DE RIVAS, María Isabel Briceño y COBOS, S. Escalamiento del proceso de mezclado de emulsiones O/W concentradas. *Ciencia e Ingeniería*, 2004, vol. 25, no 3, p. 125-133.
- [27] MCCABE, Warren L. y SMITH, Julian C. Operaciones básicas de ingeniería química. México: McGraw - Hill, 2007. ISBN 0-07-284823-5
- [28] ALUPULUI, Ani y LAVRIC, Vasile. Extraction intensification using ultrasounds case study: Glycosides from Stevia rebaudiana Bert. *Revista de Chimie*, 2009, vol. 60, no 5, p. 497-500.
- [29] CHEMAT, Farid, *et al.* Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 2011, vol. 18, no 4, p. 813-835.
- [30] TEO, Chin Chye, *et al.* Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of Stevia rebaudiana Bertoni. *Journal of separation science*, 2009, vol. 32, no 4, p. 613-622.
- [31] CEKINSKI, Efraim. Agitação e mistura em processos industriais. [En línea]. São Paulo. 2013. [Recuperado en 12 mayo 2017]. Disponible en: http://www.abeq.org.br/2013/CursosABEQ/Curso/agitacao2013/1%20ABEQ12013_introdu%E7%E3oPB.pdf.
- [32] YAPICI, Kerim, *et al.* Numerical investigation of the effect of the Rushton type turbine design factors on agitated tank flow characteristics. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2008, vol. 47, no 8, p.

1340-1349.

- [33] MARTÍN I., SALCEDO R. Y FONT R. Mecánica de fluidos. [En línea]. California, 2011. [Recuperado en 12 junio 2017]. Disponible en: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/20299/11/tema5_operaciones%20separacion.pdf.
- [34] GILABERT, J. y ENCINAS, T. De la stevia al E-960: un dulce camino. En Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. Reduca (Recursos Educativos). Serie Congresos Alumnos. 2014. p. 305-311.
- [35] GASMALLA, Mohammed Abdalbasit A., et al. Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from Stevia (Stevia rebaudiana bertonii) leaves. Arabian Journal of Chemistry, 2017, vol. 10, no 5, p. 726-731.
- [36] KOLB, N., et al. Analysis of sweet diterpene glycosides from Stevia rebaudiana: improved HPLC method. Journal of agricultural and food chemistry, 2001, vol. 49, no 10, p. 4538-4541.
- [37] ESCLAPEZ, M. D., et al. Ultrasound-assisted extraction of natural products. Food Engineering Reviews, 2011, vol. 3, no 2, p. 108.
- [38] BATES, R. L.; FONDY, Ph L. y CORPSTEIN, R. R. Examination of some geometric parameters of impeller power. Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development, 1963, vol. 2, no 4, p. 310-314.
- [39] JULLIEN, C., et al. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. Journal of Food Engineering, 2003, vol. 56, no 1, p. 77-87.

ALUPULUI, Ani y LAVRIC, Vasile. Extraction intensification using ultrasounds case study: Glycosides from Stevia rebaudiana Bert. Revista de Chimie, 2009, vol. 60, no 5, p. 497-500.

ALUPULUI, Ani y LAVRIC, Vasile. Ultrasound extraction of active principles with hypoglycaemic activity from medicinal plants. Chem. Eng. Transact, 2008, vol. 14, p. 83-90.

ASME, Section VII Rules for construction of pressure vessel. 2015 ASME boiler & pressure vessel code. An international code. [En línea]. New York, 2015. [Recuperado en 12 junio 2017]. Disponible en: <http://www.daboosanat.com/images/pdf/Standard/ASME---00026---SEC-VIII-Div.3-2015.pdf>. [citado en mayo de 2017].

BATES, R. L.; FONDY, Ph L. y CORPSTEIN, R. R. Examination of some geometric parameters of impeller power. Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development, 1963, vol. 2, no 4, p. 310-314.

CEKINSKI, Efraim. Agitação e mistura em processos industriais. [En línea]. São Paulo. 2013. [Recuperado en 12 mayo 2017]. Disponible en: http://www.abeq.org.br/2013/CursosABEQ/Curso/agitacao2013/1%20ABEQ12013_introdu%E7%E3oPB.pdf.

CHEMAT, Farid, *et al.* Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. Ultrasonics sonochemistry, 2011, vol. 18, no 4, p. 813-835.

DE RIVAS, María Isabel Briceño y COBOS, S. Escalamiento del proceso de

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

mezclado de emulsiones O/W concentradas. Ciencia e Ingeniería, 2004, vol. 25, no 3, p. 125-133.

ERKUCUK, A.; AKGUN, I. y YESIL-CELIK TAS, O. Supercritical CO 2 extraction of glycosides from Stevia rebaudiana leaves: Identification and optimization. The Journal of Supercritical Fluids, 2009, vol. 51, no 1, p. 29-35.

ESCLAPEZ, M. D., et al. Ultrasound-assisted extraction of natural products. Food Engineering Reviews, 2011, vol. 3, no 2, p. 108.

GASMALLA, Mohammed Abdalbasit A., et al. Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from Stevia (Stevia rebaudiana bertonii) leaves. Arabian Journal of Chemistry, 2017, vol. 10, no 5, p. 726-731.

GILABERT, J. y ENCINAS, T. De la stevia al E-960: un dulce camino. En Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. Reduca (Recursos Educativos). Serie Congresos Alumnos. 2014. p. 305-311.

GIOVANETTO, R. Method for the recovery of steviosides from plant raw material. United States Patente 4892938, 1990.

GUPTA, Ena, et al. Nutritional and therapeutic values of Stevia rebaudiana: A review. Journal of Medicinal Plants Research, 2013, vol. 7, no 46, p. 3343-3353.

I. T. VERACRUZ ADMINISTRACIÓN. U.N.I.D.A. [En línea]. Veracruz. 2010. [Recuperado en 12 junio 2017]. Disponible en: <http://www.itver.edu.mx/html/administracion/subacad/unida.html>.

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ. Dra. beatriz torrestiana sánchez. [En línea]. Veracruz. 2017. [Recuperado en 12 junio 2017]. Disponible en: http://unida.itver.edu.mx/?page_id=45.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

JAITAK, Vikas; BANDNA, Bikram Singh y KAUL, V. K. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from Stevia rebaudiana (Bertoni). Phytochemical Analysis, 2009, vol. 20, no 3, p. 240-245.

JENTZER, Jean-Baptiste, et al. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. Food chemistry, 2015, vol. 166, p. 561-567.

JIMÉNEZ, Martín Berzosa y CÓRDOBA, Manuel Enrique. Determinación de modelos para evaluar el consumo de potencia en tanques agitados para soluciones pseudoplásticas. Journal of Tropical Engineering, 2011, vol. 20, no 1-2.

JULLIEN, C., et al. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. Journal of Food Engineering, 2003, vol. 56, no 1, p. 77-87.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

KOLB, N., et al. Analysis of sweet diterpene glycosides from Stevia rebaudiana: improved HPLC method. Journal of agricultural and food chemistry, 2001, vol. 49, no 10, p. 4538-4541.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

KOVYLYAEVA, G., et al. Glycosides from Stevia rebaudiana. Chemistry of Natural Compounds, 2007, vol. 43, no 1, p. 81-85.

KUMAR, Sampath. Method for recovery of stevioside. U.S. Patent No 4,599,403, 8 Jul. 1986.

LIU, Jie; LI, Jin-wei y TANG, Jian. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from Stevia rebaudiana Bertoni and identification of extracts. Food and bioproducts processing, 2010, vol. 88, no 2, p. 215-221.

MARTÍN I., SALCEDO R. Y FONT R. Mecánica de fluidos. [En línea]. California, 2011. [Recuperado en 12 junio 2017]. Disponible en:

https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/20299/11/tema5_operaciones%20separacion.pdf.

MCCABE, Warren L. y SMITH, Julian C. Operaciones básicas de ingeniería química. México: McGraw - Hill, 2007. ISBN 0-07-284823-5

MORINI, Thiago. la stevia conquista el mundo del dulce. [En línea]. [Recuperado en 12 junio 2017] Disponible en: http://economia.elpais.com/economia/2015/08/13/actualidad/1439464536_243785.html.

MOSS D. Pressure Vessel, Burlington: Elsevier, 2004. ISBN 0-07506-07740-6

ORTIZ, Levi. Extracción y purificación de glucósidos de Stevia (Stevia rebaudiana). Trabajo de grado para obtener el título en maestría en ciencias en ingeniería bioquímica, Veracruz: Instituto Tecnológico de Veracruz. UNIDA, 2014, 137 p.

PAYZANT J.; LAIDER J. y IPPOLITO R. Method of extracting selected sweet glycosides from Stevia Rebaudiana, United States Patente 5962678, 1999.

PERICHE, Angela, et al. Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in Stevia rebaudiana leaves. Food chemistry, 2015, vol. 172, p. 1-6.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

PURI, Munish, et al. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from Stevia rebaudiana leaves. Food Chemistry, 2012, vol. 132, no 3, p. 1113-1120.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

PURI, Munish; SHARMA, Deepika y BARROW, Colin J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. Trends in biotechnology, 2012, vol. 30, no 1, p. 37-44.

RAMÍREZ, Agustín, et al. AGITACION Y MEZCLADO STIRRING AND

MIXING. Naturaleza y Tecnología, 2012, vol. 4, no 1.

ROY, Anirban y DE, Sirshendu. Extraction of steviol glycosides using novel cellulose acetate phthalate (CAP)–Polyacrylonitrile blend membranes. Journal of Food Engineering, 2014, vol. 126, p. 7-16.

RUIZ A. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante. Trabajo de grado para obtener el título de Doctorado en Ingeniería, Medellín: Universidad Nacional de Colombia Vede Medellín, Facultad de minas, Escuela de procesos y energía, 2009, 175 p..

SALVADOR-REYES, Rebeca; SOTELO, Medali y PAUCAR, Luz. Estudio de la Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. Scientia Agropecuaria, 2014, vol. 5, no 3, p. 157-163.

SHI, Rongfu, *et al.* Synthesis of bifunctional polymeric adsorbent and its application in purification of Stevia glycosides. Reactive and Functional Polymers, 2002, vol. 50, no 2, p. 107-116.

TEO, Chin Chye, *et al.* Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of Stevia rebaudiana Bertoni. Journal of separation science, 2009, vol. 32, no 4, p. 613-622.

TREYBAL R. Mass-Transfer Operation, Singapore: McGraww-Hill, 1981, (McGraw-hill chemical engineering series). ISBN 0-07-066615-6

YAPICI, Kerim, *et al.* Numerical investigation of the effect of the Rushton type turbine design factors on agitated tank flow characteristics. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2008, vol. 47, no 8, p. 1340-1349.

YILDIZ, Ece; TAG, Ozgur y YESIL, Ozlem. Subcritical water extraction of steviol glycosides from Stevia rebaudiana leaves and characterization of the raffinate

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

[phase. The Journal of Supercritical Fluids, 2014, vol. 95, p. 422-430.](#)