



**CIIDIR**  
OAXACA

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo  
Integral Regional Unidad Oaxaca

---

---

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento  
de Recursos Naturales.

“Cuantificación del esteviósido y rebaudiósido A  
después del secado por aspersion de extracto  
acuoso de *Stevia rebaudiana*”

TESIS

Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

Irene Chaparro Hernández.

Directores de tesis:

Dr. Juan Rodríguez Ramírez.

Dr. Luis Gerardo Barriada Bernal.

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca

Diciembre 2017.



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca siendo las 11:00 horas del día 31 del mes de octubre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR OAXACA para examinar la tesis titulada:  
Cuantificación del esteviósido y rebaudiósido A después del secado por aspersión de extracto acuoso de Stevia rebaudiana

Presentada por el alumno:

Chaparro Hernández  
Apellido paterno Apellido materno  
Nombre(s) Irene

Con registro: 

B	1	5	0	5	0	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Juan Rodríguez Ramírez

Dr. Luis Gerardo Barriada Bernal

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

Dr. Sadoth Sandoval Torres

M. en C. Laura Victoria Aquino González

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.

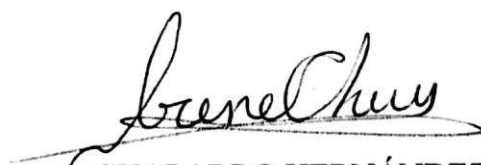


**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día 1 del mes de diciembre del año 2017, el (la) que suscribe Chaparro Hernández Irene alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES, con número de registro B150505, adscrito(a) al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca**, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) **Dres. Juan Rodríguez Ramírez y Luis Gerardo Barriada Bernal** y cede los derechos del trabajo titulado **“Cuantificación del esteviósido y rebaudiósido A después del secado por aspersión de extracto acuoso de Stevia rebaudiana”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [posgradoox@hotmail.com](mailto:posgradoox@hotmail.com) ó [irene.chaparroh@gmail.com](mailto:irene.chaparroh@gmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
**CHAPARRO HERNÁNDEZ IRENE**  
Nombre y firma del alumno(a)



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.**

# Cuantificación del esteviósido y rebaudiósido A después del secado por aspersión de extracto acuoso de *Stevia rebaudiana*

Por Irene Chaparro Hernández

## Resumen

La planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni debido a su poder edulcorante acalórico y sus propiedades antioxidantes ha generado mayor interés. La propiedad de edulcorante de la stevia proviene de sus moléculas llamadas glucósidos de esteviol (comúnmente llamados esteviósidos), entre ellos steviósido y el rebaudiósido A que se encuentran en mayor proporción principalmente en las hojas. El secado por aspersión es una tecnología utilizada en los extractos de plantas ya que ayuda a preservar los compuestos de interés presentes en estos. La conservación de los glucósidos de esteviol y poder antioxidante de stevia por medio del secado por aspersión de extracto acuoso de hojas frescas de stevia no ha sido estudiado. En este trabajo las condiciones de secado por aspersión fueron optimizadas en base al contenido de esteviósido y rebaudiósido A y el rendimiento en relación a los sólidos totales del extracto. Un diseño factorial  $2^2$  con tres puntos centrales y con bloques fue aplicado para analizar el efecto de las condiciones de secado en el contenido de glucósidos de esteviol (esteviósido y rebaudiósido A) y la capacidad antioxidante (contenido fenólico total, contenido de flavonoides, % inhibición). Hojas frescas procedentes de dos lotes diferentes (diferentes ubicación, fecha de cosecha, hora de corte) fueron utilizadas para realizar la experimentación por lo que el factor "Lotes" fue bloqueado en el análisis factorial. Los efectos de la temperatura del aire de entrada y del flujo de alimentación fueron evaluados sobre el contenido de glucósidos de esteviol, la capacidad antioxidante, el rendimiento y el contenido de humedad. El tratamiento de secado por aspersión en el que se obtuvo el mayor contenido de rebaudiósido A fue el de 200 °C de temperatura de aire de entrada y 2 kg/h de flujo de alimentación, el tratamiento de secado donde se obtuvo el mayor contenido de esteviósido fue en el de 160 °C y 2 kg/h de flujo de alimentación y conservó 90% de fenoles, 68% de flavonoides y 88% de Inhibición. La pérdida de esteviósido y rebaudiósido A durante el secado por aspersión se ve favorecida por la reacción de hidrólisis en las moléculas de glucósidos de esteviol.

Dirigida por

Dr. Juan Rodríguez Ramírez.

Dr. Luis Gerardo Barriada Bernal.

Stevioside and rebaudioside A quantification after spray drying of *Stevia rebaudiana* aqueous extract.

By Irene Chaparro Hernández.

**Abstract**

Interest in the *Stevia rebaudiana* Bertoni plant has currently grown due to its caloric sweetening power and antioxidant properties. The sweetening property of stevia comes from its molecules called steviol glycosides (commonly called steviosides), including stevioside and rebaudioside A, which are found mostly in leaves. Spray drying is a technology used in plant extracts as it helps to preserve the compounds of interest present in them. The conservation of steviol glycosides and the antioxidant power of stevia by the spray drying of aqueous extract of fresh stevia leaves has not been studied. In this work the spray drying conditions were optimized based on the content of stevioside and rebaudioside A and the yield related to the total solids of the extract. A factorial design 2<sup>2</sup> with three center points and 2 blocks was applied to analyze the effect of drying conditions on steviol glycosides (stevioside and rebaudioside A) and the antioxidant ability (total phenolic content, flavonoid content, % inhibition). Fresh leaves from two different lots (different location, harvest time, and harvest hour) were used to perform the experimentation, so the factor "Lots" was blocked in the factor analysis. The effects of inlet air temperature and feed flow were evaluated on steviol glycoside content, antioxidant capacity, yield and moisture content. In the spray drying treatment at 200 °C inlet air temperature and 2 kg/h feed flow rate, the highest rebaudioside A content was obtained, while the highest stevioside content was obtained at 160 °C and 2 kg/h feed flow rate, which retained 90% of phenols, 68% of flavonoids and 88% of Inhibition. The loss of stevioside and rebaudioside A during spray drying was favored by the hydrolysis reaction on steviol glycoside molecules.

Directed by

Dr. Juan Rodríguez Ramírez.

Dr. Luis Gerardo Barriada Bernal.

## **Agradecimientos**

A mis directores de tesis Dr. Juan Rodríguez Ramírez del CIIDIR-IPN Oaxaca y Dr. Luis Gerardo Barriada Bernal cátedras CONACyT por sus conocimientos compartidos, apoyo y consejos brindados.

A la Dra. Lilia Méndez Lagunas

A la M. en C. Laura Victoria Aquino González

A todas aquellas personas que de alguna manera han participado en la elaboración de esta tesis.

Al Instituto Politécnico Nacional por la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) otorgada durante los periodos: Enero-Julio 2016, Agosto-Junio 2017.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada en mis estudios de posgrado.

## ÍNDICE GENERAL

Lista de figuras.....	iv
Lista de cuadros.....	vi
Simbología.....	vii
I. Planteamiento de la investigación	
1.1. Introducción.....	1
1.2. Justificación.....	4
1.3. Antecedentes .....	6
1.3.1.Las condiciones de cultivo de la stevia y su efecto sobre el contenido de glucósidos de esteviol.....	6
1.3.2.Influencia de los métodos de secado en los glucósidos de esteviol. ....	6
1.3.3.Antioxidantes y compuestos volátiles. ....	7
1.3.4.Secado por aspersion de extracto de stevia .....	9
1.3.5.Secado por aspersion de extractos de plantas .....	10
1.4. Planteamiento del problema.....	11
1.5. Hipótesis.....	13
1.6. Objetivo general .....	13
1.6.1.Objetivos específicos .....	13
II. Marco teórico y conceptual	
2.1. Componentes de la stevia. ....	14
2.2 El enlace glucosídico.....	15
2.2.1.Hidrólisis .....	15

2.3. Propiedades del esteviósido y rebaudiósido A. ....	16
2.4. Extracción de glucósidos de esteviol.....	17
2.4. Capacidad antioxidante.....	18
2.5. Compuestos fenólicos .....	19
2.5.1.Flavonoides .....	21
2.6. Secado por aspersión.....	27
2.6.1.Etapas y elementos de un sistema de secado por aspersión .....	31
2.7. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	37
 III. Materiales y métodos	
3.1. Materia prima.....	39
3.2. Preparación del extracto acuoso. ....	39
3.3. Grados Brix .....	41
3.4. Determinación de pH.....	41
3.5. Sólidos totales .....	41
3.6. Secado por aspersión.....	42
3.7. Rendimiento .....	44
3.8. Contenido de humedad .....	44
3.9. Análisis HPLC.....	45
3.10. Determinación del contenido de fenoles totales .....	47
3.11. Determinación de la capacidad antioxidante .....	48
3.12. Determinación de flavonoides totales.....	49
3.13. Determinación de azúcares reductores .....	50
3.14. Diseño experimental.....	51



## IV. Resultados y discusión

4.1. Métodos de extracción con relación al contenido de glucósidos de esteviol en los extractos.....	52
4.2. Secado por aspersion.....	54
4.2.1.Rendimiento.....	54
4.2.2.Contenido de humedad.....	56
4.3. Glucósidos de esteviol.....	56
4.4. Antioxidantes.....	62
4.4.1.Contenido fenólico total. ....	62
4.4.2.Contenido de flavonoides totales.....	64
4.4.3.Capacidad antioxidante. ....	66

## V. Conclusiones

Conclusiones .....	69
Recomendaciones .....	70
Referencias bibliográficas .....	71
Anexos.....	78

## Lista de figuras

Figura 1. Contenido promedio de 4 glucósidos de esteviol.....	7
Figura 2. Contenido promedio de antioxidantes en diferentes condiciones de secado. ....	8
Figura 3. Núcleo molecular esteviol.....	14
Figura 4. Reacción del DPPH con un radical libre. ....	19
Figura 5. Estructura base de compuestos fenólicos. ....	20
Figura 6. Estructura base de algunos fenoles ácidos.(Drago Serrano, López López y Saínez Espuñez, 2016) .....	20
Figura 7. Estructura base de los flavonoides. ....	21
Figura 8. Reacción del ácido gálico con el molibdeno del reactivo de Folin-Ciocalteu (Oliveira, Valentim y Goulart, 2009). ....	24
Figura 9. Estructura básica de los flavonoides.....	25
Figura 10. Estructura molecular de una flavona.....	25
Figura 11. 3-hidroxiflavona, estructura base de los flavonoles. ....	26
Figura 12. Reacción de quelación del ión $Al_3^+$ con flavonoides .....	26
Figura 13. Diagrama de un secador por aspersion.(Hurtado y German, 2003) .....	29
Figura 14. Aspersor de disco rotatorio (Hurtado y German, 2003) .....	32
Figura 15. Tipos de arreglos gota-aire caliente.....	34
Figura 16. Curva de velocidad de secado.(Treyball, 1996).....	36
Figura 17. Principales cambios cualitativos en el secado de una gota asperjada (Grajales, 1996). ....	36
Figura 18. Hojas frescas de stevia.....	39
Figura 19. Metodología de la extracción acuosa.....	40
Figura 20. Secador por aspersion a escala piloto NIRO <sup>®</sup> , Mobile Minor. ....	42
Figura 21. Cromatógrafo HPLC Perkin-Elmer.....	45
Figura 22. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en el rendimiento de polvos. ....	55

Figura 23. Hidrólisis del esteviósido y del rebaudiósido A. ....	58
Figura 24. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en el contenido de esteviósido. ....	61
Figura 25. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en el contenido de rebaudiósido A. ....	61
Figura 26. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en el contenido de compuestos fenólicos.....	64
Figura 27. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en el contenido de flavonoides. ....	66
Figura 28. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en la capacidad antioxidante. ....	68

## Lista de cuadros

Cuadro 1. Propiedades del rebaudiósido A y del esteviósido (Kinghorn <i>et al.</i> , 2002). .....	17
Cuadro 2. Flavonoides identificados en hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> (Wölwer-Rieck, 2012).....	23
Cuadro 3. Especificaciones del secador por aspersion Niro-atomizer.....	43
Cuadro 4. Diseño factorial 2 <sup>2</sup> con tres puntos centrales. ....	51
Cuadro 5. Contenido promedio de esteviósido y rebaudiósido A en los extractos.	53
Cuadro 6. Comparativo del contenido de glucósidos de esteviol en los polvos de secado. ....	53
Cuadro 7. Rendimiento de los polvos de secado.....	54
Cuadro 8. Contenido de humedad base seca.....	56
Cuadro 9. Contenido promedio de esteviósido y rebaudiósido A en los polvos de las diferentes condiciones de secado.....	57
Cuadro 10. Contenido promedio de azúcares reductores en la stevia fresca y en los polvos de secado. ....	59
Cuadro 11. Comparación de los resultados obtenidos en microencapsulación y en extracto acuoso sin encapsular.....	60
Cuadro 12. Contenido fenólico total.....	63
Cuadro 13. Contenido de flavonoides.....	65
Cuadro 14. Datos del % de inhibición (%I). ....	67

## Simbología

FA	Flujo de alimentación (kg/h)
$T_{in}$	Temperatura del aire de entrada ( $^{\circ}$ C)
$T_{out}$	Temperatura del aire de salida ( $^{\circ}$ C)
P	Peso (g)
$S_T$	Sólidos totales (g/l)
$PV_1$	Peso del vaso vacío (g)
$PV_2$	Peso del vaso vacío + peso de los polvos (g)
$X_{bh}$	Contenido de humedad base húmeda ( $\frac{g_{agua}}{g_{materia\ húmeda}}$ )
$y$	Rendimiento de los polvos (%)
V	Volumen (ml)
$V_M$	Volumen alimentado de extracto de stevia (l)
$\%CH_{bs}$	Contenido de humedad base seca (%)
$P_{humedo}$	Peso inicial de la muestra (g)
$P_{seco}$	Peso de la muestra sin agua (g)
$\%I$	Porcentaje de inhibición (%)
A	Absorbancia del blanco (mAU)
$A_1$	Absorbancia de la muestra (mAU)
$C_m$	Concentración de la muestra (mg/ml)
$C_m$	Volumen de la solución usado para la extracción (ml)
$M_s$	Peso seco de las hojas (g hs)

## I. Planteamiento de la investigación.

### 1.1.Introducción

La stevia es una planta nativa del Paraguay (América del Sur), perteneciente a la familia de las Asteraceae. Es un arbusto herbáceo, presenta hojas ovales o lanceoladas, con una disposición opuesta en sus estados juveniles, y alternas cuando las plantas llegan a su madurez. Sus flores son pequeñas y blancas con su centro de color púrpura pálido.

El consumo de la stevia ha ido en aumento en los últimos años debido a sus propiedades como endulzante no calórico y sus compuestos bioactivos. Se ha informado en diversas investigaciones su actividad como antioxidante, hipotensor, anticonceptivo, en el tratamiento de alteraciones de la piel, en la prevención de caries y antibacterianas. Su dulzura deriva de los glucósidos de esteviol, los cuatro principales son: esteviósido (9.1%), rebaudiósido A, rebaudiósido C y dulcósido A (Singh y Rao 2005). Siendo el esteviósido y el rebaudiósido A los de mayor interés en la industria porque son hasta 300 veces más dulces que el azúcar y a los que se les atribuyen la mayoría de las propiedades bioactivas; por ello el presente trabajo se enfoca en su cuantificación.

Las hojas de la planta silvestre de stevia contienen 0.3% dulcósido, 0.6% rebaudiósido C, 3.8% rebaudiósido A y el 9.1% de esteviósido. La composición química completa de las especies de stevia aún no está disponible. De las 110 especies estudiadas por el sabor dulce solo 18 muestran esta característica. De todas las especies la *Stevia rebaudiana* Bertoni es la más dulce. De acuerdo a Sharma et al. (2006) las hojas frescas de stevia contienen una gran cantidad de agua (80 a 85%). Aparte de los componentes antes mencionados (glucósidos), las hojas contienen ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, cromo, cobalto, magnesio, hierro, potasio, fósforo, riboflavina, tiamina, estaño, zinc, etc. Entre los productos químicos

encontrados están la apigenina, austroinilina, avicularin,  $\beta$ -sitoesterol, ácido caféico, campesterol, cariofileno, centaureidin, ácido clorogénico, clorofila, kaempferol, luteolina, quercetina, estigmasterol, entre otras.

El secado por aspersión es una excelente tecnología para el secado de extractos de plantas ya que por los tiempos de secado que se manejan la exposición del material a altas temperaturas es muy corta y así se conservan sus propiedades, además de que nos proporciona un producto homogéneo de alta estabilidad y una larga vida de anaquel.

El secado por aspersión es un método para el secado de los extractos acuosos de plantas, es aplicado tanto a nivel laboratorio como a nivel industrial, pero es muy importante definir las condiciones adecuadas para llevarlo a cabo ya que podría generar una pérdida significativa de las propiedades del producto. El extracto de stevia sólo se ha secado por aspersión con agentes encapsulantes, algunos de los cuales como la maltodextrina e inulina le agregan calorías al producto final además de impacto en el índice glucémico, siendo que en su forma natural los glucósidos de esteviol no aportan calorías ni impactan el índice glucémico ya que dichos compuestos no son metabolizados por el organismo humano. De ahí la importancia de la presente investigación para evaluar las condiciones óptimas de secado con el fin de disminuir el impacto en la cantidad del esteviósido y el rebaudiósido A, llevando a cabo su cuantificación.

## 1.2. Justificación

El interés por la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni ha crecido en los últimos años debido a su contenido de glucósidos de esteviol que son hasta 300 veces más dulces que el azúcar y son utilizados como un edulcorante alternativo; que además poseen propiedades hipoglucemiantes, hipotensoras y pueden aumentar la producción de insulina de las células beta del páncreas y aumentar la tolerancia a la glucosa, siendo por lo tanto una opción adecuada para los diabéticos tipo II (Puri, Sharma y Tiwari, 2011; Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Por su contenido de compuestos fenólicos la stevia actúa también como un excelente antioxidante y anticancerígeno; asimismo se ha demostrado que posee propiedades antibacterianas, anticonceptivas y diuréticas (Kinghorn *et al.*, 2002).

El proceso de aislamiento de los glucósidos de esteviol presenta varios problemas como: i) tiempos de proceso extensos; ii) empleo de solventes con efectos en la salud (posteriormente retirados); y iii) bajos rendimientos. 3) Elaboración de mezclas de “edulcorantes con base en stevia”, en donde la mayor parte se compone de otro u otros edulcorantes y aditivos (principalmente sacarosa, sucralosa, maltodextrina) al que se le añade una porción de esteviósidos (normalmente entre el 0.5-1%). El estudio de procesos alternativos para la obtención de edulcorantes de stevia, como es el caso del secado por aspersion es importante ya que nos permite obtener un edulcorante soluble y con propiedades antioxidantes, para ello es importante determinar los factores que afecten el proceso.

El secado por aspersion es una tecnología utilizada para los extractos de plantas, ya que preserva los componentes naturales presentes en éstos, además de brindar otras ventajas como mejorar la estabilidad del producto, disminuir la actividad de agua y la actividad microbológica, minimizar los cambios físicos y químicos en el almacenamiento, es un proceso rápido y emplea temperaturas relativamente bajas. Otras ventajas del producto seco son la reducción de espacio para almacenamiento y la disminución de costos de empaque y transporte.



Sin embargo, existen factores en el secado por aspersión que afectan la calidad del producto final, por ello se requiere encontrar las condiciones de proceso, temperatura del aire de entrada, velocidad de atomización y flujo de alimentación que proporcionen las características deseadas en el producto final, así como también determinar las mejores condiciones para llevarlo a cabo en función de la respuesta del material, sin tener que invertir un gran recurso económico.

Para mantener la condición de natural en el producto, en el presente trabajo se optó por una extracción acuosa. En algunos procedimientos también se someten las hojas a pretratamiento para desgrasarlas pero esto implica aplicar solventes como cloroformo o hexano, con esto se eliminan también aceites esenciales, principios apolares y clorofila (Kinghorn *et al.*, 2002), pero también se contamina el producto con el solvente. Otra desventaja de utilizar solventes orgánicos en el proceso de extracción es que requieren procesos posteriores de separación aumentando con esto gastos de producción.

### **1.3. Antecedentes**

#### **1.3.1. Las condiciones de cultivo de la stevia y su efecto sobre el contenido de glucósidos de esteviol.**

La luz y la temperatura son dos factores que tienen un efecto importante sobre la síntesis de glucósidos; el crecimiento vegetativo, el área foliar, el peso seco de hojas y el rendimiento de glucósidos varían de acuerdo a la duración de la luz del sol y estos parámetros son mayores en días con largos periodos de luz solar al compararlos con días de cortos periodos de luz solar, principalmente, la concentración de esteviósidos, que aumenta en un 50% en las plantas cultivadas en lugares donde tienen más horas de luz solar (Kinghorn *et al.*, 2002). Los primeros trabajos en stevia llevados a cabo por Sumida en 1980, indican que el rango óptimo de temperaturas para el cultivo de esta planta es de 15-30 °C y puede soportar temperaturas críticas de 0-2 °C. El efecto de las temperaturas y la producción de los glucósidos en stevia sigue siendo un tema de discusión a nivel mundial. Los macronutrientes de la planta de stevia también tienen efecto sobre la concentración de los glucósidos totales; deficiencias de macronutrientes como potasio (K), Calcio (Ca) y azufre (S) pueden disminuir la concentración de glucósidos de esteviol (Jarma O., Combatt C. y Polo S., 2012).

La stevia presenta diversidad fenotípica y genotípica que se observa en plantas que crecen espontáneamente, así como en cultivos comerciales. Los resultados de algunos estudios muestran que existe una gran variabilidad para los contenidos de esteviósido y rebaudiósido A. lo que indica que ambas características son gobernadas por genes de herencia cuantitativa por lo que es de esperar influencias de factores ambientales sobre los mismos (época de cosecha, pos cosecha, temperatura, humedad, fotoperiodo) (Jiménez, Cabrera y Alvarez, 2010).

#### **1.3.2. Influencia de los métodos de secado en los glucósidos de esteviol.**

Los glucósidos de esteviol varían de acuerdo a los métodos de secado que se aplican en la hoja de stevia, en 2014 Periche, Castelló, Heredia y Esriche evaluaron en qué medida estos compuestos son afectados por los métodos de: liofilización, secado en

sombra y secado por aire caliente a 100 y 180°C; así como por los procedimientos de obtención de extractos de sus hojas (infusión, convencional, microondas y ultrasonido) (Periche *et al.*, 2015).

Con relación a la hoja fresca, el secado (liofilización, secado en sombra y secado por aire caliente) ocasiona una disminución en los principales glucósidos de esteviol. En la Figura 1 se observan los valores del contenido de esteviósido, dulcósido A, rebaudiósido A y rebaudiósido C; identificados y cuantificados en fresco, y en hojas secas de stevia aplicando los diferentes métodos de secado. Todos los valores están expresados en miligramos de compuestos por cada gramo de materia seca (Periche *et al.*, 2015).

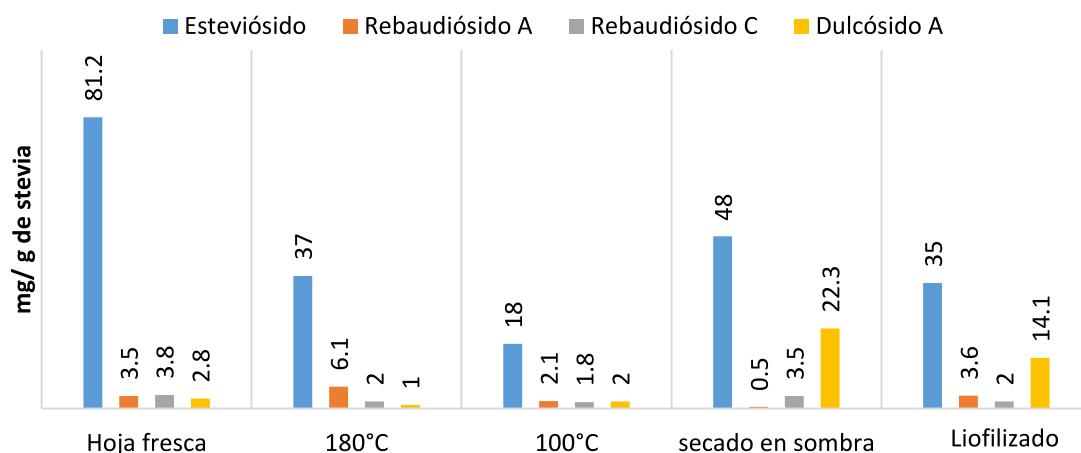


Figura 1. Contenido promedio de 4 glucósidos de esteviol.

### 1.3.3. Antioxidantes y compuestos volátiles.

Los antioxidantes son compuestos sensibles a los métodos de secado que se aplican sobre la hoja de la stevia. Periche, Castelló, Heredia y Esriche evaluaron en 2014 la aplicación de diferentes condiciones de secado (liofilización, secado en sombra y secado por aire caliente) y su efecto sobre los antioxidantes de las hojas de stevia. Comparado con el contenido en las hojas frescas, el secado ocasiona un aumento

importante en los compuestos antioxidantes (fenoles totales, flavonoides y antioxidantes totales), especialmente con aire caliente a 180°C, el secado en sombra origina un mayor desarrollo de compuestos volátiles (Periche *et al.*, 2015).

En la Figura 2 se muestran los datos obtenidos del total de fenoles (mg de ácido gálico equivalente/ g de stevia), flavonoides (mg de catequina equivalente/ g de stevia), y antioxidantes totales (mg de Trolox equivalente/ g de stevia), cuantificados en fresco y en hojas secas aplicando los diferentes métodos de secado (Periche *et al.*, 2015).

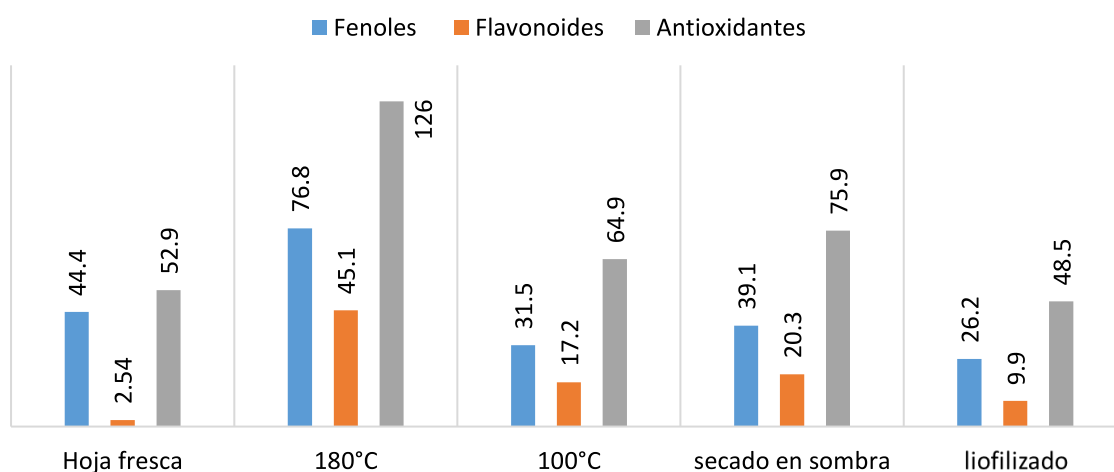


Figura 2. Contenido promedio de antioxidantes en diferentes condiciones de secado.

Las condiciones de secado producen un aumento importante en la capacidad antioxidante, pero una disminución significativa en el glucósido de esteviol principal (esteviósido) que disminuyó con todos los tratamientos, sobre todo con aire caliente a 100 °C. Para este compuesto, no hubo diferencias significativas entre los otros tratamientos, aunque el secado a la sombra produjo los valores más altos de este compuesto. El dulcósido A sólo aumentó con el secado a la sombra y con el tratamiento de liofilización.

El tratamiento en el que se obtuvo un mayor contenido de glucósidos de esteviol fue el de secado en sombra. El método de secado de aire caliente a 180 °C aumentó la concentración de todos los compuestos antioxidantes (fenoles totales, flavonoides y

antioxidantes totales) en comparación con las concentraciones en las hojas frescas de stevia. Por lo tanto, las condiciones de secado para hojas frescas de stevia se determinan en base a su uso, si se utilizan para endulzar o por sus propiedades antioxidantes. (Periche *et al.*, 2015).

#### 1.3.4. Secado por aspersion de extracto de stevia

Chranioti, Chanioti y Tzia (2015) llevaron a cabo el secado por aspersion de una solución de esteviósido y rebaudiósido A puros utilizando maltodextrina e inulina como agentes encapsulantes en un porcentaje fijo de 80:20 (p/p) y probando formulaciones con 1.5, 2.5 y 3.5% de sólidos en solución de esteviósido y rebaudiósido A con el objetivo de reducir el regusto amargo de los glucósidos de esteviol. Del producto obtenido se evaluó la higroscopicidad, solubilidad, contenido de fibra y eficiencia de la microencapsulación en base a contenido de rebaudiósido A. La evaluación sensorial se llevó a cabo de acuerdo con la literatura (Pangborn, 1963; Parpinello *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2013). El índice de rebaudiósido A en el producto final se midió aplicando la Ecuación (1). Se toma como referencia el rebaudiósido A ya que es el glucósido de esteviol que tiene el mayor poder edulcorante y no tiene regusto amargo.

%MEE : Eficiencia de la microencapsulación.

(1)

$$\%MEE = \frac{\text{rebaudiósido A encapsulado}}{\text{rebaudiósido A inicial}} \times 100$$

Para los productos encapsulados producidos con 1,5, 2,5 y 3,5% de glucósidos de esteviol en total de sólidos en solución, los valores de eficiencia de la microencapsulación fueron 62.36, 82.46 a 94.67%, los de la higroscopicidad 21,51, 26,67 y 24,25% y los valores de solubilidad 99,93, 97,50 a 96,03%, respectivamente. El producto encapsulado producido con 2,5% de glucósidos de esteviol en sólidos totales presentó las características sensoriales y de calidad más atractivas. Al aumentar el porcentaje de glucósidos de esteviol en sólidos totales en la disolución

se obtuvo un mayor rendimiento en la microencapsulación de los polvos de secado (Chranioti, Chanioti and Tzia, 2015).

### **1.3.5. Secado por aspersion de extractos de plantas**

El secado por aspersion es un método utilizado para llevar a cabo el secado de los extractos de diversas plantas a las que se les atribuyen propiedades medicinales, este método se ha aplicado invariablemente con el uso de agentes encapsulantes como coadyuvantes en el secado:

***Secado por aspersion de extracto acuoso de Bidens alba L. a escalas de laboratorio y banco (2008).*** Se utilizaron almidón y maltodextrina como agentes encapsulantes, con el objetivo de determinar el encapsulante que proporcionara mayor rendimiento. Conclusiones: se obtuvo el mayor rendimiento con el uso de una mezcla de 45 % de almidón soluble y 1 % de Aerosil 200 V permite obtener un polvo con 95 % de rendimiento (López Hernández, Torres Amaro y Chávez Figueredo, 2008).

***Influencia del uso de aditivos en el rendimiento del proceso de secado por aspersion de extracto acuoso de Calendula officinalis L (2006).*** Agentes encapsulantes: almidón y maltodextrina. Se realizaron diferentes corridas en un secador de spray de laboratorio, con distintas concentraciones de maltodextrina y almidón soluble. Se obtuvo el mayor rendimiento con 15 % de almidón soluble respecto a los sólidos totales del extracto. Se obtuvo un producto en forma de polvo mediante secado por aspersion con un rendimiento superior a 90 %, útil para ser utilizado como materia prima en la elaboración de medicamentos de origen natural (López Hernández, Muñoz Cernada y Torres Amaro, 2006).

***Estudio de secado por aspersion hasta escala de banco del extracto acuoso de Boerhaavia erecta L (2008).*** Agentes encapsulantes: almidón y maltodextrina. Se estudió la influencia del uso de diferentes aditivos sobre el rendimiento en el proceso

de secado por aspersión. Se logró obtener a escala de banco un extracto seco que cumple con los requisitos de calidad fisicoquímicos y microbiológicos, con un rendimiento superior a 90 % (López Hernández *et al.*, 2008).

***Estudio de secado por aspersión de extractos de Plectranthus amboinicus, Ocimum tenuiflorum, Passiflora incarnata, Matricaria recutita y Melissa officinalis (2010).*** Agentes encapsulante: maltodextrina, almidón soluble y celulosa microcristalina. A los polvos secos se les determinó: humedad, cenizas, conteo microbiológico, contenido de polifenoles en el extracto seco de *P. amboinicus* y contenido de flavonoides totales en base a apigenina y quercetina en los extractos de *P. incarnata*, *M. recutita* y *M. officinalis*. El contenido de humedad en todos los casos fue menor del 10 %, límite máximo establecido como parámetro de control de calidad en extractos secos. El contenido de polifenoles fue mayor de 3 %, límite establecido como parámetro de control de calidad del mismo, los valores de flavonoides obtenidos no presentaron diferencias entre las escalas analizadas. El secado por aspersión aplicado a extractos de plantas, requiera o no de coadyuvantes del secado, proporciona productos de calidad fisicoquímica y microbiológica adecuada con posibilidad de ser introducidos en la industria de productos fitoterapéuticos (López Hernández, Castillo Menéndez y Peña, García, 2010).

#### **1.4. Planteamiento del problema**

La *Stevia rebaudiana* Bertoni tiene un gran potencial edulcorante y otras propiedades bioactivas que le pueden otorgar diversidad de usos. Estudios mencionan sus propiedades antioxidantes, anticaries, antihipertensivas y coadyuvantes en los procesos de cicatrización (Madan *et al.*, 2010).

El potencial edulcorante de esta planta se debe a sus componentes naturales activos presentes en las hojas que son los glucósidos de esteviol que hasta el presente año se han identificado 40 glucósidos de esteviol que se encuentran en diferentes proporciones (Purkayastha *et al.*, 2016).

Para poder aprovechar todo su potencial se requiere que el producto sea estable, de fácil transporte, de una larga vida de anaquel y que conserve el mayor porcentaje de edulcorantes y compuestos bioactivos; todas estas características las proporciona el secado por aspersion pero para lograrlas es indispensable, establecer las condiciones de secado (temperatura del aire de secado, velocidad de atomización, flujo de alimentación) con las que se obtengan los mejores rendimientos del producto.

El trabajo de secado por aspersion de stevia que se ha realizado hasta ahora se ha llevado a cabo utilizando agentes acarreadores o materiales puros (inulina, maltodextrina) esto con el fin de disminuir el regusto amargo del producto final y utilizando solo el esteviósido y el rebaudiósido A como materia prima, como consecuencia de esto se alteran las propiedades de la planta, aumenta las calorías del edulcorante e impactan el índice glucémico por su contenido de azúcares, otra desventaja también es el desperdicio de las propiedades bioactivas que proporcionan otros componentes de la stevia como los fenoles que proporcionan capacidad antioxidante.

Actualmente muchos de los productos de la industria de alimentos únicamente utilizan el rebaudiósido A como edulcorante ya que a diferencia del esteviósido no deja resabio amargo, sin embargo el esteviósido además de propiedad edulcorante posee propiedades como anticaries, antisépticas, antitumorales, antihipertensivas (Durán A, Rodríguez N. y Cordon A., 2012).

Los edulcorantes que se encuentran a la venta en presentación de cristales están combinados con acarreadores y/u otros edulcorantes sintéticos, y las presentaciones de edulcorantes de hojas naturales no son homogéneos, no tienen un control de calidad del producto y no certifican un manejo higiénico de la materia prima.

Las características de calidad de un producto tales como contenido de humedad (mayor vida de anaquel, estabilidad), tamaño de partícula (homogéneo), color, rendimiento, conservación de los compuestos de interés dependen de las características tanto del fluido de alimentación (contenido de sólidos) como de las condiciones de secado: tipo



de atomizador, temperatura del aire de secado, temperatura de salida, una correcta elección y aplicación de estos parámetros nos asegura una mejor calidad del producto seco.

### **1.5. Hipótesis**

La temperatura del aire de entrada y el flujo de alimentación en el secado por aspersion de extracto de hojas frescas de stevia reduce la concentración de esteviósido y rebaudiósido A en los polvos deshidratados debido a que las reacciones de hidrólisis en los glucósidos de esteviol son favorecidas por la temperatura y la disponibilidad del agua.

Las moléculas antioxidantes del extracto acuoso de stevia disminuyen durante el secado por aspersion porque son moléculas sensibles a la temperatura.

### **1.6. Objetivo general**

Estudiar el efecto de las condiciones de secado por aspersion de extractos acuosos de stevia en el contenido de glucósidos y antioxidantes.

#### **1.6.1. Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de la temperatura del aire de entrada en: i) el contenido de esteviósido y rebaudiósido A, ii) la capacidad antioxidante (contenido de fenoles, flavonoides, % de inhibición), iii) el contenido de humedad, iv) el rendimiento
2. Evaluar el efecto del flujo de alimentación en: i) el contenido de esteviósido y rebaudiósido A, ii) la capacidad antioxidante (contenido de fenoles, flavonoides y el % de inhibición), iii) el contenido de humedad, iv) el rendimiento
3. Determinar las condiciones de secado por aspersion en base al máximo contenido de esteviósido y rebaudiósido A.

## II. Marco teórico y conceptual.

### 2.1. Componentes de la stevia.

Las hojas de la stevia contienen varios compuestos glucósidos que son los que otorgan el sabor dulce. El género stevia incluye más de 200 especies, sin embargo, solo dos de ellas contienen glucósidos de esteviol, siendo la *Stevia rebaudiana* Bertoni la variedad que contiene los compuestos más dulces. Los glucósidos son moléculas compuestas por un glúcido (generalmente monosacáridos) y un compuesto no glucídico (Kinghorn *et al.*, 2002).

Muchas plantas almacenan los productos químicos importantes en forma de glucósidos inactivos; si estos productos químicos son necesarios, se hidrolizan en presencia de agua y una enzima, generando azúcares importantes en el metabolismo de la planta. Muchos glucósidos de origen vegetal se utilizan como medicamentos. El glúcido se enlaza a través de su carbono anomérico (puede ser alfa o beta) a otro compuesto de diferente naturaleza química (Brahmkshatriya y Brahmkshatriya 2013). La única diferencia entre varios glucósidos de esteviol es la cantidad y la disposición de las moléculas de glucosa adheridas al núcleo de esteviol. En base seca, los cuatro principales glucósidos son el dulcósido A, el rebaudiósido C, el rebaudiósido A y el esteviósido (en general a 0,3%, 0,6%, 3,8% y 9,1%, respectivamente). Otros glucósidos menos importantes incluyen el rebaudiósido B, D, E y F, el esteviolbíosido y el rubosósido (Kinghorn *et al.*, 2002). Todos los glucósidos de esteviol comparten el mismo núcleo molecular: el esteviol (Figura 3)

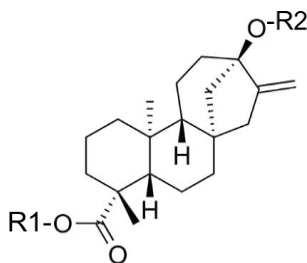


Figura 3. Núcleo molecular esteviol

## **2.2 El enlace glucosídico.**

Compuestos con grupos OH, NH<sub>2</sub> y SH pueden reaccionar con el OH hemiacetalico del carbono anomérico, de un monosacárido con pérdida de una molécula de agua para formar un enlace glucosídico. Según la naturaleza del grupo reaccionante se diferencian O-glucósidos (a partir de un OH), N-glucósidos (a partir de NH<sub>2</sub>) y S-glucósidos (a partir de SH). En los glucósidos de esteviol la aglicona (compuesto no glucídico) es el esteviol al que se unen diferentes unidades de monosacáridos (glucosa, ramnosa, xilosa) en R1 y R2 (Figura 3) (Kinghorn *et al.*, 2002).

La formación del enlace glucosídico aumenta la solubilidad de la aglicona y el carbono anomérico pierde su carácter reductor. El enlace glucosídico es susceptible a la hidrólisis ácida y a la acción de enzimas llamadas glicosidasas (Bemiller, 1967).

### **2.2.1. Hidrólisis**

La hidrólisis es una reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar parte de otra especie química, estas reacciones se ven favorecidas en medio ácido y temperaturas de 100 °C o menores (Bemiller, 1967).

Muchos factores parecen influir en la reacción de hidrólisis de los glucósidos, incluidos el tamaño del anillo, la configuración, la conformación y la polaridad del azúcar y el tamaño y la polaridad de la aglicona. Algunos autores han explicado las diferencias en las tasas de hidrólisis sobre la base de los efectos electrónicos, y otros sobre la base de efectos estéricos. La hidrólisis catalizada por ácido de los glucósidos está influenciada por varios factores, algunos de los cuales son más importantes en algunos glucósidos, otros en otros glucósidos. Por lo tanto, a menudo es imposible señalar un factor que explique las diferencias en las tasas de hidrólisis entre dos glucósidos, y en algunos casos aún no es posible dar ninguna explicación para el comportamiento de un par o pares de glucósidos (Bemiller, 1967).

### 2.3. Propiedades del esteviósido y rebaudiósido A.

Los glucósidos de esteviol se producen en las hojas de Stevia de donde se extraen para después aislarlos y purificarlos sin realizar modificaciones químicas (FDA, 2010).

**Contenido calórico:** Los glucósidos de esteviol no se metabolizan ni se acumulan en el cuerpo por lo que su aporte calórico es nulo (FDA, 2010).

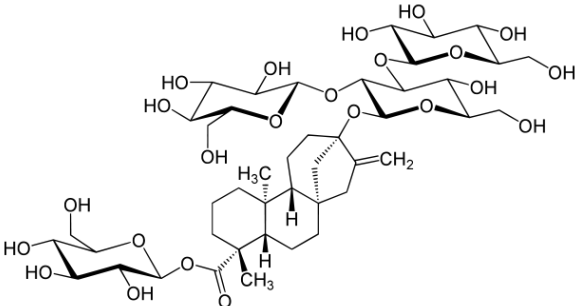
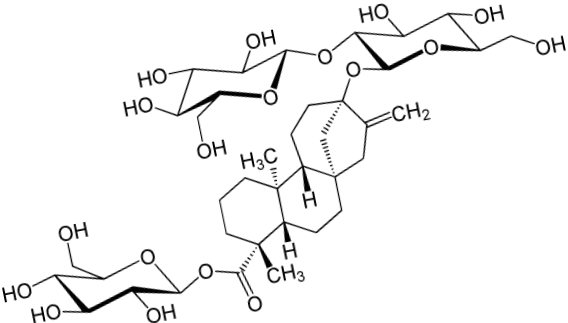
**Dulzor:** El rebaudiósido A es 250 a 450 veces más intenso en dulzor que la sacarosa, mientras que el esteviósido es unas 300 veces más intenso (Kingham *et al.*, 2002).

**Solubilidad:** El esteviósido es menos soluble en agua que el rebaudiósido A, 1 gramo de esteviósido se disuelve en 800 ml de agua, mientras que 1 gramo de rebaudiósido A se disuelve en 80 ml de agua (Kingham *et al.*, 2002). Son altamente solubles en metanol (Abou-Arab, Abou-Arab y Abu-Salem, 2010), el esteviósido es altamente soluble en etanol (Kingham *et al.*, 2002).

**Estabilidad:** A 120°C el esteviósido es estable por una hora, sin embargo sobre 140°C se observó su descomposición (Kroyer, 1999), es estable en medio ácido, no fermenta, lo cual representa una ventaja adicional para su uso en jarabes y bebidas, se recomienda su uso en caramelos y gomas de mascar para reemplazar el azúcar (Galperin de Levy, 1982). El rebaudiósido A es estable en distintas matrices alimentarias durante varias semanas de almacenamiento. En el caso de las bebidas carbonatadas el rebaudiósido A es estable en los rangos de pH de 4 a 6 y a temperaturas de 5°C a 25°C, hasta por 26 semanas (Cargill., 2008).

En el Cuadro 1 se especifican algunas de las características más importantes del esteviósido y rebaudiósido A.

Cuadro 1. Propiedades del rebaudiósido A y del esteviósido (Kinghorn *et al.*, 2002).

Rebaudiósido A	Esteviósido
	
(Yikrazuul, sin fecha)	(Yikrazuul, sin fecha)
Fórmula molecular: C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>23</sub>	Fórmula molecular: C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub>
Apariencia: Polvo blanco	Apariencia: Polvo blanco
Densidad: 3.71 g/cm <sup>3</sup>	Densidad: No hay datos.
Masa molar: 967.01 g/mol	Masa molar: 804.8 g/mol
Ph: 3-9	Ph: 3-9
Punto de fusión: 242 - 244 °C	Punto de fusión: 196-198 °C

## 2.4. Extracción de glucósidos de esteviol.

Los métodos reportados para la extracción de los glucósidos de esteviol son diversos, utilizan diferentes extracciones como: con fluidos supercríticos o con enzimas, con diversos solventes como etanol, agua, éter, metanol incluso hexano; aplicando diferentes temperaturas y periodos de tiempo. Para elegir un solvente de extracción es necesario considerar: selectividad, facilidad de manipulación, precio, seguridad, riesgo de posible contaminación ambiental y grado de toxicidad. En algunas plantas se usan alcoholes como el metanol, el cual posteriormente es removido del producto final. Se

presume que el uso de tal compuesto aumenta la eficacia de la extracción y la separación de los esteviósidos. Sin embargo el uso de ésta en la operación, parece ser la razón por la cual la FDA (Food and Drug Administration) no califica a los extractos de stevia como productos naturales y seguros (Macia y Monesterolo, 2008). La extracción acuosa es un método con buena eficiencia, amigable con el ambiente, no interacciona con ninguno de los componentes de la hoja, es económicamente factible y tanto el esteviósido como el rebaudiósido A son solubles en agua.

El tamaño de partícula es otra variable importante en el proceso de extracción, la extracción en materia entera o dividida en fragmentos gruesos podría ser incompleta o muy lenta debido a la pobre penetración del solvente en el tejido vegetal; una división excesiva de las hojas también causa problemas puede generar que las partículas se apelmacen dificultando la extracción (Bruneton, 2001).

#### **2.4. Capacidad antioxidante.**

Los antioxidantes están ampliamente presentes en las frutas y las plantas, y pertenecen a varias clases de compuestos químicos. Existen cuatro fuentes generales de antioxidantes: enzimas como superóxido dismutasa y catalasa; moléculas grandes como la albúmina y la ferritina; moléculas pequeñas como ácido ascórbico, glutatión, ácido úrico, tocoferoles, carotenoides, (poli) fenoles y otros (Wölwer-Rieck, 2012).

Para evaluar la capacidad de atrapar radicales libres de los productos naturales, existen muchas pruebas disponibles que difieren en los principios de medición, reactivos y mecánica de reacción (Wölwer-Rieck, 2012). El método de captura del radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil), el cual determina actividades de captura de los radicales libres, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso (Jiménez Monreal, Sánchez Manzanera y Martínez Tomé, 2012). El método de captura del radical DPPH ha sido modificado por numerosos autores como la concentración de DPPH (0,1 mM, 0,2 mM, 600 mM), tiempo de incubación o ataque (30 min, 60 min, 500 min o incluso sin tiempo definido, hasta llegar

a saturación), relación DPPH/muestra (8/1, 5/1, 39/1), etc. (Jiménez Monreal, Sánchez Manzanera y Martínez Tomé, 2012).

La reducción del DPPH se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia la desaparición del DPPH proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. En la Figura 4 se ejemplifica cómo el DPPH atrapa un radical libre.

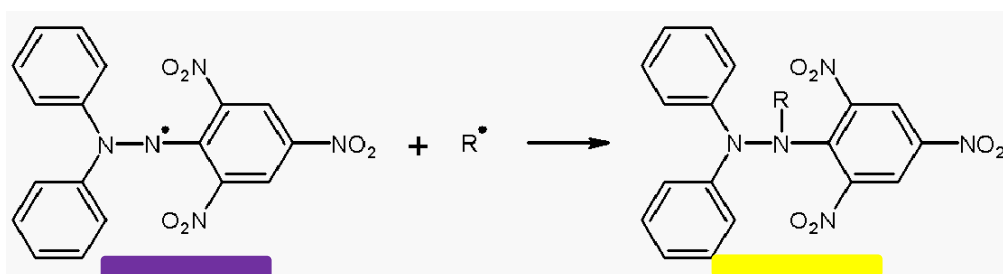


Figura 4. Reacción del DPPH con un radical libre.

Un antioxidante actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultados radicales con estructuras moleculares estables, que detendrán la reacción en cadena, como es el caso de los fenoles. Cuando esta reacción ocurre, la concentración del DPPH disminuye mientras aparece la forma reducida DPPH-R\* provocando un cambio en el color de morado a amarillo y la absorbancia de la solución decrece.

## 2.5. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8.000 compuestos distintos. Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxidos (Figura 5) (Gutiérrez Avella, Ortiz García y Mendoza Cisneros, 2008).

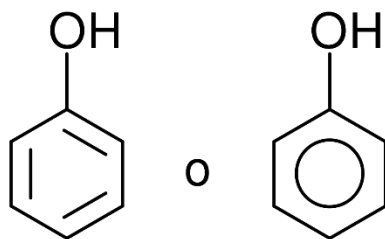


Figura 5. Estructura base de compuestos fenólicos.

Los polifenoles son moléculas con actividad antioxidante que incluye a los fenoles ácidos y flavonoides. En términos generales, los fenoles ácidos se caracterizan por tener un anillo aromático central como en el caso del ácido cinámico y otros derivados (Figura 6) (Drago Serrano, López López y Saínez Espuñez, 2016), mientras que los flavonoides tienen dos anillos fenólicos unidos por un anillo heterocíclico.

Los fenoles ácidos como los ácidos: cumárico, caféico y ferúlico, inhiben la actividad de agentes mütagenos, estimulan la actividad de la enzima fenolsulfotransferasa implicada en la destoxificación de compuestos metabólicos potencialmente tóxicos y poseen actividad bactericida. La actividad antioxidante de los polifenoles se ha relacionado con su capacidad para prevenir falla cardiaca, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular y neoplasias.(Drago Serrano, López López y Saínez Espuñez, 2016)

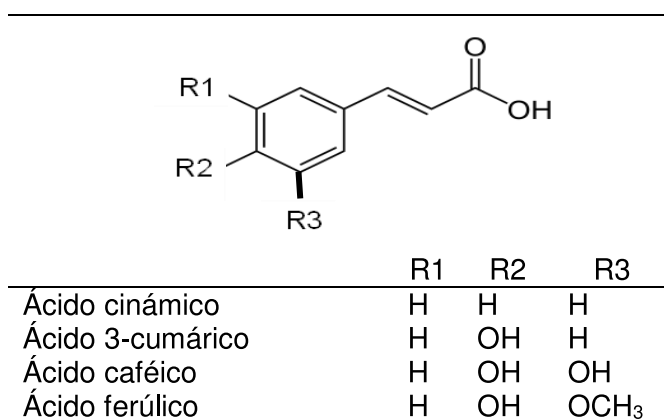


Figura 6. Estructura base de algunos fenoles ácidos.(Drago Serrano, López López y Saínez Espuñez, 2016)



### 2.5.1. Flavonoides

Los flavonoides constituyen una amplia familia de compuestos que a su vez incluye varios grupos entre los que, tienen especial interés: antocianos, flavanos, flavonoles, flavonas, flavanonas, calconas e isoflavonoides. Estructuralmente, los flavonoides se caracterizan por poseer una estructura como la que se muestra en la Figura 7 (Gonzalo Rivas y García Alonso 2002).

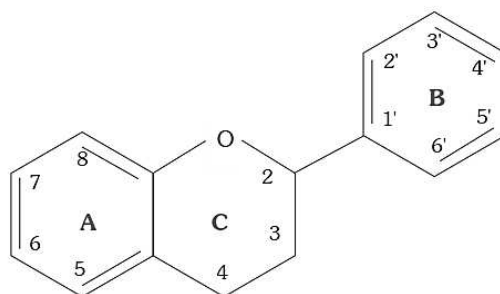


Figura 7. Estructura base de los flavonoides.

Estos grupos se diferencian entre sí por el grado de insaturación y sustituyentes del anillo C (Figura 7). Se pueden distinguir entre compuestos que poseen un radical cetónico en el heterociclo: flavonas, flavonoles, flavanonas (dihidroflavonas) y calconas, y los que no lo poseen: flavanoles y antocianidinas. La existencia de un hidroxilo en posición 3 es otra característica común a antocianidinas, flavanoles y flavonoles. Dentro de cada uno de estos grupos los compuestos se diferencian entre sí por los sustituyentes en el anillo B y por los sustituyentes en los diferentes hidroxilos de la molécula (metilos, azúcares y/o ácidos orgánicos, más habitualmente) (Gonzalo Rivas y García Alonso 2002).

Los flavonoides identificados en las hojas de Stevia pertenecen a los subgrupos de **flavonoles** y **flavonas**. Cuantitativamente, se analizan como contenido total de flavonoides utilizando el método colorimétrico de cloruro de aluminio, en el Cuadro 2 se enlistan los flavonoides que se han identificado en las hojas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) (Wölwer-Rieck, 2012).

### **Flavonoles y flavonas.**

Habitualmente se encuentran en los tejidos vegetales principalmente bajo la forma de heterósidos (glucósidos, galactósidos, ramnósidos, rutinósidos o glucuronósidos). Las flavonas se encuentran en muchas plantas herbáceas. El perejil y otras hierbas aromáticas, como el romero y el tomillo, contienen apigenina, que junto a la luteolina, presente en cereales, son las flavonas más comunes. Los glicósidos de flavonas están presentes en verduras y hortalizas. Participan en cierta medida en las características sensoriales de los vegetales. Así, en altas concentraciones o formando complejos con metales pueden contribuir a la coloración de plantas; algunas flavonas no glicosídicas y altamente metoxiladas (nobiletina, sinensetina y tangeretina) son responsables del sabor amargo de algunos cítricos. Por el contrario, algunas flavonas glicosiladas (neodiosmina y roifolina) reducen el amargor de compuestos como limonina, naringina, cafeína o quinina (Gonzalo Rivas y García Alonso 2002).

Los flavonoles se encuentran repartidos abundantemente en todos los alimentos de origen vegetal, y las pieles u hollejos de las frutas son particularmente ricas en estos compuestos. Los más conocidos son la quercetina, kaempherol y miricetina, y se presentan generalmente en forma de glicósidos. Al igual que las flavonas en altas concentraciones proporcionan un ligero color amarillo a los tejidos vegetales. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en plantas superiores, aunque los flavonoles son predominantes en las frutas. Es destacable el contenido de derivados de quercetina en cebollas, teniendo en cuenta que sólo se han encontrado trazas de flavonoles en las partes subterráneas de las plantas (Gonzalo Rivas y García Alonso 2002).

Cuadro 2. Flavonoides identificados en hojas de *Stevia rebaudiana* (Wölwer-Rieck, 2012)

The diagram shows the general structure of a flavonoid. It consists of a chromone core (a benzopyrone ring system) with a phenyl ring attached at the 3-position. The chromone ring has a hydroxyl group at position 5 and a carbonyl group at position 4. The phenyl ring has substituents R1, R2, and R3. The chromone ring has substituents R4 and R5. The positions 3, 4', 5, and 7 are labeled on the chromone ring, and R1, R2, R3, R4, and R5 are labeled on the phenyl ring.

Nombre	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
<i>Flavonoles</i>					
Quercetina	OH	OH	H	OH	OH
Quercetina-3- <i>O</i> -β-D-arabinósido	OH	OH	H	<i>O</i> - arabinósido	OH
Quercetina-3- <i>O</i> -β-D-ramnósido	OH	OH	H	<i>O</i> -ramnósida	OH
Quercetina-3- <i>O</i> -glucósida	OH	OH	H	<i>O</i> - glucósida	OH
Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósida	OH	OH	H	<i>O</i> -rutinósida	OH
Quercetina-3- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -trans-cafeico)-α-L-ramno-piranosil-(1-6)—D-galactopiranosida	OH	OH	H	(4- <i>O</i> -trans-cafeico)-α-L-ramno-piranosil-(1-6)—D-galactopiranosida	OH
kaempferol-3- <i>O</i> -ramnósida	H	OH	H	<i>O</i> -ramnósida	OH
<i>Flavones</i>					
Apigenina	H	OH	H	H	OH
Apigenina-4'- <i>O</i> -β-D-glicósida	H	<i>O</i> -glicósida	H	H	OH
Apigenina-7- <i>O</i> -β-D-glicósida	H	OH	H	H	<i>O</i> -glicósida
Luteolina	OH	OH	H	H	OH
Luteolina-7- <i>O</i> -β-D-glicósida	OH	OH	H	OH	<i>O</i> -glicósida

### Contenido fenólico total

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico, como se observa en la Figura 8 (Gutiérrez Avella, Ortiz García y Mendoza Cisneros, 2008). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez Avella, Ortiz García y Mendoza Cisneros, 2008).

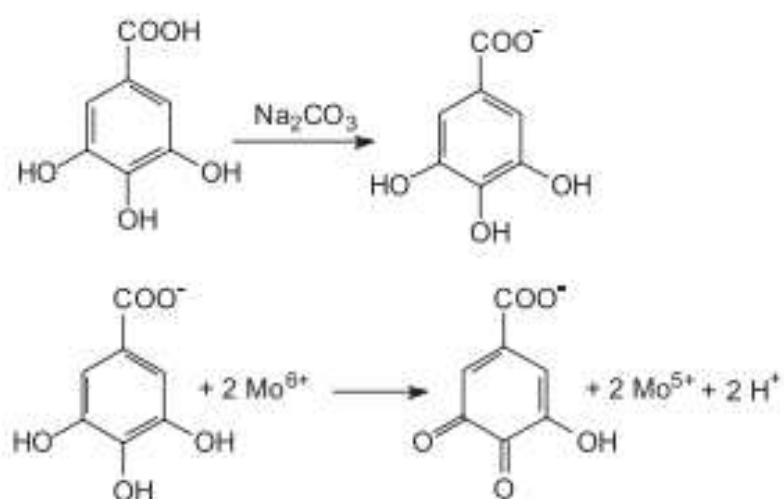


Figura 8. Reacción del ácido gálico con el molibdeno del reactivo de Folin-Ciocalteu (Oliveira, Valentim y Goulart, 2009).

### Contenido de flavonoides totales

Los flavonoides, uno de los dos grandes grupos de compuestos fenólicos junto con los ácidos fenólicos, son un grupo extenso de compuestos derivados del benzo- $\gamma$ -pirano. Poseen varios grupos hidroxilos enlazados a estructuras anulares, C6-C3-C, designadas como A, B y C (Figura 9). Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas,

flavanos y antocianinas. El anillo pirano puede ser abierto (chalconas) y reciclado en un anillo furano (auronas) (Gracia Nava, 2006).

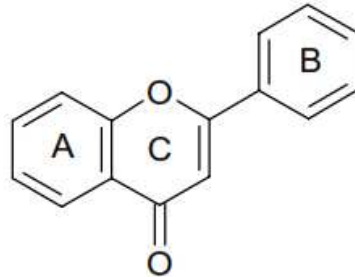


Figura 9. Estructura básica de los flavonoides.

Las flavonas (Figura 10) son amarillas y pueden estar en algunas flores, como en la primula, dándole un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas, ya que son las responsables del color amarillento de los vinos blancos. Hay tres flavonas importantes: la tricetina, presente en el polen de algunas mirtáceas y también en las podocarpáceas (*Podocarpus* spp.); la apigenina, presente en muchas plantas como la manzanilla, (*Matricaria recutita*) o el espino blanco (*Crataegus laevigata*), da un color marrón marfileño a las flores si se presenta sola; y la luteolina, de color amarillo, que incluso sirve para teñir lana y otros tejidos, para lo cual se ha empleado la Retama de los tintoreros (*Genista tinctoria*).

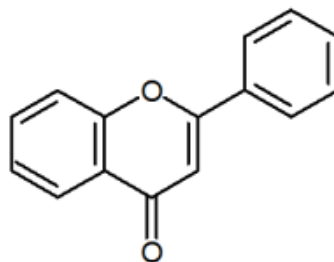


Figura 10. Estructura molecular de una flavona.

La 3-hidroxi flavona (Figura 11) es la columna vertebral de los flavonoles, este tipo de flavonoides suelen ser incoloros o amarillos y se encuentran en las hojas y en muchas flores. Los más importantes son tres: la quercetina, es el flavonol amarillo del polen de

muchas fagáceas (*Quercus* sp.); la miricetina, presente en la uva; y el kaempferol, presente en las inflorescencias y las protege de la luz ultravioleta. La fisetina es un flavonol que se extrae de la planta del género *Amphipterygium*.

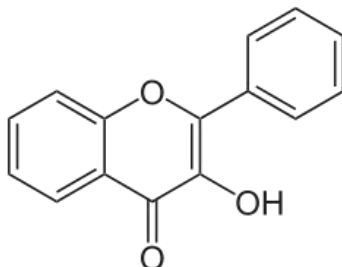


Figura 11. 3-hidroxi flavona, estructura base de los flavonoles.

La técnica colorimétrica del cloruro de aluminio es una técnica para cuantificar los flavonoides totales de una muestra que contenga mayoritariamente flavonas y flavonoles. El principio del método colorimétrico del cloruro de aluminio es que este compuesto forma complejos ácidos estables con el grupo ceto C4 y el grupo hidroxilo C3 o C5 de flavonas o flavonoles. Además el cloruro de aluminio forma complejos lábiles con los grupos ortodihidroxis en el anillo A o B de los flavonoides (Figura 12) (Chang, Yang y Wen, 2002)

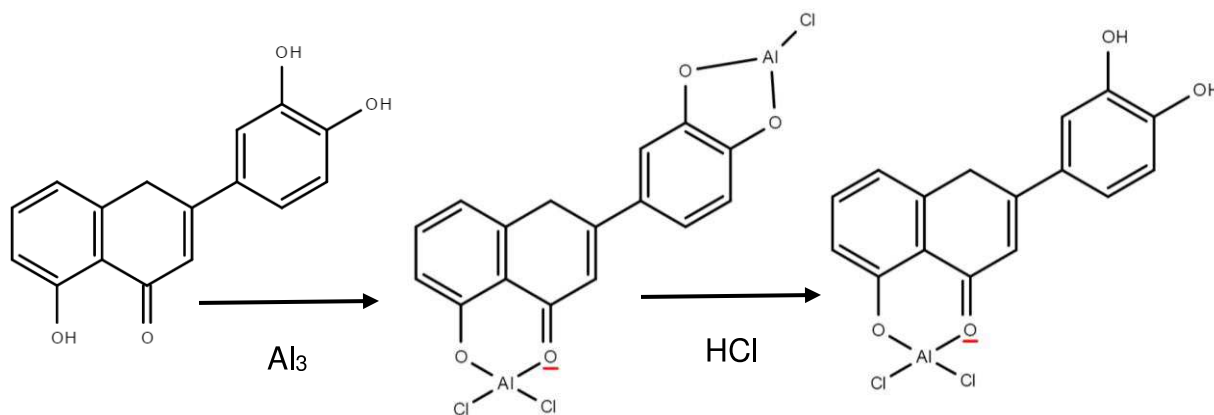


Figura 12. Reacción de quelación del ión  $Al_3^+$  con flavonoides

## 2.6. Secado por aspersión

El secado por aspersión se define como el proceso mediante el cual se convierte un producto o alimentación de un estado líquido inicial a otro pulverizado. De forma casi instantánea se obtiene un sólido seco utilizando generalmente aire caliente como medio de suministro del calor necesario para el secado. El secado por aspersión produce, dependiendo de la materia prima y de las condiciones de funcionamiento, un polvo muy fino (10-50  $\mu\text{m}$ ) o partículas de gran tamaño (2-3 mm) (Masters, 1991).

La pulverización produce una niebla que entra en contacto con el aire caliente. El objetivo principal del secado por aspersión es crear la máxima superficie posible para la evaporación con un tamaño de gota lo más homogéneo posible. Los tiempos de residencia en el secado por aspersión varían de 5 a 100 segundos (Masters, 1991).

Todo este proceso se lleva a cabo en una cámara de secado que tiene forma cilíndrica y cuenta con un cono en su parte inferior. La idea es que se pueda retirar el polvo obtenido en este proceso por efecto de la gravedad, a través del cono de la cámara de secado. El aire caliente se enfría y es expulsado por un tubo de salida que se encuentra justo en medio de la cámara de secado. En algunos casos, el aire caliente recibe un tratamiento después de ser utilizado para que vuelva a estar en condiciones de ser expulsado al ambiente.

Los polvos se depositan en la parte inferior del cono, en donde son recuperados.

Entre los alimentos que son tratados con secado por aspersión se encuentran:

- Ovoproductos
- Café
- Té
- Concentrados de frutas
- Sueros
- Papillas
- Mezclas para helados

- Extractos de carne
- Proteínas comestibles
- Mantequilla
- Queso.

El sistema de secado por aspersión (Figura 13) tiene cinco elementos básicos (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015):

1. Calentador de aire
2. Cámara de secado
3. Dispositivo para dispersar el material a secar,
4. Bomba para impulsar el líquido hacia la cámara de secado
5. Sistema de recolección de las partículas secas en el aire.

El aire de secado puede ser calentado directa (por gas o electricidad) e indirectamente (por medio de vapor, gas o aceite caliente). Los calentadores de aire eléctricos son comunes en secadores para laboratorio y planta piloto. El fluido se alimenta mediante bombas que aumentan la energía mecánica del fluido para incrementar su velocidad, presión o la altura del fluido. La bomba peristáltica es un tipo de bomba utilizada en el secador por aspersión piloto, la cual consta de tubería flexible y rodillos externos para impulsar el fluido. El rango de bombear fluidos es casi ilimitado por la gran variedad de materiales que existen para la tubería.

La función de la cámara de secado es asegurar que las gotas puedan secarse con el flujo de gas caliente y para suministrar un tiempo de residencia suficiente para evaporar la humedad. El tiempo de residencia puede ser calculado, en primera instancia, dividiendo el volumen de la cámara por el caudal total de aire. Es de particular importancia que las gotas no choquen contra las paredes de la cámara cuando todavía están húmedas. La elección del tipo de atomizador depende de la naturaleza y la viscosidad del líquido a alimentar y las características deseadas del producto seco.



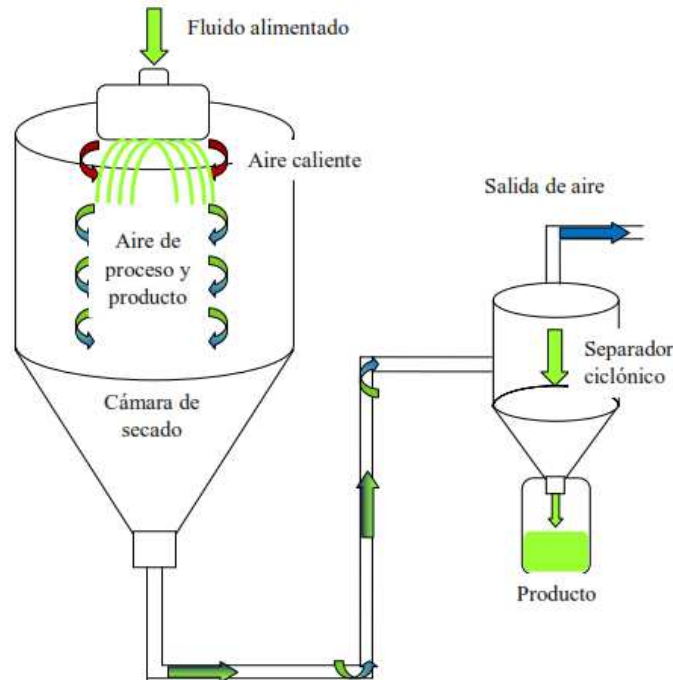


Figura 13. Diagrama de un secador por aspersión.(Hurtado y German, 2003)

### Ventajas de usar secado por aspersión

A continuación se enlistan las principales ventajas de utilizar el proceso de secado por aspersión:

- Control de los parámetros de calidad del producto así como especificaciones concretas.
- El secado por aspersión ofrece la ventaja de un secado rápido para productos sensibles al calor, un tamaño y densidad de la partícula de producto que son controlables dentro de ciertos límites y costos relativamente bajos de operación, en especial en el caso de secadores de gran capacidad en comparación con los secadores por liofilización.
- Los alimentos sensibles al calor, productos biológicos y farmacéuticos se pueden secar a presión atmosférica y a bajas temperaturas.

- El secado por atomización permite la producción de grandes cantidades en la operación continua y con un equipo relativamente simple.
- El producto entra en contacto con las superficies del equipo en condiciones anhidras, simplificando así los problemas de la corrosión y de selección de materiales costoso en la construcción del equipo.
- Produce partículas relativamente uniformes, esféricas y con casi la misma proporción de compuestos que en la alimentación líquida.
- Puesto que la temperatura de funcionamiento del gas puede extenderse de 150 a 600 °C, la eficacia es comparable a la de otros tipos de secadores directos.
- Existe una gran flexibilidad en el diseño de secadores, pudiéndose manejar:
  - a) Soluciones orgánicas,
  - b) Sustancias explosivas con el aire,
  - c) Materiales tóxicos,
  - d) Materiales de manejo higiénico.

### **Desventajas de usar el secado por aspersion**

- Altos requerimientos de energía.
- La entrada del producto al secador debe ser líquida y/o con capacidad para ser bombeada.
- El vapor agotado que deja el secador generalmente debe ser filtrado para prevenir pérdidas de producto y contaminación de la atmósfera.

### **Variables a tomar en consideración**

Propiedades físicas del material:

- Contenido de humedad del material.
- Composición y tamaño de los sólidos en suspensión.
- Viscosidad, aditivos.
- Densidad, concentración

### **Parámetros de la operación:**

- Velocidad de alimentación.
- Flujo de aire de secado.
- Temperatura del aire.
- Velocidad de rotación de disco o presión en la boquilla dispersora.

#### **2.6.1. Etapas y elementos de un sistema de secado por aspersión**

El secado por aspersión consiste en cuatro etapas (Masters, 1985):

- 1) Atomización de la solución
- 2) Contacto aire caliente-gota
- 3) Evaporación del agua
- 4) Recuperación del producto.

**1) Atomización de la solución.** La atomización de líquidos en pequeñas gotas puede llevarse a cabo por la presión o energía centrífuga. El objetivo de esta etapa es crear una superficie máxima posible de transferencia de calor entre el aire seco y el líquido con el fin de lograr la evaporación y optimizar la transferencia de masa. Cuanto más pequeñas sean las gotas, mayor la superficie y más fácil la evaporación y consecuentemente una mayor eficiencia térmica. Con respecto al secado, lo ideal es que todas las gotitas atomizadas fueran de un tamaño uniforme, lo cual significaría que el tiempo de secado sería el mismo para todas ellas; sin embargo, todavía no se ha logrado diseñar un atomizador que produzca una pulverización completamente homogénea.

**Atomizador de disco rotatorio:** Consiste de un disco que gira en el extremo de un eje, el líquido alimentado se introduce cerca del eje de rotación, siendo acelerado hasta la velocidad horizontal de la periferia de la cabeza desde donde es lanzado en forma de rocío al interior de la cámara de desecación (Figura 14). Los atomizadores rotatorios son utilizados para formar gotas de un tamaño promedio de 20 - 150  $\mu\text{m}$ . Las

características de la gota pueden variarse, modificando la velocidad del disco, en donde, a velocidad mayor, disminuye el tamaño de la gota y disminuyendo la velocidad, aumenta el tamaño de la misma. Si lo que se varía es el flujo de alimentación, entonces obtendremos, a mayor velocidad, mayor tamaño de la gota, y a menor velocidad, menor tamaño de gota. El tamaño de la gota es directamente proporcional a la velocidad de alimentación, e inversamente proporcional a la velocidad de aspersión y al diámetro del disco. Los atomizadores rotatorios, atomizan los líquidos esparciéndolos en forma de capas delgadas las cuales se descargan a alta velocidad desde la periferia de un disco especialmente diseñado que gira con gran rapidez la velocidad (Masters, 1991).

El grado de atomización también depende de la viscosidad y tensión superficial del fluido alimentado. Este atomizador es el más frecuentemente seleccionado por la versatilidad en su uso.

Resumiendo las características de este tipo de atomizador tenemos que:

- 1) Es fácil el control del tamaño de partícula.
- 2) Maneja grandes áreas de flujo.

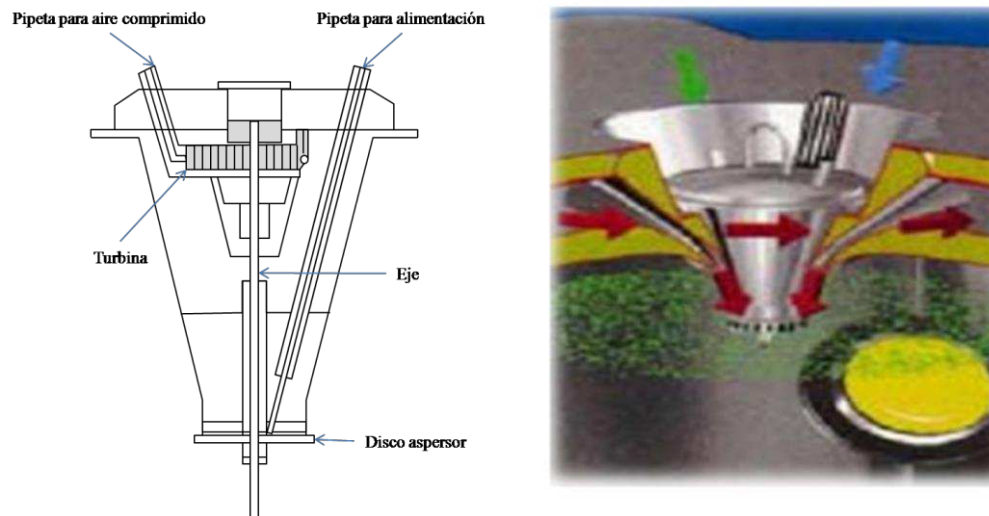


Figura 14. Aspersor de disco rotatorio (Hurtado y German, 2003)

- 3) Se requiere un atomizador sencillo tanto para grandes como para pequeñas capacidades.
- 4) Manejo de soluciones y pastas.
- 5) Talla de partícula virtualmente independiente de la velocidad de la alimentación.
- 6) Capacidad independiente de la presión de alimentación.
- 7) Partículas de gran talla solo en cámaras de diámetro grande.
- 8) Forma un sistema de baja presión.
- 9) Partículas de talla fina-mediana, de tamaño medio hasta 200  $\mu\text{m}$ .
- 10) Tendencia a formar depósitos en paredes a nivel del disco.

Este tipo de atomizador es capaz de asperjar soluciones "gruesas" de materiales alimenticios que serían imposibles de asperjar en un atomizador de presión.

Durante la atomización centrífuga, el aire alrededor del disco aspersor es atrapado en las gotas atomizadas. Un gran porcentaje de este aire permanece en la gota después de que la atomización se completa y ello afecta el proceso de secado.

La formación de vacíos en el polvo seco puede ser reducido por:

- a) Incremento de sólidos en la alimentación (una alta alimentación de sólidos produce gotas con muy pocos espacios vacíos).
- b) Alta presión de atomización, eliminación del aire en el proceso de atomización.
- c) Secado de dos etapas (secado más leve a bajas temperaturas).
- d) Eliminación del aire encapsulado por sustitución de un gas condensable (vapor).

En adición a la producción de un polvo con alta densidad de bulbo, la reducción de la superficie a la exposición al aire podrá en muchos casos reducir la oxidación del producto, extendiendo con ello su vida de anaquel (Masters, 1991).

**2) Contacto aire caliente-gota.** La forma en la cual la gota contacta con el aire caliente es un factor importante en la elección del secador, ya que de ello dependen las propiedades del producto, debido a la influencia que tiene el comportamiento de las gotas durante el secado. El contacto aire caliente-gota, está determinado por la posición del atomizador en relación a la entrada del aire.

Existen tres formas básicas de contacto del aire caliente con la gota de acuerdo con la posición del atomizador en comparación con el distribuidor de aire caliente, (Masters, 1985): flujo en paralelo o concurrente, flujo en contracorriente y mixto. En el flujo paralelo, el líquido es atomizado en la misma dirección que el flujo de aire caliente a través del equipo, la temperatura de entrada del aire caliente puede ser entre 150 y 220 °C, la evaporación se produce de forma instantánea y el producto seco se expondrá a temperaturas moderadas (50-80 °C), lo cual limita las degradaciones térmicas, por ello este tipo de arreglo es recomendado para secar productos sensibles al calor (Figura 15).

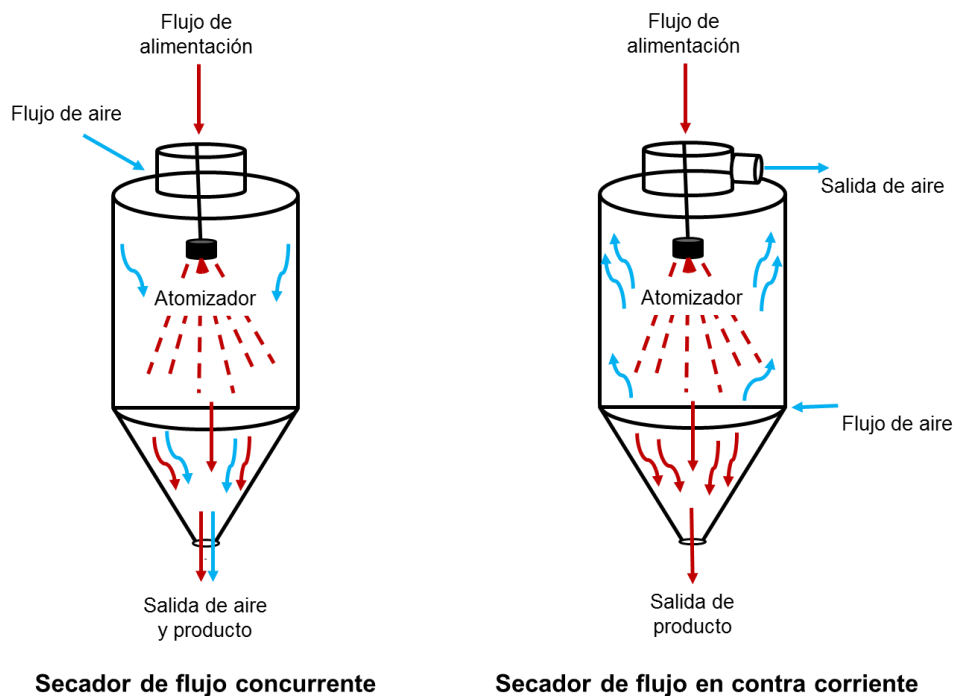


Figura 15. Tipos de arreglos gota-aire caliente.

Otro tipo de arreglo para poner en contacto al rocío y al aire secante, es el llamado a contracorriente. Consiste en hacer pasar el aire secante y el rocío en los extremos opuestos del secador. En este arreglo, existe mayor aprovechamiento del calor, habiendo más exposición del producto al calor y por lo tanto se utiliza para productos no sensibles al mismo (Figura 15).

**3) Evaporación del agua.** La velocidad de evaporación se lleva a cabo en dos periodos (Treyball, 1996): periodo de velocidad constante y periodo de velocidad decreciente. En el periodo de velocidad constante la difusión de humedad desde dentro de las gotas permite tener la superficie saturada de líquido, el tamaño de la gota disminuye y la temperatura de la superficie permanece constante; la temperatura del aire de secado desciende a medida que gana humedad.

En el periodo de velocidad decreciente la velocidad de migración de la humedad a la superficie no es suficiente para mantenerla saturada, en este momento aparecen áreas secas sobre la superficie, alcanzándose el punto crítico de humedad en donde la gota ya no puede contraerse más en volumen y su temperatura empieza a ascender; en este punto el aire de secado llega a la temperatura crítica y a una humedad crítica, su temperatura sigue disminuyendo hasta fijada por el final del proceso aumentando su humedad. La velocidad y el tiempo requerido de secado son dependientes de la temperatura del aire de secado, el coeficiente de transferencia de calor y el diámetro de la gota a secar. La curva de velocidad de secado se muestra en la Figura 16 y los principales cambios cualitativos en el secado de una gota asperjada se presentan en la Figura 17.

La diferencia entre el secado por aspersión y otros métodos de secado es que una gran cantidad de agua se evapora durante el período de velocidad constante cuando la humedad del alimento es grande. Durante este período la evaporación de agua del alimento ocurre de la misma manera que si se tratara de la evaporación de una gota de agua pura.

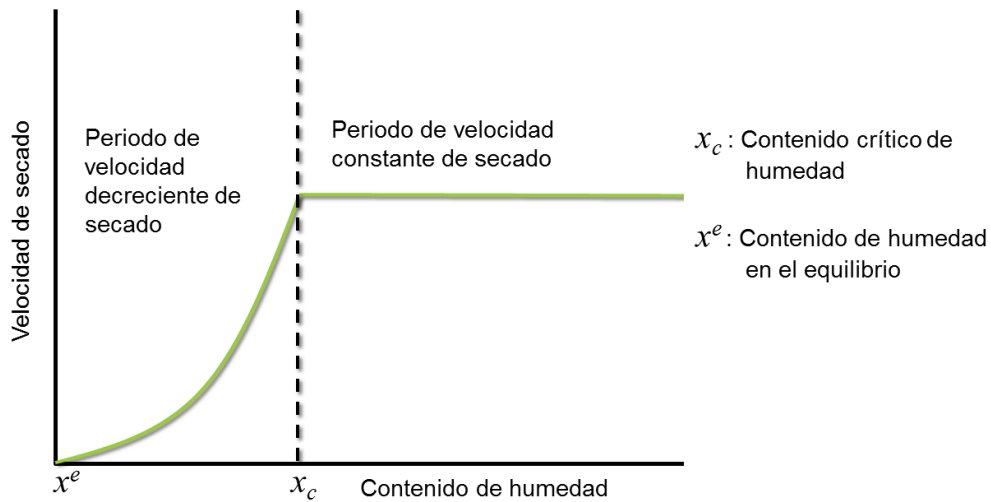


Figura 16. Curva de velocidad de secado.(Treyball, 1996)

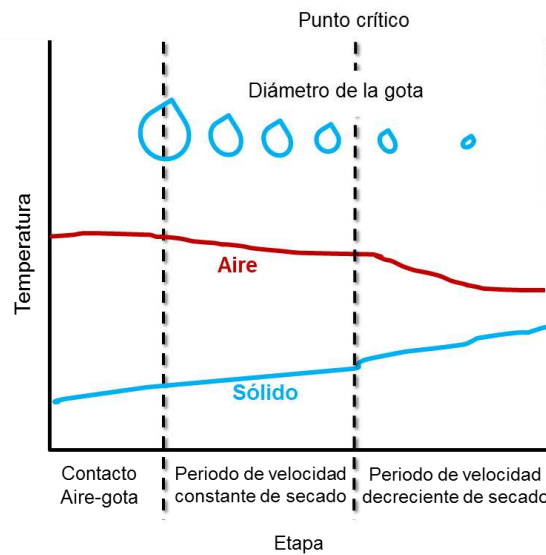


Figura 17. Principales cambios cualitativos en el secado de una gota asperjada (Grajales, 1996).

La transferencia simultánea de calor y masa ocurre de la forma siguiente: el calor para la evaporación del agua se transfiere por conducción y convección desde el aire caliente hasta la superficie de la gota. El vapor de agua resultante de la evaporación se transfiere por difusión del centro de la gota a la superficie y por



convección de la superficie de la gota a la corriente de aire. La rapidez con la cual ocurre este proceso es función de varios factores (Masters, 1991):

- Temperatura y humedad del aire
- Propiedades de transporte del aire
- Diámetro y temperatura de la gota
- Velocidad relativa y naturaleza de los sólidos en la gota líquida

**Recuperación del producto.** La separación del producto se puede realizar primero en la base de la cámara de secado (separación primaria), seguida de la recuperación de finos (separación secundaria), que puede estar constituido por ciclones, filtros bolsa, precipitadores electrostáticos o filtros húmedos. Los separadores ciclónicos son los más empleados para la separación y recolección de polvos, por ser de bajo costo, eficientes y de fácil limpieza. En estos el aire cargado de polvo entra en forma tangencial a una cámara cilíndrico-cónica girando rápidamente y sale por la parte central superior. El producto seco, debido a su inercia, tiende a moverse hacia la pared exterior del separador donde continúa hasta caer en un receptor (Puri, Sharma y Tiwari, 2011).

## **2.7. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**

Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es la más utilizada. Esta técnica deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columna, en la que la cromatografía se realizaba en columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. Para que el flujo de fase móvil fuese razonablemente rápido las partículas de fase estacionaria debían ser de gran diámetro (150-200  $\mu\text{m}$ ), lo que se traducía en una separación poco eficaz y, a pesar de todo, lenta. Para aumentar la eficacia de la separación y así incrementar la resolución era necesario emplear fases estacionarias con tamaño de partícula mucho menor (entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ ), ya que la difusión de los solutos entre las fases móvil y estacionaria se hace más rápida. Pero ello implica la necesidad de impulsar la fase móvil con un sistema de alta presión, nace así la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Ayora, 2005).

### **Cromatografía de partición.**

Se trata probablemente del tipo más usado de cromatografía líquida de alta presión. En ella se considera tanto el uso de fases líquidas retenidas sobre un soporte sólido como el de fases enlazadas unidas químicamente al soporte sólido. La separación de los solutos se basa en la diferente solubilidad entre las fases móvil y estacionaria. En general la fase estacionaria debe tener polaridad semejante a la de los analitos y la fase móvil se escoge de diferente polaridad (aunque no tan diferente que el tiempo de retención sea excesivamente largo). Suele hablarse de dos tipos de cromatografía de partición:

**Cromatografía en fase normal:** emplea fases estacionarias polares y la móvil es poco polar (Ayora, 2005).

**Cromatografía en fase inversa:** la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar. En ella los compuestos polares son eluidos más rápido que los apolares, al contrario que en cromatografía en fase normal. Actualmente es la más utilizada.

La fase estacionaria más usada es gel de sílice (polar) modificado para variar sus características, reteniendo líquidos o fases enlazadas de diferente polaridad.

Una vez fijada la fase estacionaria las características de la fase móvil son el factor clave de la separación cromatográfica. Las fases móviles se caracterizan por su capacidad de desplazamiento y selectividad. En fase normal los disolventes polares eluyen más rápidamente (tienen mayor capacidad de desplazamiento) mientras que en fase inversa es al revés. La selectividad se basa en las interacciones específicas entre el soluto y la fase móvil. Puede emplearse elución isocrática o en gradiente. La aplicación típica de la cromatografía de reparto es la separación y determinación de compuestos orgánicos (Ayora, 2005).

### III. Materiales y métodos

#### 3.1. Materia prima

Las hojas frescas de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Figura 18) que se utilizaron son de la variedad Morita II y fueron colectadas en plantaciones ubicadas en las comunidades de la región de la costa del estado de Oaxaca. Se emplearon dos lotes, el primero (Lote 1) proviene de la comunidad de Santiago Tapextla (latitud:16° 19' y longitud:98° 23') y fue cosechado en marzo de 2017 a las 6:00 pm; el segundo lote proviene de la comunidad El Arenal (latitud:15° 71' y longitud:96° 25') y fue cosechada en julio de 2017 a las 9:00 am.

El material fresco se recibió y se pesó, después se extendió sobre una superficie plana y se cubrió con paños húmedos, inmediatamente después se inició con la preparación del extracto acuoso.



Figura 18. Hojas frescas de stevia.

#### 3.2. Preparación del extracto acuoso.

En el presente trabajo se aplicó la extracción acuosa y se evaluó el efecto de la molienda de las hojas sobre la efectividad en la extracción de los glucósidos de esteviol (Figura 18).



Figura 19. Metodología de la extracción acuosa.

### 3.3. Grados Brix

Los °Brix representan los azúcares solubles presentes en el extracto acuoso, se midieron con un refractómetro manual con compensación de temperatura (Westover, modelo RHB-32 ATC). Se colocó una gota del extracto acuoso de stevia sobre el prisma del refractómetro, luego se direcciona hacia un punto iluminado para hacer incidir la luz natural y se registró el valor indicado en la escala, las mediciones se realizaron por triplicado.

### 3.4. Determinación de pH

El pH del extracto acuoso de hojas frescas de stevia se determinó por el método 981.12 de la A.O.A.C. (1990) empleando un potenciómetro digital (Orion, modelo 420 A), calibrándolo antes de realizar las mediciones, usando soluciones buffer de calibración de pH 4 y pH 7, el electrodo se sumergió en el extracto, cubriendo totalmente el sensor y se tomó la lectura en la pantalla, posteriormente el electrodo fue retirado y enjuagado con agua destilada. Las mediciones se realizaron por triplicado.

### 3.5. Sólidos totales

Los sólidos totales se midieron de acuerdo a la norma mexicana (NMX-F-510-1998) para sólidos totales en leche. Una muestra de 2 ml del extracto acuoso se aplicó en una cápsula con cama de gasa a peso constante.

Los sólidos totales  $S_T$  (g/l) se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$S_T = \left[ \frac{P_2 - P_1}{V} \right] 1000 \quad (2)$$

Donde  $P_2$  es la masa de la cápsula con residuo seco en g,  $P_1$  es la masa de la cápsula con la cama de gasa en g,  $V$  es el volumen la muestra en ml.

### 3.6. Secado por aspersión

El secado por aspersión del extracto acuoso de stevia, se realizó en un equipo escala piloto, NIRO Mobile Minor atomizer con atomizador rotatorio (SL24-50/M02/B) que trabaja en flujo en paralelo (Figura 20), con las especificaciones indicadas en el Cuadro 3. La velocidad de atomización del disco rotatorio fue fijada a 23,000 rpm y el flujo de aire de secado a  $80 \pm 2$  kg/h. Se usó agua destilada a temperatura ambiente para el arranque y parada del secador.

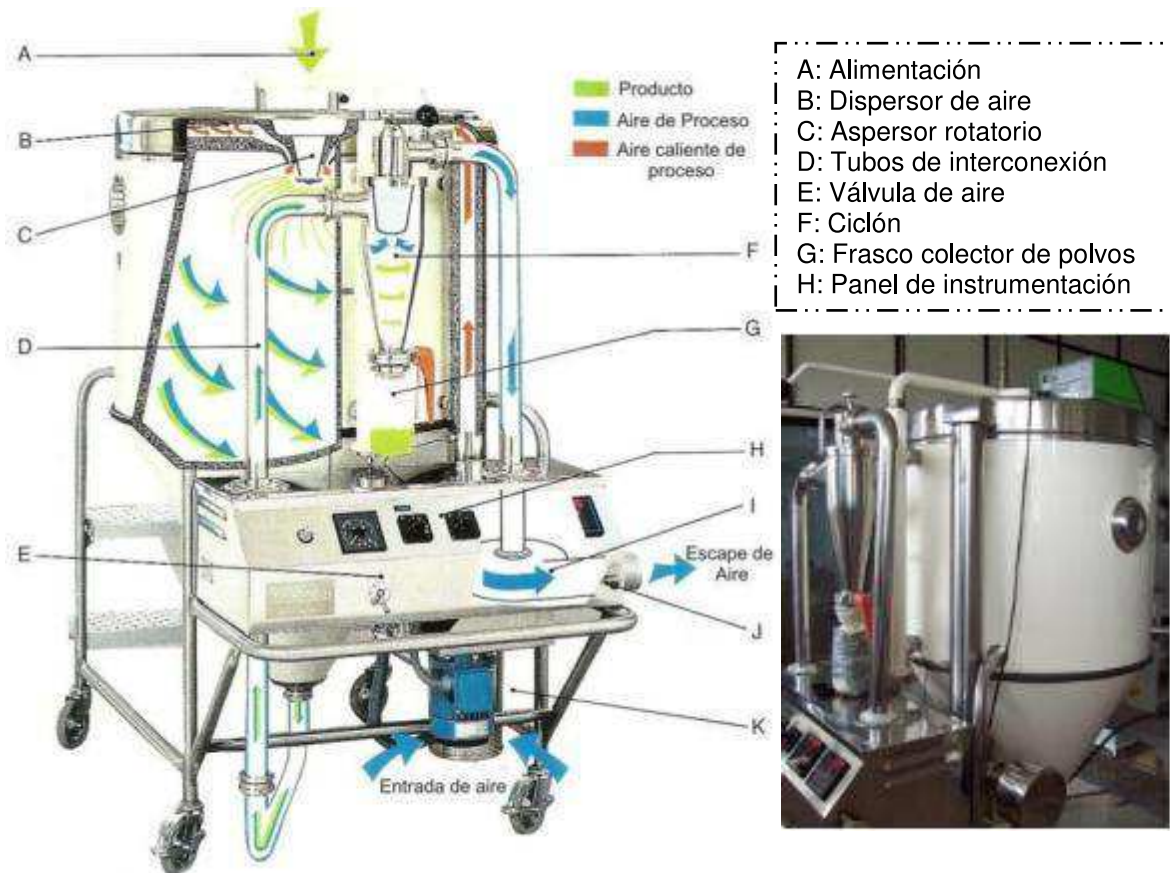


Figura 20. Secador por aspersión a escala piloto NIRO<sup>®</sup>, Mobile Minor.

Cuadro 3. Especificaciones del secador por aspersión Niro-atomizer.

<b>Tipo de secador</b>	Mobile Minor, modelo básico
<b>Cámara</b>	Diámetro: 800 x 620 mm/cono 60º, cámara interna de lámina de AISI 316, revestimiento de acero dulce pintado. Volumen de 1.10 m <sup>3</sup>
<b>Sistema de escape</b>	Diámetro del Ciclón 140 CHE Opción: filtro de cartucho
<b>Calentamiento</b>	Calentador eléctrico, 7.5 kW Temperatura máxima de entrada de 350 °C
<b>Equipo de atomización</b>	Atomizador rotatorio con impulso neumático de 4.6 cm de diámetro, de 24 orificios rectangulares de 0.5cm X 0.2cm
<b>Colector de polvos</b>	Único punto en el marco del ciclón
<b>Bomba</b>	Peristáltica, de control infinitamente variable, local. Consumo de potencia: 0.1 kW
<b>Ventilador</b>	Ventilador de escape Motor de ventilador: 0.25 kW / 2900 rpm
<b>Caudal del aire de secado con temperatura de aire a la entrada de 200°C</b>	80 kg/h
<b>Temperaturas máximas de operación</b>	Aire a la entrada 350°C (662°F) Aire de salida 120°C (248°F)
<b>Capacidad de secado</b>	Entre 1-7 kg de agua evaporada/h dependiendo de los parámetros elegidos
<b>Requerimientos de espacio</b>	800 x 25 x 2200 mm
<b>Peso</b>	280 kg

### 3.7. Rendimiento

El rendimiento de los polvos obtenidos se determinó de acuerdo a la siguiente relación:

$$y = \frac{(PV_2 - PV_1) - (X_{bh})(PV_2 - PV_1)}{V_M S_T} 100 \quad (3)$$

Donde  $PV_2$  es el peso del vaso vacío + el peso de los polvos en g,  $PV_1$  es el peso del vaso en g,  $S_T$  son sólidos totales en g/l,  $V_M$  es el volumen alimentado de extracto de stevia en l,  $X_{bh}$  es el contenido de humedad del polvo en base húmeda,  $y$  es el rendimiento de polvos en % base peso seco.

El peso del vaso con la muestra ( $PV_2$ ) se midió después de que permaneció al menos 10 minutos en un desecador hasta que la muestra alcanzara la temperatura ambiente.

### 3.8. Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó con la técnica de secado en estufa 934.01 (A.O.A.C., 1984) aplicando la siguiente formula:

$$\%CH_{bs} = \frac{P_{humedo} - P_{seco}}{P_{seco}} \quad (4)$$

Donde:  $P_{humedo}$  es el peso inicial de la muestra,  $P_{seco}$  es el peso de la muestra después de que ha perdido toda el agua.



### 3.9. Análisis HPLC

El esteviósido y rebaudiósido A se cuantificaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) de la marca Perkin-Elmer modelo Flexar con bomba cuaternaria y detector UV utilizando el software Chromera versión 4.1.16396 (Figura 21):



Figura 21. Cromatógrafo HPLC Perkin-Elmer.

Muchas técnicas han sido utilizadas para cuantificar la concentración de glucósidos en la stevia, sin embargo el método recomendado por la JECFA (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios) es el de HPLC.

Se aplicó el método modificado propuesto por Aranda-González et al. (2015) para la determinación de esteviósido y rebaudiósido A en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni que se cultiva en México:

- Método isocrático
- Columna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m)
- Detector UV fijado a 210 nm
- Fase móvil: 35:65 (v/v) mezcla de acetonitrilo y agua

- Flujo: 0.9 ml/min
- Estándares de esteviósido y rebaudiósido A (50956 y 01432 Sigma-Aldrich)

Las muestras de polvo seco se realizaron de la siguiente manera: a 0.5 g de muestra se le adicionaron 5 ml de agua a 100 °C y el extracto se sometió a 30 min de baño ultrasónico, y posteriormente a 10 minutos en centrifugación a 2080 rpm, recuperando el sobrenadante y agregando 5 ml más de agua a 100 °C y repitiendo todo el procedimiento tres veces. Las hojas frescas se muelen y se sigue el mismo procedimiento de extracción que en las muestras de polvo seco. Las fases acuosas se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 ml. Todas las muestras se filtraron en filtros de membrana de PVDF de 0.45 µm antes de ser inyectadas al HPLC.

La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva de calibración que se obtuvo con las disoluciones de los estándares (Anexo 1. a y b). Para verificar la presencia de los esteviósidos siempre se inyectaron los estándares antes de cada lote de muestras. Se determinó el peso seco de las muestras, con base en su respectivo contenido de humedad y ese peso seco fue utilizado para realizar el cálculo en base de hojas secas. Los resultados se reportan en mg de glucósido de esteviol por gramo de hoja seca (mg/g hs). El cálculo del contenido de glucósidos de esteviol se realizó conforme a la ecuación (5).

$$\frac{C_m \times V_s}{M_s} \times FD \quad (5)$$

Donde  $C_m$  es la concentración de la muestra en mg/ml,  $V_s$  es el volumen de la solución usado para la extracción en ml,  $M_s$  es el peso seco de las hojas con base en su respectivo contenido de humedad en g hs y  $FD$  es el factor de dilución es adimensional.

### 3.10. Determinación del contenido de fenoles totales

El método de Folin-Ciocalteu se utilizó para la determinación del contenido de fenoles totales, mediante la metodología modificada de Periche et al. (2015). Se realizó una dilución de 1:1 v/v de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) con agua destilada, cuidando siempre de no exponer el reactivo a la luz. A 0.1 g de polvo seco se le adicionaron 5 ml de metanol acidificado y el extracto se sometió a 15 min de baño ultrasónico, y posteriormente a 15 min en centrifugación a 2080 rpm, recuperando el sobrenadante y agregando 5 ml más de metanol acidificado y repitiendo todo el procedimiento hasta obtener una solución incolora.

La cuantificación se realizó por medio de una curva estándar de ácido gálico (Anexo 1. c), la solución de ácido gálico (solución madre) se preparó pesando 12 mg de ácido gálico y se aforó con agua a 100 ml, en ambiente oscuro. En tubos de ensayo ámbar, o en su defecto forrados en papel aluminio; se hicieron diluciones de ácido gálico teniendo un volumen final de 2 ml.

De cada dilución, preparada, se tomaron 0.2 ml y se agregó 0.2 ml de Folin-Ciocalteu y se agitó en vórtex. Después se añadieron 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7% (p/v), se agitó y agregaron 2.6 ml de agua. Se incubó por una hora. La absorbancia fue medida a 750 nm en un espectrofotómetro UV-visible (GBC Cintra 4040) utilizando como blanco una solución 1:1:1 (v/v/v) de carbonato de sodio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: agua: metanol acidificado al 1% (v/v) con ácido clorhídrico. Los resultados se reportaron en mg de ácido gálico equivalente/ g de hoja seca (mg GAE/ g hs). Se determinó el peso seco de las muestras y éste fue utilizado para realizar el cálculo en base de hojas secas. El cálculo del contenido de fenoles se realizó conforme a la ecuación (5).

$$\frac{C_m \times V_s}{M_s} \times FD \quad (5)$$

Donde  $C_m$  es la concentración de la muestra en mg/ml,  $V_s$  es el volumen de la solución usado para la extracción en ml,  $M_s$  es el peso seco de las hojas con base

en su respectivo contenido de humedad en g hs y  $FD$  es el factor de dilución es adimensional.

### 3.11. Determinación de la capacidad antioxidante

El método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) desarrollado por Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995) se empleó para la determinación de la capacidad antioxidante. Los polvos de secado se extrajeron con metanol al 80%, a 0.1 g de polvo se adicionaron 5 ml de de metanol al 80% y el extracto se sometió a 15 min de baño ultrasónico, y posteriormente a 15 min en centrifugación a 2080 rpm, recuperando el sobrenadante y agregando 5 ml más de metanol al 80% y repitiendo todo el procedimiento hasta obtener una solución incolora. El reactivo de DPPH se preparó pesando 3.9 mg de DPPH, se aforó a 100 ml con MeOH al 80%, y se llevó al baño ultrasónico durante 10 minutos, se agitó vigorosamente. Es importante evitar en todo momento el contacto con la luz.

La curva de calibración se realizó con ácido ascórbico (Anexo 1. e), para hacer la solución madre se pesaron 25 mg de ácido ascórbico y se aforó a 100 ml con MeOH al 80%. Las soluciones stock, se realizaron en diferentes concentraciones establecidas para obtener un volumen final de 2 ml. En oscuridad total, en tubos por triplicado se agregaron 100  $\mu$ l de las soluciones stock, 2.9 ml de reactivo DPPH preparado, y se dejó reposar por 30 min contando a partir de la primera muestra a la que se le agregó DPPH.

Las muestras se midieron en un espectrofotómetro UV-visible (GBC Cintra 4040) a 517 nm usando como blanco MeOH al 80%. Los resultados se reportaron como % de inhibición (%I) con la siguiente fórmula (Shukla, Mehta y Menta, 2012):

$$\%I = \frac{A - A_1}{A} 100 \quad (6)$$

Donde  $A$  es la absorbancia del blanco y  $A_1$  es la absorbancia de la muestra.

### 3.12. Determinación de flavonoides totales

El método colorimétrico descrito por Chia-Chi Chang et al. (2002) se empleó para la determinación de flavonoides. Las muestras de secado se extrajeron a partir de 0.1 g de polvo seco se le adicionaron 5 ml de metanol al 80% y el extracto se sometió a 15 min de baño ultrasónico, y posteriormente a 15 min en centrifugación a 2080 rpm, recuperando el sobrenadante y agregando 5ml más de metanol al 80% y repitiendo todo el procedimiento hasta obtener una solución incolora.

Se mezcló en tubos de ensayo, 1 ml de la muestra, 4 ml de agua y 0.30 ml de una solución de nitrito de sodio  $\text{NaNO}_2$  al 5%, se agitaron los tubos. Después de 6 min, se agregaron 0.30 ml de solución de cloruro de aluminio  $\text{AlCl}_3$  al 10% y 2 ml de hidróxido de sodio 1 M, se agitó nuevamente, se dejó reposar por 5 minutos, finalmente se adicionaron 2 ml de agua destilada y se midió la absorbancia a 510 nm en espectrofotómetro UV-visible (GBC Cintra 4040), el blanco que se utilizó se preparó siguiendo los pasos de la solución antes mencionada pero sin agregar el cloruro de aluminio.

La curva de calibración se realizó con reactivo estándar de quercetina (Sigma–Aldrich, Germany) (Anexo 1. d). Para preparar la solución madre para la curva, se pesaron 0.0025 g de quercetina y se disolvieron en 25 ml de MeOH al 80%, cuidando en todo momento que no tuviera contacto con la luz. Los resultados se expresan como mg de quercetina equivalente/ g de hoja seca (mg QE/g hs). Se determinó el peso seco de las muestras y éste fue utilizado para realizar el cálculo en base de hojas secas. El cálculo del contenido de flavonoides se realizó conforme a la ecuación (5).

$$\frac{C_m \times V_s}{M_s} \times FD \quad (5)$$

Donde  $C_m$  es la concentración de la muestra en mg/ml,  $V_s$  es el volumen de la solución usado para la extracción en ml,  $M_s$  es el peso seco de las hojas con base en su respectivo contenido de humedad en g hs y  $FD$  es el factor de dilución es adimensional.

### 3.13. Determinación de azúcares reductores

La determinación se realizó con el método colorimétrico de DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico) técnica descrita por Miller (Miller, 1959), las muestras de polvo seco se realizaron de la siguiente manera: a 0.5 g de muestra se le adicionaron 5 ml de agua a 100 °C y el extracto se sometió a 30 min de baño ultrasónico, y posteriormente a 10 minutos en centrifugación a 2080 rpm, recuperando el sobrenadante y agregando 5 ml más de agua a 100 °C y repitiendo todo el procedimiento tres veces. Las hojas frescas se muelen y se sigue el mismo procedimiento de extracción que en las muestras de polvo seco. Las fases acuosas se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 ml.

La curva de calibración se realizó con glucosa (Anexo 1. f), se pesaron 275 mg de glucosa y se aforó a 25 ml con agua destilada, para hacer la solución madre. Las soluciones stock se realizaron con diferentes concentraciones establecidas para obtener un volumen final de 0.75 ml. Las soluciones stock se agregaron en tubos por triplicado con 500 µl cada uno y se añadieron 500 µl de reactivo DNS, se llevaron a baño María por 5 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 5 ml de agua destilada con previa agitación.

Las muestras se midieron en espectrofotómetro UV-visible (GBC Cintra 4040) a 540 nm usando agua destilada como blanco. Los resultados se reportaron como mg de glucosa equivalente/ g de hoja seca (mg GlucE/ g hs). Se determinó el peso seco de las muestras y éste fue utilizado para realizar el cálculo en base de hojas secas. El cálculo del contenido de azúcares reductores se realizó conforme a la ecuación (5).

$$\frac{C_m \times V_s}{M_s} \times FD \quad (5)$$

Donde  $C_m$  es la concentración de la muestra en mg/ml,  $V_s$  es el volumen de la solución usado para la extracción en ml,  $M_s$  es el peso seco de las hojas con base en su respectivo contenido de humedad en g hs y  $FD$  es el factor de dilución es adimensional.

### 3.14. Diseño experimental

En esta investigación se utilizó un diseño de bloques utilizando un análisis de varianza (ANOVA) (Cuadro 4) con una significancia de  $\alpha=0.05$  evaluando los factores de temperatura del aire de entrada, flujo de alimentación y los lotes como 2 bloques (lote 1 y lote 2) ya que este diseño permite determinar cómo afectan los factores principales (temperatura del aire de entrada y flujo de alimentación) en las variables respuesta de interés que son: contenido de humedad, rendimiento, contenido de glucósidos y capacidad antioxidante (contenido fenólico total, contenido de flavonoides, DPPH).

El factor Lote lo bloqueamos para eliminar estadísticamente la influencia de este factor que no podemos controlar y poder reducir con ello la variabilidad no explicada en nuestras variables de interés.

El aumento de las corridas centrales se hace para conocer la curvatura del proceso y determinar mejor el error experimental (Montgomery, 2004). El orden de ejecución de los tratamientos experimentales, fue de manera aleatoria, con el fin de evitar efectos de factores externos. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Cuadro 4. Diseño de bloques con tres puntos centrales.

<b>Bloques</b>	<b>T<sub>in</sub> °C</b>	<b>FA (kg/h)</b>
Lote 1	160	2
Lote 2	160	3
	200	2
	200	3
	180*	2.5*
	180*	2.5*
	180*	2.5*

\*corridas centrales

Para visualizar el efecto de las condiciones de proceso (temperatura del aire de entrada y flujo de alimentación) sobre las variables de interés, se analizaron las superficies de respuesta generadas por el análisis de varianza.

## IV. Resultados y discusión

### 4.1. Métodos de extracción con relación al contenido de glucósidos de esteviol en los extractos.

La molienda de las hojas de stevia dio como resultado un 73% más de rebaudiósido A y 96% más de esteviósido en comparación con la extracción sin molienda de hojas. En el Cuadro 5 se presenta la concentración promedio de esteviósido y rebaudiósido A en las extracciones que se hicieron por triplicado con y sin molienda de las hojas de stevia del lote 1 y 2. Todos los extractos tuvieron un pH de 5.6 y 3 °Brix. El contenido de esteviósido y rebaudiósido A del extracto de las hojas molidas fue mayor que sin molienda.

El lote 1 y 2 dieron valores similares de glucósidos, el lote 3 dio valores mayores que los lotes 1 y 2. Los datos obtenidos en esta experimentación y en otros estudios como el de Yildiz-Ozturk *et al.* (2015), Orozco, Cardona Ayala y Fernández Herrera, (2012) evidencian que el origen y la ubicación del crecimiento de la planta tienen un impacto significativo en el contenido de glucósidos de esteviol de la planta.

La molienda de las hojas permite aumentar la superficie de contacto durante la extracción lo que ayuda a la penetración del agua en el tejido vegetal de las hojas de stevia, la extracción en la hoja entera probablemente haya sido ineficiente debido a la pobre penetración del agua en el tejido vegetal porque las membranas celulares actúan como barreras que dificultan el proceso de extracción, en cambio al moler las hojas las membranas celulares se encuentran parcialmente destruidas lo que ayuda a que el proceso de extracción sea eficiente (Bruneton, 2001).



Cuadro 5. Contenido promedio de esteviósido y rebaudiósido A en los extractos.

Lote	Extracto sin molienda de hojas (mg / g hs)		Extracto con molienda de hojas (mg / g hs)	
	Esteviósido	Rebaudiósido A	Esteviósido	Rebaudiósido A
1	45.36±1.13	60.05±1.90	94.23±1.12	102.67±0.45
2	47.54±0.35	59.82±1.12	94.79±1.93	103.88±0.52
3	53.39±1.16	56.74±1.07	98.07±1.23	102.81±1.19

Los extractos acuosos con y sin molienda se secaron por aspersión a diferentes condiciones de operación ( $T_{in}$ , FA), para evaluar la pérdida de glucósidos de esteviol en estos. El

Cuadro 6 muestra el contenido de glucósidos de esteviol en los polvos de los extractos. Los extractos con molienda pierden hasta un 61% de rebaudiósido A y un 59% de esteviósido, mientras que los extractos sin molienda pierden solo el 24% de esteviósido y rebaudiósido A.

El método de extracción sin molienda de la hoja de stevia fue elegido debido a que requiere menor tiempo de preparación y con el cual se obtiene una menor pérdida de glucósidos de esteviol durante el secado por aspersión del extracto acuoso de stevia.

Cuadro 6. Comparativo del contenido de glucósidos de esteviol en los polvos de secado.

<i>Secado por aspersión de los extractos:</i>						
Condiciones de secado		Lote	Extracción sin molienda de hojas (mg / g hs)		Extracción con molienda de hojas (mg / g hs)	
$T_{in}$ °C	FA (kg/h)		Esteviósido	Rebaudiósido A	Esteviósido	Rebaudiósido A
130	2	1	43.01±1.05	45.84±1.14	38.25±1.22	40.18±1.00
155	2.5	2	45.94±1.11	50.00±1.29	42.52±1.02	45.70±1.07
180	3	3	40.56±0.72	46.10±1.13	48.59±1.19	43.97±1.17

## 4.2. Secado por aspersión.

### 4.2.1. Rendimiento

En el Cuadro 7 se muestran los resultados promedio del rendimiento de los lotes 1 y 2 con su respectiva desviación estándar. El lote no tuvo un efecto significativo.

Cuadro 7. Rendimiento de los polvos de secado.

<b>T<sub>in</sub></b> <b>(°C)</b>	<b>FA</b> <b>(kg/h)</b>	<b>Rendimiento</b> <b>%</b>
200	2	86.44 ±0.09
200	3	86.21 ±0.29
160	2	80.17 ±0.25
160	3	79.06 ±0.69

El análisis de varianza mostró un efecto significativo, de la temperatura del aire a la entrada y del flujo de alimentación ( $p=0.01$ ).

La temperatura tuvo un efecto positivo en el rendimiento, los mayores rendimientos se obtuvieron a altas temperaturas (200 °C) y flujos de alimentación bajos (2 kg/h), el efecto de la temperatura y flujo de alimentación en el rendimiento concuerda con los resultados de Tonon *et al.* (2008) para el secado de acai (*Euterpe oleracea* Mart.) y por Maury *et al.* (2005) para el secado de trehalosa, Toneli *et al.* (2006) para secado por aspersión de inulina también tuvo un aumento en el rendimiento de los polvos al aumentar la temperatura y disminuir la velocidad de flujo de la bomba de alimentación, usualmente, temperaturas de aire de secado más altas resultan en un rápido secado (mejor transferencia de masa y calor), causando mayor rendimiento de polvos en relación con los sólidos totales del extracto.

Las altas temperaturas en el secado por aspersión mejoran la transferencia de calor y masa, por ello a altas temperaturas se obtuvieron mayores rendimientos en los polvos de secado, y un aumento en el flujo de alimentación disminuye el rendimiento esto podría deberse a que hay un menor calentamiento y transferencia de masa que se produce cuando se aumenta el flujo de alimentación.

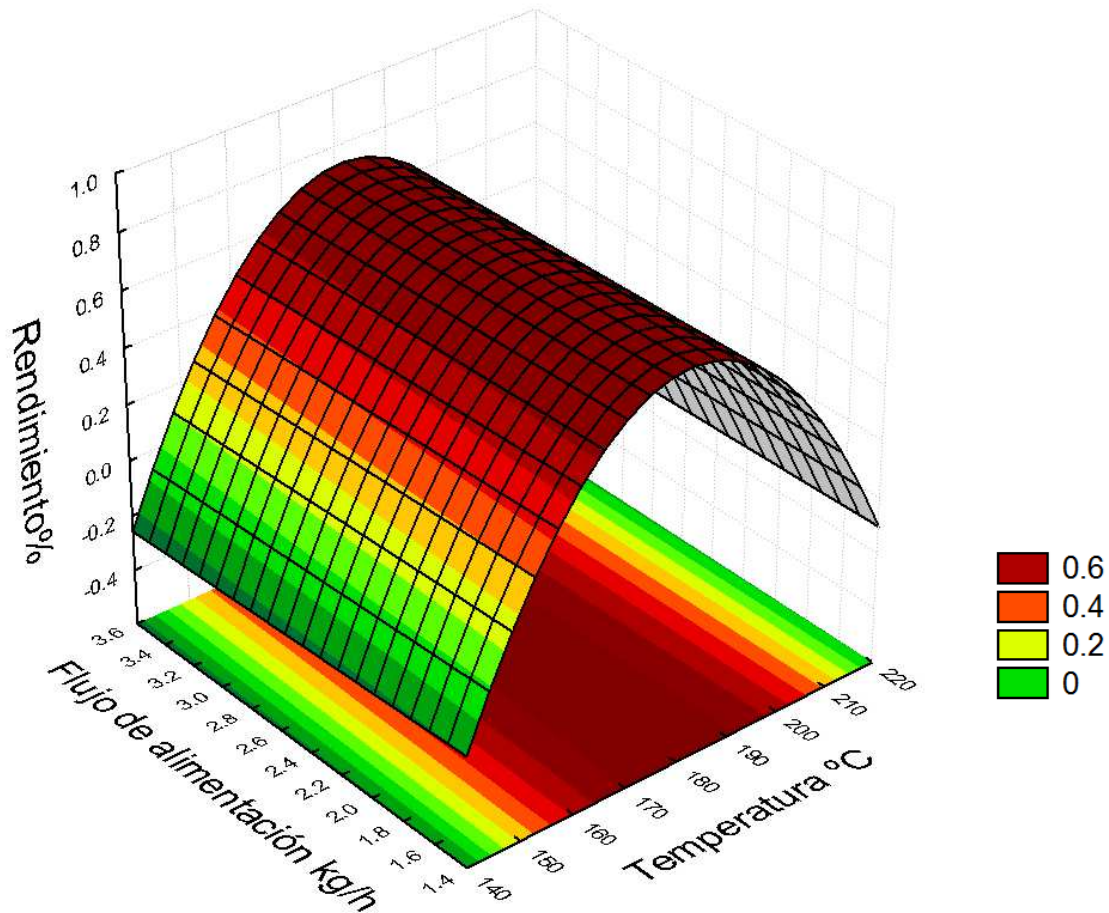


Figura 22. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en el rendimiento de polvos.

Los mayores rendimientos de sólidos se obtuvieron al trabajar en temperaturas de 165-200 °C y flujos de alimentación de 1.4-3.6 kg/h, y conforme aumentan o disminuyen las temperaturas el rendimiento disminuye, los puntos máximos para este diseño se observan en el punto medio de temperatura y para los diferentes flujos de alimentación (180 °C; 2.5-3.6 kg/h).

#### 4.2.2. Contenido de humedad.

El contenido promedio de humedad de los lotes 1 y 2 con su respectiva desviación estándar se muestran en el Cuadro 8. El lote no tuvo un efecto significativo en el contenido de humedad.

El contenido de humedad varía de 2.36 a 1.50% base seca, el contenido de humedad aumenta conforme disminuye la temperatura e incrementa el flujo de alimentación, sin embargo esta diferencia no resulta significativa ( $p>0.05$ ); la temperatura ( $p=0.20$ ) y el flujo de alimentación ( $p=0.11$ ) no tuvieron un efecto significativo en el contenido de humedad.

El contenido de humedad más bajo se encuentra en la temperatura más alta y el flujo más bajo, esto se debe a que a mayor temperatura la diferencia entre la temperatura del aire de secado y las partículas es mayor, por lo que la humedad se elimina más rápido; y al disminuir el flujo de alimentación el tamaño de gotas es más pequeño incrementando con ello la superficie de contacto entre el aire de secado y las partículas, lo que permitió una mayor deshidratación del producto.

Cuadro 8. Contenido de humedad base seca.

<b>T<sub>in</sub></b> <b>(°C)</b>	<b>FA</b> <b>(kg/h)</b>	<b>T<sub>out</sub></b> <b>(°C)</b>	<b>Contenido de humedad</b> <b>% bs</b>
200	2	102	1.50 ±0.42
200	3	85	1.79 ±0.49
160	2	84	1.57 ±0.43
160	3	70	2.36 ±1.07

#### 4.3. Glucósidos de esteviol.

El contenido promedio de glucósidos de esteviol del lote 1 y 2 con su respectiva desviación estándar se muestran en el Cuadro 9. El lote tuvo un efecto significativo solo en el contenido de rebaudiósido A.

Cuadro 9. Contenido promedio de esteviósido y rebaudiósido A en el extracto y en los polvos.

	<b>T<sub>in</sub></b> <b>(°C)</b>	<b>FA</b> <b>(kg/h)</b>	<b>mg</b> <b>esteviósido/</b> <b>g hs</b>	<b>mg</b> <b>esteviósido/</b> <b>g ps</b>	<b>mg</b> <b>rebaudiósido</b> <b>A/ g hs</b>	<b>mg</b> <b>rebaudiósido</b> <b>A/ g ps</b>
Extracto de hojas frescas			42±0.08		61.12±0.05	
	200	2	37.76±0.53	108.09±1.82	58.97±0.39	169.63±0.94
	200	3	29.84±1.80	85.76±2.24	46.62±1.96	118.54±0.52
	160	2	40.54±3.46	125.09±0.62	57.22±0.36	160.89±3.13
	160	3	32.94±1.80	94.41±3.31	47.02±3.34	127.14±0.72

El contenido más alto de rebaudiósido A se obtuvo en la condición térmica más alta a 200 °C y el menor flujo de alimentación 2 kg/h, mientras que el contenido más alto de esteviósido se obtuvo a la menor temperatura y menor flujo de alimentación 160 °C y 2kg/h; la temperatura ( $p=0.00$ ) y el flujo de alimentación ( $p=0.00$ ) tuvieron un efecto significativo ( $\alpha=0.05$ ) tanto para el contenido de esteviósido como para el contenido de rebaudiósido A

En todos los tratamientos de secado tanto el contenido de esteviósido como el contenido de rebaudiósido A disminuyeron, esta pérdida de glucósidos de esteviol posiblemente se deba a que se lleva a cabo una hidrólisis térmica de las moléculas de glucosas unidas a la molécula de esteviol.

Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos por Jooken *et al.* (2012) que dan seguimiento a la concentración de nueve diferentes glucósidos de esteviol entre ellos rebaudiósido A y esteviósido expuestos a un calentamiento de 180 °C, midieron el contenido de glucósidos de esteviol cada 20 minutos donde se observó un decremento en el esteviósido y rebaudiósido A y este decremento se reflejó en un aumento de rebaudiósido B y esteviósido B (Jooken *et al.*, 2012). En la Figura 23 se propone cómo se da la hidrólisis del enlace glucosídico en R1 (Figura 3) en el esteviósido y en el rebaudiósido A.

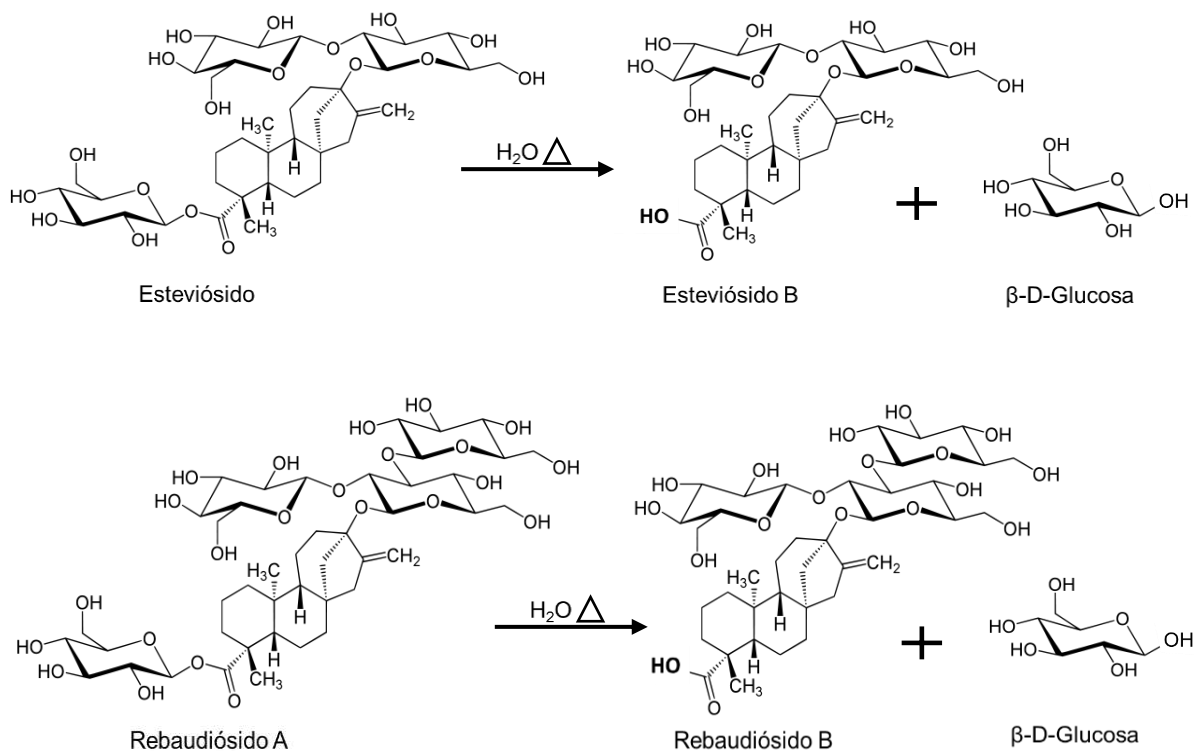


Figura 23. Hidrólisis del esteviósido y del rebaudiósido A.

Si la hidrólisis se presenta con el rompimiento del enlace glucosídico en el esteviósido y rebaudiósido A, es posible que la cuantificación de azúcares reductores en el material deshidratado sea mayor que en el material que no se somete a un tratamiento térmico como lo es el secado. El rompimiento del enlace de la glucosa unida al esteviol en el enlace R1 (Figura 3) lo comprobamos realizando la cuantificación de los azúcares reductores tanto en el extracto como en los polvos obtenidos en las diferentes condiciones de secado, ya que la glucosa es un azúcar reductor, por lo tanto, al disminuir el contenido de esteviósido y rebaudiósido A debe verse reflejado en un aumento en el contenido de azúcares reductores.

En el Cuadro 10 se presenta el contenido de azúcares reductores de la hoja fresca y la de los polvos obtenidos por secado por aspersion a diferentes condiciones de operación. El mayor contenido de azúcares reductores se obtuvo en la condición de 160 °C y 3 kg/h que es la condición a la que se obtuvo el menor contenido promedio de esteviósido y rebaudiósido A, esto podría deberse a que hubo una mayor cantidad de glucosas libres debido al rompimiento del enlace de glucosa durante la hidrólisis.

Cuadro 10. Contenido promedio de azúcares reductores en la stevia fresca y en los polvos de secado.

<b>Tratamiento</b>	<b>T<sub>in</sub> (°C)</b>	<b>FA (kg/h)</b>	<b>Azúcares reductores mg GlucE/g hs</b>
Fresco			87.87±0.05
	160	2	212.76±0.25
	160	3	227.02±0.92
	200	2	216.06±0.86
	200	3	218.55±0.55

GlucE: Glucosa Equivalente

El flujo de alimentación ( $p=0.00$ ) tuvo un efecto significativo ( $\alpha=0.05$ ) sobre el contenido de esteviósido y rebaudiósido A, esto podría deberse a que a menores flujos de alimentación las gotas son de menor tamaño por lo que el secado es más rápido y el agua necesaria para la hidrólisis se encuentra disponible menor tiempo para poder llevar a cabo dicha reacción; por ello en los flujos de alimentación menores se encontró el mayor contenido de esteviósido y rebaudiósido A.

En el Cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos del índice de rebaudiósido A contenido en los polvos del secado obtenido en el presente trabajo y se comparan con los obtenidos por Chranioti, Chanioti y Tzia (2015), los cálculos del índice de rebaudiósido A se realizaron conforme a la Ecuación 1.

Cuadro 11. Comparación de los resultados obtenidos en microencapsulación y en extracto acuoso sin encapsular.

Resultados con encapsulante (Chranioti, Chanioti y Tzia, 2015)		Resultados sin encapsulante		
$T_{in}$ °C	%MEE	$T_{in}$ °C	FA (kg/h)	%MEE
160	62.36±1.8 <sup>A</sup>	200	2	96.48±0.07
	82.46±1.6 <sup>B</sup>	200	3	76.27±1.3
	94.67±1.93 <sup>C</sup>	160	2	93.62±0.46
		160	3	76.93±0.59

En los datos que se comparan en el Cuadro 11 se puede observar que en el secado por aspersión a bajos flujos de alimentación (2 kg/h) se conserva más del 93% de rebaudiósido A sin agentes encapsulantes y a bajo flujo de alimentación y alta temperatura (2 kg/h y 200 °C) se conserva más del 95%, lo que demuestra la estabilidad de esta molécula a altas temperaturas que se conserva aún sin agentes encapsulantes, esto podría deberse a que utilizando el extracto completo de las hojas de stevia, otros componentes como las fibras que están presentes actúan como encapsulantes.

En el secado por aspersión llevado a cabo por Chranioti, Chanioti y Tzia (2015) obtuvieron un rendimiento de hasta 94.67% de rebaudiósido A pero el producto obtenido es mayoritariamente inulina y maltodextrina, ya que la solución de secado estaba compuesta por 96.5% de sólidos de inulina y maltodextrina y sólo 3.5% de sólidos de esteviósido y rebaudiósido A.

Las mayores concentraciones de esteviósido se encuentran en el rango de temperaturas de 160-190 °C y flujos de alimentación bajos de 1.4-1.6 kg/h, el punto máximo de contenido de esteviósido se observa en las condiciones de 180 °C y 1.4 kg/h, al aumentar la temperatura y el flujo de alimentación o al disminuir la temperatura por debajo de 150 °C y aumentar el flujo de alimentación el contenido de esteviósido disminuye (Figura 24).



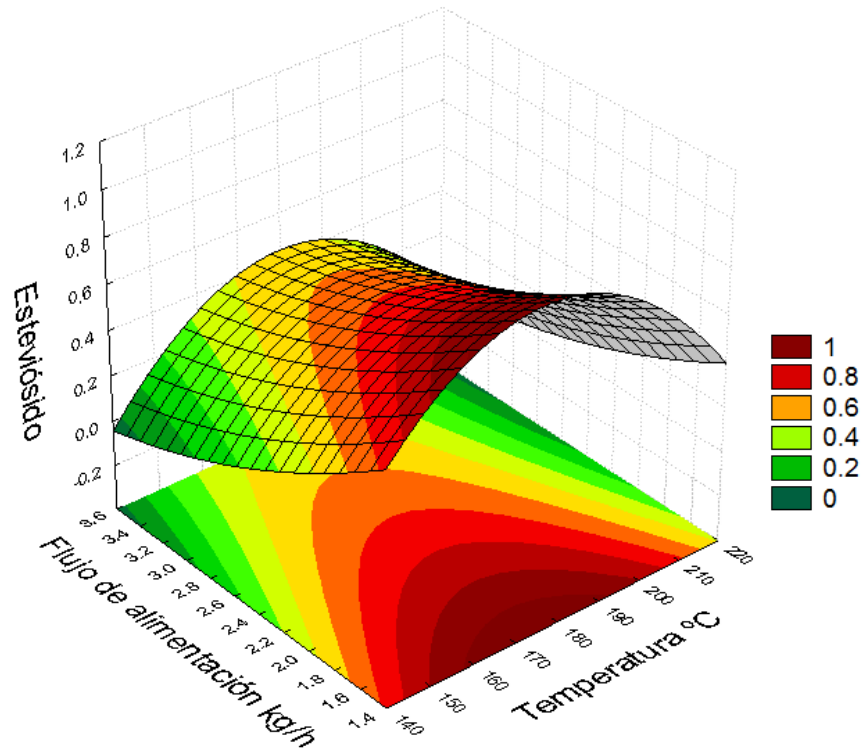


Figura 24. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en el contenido de esteviósido.

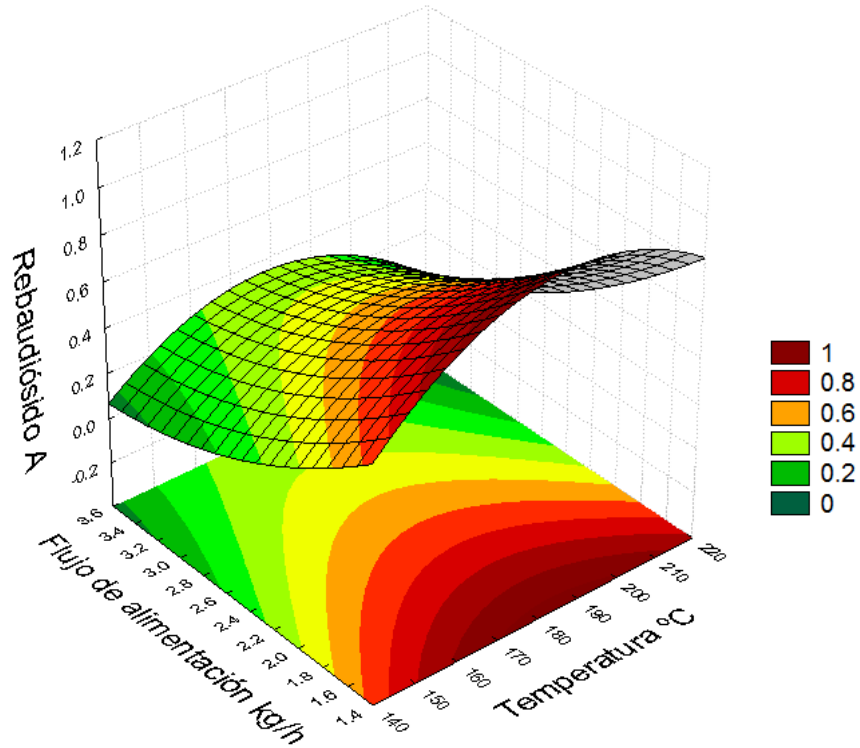


Figura 25. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en el contenido de rebaudiósido A.

El rebaudiósido A resiste temperaturas más altas que el esteviósido pues el rango de temperaturas donde se encuentra el mayor contenido es de 160 °C-210 °C y flujos de alimentación bajos de 1.4-1.6 kg/h, incluso a 220 °C aún se pueden encontrar contenidos altos de rebaudiósido A (Figura 25).

#### **4.4. Antioxidantes.**

##### **4.4.1. Contenido fenólico total.**

Cuadro 12 se muestra el contenido promedio de fenoles totales del lote 1 y el lote 2 con su correspondiente desviación estándar. El lote tuvo un efecto significativo en el contenido de fenoles totales.

El contenido de fenoles disminuyó en todos los tratamientos de secado con respecto al contenido en hoja fresca. El análisis estadístico mostró un efecto significativo, de la temperatura del aire a la entrada, el flujo de alimentación no tuvo un efecto significativo ( $p=0.38$ ). El mayor contenido fenólico total se obtuvo en el tratamiento de menor temperatura (160 °C) y menor flujo de alimentación (2 kg/h).

Es notable también la diferencia en el contenido de fenoles en las hojas frescas, ya que las hojas utilizadas en los diferentes lotes fueron cultivadas en lugares diferentes y cosechadas en diferentes épocas del año y a diferentes horas del día, los resultados obtenidos concuerda con lo que indica Orozco *et al.* (2012) que las condiciones edafoclimáticas influyen en el contenido de metabolitos secundarios de las plantas, en este caso los fenoles.

Los resultados obtenidos en este trabajo contrastan con los obtenidos por Periche *et al.* (2015) quien reportó en hojas frescas un contenido de 44.40 mg GAE/g de materia seca, en secado con aire caliente a 100 °C un contenido de 31.5 mg GAE/g de materia seca y en secado con aire caliente a 180 °C 76.8 mg GAE/g de materia seca es decir que a mayor temperatura de secado mayor contenido fenólico (Periche *et al.*, 2015). A diferencia de los datos obtenidos en el presente trabajo en donde el mayor contenido fenólico total se obtuvo a la menor temperatura.

Cuadro 12. Contenido fenólico total.

	$T_{in}$ °C	FA (kg/h)	Lote 1	Lote 2
			Compuestos fenólicos mg GAE/g hs	Compuestos fenólicos mg GAE/g hs
Hojas frescas			47.64±0.64	77±0.59
	160	2	32.94±0.56	49.93±0.91
	160	3	29.93±1.44	47.21±0.11
	200	2	25.93±0.10	40.90±0.57
	200	3	29.63±1.79	41.48±0.78

GAE: Ácido gálico equivalente

Esto podría deberse a que los compuestos fenólicos son sensibles a altas temperaturas. Las hojas frescas de stevia se molieron para preparar el extracto acuoso que se alimentó al secador por aspersión por lo que los compuestos fenólicos se encuentran más expuestos durante el secado por aspersión a diferencia de cuando se seca la hoja completa en donde los compuestos fenólicos se encuentran protegidos en las vacuolas (Bruneton, 2001). Los compuestos fenólicos son termolábiles y logran conservarse debido a que el secado por aspersión es adecuado para compuestos sensibles al calor (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015). Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los obtenidos por Tonon, Brabet y Hubinger (2008) en el secado por aspersión del jugo de acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) el contenido de antocianinas disminuyó al aumentar la temperatura del aire de entrada, y con los resultados reportados por Duduku Krishnaiah, Sarbatly y Nithyanandam (2012) en el secado por aspersión de extracto de *Morinda citrifolia* donde al aumentar la temperatura el contenido fenólico total disminuyó.

Las mayores concentraciones del contenido fenólico total (Figura 26) en el secado por aspersión se encuentran en el rango de temperaturas de aire de entrada de 150-140 °C y flujos de alimentación de 1.4-2.2 kg/h. El contenido fenólico total se ve favorecido por bajas temperaturas y bajos flujos de alimentación.

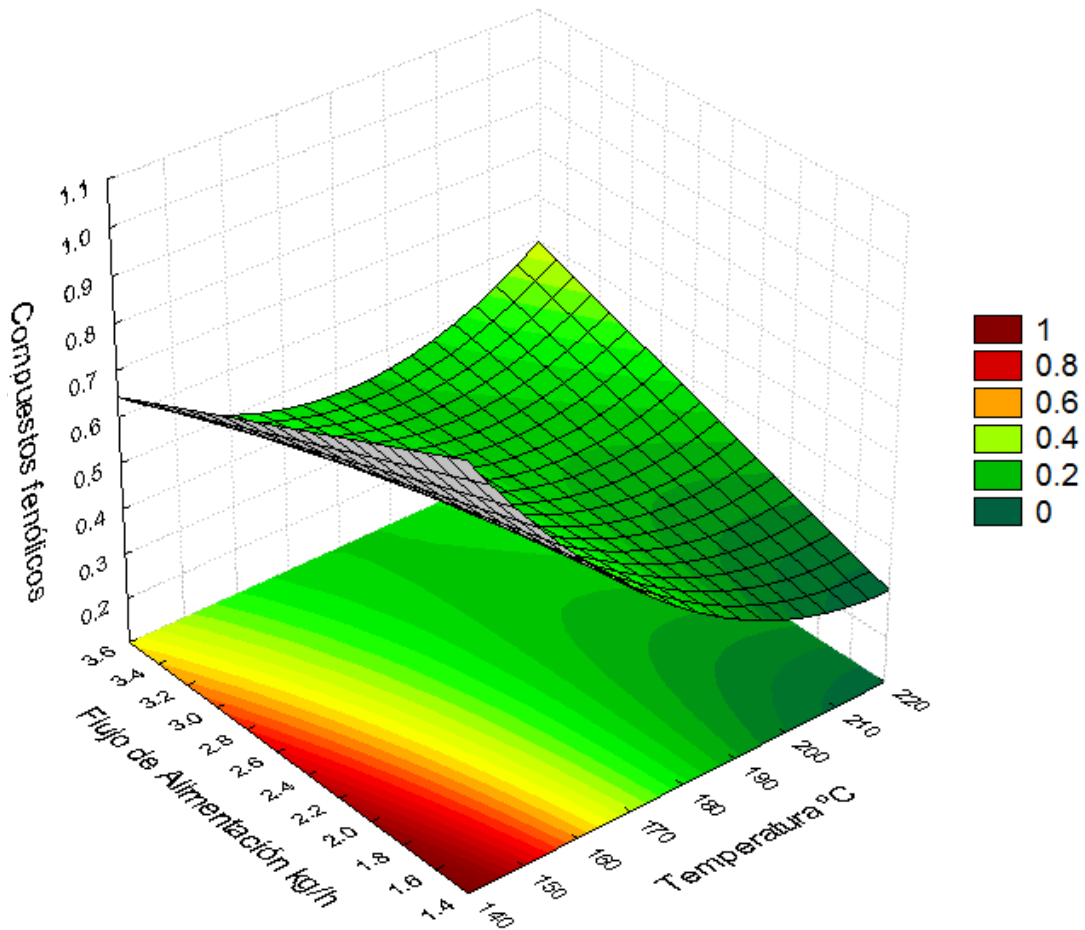


Figura 26. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en el contenido de compuestos fenólicos.

#### 4.4.2. Contenido de flavonoides totales.

En el Cuadro 13 se muestran los datos promedio del contenido de flavonoides del lote 1 y 2. El lote no tuvo un efecto significativo en el contenido de flavonoides. El contenido de flavonoides disminuyó en todos los tratamientos de secado con respecto al contenido en hoja fresca. El flujo de alimentación ( $p=0.00$ ) y la temperatura del aire de entrada ( $p=0.00$ ) mostraron un efecto significativo en el contenido de flavonoides.

El mayor contenido de flavonoides se obtuvo en la menor temperatura  $160\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el mayor flujo de alimentación  $3\text{ kg/h}$ , el contenido de flavonoides presentó un decremento al aumentar la temperatura y disminuir el flujo de alimentación.

Cuadro 13. Contenido de flavonoides.

	<b>T<sub>in</sub> °C</b>	<b>FA (kg/h)</b>	<b>Flavonoides mg QE/g hs</b>
Hojas frescas			170.45±0.61
	160	2	115.63±3.14
	160	3	125.80±1.99
	200	2	108.31±2.66
	200	3	117.89±1.03

QE: Quercetina equivalente

En otros trabajos en hojas de stevia se reportan los siguientes resultados: Kim et al. (2011) en hojas secadas a 40 °C por 12 horas reportaron 15.64 mg QE/g hs; Yildiz et al. (2015) obtuvieron en hoja secas (no reportan condiciones de secado) 111.16 mg QE/g hs y 126.70 mg QE/g hs, con extracción en microondas y con sonda ultrasónica respectivamente, los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los reportados por Yildiz et al. (2015).

El contenido de flavonoides disminuyó en todos los tratamientos de secado en comparación con el contenido en fresco, esto podría deberse a que los flavonoides son sensibles a la oxidación y la degradación térmica durante el secado por aspersión (Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015), y los flavonoides con más grupos hidroxilos (OH) dentro de su estructura son más susceptibles a la degradación térmica (Buchner *et al.*, 2006), como el caso de la quercetina que es un flavonoide que se encuentra en las hojas de stevia y tiene 4 grupos hidroxilo en su estructura y otros flavonoides como Quercetina-3-O-β-D-arabinósido, Quercetina-3-O-β-D-ramnósido, Quercetina-3-O-glucósida y otros que se mencionan en el Cuadro 2 que tienen 3 grupos hidroxilo en su estructura.

Conclusiones similares fueron obtenidas por Pang et al. (2014). Entre los compuestos fenólicos vegetales de las hojas de *Orthosiphon stamineus*, el ácido rosmarínico y el eupatorin mostraron mayor degradación que la sinensetina, debido a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura molecular. La ausencia de un

grupo hidroxilo sobre la estructura molecular de sinensetina la hizo estable durante el secado por aspersión, incluso sin encapsulación.

El contenido de los flavonoides aumenta al aumentar los flujos de alimentación y disminuir la temperatura del aire de entrada, encontrándose el contenido máximo al mayor flujo de alimentación 3.6 kg/h y la menor temperatura 140 °C (Figura 27)

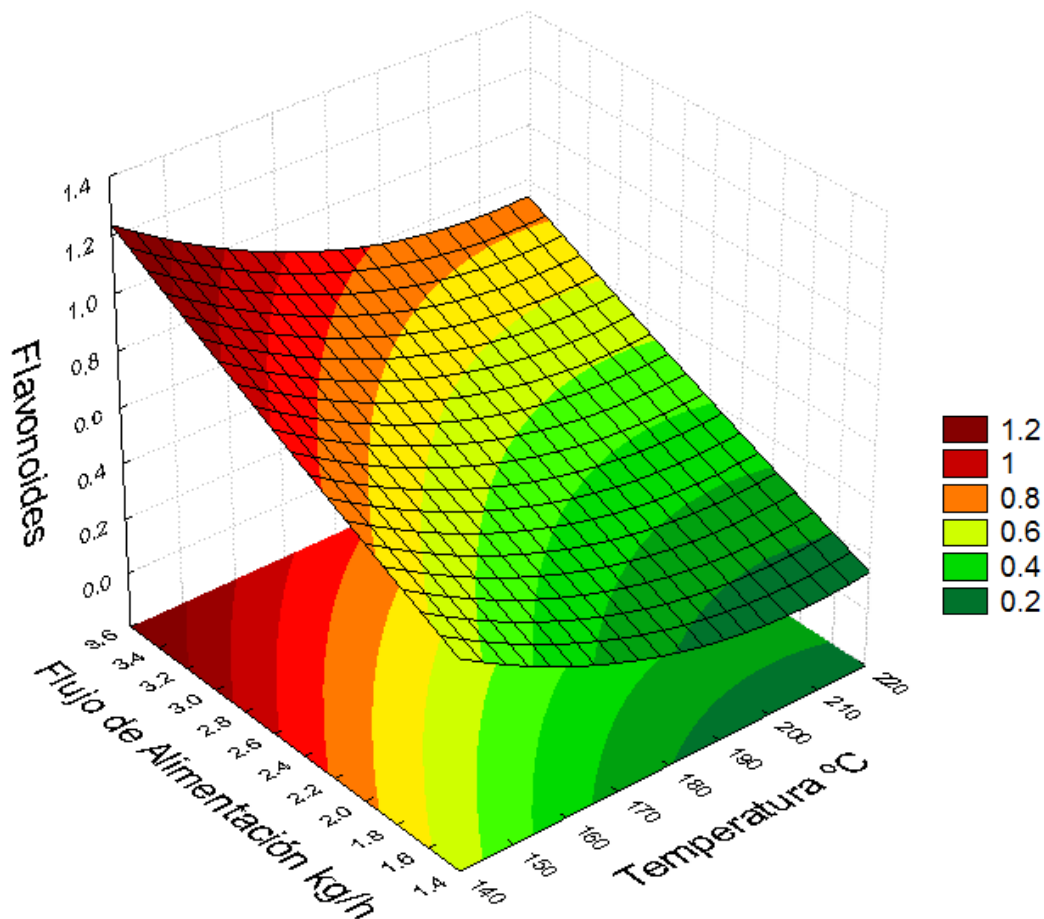


Figura 27. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en el contenido de flavonoides.

#### 4.4.3. Capacidad antioxidante.

En el Cuadro 14 se muestran los valores promedio de la capacidad antioxidante del lote 1 y 2. El lote tuvo un efecto significativo en el porcentaje de inhibición. En el análisis estadístico (ANOVA), la temperatura del aire de entrada ( $p=0.00$ ) y el flujo

de alimentación ( $p=0.00$ ) mostraron un efecto significativo en el % de inhibición. El mayor % de inhibición se obtuvo a la temperatura más baja 160 °C y el mayor flujo de alimentación 3 kg/h (Cuadro 14).

Cuadro 14. Datos del % de inhibición (%I).

	$T_{in}$ °C	FA (kg/h)	% Inhibición %I
Hojas frescas			93.66±0.55
	160	2	87.67±0.32
	160	3	89.09±4.37
	200	2	88.89±5.18
	200	3	80.48±5.35

La capacidad antioxidante asociada a los flavonoides se refleja en el % de inhibición, en el tratamiento de 160 °C y 3 kg/h ya que el mayor contenido de flavonoides se obtuvo también a estas condiciones, sin embargo la tendencia de las demás condiciones de secado no es la misma que los flavonoides ni los compuestos fenólicos, por lo que se puede inferir que dicha actividad biológica es mayoritariamente atribuida a otros compuestos antioxidantes más que a los compuestos fenólicos obtenidos en la fracción de metanol acidificado.

El porcentaje de inhibición disminuyó en todos los tratamientos de secado en comparación con el porcentaje de inhibición en hoja fresca, en los diferentes tratamientos de secado el porcentaje de inhibición decrece con temperatura alta, este comportamiento es similar al reportado por Georgetti et al. (2008) en el secado por aspersion de extracto de soya con y sin encapsulante y por Krishnaiah et al. (2011) en el secado por aspersion de *Morinda citrifolia*.

Esto podría deberse a que las moléculas con poder antioxidante pueden tener reacciones de oxidación y/o descomposición de compuestos termolábiles así como también la pérdida de algunas sustancias volátiles durante el secado por aspersion y estas reacciones se incrementan al aumentar la temperatura.

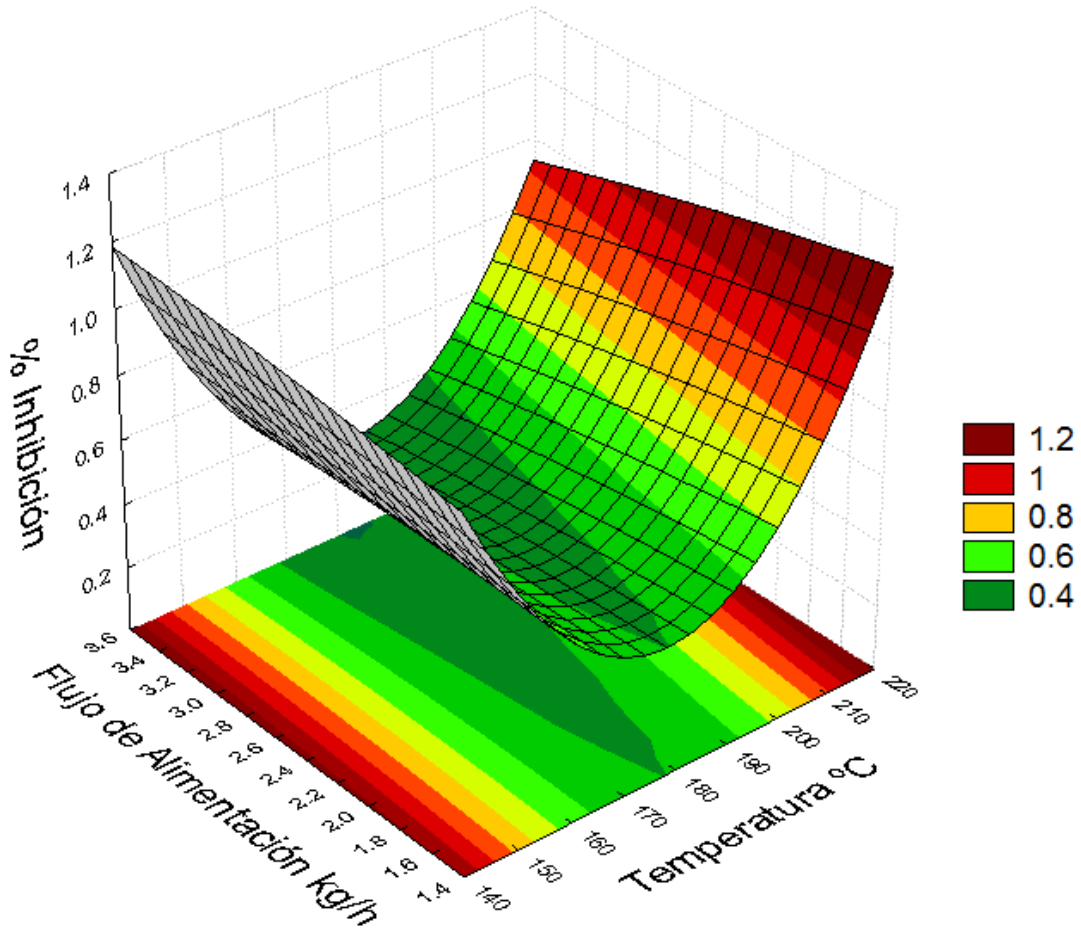


Figura 28. Superficie respuesta del efecto de las variables de secado en la capacidad antioxidante.

El porcentaje de inhibición (%I) presentó dos puntos máximos (Figura 28) uno en bajas temperaturas 140-145 °C y un amplio rango de flujos de alimentación 1.4-3.6 kg/h y otro punto máximo en altas temperaturas 200-210 °C y flujos de 1.4-2.4 kg/h, este comportamiento posiblemente se deba a que en el análisis factorial de los resultados en la experimentación no hubo diferencias significativas entre las condiciones de secado de 160 °C y 3 kg/h (89.09 % I) y la condición de 200 °C y 2 kg/h (88.89 % I).



## VI. Conclusiones

### Conclusiones

El secado por aspersión del extracto acuoso de hojas frescas de stevia es eficiente para la conservación de esteviósido y rebaudiósido A sin el uso de encapsulantes. En todos los tratamientos de secado por aspersión, la concentración de esteviósido y rebaudiósido A disminuyó, esto podría deberse a las reacciones de hidrólisis térmica. En los tratamientos de secado con la mayor velocidad de flujo de alimentación, se encontraron las concentraciones más bajas de esteviósido y rebaudiósido A. Con los resultados obtenidos del análisis de superficie respuesta, se recomienda un tratamiento de secado por aspersión de 220 °C y 1.4 kg/h, donde se encuentran altas concentraciones de rebaudiósido A y bajas concentraciones de esteviósido, lo que representa una ventaja ya que podría llegar a disminuir el regusto amargo ya que el esteviósido es una de las moléculas a la que se le atribuye el regusto amargo. En todos los tratamientos de secado aplicados se obtuvieron contenidos de humedad por debajo del 10% asegurando la estabilidad a las degradaciones enzimáticas, microbiológicas y oxidativas en los polvos secos, y se obtuvieron rendimientos mayores al 79%. Los compuestos antioxidantes fueron afectados por las altas temperaturas el mayor contenido de compuestos antioxidantes se obtuvo en la menor temperatura (160 °C), en el secado por aspersión se conservaron los compuestos antioxidantes aún sin utilizar agentes encapsulantes.

El secado por aspersión del extracto acuoso de hojas frescas de stevia sin utilizar agentes encapsulantes permite obtener un producto con concentraciones mayores a 47 mg/g hs de rebaudiósido A y de 30 mg/g hs de esteviósido, con compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos y flavonoides) y con contenidos de humedad menores al 2.5%.

## Recomendaciones

El análisis de superficie respuesta mostró que a temperaturas entre 170 a 190 °C y flujos de alimentación e 1.4 a 1.6 kg/h se reducen las reacciones de hidrólisis. Con el propósito de evaluar la energía mínima para la reacción de hidrólisis es recomendable realizar pruebas de secado por aspersion disminuyendo la temperatura del aire de entrada iniciando con la prueba de la temperatura mínima 100 °C y un flujo de alimentación de 1.5 kg/h que son las condiciones mínimas a las cuales puede trabajar el secador Niro-atomizer.

La cantidad de sólidos en la alimentación puede ser incrementada para un proceso de secado más efectivo. Masters (1985) indica que el incrementar de 10 % a 25 % la cantidad de solidos de la solución que se alimenta al secador por aspersion reduce la demanda de energía en 2/3. El límite del contenido de solidos depende de la reología de la alimentación, que determina la posibilidad de dispersión de la alimentación. El contenido de solidos de extractos de stevia fue de 2% por lo que el gasto energético se emplea para evaporar el 98% de agua. La factibilidad técnica económica del secado por aspersion depende de una mayor cantidad de solidos presentes en el extracto. Se hace necesario el estudio del secado por aspersion de extractos con concentraciones de solidos mayores a 10%.

El uso de encapsulantes reduce la pérdida de glucósidos y antioxidantes (Duduku Krishnaiah, Sarbatly y Nithyanandam, 2012; Anandharamakrishnan y Ishwarya, 2015; Chranioti, Chanioti y Tzia, 2015). El uso de hidratos de carbono como agentes encapsulantes incorpora elementos que aumentan el índice glucémico de la stevia. Es recomendable estudiar el secado por aspersion del extracto acuoso de hojas frescas de stevia con encapsulantes que tengan bajo o cero índice glucémico (inulina, oligofruktosas, gelatina), con el fin de conservar un mayor contenido de glucósidos de esteviol y de las moléculas antioxidantes.

La hidrólisis de los glucósidos para obtener azúcares reductores se ve favorecida por el pH ácido. El pH del extracto de stevia es ligeramente ácido (5.6). El secado

de extracto acuoso de hojas frescas de stevia basificado podría reducir las reacciones de hidrólisis de glucósidos.

### Referencias bibliográficas

- A.O.A.C. (1984) *Oficial Methods of Analysis of the Association of Oficial Analytical Chemists*. Arlington, Virginia.
- Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A. y Abu-Salem, M. F. (2010) "Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertoni plant", *African Journal of Food Science*(2010), 4(May), pp. 269–281.
- Anandharamakrishnan, C. y Ishwarya, S. P. (2015) *Spray drying technique for food ingredient encapsulation*. Editado por I. Press. WILEY Blackwell.
- Aranda-González, I., Moguel-Ordoñez, Y. y Betancur-Ancona, D. (2015) "Determination of Rebaudioside A and Stevioside in Leaves of *S. rebaudiana* Bertoni Grown in México by a Validated HPLC Method", *American Journal of Analytical Chemistry*, 6, pp. 878–885.
- Ayora, M. J. (2005) "Cromatografía de líquidos", en *Tècniques cromatogràfiques*, pp. 1–40.
- Bemiller, J. N. (1967) "Acid-Catalyzed Hydrolysis of Glycosides", en *Advances in Carbohydrate Chemistry*, pp. 25–108. doi: 10.1016/S0096-5332(08)60151-4.
- Brahmkshatriya, P. P. y Brahmkshatriya, P. S. (2013) *Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications, Natural Products*. Springer. doi: 10.1038/188440b0.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995) "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), pp. 25–30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

- Bruneton, J. (2001) *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales*.
- Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S. y Kroh, L. . (2006) “Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, pp. 3229-32–35.
- Cargill. (2008) “Cargill GRAS Notification for Rebaudioside A.” Washington, DC.: FDA.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H. y Wen, H.-M. (2002) “Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods”, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), pp. 178–182. doi: N/A.
- Chranioti, C., Chanioti, S. y Tzia, C. (2015a) “Comparison of spray, freeze and oven drying as a means of reducing bitter aftertaste of steviol glycosides (derived from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant) - Evaluation of the final products”, *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 190, pp. 1151–1158. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.083.
- Chranioti, C., Chanioti, S. y Tzia, C. (2015b) “Microencapsulation of steviol glycosides ( *Stevia rebaudiana* Bertoni ) by a spray drying method – Evaluation of encapsulated products and prepared syrups”, *International Journal of food studies*, 4(October), pp. 212–220.
- Drago Serrano, M. E., López López, M. y Saínez Espuñez, T. del R. (2016) “Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal Bioactive Components of Functional Foods from Vegetable ...”, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(March).
- Durán A, S., Rodríguez N., M. del P. y Cordon A., K. (2012) “Stevia ( *stevia rebaudiana* ), non-caloric natural sweetener”, *Revista chilena de nutrición*, 39(4), pp. 203–206.
- FDA, (Food and drugs administration) (2010) *FDA 2010*.
- Galperin de Levy, R. H. (1982) “*Stevia rebaudiana* Bertoni: Extracción, Purificación y empleo del steviósido.”, *INFYB*, 7, pp. 47–57.

- Georgetti, S. R., Casagrande, R., Souza, C. R. F., Oliveira, W. P. y Fonseca, M. J. V (2008) "Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity", *LWT - Food Science and Technology*, 41(8), pp. 1521–1527. doi: 10.1016/j.lwt.2007.09.001.
- Gonzalo Rivas, J. C. y García Alonso, M. (2002) "Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante", *Alimentación Nutrición y Salud*, Vol.9, pp. 31–38.
- Gracia Nava, M. A. (2006) "Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales", *Universidad Autonoma de Querétaro*, pp. 1–4. doi: 10.1590/S0102-695X2010000200015.
- Grajales, R. (1996) *Reconstrucción de un secador por aspersion y desarrollo de un modelo matemático para la predicción de las condiciones de secado*. ENCB-IPN.
- Gutiérrez Avella, D. M., Ortiz García, A. C. y Mendoza Cisneros, A. (2008) "Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal", *Simposio de Metrologia*, pp. 1–5.
- Hurtado, Y. y German, E. (2003) "Diseño de un secador por atomización a nivel piloto para jugo concentrado de tomate de árbol", pp. 1–121.
- Jarma O., A., Combatt C., E. y Polo S., J. (2012) "Deficiencias nutricionales en *Stevia rebaudiana* Bert . glycoside contents depending on the nutrient deficiencies in *Stevia rebaudiana* Bert .", *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 3, pp. 107–116.
- Jiménez, T., Cabrera, G. y Alvarez, E. (2010) "Evaluation of the content of stevioside and rebaudioside A in a population of *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaâ heê) commercially cultivated. A preliminary study", *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.*, 8(1), pp. 47–53.
- Jiménez Monreal, A. M., Sánchez Manzanera, M. y Martínez Tomé, M. (2012) "Optimization of the DPPH method to evaluate antioxidant activity of coffee brew", *Anales de veterinaria de Murcia*, 28, pp. 67–78.

- Jooker, E., Amery, R., Struyf, T., Duquenne, B. y Geuns, J. (2012) "Stability of Steviol Glycosides in Several Food Matrices".
- Kinghorn, A. D., Soejarto, D. D., J. Kennelly, E., Cerda-García-Rojas, C. M., Pereda-Miranda, R., S.H.L.Kim, D., Ohtani, K., Yamasaki, K., J. Huxtable, R., Mizutani, K., Tanaka, O., Kim, J., Choi, Y. H. y Choi, Y.-H. (2002) *stevia-The genus stevia*. Editado por F. and Taylor. London.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. y Nithyanandam, R. (2012) "Microencapsulation of Morinda citrifolia L. extract by spray-drying", *Chemical Engineering Research and Design*. Institution of Chemical Engineers, 90(5), pp. 622–632. doi: 10.1016/j.cherd.2011.09.003.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. y Nithyanandam, R. (2012) "Optimization of Morinda Citrifolia L. fruit extract.pdf", *Chemical Engineering Research and Design*, pp. 622–632.
- Kroyer, G. T. (1999) "The low calorie sweetener stevioside: stability and interaction with food ingredients.", *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32, pp. 509–512.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L. y Kong, A.-H. (2012) "Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects", *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 132(3), pp. 1121–1132. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140.
- López Hernández, O. D., Castillo Menéndez, R. A. y Peña, García, M. C. (2010) "Estudio de secado por aspersion de extractos de Plectranthus amboinicus , Ocimum tenuiflorum , Passiflora incarnata , Matricaria recutita", *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*.
- López Hernández, O. D., Muñoz Cernada, A. y Torres Amaro, L. (2006) "Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersion de extracto acuoso de Calendula officinalis L.", *revista cubana Plant Med*, 11(1), pp. 296–297.

- López Hernández, O. D., Torres Amaro, L. y Chávez Figueredo, D. (2008) “Secado por aspersión de extracto acuoso de *Bidens alba* L. a escalas de laboratorio y banco”, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 1999, Editorial Ciencias Médicas, 13(4).
- López Hernández, O. D., Torres Amaro, L., González Sanabia, M. L. y Rodríguez Ferradá, C. A. (2008) “Estudio de secado por aspersión hasta escala de banco del extracto acuoso de *Boerhaavia erecta* L.”, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- Macia, E. y Monesterolo, V. (2008) “Evaluación de los procesos de extracción y purificación de los compuestos endulzantes de la hoja de *Stevia rebaudiana*”, *Edutecne.Utn.Edu.Ar*.
- Madan, S., Ahmad, S., Singh, G. N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R. y Garg, M. (2010) “*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni - A Review”, *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(3), pp. 267–286.
- Masters, K. (1985) *Spray Drying*. Editado por G. Godwin. London.
- Masters, K. (1991) *Applications in the food industry. In Spray Drying Handbook*. 5a ed. New York: Longman Scientific & Technical.
- Maury, M., Murphy, K., Kumar, S., Shi, L. y Lee, G. (2005) “Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(3), pp. 565–573. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.10.002.
- Miller, G. L. (1959) “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”, *Analytical Chemistry*, 31(3), pp. 426–428.
- Montgomery, D. C. (2004) *Diseño y análisis de experimentos*. segunda ed. Editorial Limusa S.A de C.V.
- Oliveira, A. C. De, Valentim, I. B. y Goulart, M. O. F. (2009) “Fontes vegetais naturais de antioxidantes”, *Química Nova*, 32(3), pp. 689–702. doi: 10.1590/S0100-40422009000300013.

- Orozco, A. J., Cardona Ayala, C. y Fernández Herrera, C. (2012) “Producción de glucósidos de esteviol en *Stevia rebaudiana* en el caribe húmedo colombiano”, *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, pp. 339–347.
- Pang, S. F., Yusoff, M. M. y Gim bun, J. (2014) “Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts”, *Food Hydrocolloids*, 37, pp. 159–165.
- Pangborn, R. (1963) “Relative taste intensities of selected sugars and organic acids”, *Journal of Food Science*, 6(28), pp. 726–733.
- Parpinello, G. P., Versari, A., Castellari, M. y Galassi, S. (2001) “Stevioside as a replacement of sucrose in peach race: sensory evaluation.”, *Journal of Sensory Studies*, 5(16), pp. 471–484.
- Periche, A., Castelló, M. L., Heredia, A. y Escriche, I. (2015) “Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves.”, *Food chemistry*. Elsevier Ltd, 172, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.029.
- Puri, M., Sharma, D. y Tiwari, A. K. (2011) “Downstream processing of stevioside and its potential applications.”, *Biotechnology Advance*, 29, pp. 781–791.
- Purkayastha, S., Markosyan, A., Prakash, I., Bhusari, S., Pugh, G., Lynch, B. y Roberts, A. (2016) “Steviol glycosides in purified stevia leaf extract sharing the same metabolic fate”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Elsevier Ltd, 77, pp. 125–133. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.02.015.
- Shukla, S., Mehta, A. y Menta, P. & B. (2012) “Antioxidant ability and phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Experimental and Toxicologic”, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64, pp. 807–811.
- Singh, S. D. y Rao, G. P. (2005) “Stevia: The herbal sugar of 21st century”, *Sugar Tech*, 7(1), pp. 17–24. doi: 10.1007/BF02942413.



- Toneli, J., Park, K. J., Murr, F. y Negreiros, A. (2006) "Proceedings of the 15th International Drying Symposium", en *Spray drying optimization to obtain inulin powder*. Budapest, Hungary.
- Tonon, R. V., Brabet, C. y Hubinger, M. D. (2008) "Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying", *Journal of Food Engineering*, 88(3), pp. 411–418. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029.
- Treyball, R. E. (1996) *Operaciones Unitarias de Transferencia de Masa*. Editado por McGraw-Hill. México.
- Wölwer-Rieck, U. (2012) "The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: A review", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), pp. 886–895. doi: 10.1021/jf2044907.
- Ye, F., Yang, R., Hua, X., Shen, Q., Zhao, W. y Zhang, W. (2013) "Modification of stevioside using transglucosylation activity of bacillus amyloliquefaciens alpha-amylase to reduce its bitter aftertaste.", *LWT-Food Science and Technology*, 2(51), pp. 524–530.
- Yikrazuul (sin fecha) *Wikipedia*. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Estevi%25C3%25B3sido#/media/File:Stevioside.svg>.
- Yildiz-Ozturk, E., Nalbantsoy, A., Tag, O. y Yesil-Celiktas, O. (2015) "A comparative study on extraction processes of *Stevia rebaudiana* leaves with emphasis on antioxidant, cytotoxic and nitric oxide inhibition activities", *Industrial Crops and Products*. Elsevier B.V., 77, pp. 961–971. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.10.010.

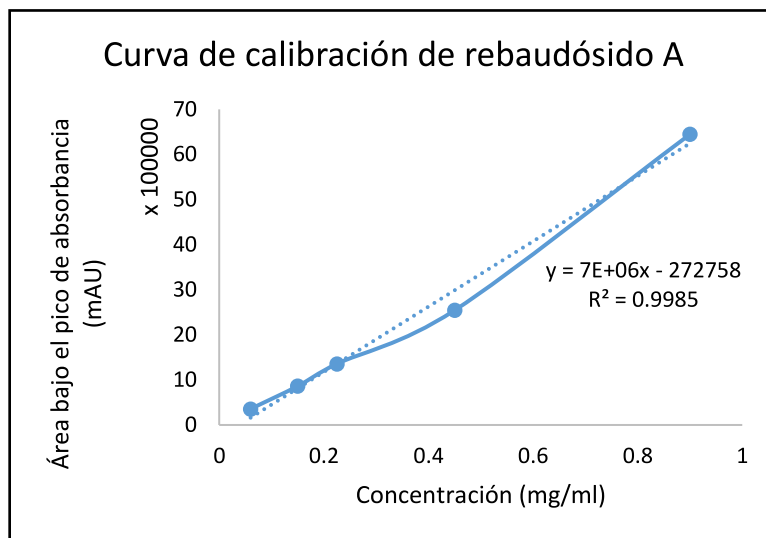
## **Anexos**

Anexo 1. Curvas de calibración .....	81
Anexo 2. Datos obtenidos de la cuantificación de las variables de interés ..	84
Anexo 3. Datos del análisis de varianza de las variables de interés .....	88

## Anexo 1. Curvas de calibración

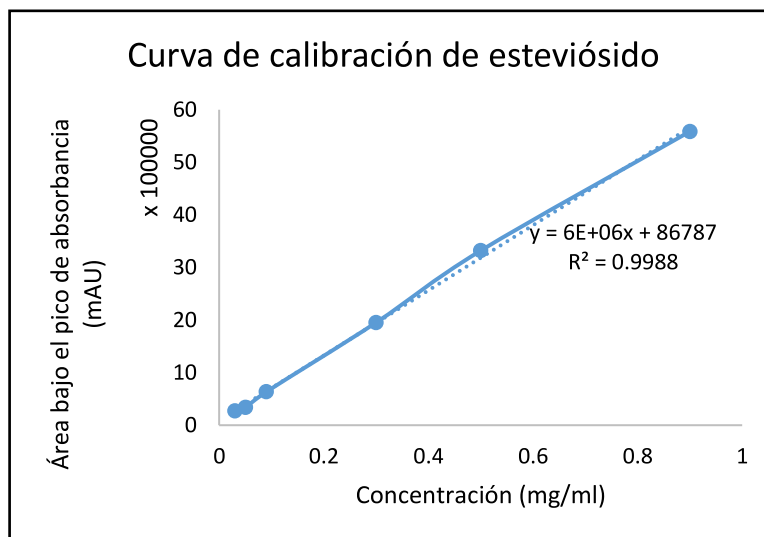
a) Rebaudiósido A.

Concentración (mg/ml)	Área (mAU)
0.9	626932.81
0.45	316228.18
0.225	190292.94
0.15	113471.17
0.06	48079.1



b) Esteviósido

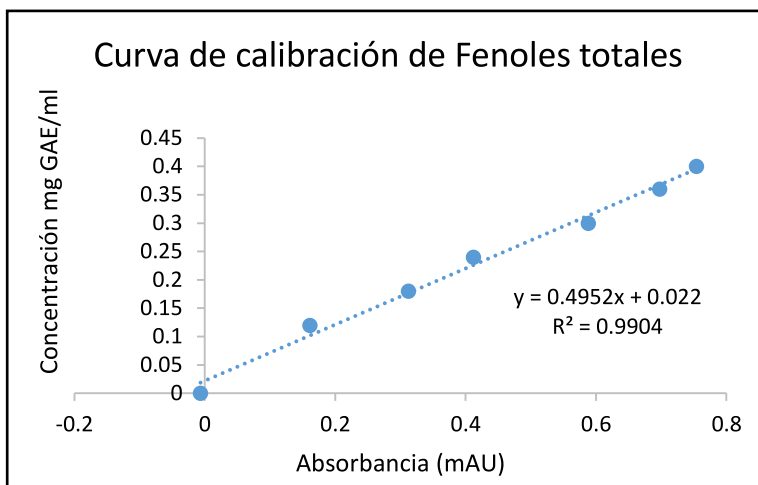
Concentración (mg/ml)	Área (mUA)
0.9	5586553.08
0.5	3319243.55
0.3	1952312.90
0.09	634330.47
0.05	337700.90
0.03	271274.53



c) Ácido Gálico (para cuantificación de compuestos fenólicos totales)

Concentración (mg GAE/ml)	Absorbancia (mAU)
0.4	0.754338
0.36	0.69796
0.3	0.588194
0.24	0.41224
0.18	0.3127
0.12	0.161356
0	-0.006582

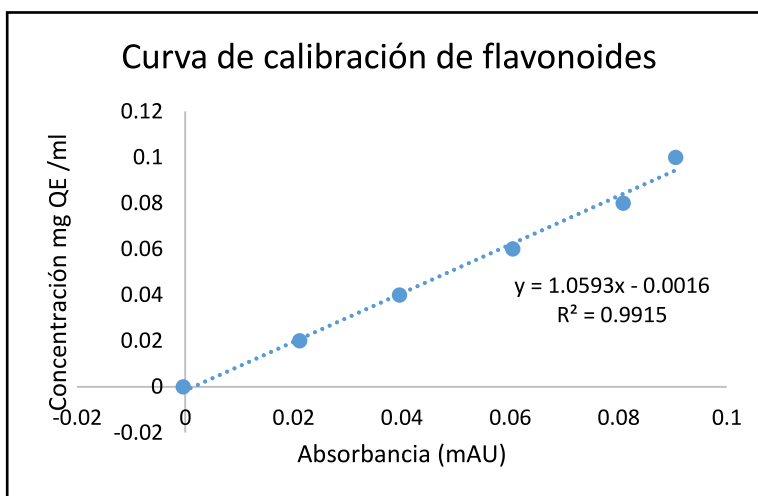
\*GAE: ácido gálico equivalente.



d) Quercetina (para cuantificación de flavonoides)

Concentración (mg QE/ml)	Absorbancia (mAU)
0	-0.000401
0.02	0.021165
0.04	0.039561
0.06	0.060514
0.08	0.080898
0.10	0.09061

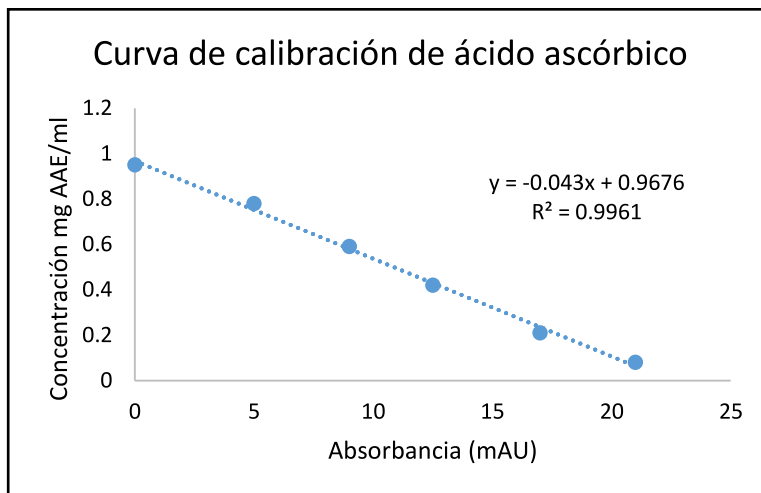
\*QE: quercetina equivalente



e) Ácido ascórbico (determinación de % de inhibición)

Concentración (mg AAE/ml)	Absorbancia (mAU)
21	0.08
17	0.21
12.5	0.42
9	0.59
5	0.78
0	0.95

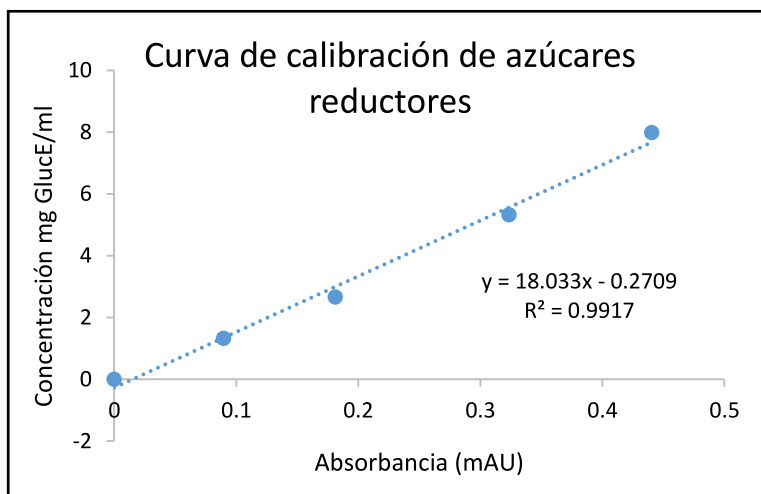
\*AAE: ácido ascórbico equivalente



f) Glucosa (para cuantificar azúcares reductores)

Concentración mg GlucE/ml	Absorbancia (mAU)
0	0
7.985	0.440
5.323	0.324
2.662	0.181
1.331	0.090

\*GlucE: glucosa equivalente



## Anexo 2. Datos obtenidos de la cuantificación de las variables de interés

Contenido de estevósido y rebaudiósido A en los polvos obtenidos en las diferentes condiciones de secado.

LOTE 1			
FA (kg/h)	T <sub>in</sub> °C	Rebaudiósido A (mg/g hs)	Estevósido (mg/g hs)
2	200	59.00144	38.014
2	200	58.3475	37.761
3	200	54.64193	31.78291
3	200	53.80873	31.47114
2	160	56.99	36.95291
2	160	56.8925	36.96646
3	160	50.75781	34.88156
3	160	50.57675	34.84973
2.5	180	56.61217	37.35854
2.5	180	57.26044	37.99371

LOTE 2			
FA (kg/h)	T <sub>in</sub> °C	Rebaudiósido A (mg/g hs)	Estevósido (mg/g hs)
2	200	59.38264858	37.3910955
2	200	58.9711875	37.1379244
2	200	59.16226295	38.5035710
3	200	41.0734877	27.4379718
3	200	41.9874114	29.4730956
3	200	41.5729469	29.0272184
2	160	57.1654008	43.6857889
2	160	57.213125	43.9938003
2	160	57.816339	41.0917633
3	160	44.36386101	31.1250473
3	160	44.65321245	32.2101266
3	160	44.73016272	31.645
2.5	180	54.307516	40.2281066
2.5	180	53.8469336	39.2305209
2.5	180	54.5080403	41.5458133

Los datos de los cuadros son el promedio de las mediciones que se realizaron por triplicado.

Resultados obtenidos del contenido de humedad y el rendimiento de los polvos de secado.

LOTE 1			
FA (kg/h)	T <sub>in</sub> °C	%CHbs	% y
2	200	2.242872393	81.2448921
2	200	1.179646115	82.3224942
3	200	2.606253453	87.4663349
3	200	1.32643859	88.1673953
2	160	2.311901877	78.2664602
2	160	1.200528411	79.6707168
3	160	4.209892937	78.9542803
3	160	1.440435824	79.2623449
2.5	180	1.619097574	99.9717079
2.5	180	1.280652771	99.5083881

LOTE 2			
FA (kg/h)	T <sub>in</sub> °C	%CHbs	% y
2	200	1.345465633	86.3363319
2	200	1.354493076	86.5220889
2	200	1.395207765	86.4719616
3	200	1.502560059	86.4567942
3	200	1.770705333	85.8947945
3	200	1.740968099	86.3663714
2	160	1.405523112	80.4338571
2	160	1.447683706	80.060322
2	160	1.4735363	79.8678619
3	160	1.987614862	78.7147146
3	160	2.108313349	79.787347
3	160	2.067518977	78.28076
2.5	180	1.369615498	87.1920488
2.5	180	1.362904848	86.0758872
2.5	180	1.589217461	87.0917393

Resultados obtenidos del contenido de fenoles y flavonoides en los polvos de secado.

LOTE 1			
FA (kg/h)	T <sub>in</sub> °C	Fenoles (mg GAE/g hs)	Flavonoides (mg QE/g hs)
2	200	26.0042357	104.928494
2	200	25.8568844	105.227657
3	200	30.8968394	118.926127
3	200	28.3692964	118.733402
2	160	33.3355647	113.191314
2	160	32.5409591	113.650118
3	160	30.9524512	127.860686
3	160	28.9173596	127.132241
2.5	180	30.6728271	120.545644
2.5	180	31.5773084	120.626934

LOTE 2			
FA (kg/h)	T <sub>in</sub> °C	Fenoles (mg GAE/g hs)	Flavonoides (mg QE/g hs)
2	200	40.6614364	109.9461554
2	200	40.486907	110.9032123
2	200	41.5493368	110.5495053
3	200	40.8027683	116.0541549
3	200	41.3025611	118.1340149
3	200	42.3303967	117.5971813
2	160	49.9416295	117.3382142
2	160	50.8404732	116.8519011
2	160	49.017392	117.0950577
3	160	47.2136925	124.9747943
3	160	47.1050576	125.0456128
3	160	47.3256344	124.0075194
2.5	180	41.9321621	111.5859943
2.5	180	41.9850188	112.2984551
2.5	180	40.9279179	112.7063974



Resultados obtenidos del contenido del porcentaje de inhibición (%I) en los polvos de secado.

<b>LOTE 1</b>		
FA (kg/h)	T <sub>in</sub> °C	% I
2	200	89.2819817
2	200	89.1351645
3	200	85.8461079
3	200	85.7607209
2	160	87.1956357
2	160	87.8508667
3	160	89.3274346
3	160	89.9465313
2.5	180	88.5074729
2.5	180	88.9674664

<b>LOTE 2</b>		
FA (kg/h)	T <sub>in</sub> °C	% I
2	200	88.5466652
2	200	88.4764593
2	200	89.0307965
3	200	76.3118735
3	200	76.87913
3	200	77.5880469
2	160	86.6421127
2	160	86.9677017
2	160	85.4781032
3	160	90.3142438
3	160	89.3695581
3	160	90.7007925
2.5	180	68.2532298
2.5	180	67.7608837
2.5	180	67.8874715

### Anexo 3. Datos del análisis de varianza de las variables de interés.

Cuadro de análisis de varianza del contenido de rebaudiósido A.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: FA</b>	1	508.4019	508.4019	4285.50	0.000000*	1.000000
<b>B: T</b>	1	4.865545	4.865545	41.01	0.000034*	0.999947
<b>C: Lotes</b>	1	95.16932	95.16932	802.22	0.000000*	1.000000
<b>AC</b>	1	116.6657	116.6657	983.42	0.000000*	1.000000
<b>BC</b>	1	12.89167	12.89167	108.67	0.000000*	1.000000
<b>ABC</b>	1	13.21243	13.21243	111.37	0.000000*	1.000000
<b>S</b>	12	1.423596	0.118633			
<b>Total (Adjusted)</b>	19	883.4064				
<b>Total</b>	20					

\* Term significant at alpha = 0.05

Cuadro de análisis de varianza del contenido de esteviósido.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: FA</b>	1	246.2412	246.2412	324.84	0.000000*	1.000000
<b>B: T</b>	1	33.52395	33.52395	44.22	0.000024*	0.999979
<b>C: Lotes</b>	1	5.608761E-02	5.608761E-02	0.07	0.790236	0.057246
<b>AC</b>	1	42.77371	42.77371	56.43	0.000007*	0.999999
<b>BC</b>	1	10.61865	10.61865	14.01	0.002808*	0.929204
<b>ABC</b>	1	12.28311	12.28311	16.20	0.001683*	0.957890
<b>S</b>	12	9.096437	0.7580364			
<b>Total (Adjusted)</b>	19	419.2319				
<b>Total</b>	20					

\* Term significant at alpha = 0.05

Cuadro de análisis de varianza del contenido de azúcares reductores.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: FA</b>	1	1170.447	1170.447	3593.5	0.000000*	1.000000
<b>B: T</b>	1	30.74004	30.74004	94.38	0.000000*	1.000000
<b>C: Lotes</b>	1	15043.8	15043.8	46187.8	0.000000*	1.000000
<b>AC</b>	1	251.8108	251.8108	773.12	0.000000*	1.000000
<b>BC</b>	1	1.548088E-02	1.54808E-02	0.05	0.831082	0.054648
<b>ABC</b>	1	200.2905	200.2905	614.94	0.000000*	1.000000
<b>S</b>	12	3.90851	0.3257092			
<b>Total (Adjusted)</b>	19	17146.9				
<b>Total</b>	20					

\* Term significant at alpha = 0.05

Cuadro de análisis de varianza del contenido de humedad.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: FA</b>	1	1.508812	1.508812	3.07	0.105069	0.364636
<b>B: T</b>	1	0.5581797	0.5581797	1.14	0.307277	0.165846
<b>C: Lotes</b>	1	0.8935033	0.8935033	1.82	0.202219	0.237263
<b>AC</b>	1	4.931585E-02	4.931585E-02	0.10	0.756733	0.059852
<b>BC</b>	1	5.901055E-02	5.901055E-02	0.12	0.734821	0.061801
<b>ABC</b>	1	7.741416E-02	7.741416E-02	0.16	0.698267	0.065511
<b>S</b>	12	5.891219	0.4909349			
<b>Total (Adjusted)</b>	19	9.262757				
<b>Total</b>	20					

\* Term significant at alpha = 0.05

Cuadro de análisis de varianza del rendimiento de los polvos de secado.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: FA</b>	1	2.101488	2.101488	10.55	0.006973*	0.846212
<b>B: T</b>	1	214.5304	214.5304	1077.44	0.000000*	1.000000
<b>C: Lote</b>	1	4.152786E-02	4.15278E-02	0.21	0.656050	0.070569
<b>AC</b>	1	6.548055E-03	6.54805E-03	0.03	0.859123	0.053213
<b>BC</b>	1	8.351135E-02	8.35113E-02	0.42	0.529423	0.091766
<b>ABC</b>	1	1.819757E-02	1.81975E-02	0.09	0.767589	0.058959
<b>S</b>	12	2.389342	0.1991118			
<b>Total (Adjusted)</b>	19	231.0046				

\* Term significant at alpha = 0.05

Cuadro de análisis de varianza del contenido fenólico total.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: FA</b>	1	0.6219679	0.6219679	0.82	0.383970	0.132499
<b>B: T</b>	1	146.2539	146.2539	192.01	0.000000*	1.000000
<b>C: Lotes</b>	1	1119.559	1119.559	1469.83	0.000000*	1.000000
<b>AC</b>	1	2.416568	2.416568	3.17	0.100187	0.374337
<b>BC</b>	1	16.69825	16.69825	21.92	0.000530*	0.989891
<b>ABC</b>	1	3.484637	3.484637	4.57	0.053697	0.502782
<b>S</b>	12	9.14033	0.7616942			
<b>Total (Adjusted)</b>	19	1353.348				
<b>Total</b>	20					

\* Term significant at alpha = 0.05

Cuadro de análisis de varianza del contenido de flavonoides.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: FA</b>	1	534.3494	534.3494	1593.13	0.000000*	1.000000
<b>B: T</b>	1	289.2736	289.2736	862.45	0.000000*	1.000000
<b>AB</b>	1	0.3692858	0.3692858	1.10	0.314720	0.162090
<b>C: Lotes</b>	1	6.554128	6.554128	19.54	0.000835*	0.981473
<b>AC</b>	1	54.27902	54.27902	161.83	0.000000*	1.000000
<b>BC</b>	1	2.639826	2.639826	7.87	0.015883*	0.731087
<b>ABC</b>	1	6.3857E-02	6.3857E-02	0.19	0.670341	0.068759
<b>S</b>	12	4.024907	0.335409			
<b>Total</b>	20					

\* Term significant at alpha = 0.05

Cuadro de análisis de varianza de la capacidad antioxidante.

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
<b>A: FA</b>	1	54.76918	54.76918	183.32	0.000000*	1.000000
<b>B: T</b>	1	50.91936	50.91936	170.43	0.000000*	1.000000
<b>C: Lotes</b>	1	30.42385	30.42385	101.83	0.000000*	1.000000
<b>AC</b>	1	1.835966	1.835966	6.15	0.029014*	0.624728
<b>BC</b>	1	22.87225	22.87225	76.56	0.000001*	1.000000
<b>ABC</b>	1	60.76855	60.76855	203.40	0.000000*	1.000000
<b>S</b>	12	3.585204	0.298767			
<b>Total (Adjusted)</b>	19	369.813				
<b>Total</b>	20					

\* Term significant at alpha = 0.05