

UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAVELICA

(CREADA POR LEY N° 25265)



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGROINDUSTRIAS
TESIS

“EXTRACCIÓN DE EDULCORANTE A PARTIR DE LA
HOJA DE STEVIA (*Stevia rebaudiana Bertoni*)
PROVENIENTE DE CULTIVO INVITRO”

LINEA DE INVESTIGACIÓN

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

LLACTA HUAROC Mildor

ACOBAMBA - HUANCAVELICA - PERÚ

2014

**ACTA DE SUSTENTACION O APROBACION DE UNA DE LAS MODALIDADES DE
TITULACION**

En la Ciudad Universitaria de "Común Era"; auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, a los 23 días del mes de Julio del año 2014, a horas 4:00 P.M. Se reunieron; el Jurado Calificador, conformado de la siguiente manera:

- PRESIDENTE : Dr. David RUÍZ VÍLCHEZ
- SECRETARIO : Ing. Alfonso RUIZ RODRIGUEZ
- VOCAL : Ing. Virgilio VALDERRAMA PACHO

Designados con Resolución N° 0023-2011-FCA-CGT-UNH; del: proyecto de investigación
Titulado: **"EXTRACCIÓN DE EDULCORANTE APARTIR DE LA HOJA DE STEVIA (*Stevia rebaudiana Bertoni*) PROVENIENTE DE CULTIVO INVITRO"**

Cuyo autor es él graduado:

BACHILLER: Mildor, LLACTA HUAROC

A fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del: proyecto de investigación, antes citado.

Finalizado la evaluación; se invitó al público presente y al sustentante abandonar el recinto; y, luego de una amplia deliberación por parte del jurado, se llegó al siguiente el resultado:

- APROBADO POR Mayoría
- DESAPROBADO

En conformidad a lo actuado firmamos al pie.



 Dr. David RUÍZ VÍLCHEZ
 PRESIDENTE




 Ing. Alfonso RUIZ RODRIGUEZ
 SECRETARIO



 Ing. Virgilio VALDERRAMA PACHO
 VOCAL

ASESOR

Ing. Rafael Julian MALPARTIDA YAPIAS

VºBº


COASESOR

Ing. Santiago Oscar, PUENTE SEGURA

DEDICATORIA

A Dios por estar siempre conmigo, guiar mi camino, darme fuerza para vencer los obstáculos con el anhelo de alcanzar mis sueños y metas.

A mis Padres Miguel y Macedonia, por su enorme sacrificio por haberme brindado la mejor herencia de esta vida una carrera profesional.
Por darme todo su apoyo incondicional, esfuerzo, comprensión y motivación hasta el logro de mis objetivos hacia el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento incondicional a mí Dios por que sin su ayuda no estaría en el lugar de hoy, por tenerme guardado este momento tan esperado y muchas cosas buenas que se vendrán adelante.

Quiero expresar mi agradecimiento, admiración y respeto a las siguientes personas que me apoyaron para la realización de este proyecto de investigación. Al Ing. Rafael Julián Malpartida Yapias, así mismo al Ing. Santiago Oscar, Puente Segura, por su asesoramiento, consejos y apoyo inquebrantable durante la ejecución y culminación de la tesis.

Así mismo quiero expresar mi sincero agradecimiento, admiración y respeto:

- A mis padres; Miguel y Macedonia, que por su constancia, perseverancia quienes me brindan su amor y confianza en las decisiones tomadas en mi desarrollo personal y profesional logrando un sueño en mi vida.
- A todos mis hermanos por el apoyo que me han brindado en el transcurso de mi vida.
- A la Universidad Nacional de Huancavelica, mi alma mater cuyas aulas guardo gratos recuerdos.
- A los Docentes de la Escuela Académico Profesional de Agroindustrias, por sus enseñanzas, consejos y la Facultad de Ciencias Agrarias quienes comparten sus conocimientos de mi manera incondicional.
- Al Ing. Perfecto Chagua Rodríguez quien me apoyo incondicionalmente en la elaboración del informe final de la presente investigación.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
I. PROBLEMA	
1.1. Planteamiento del problema	14
1.2. Formulación del problema	15
1.3. Objetivos	15
1.4. Justificación	15
II. MARCO TEÓRICO	
2.1. Antecedentes	17
2.2. Bases teóricas	19
2.2.1. Stevia	19
2.2.2. Descripción botánica	20
2.2.3. Origen de la Stevia	25
2.2.4. Edulcorantes	27
2.2.5. Ingesta diaria admisible de los edulcorantes	28
2.2.6. Poder edulcorante	29
2.2.7. Clasificación de los edulcorantes	30
2.2.8. Cultivo In Vitro de la stevia	40
2.2.8.1 Propagación de Stevia	42
2.2.8.2 Propagación in vitro y Cultivo de Tejidos	43
2.2.8.3 Fases de la micropogacion	43
2.2.9. Tiamina	48
2.2.10. Kinetina	49
2.2.11. Composición química de la Stevia	49
2.2.12. Poder edulcorante de la Stevia	53
2.2.13. Propiedades de la Stevia	54

2.2.14. Cosecha de la Stevia	56
2.2.15. Industrialización de la Stevia	57
2.2.16. Diversas aplicaciones de la Stevia	60
2.2.17. Características antibacterianas del extracto	62
2.2.18. Ventajas y usos de la Stevia	63
2.2.19. Glucósidos de esteviol	64
2.2.20. Esteviósido	66
2.2.21. Rebaudiósido A	67
2.2.22. Propiedades de los glucósidos de steviol	67
2.2.23. Cromatografía de Líquida de Alta Eficacia (HPLC)	68
2.2.24. Determinación de la concentración de esteviósido	68
2.2.25. Caracterización del steviosido en una muestra al final	70
2.2.26. Métodos de extracción de los componentes activos de la Stevia	72
2.3. Hipótesis	75
2.4. Variables de estudio	75
2.4.1. Independiente	75
2.5.2. Dependiente	75
2.5. Definición operativa de variables e indicadores	87
III.METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	
3.1. Ámbito de estudio	77
3.2. Tipo de Investigación	77
3.3. Nivel de Investigación	77
3.4. Método de Investigación	77
3.5. Diseño de investigación	78
3.5.1. Proceso de extracción de edulcorante proveniente del cultivo in vitro de la hoja de stevia	79
3.5.2. Determinación de esteviosido y revadiosido de la stevia	80
3.6. Población, Muestra, Muestreo	80
3.6.1. Población	80
3.6.2. Muestra	80

3.6.3. Muestreo	80
3.7. Técnicas e Instrumentos de recolección de datos	80
3.7.1. Técnicas	80
3.7.2. Instrumentos	81
3.7.2.1. Materiales	81
3.7.2.2. Equipos	81
3.7.2.3. Reactivos	81
3.7.3. Recolección de datos	81
3.8. Procedimiento de recolección de datos	82
3.8.1. Procedimiento para la identificación y cuantificación por HPLC	82
3.9. Técnicas de procesamiento y Análisis de datos	82
3.9.1. Determinación y cuantificación del esteviosido y rebaudiosido.	82
IV. RESULTADOS	
4.1. Presentación de resultados	83
4.1.1. Presentación de resultados de la determinación de esteviosido y rebaudiosido del cultivo in vitro de la hoja de stevia	94
4.1.2. Utilización del método en la extracción de las hojas de stevia proveniente del cultivo in vitro por el método descrito por Payzant John Donald.	84
4.2. Discusiones	86
Conclusiones	88
Recomendaciones	89
Referencia bibliográfica	90
Artículo científico	95
Anexos	

ÍNDICE DE CUADRO

Cuadro N° 1. Clasificación sistemática de la Stevia	20
Cuadro N° 2. Ingesta diaria admisible de edulcorante.(mg/kg/día)	29
Cuadro N°3. Poder edulcorante de los sustitutos del azúcar, con respecto a la sacarosa	30
Cuadro N° 4. Descripción de edulcorantes calóricos y sus usos	32
Cuadro N° 5. Edulcorantes no calóricos nutritivos de origen natural	35
Cuadro N° 6. Edulcorantes no calóricos o no nutritivos de origen sintético	38
Cuadro N° 7. Composición nutricional de la stevia en estado natural	50
Cuadro N° 8. Nombres químicos de los componentes de la hoja de Stevia	51
Cuadro N° 9. Fitonutrientes presentes en la Stevia.	53
Cuadro N°10. Parámetros generales de calidad de la hoja de (<i>Stevia rebaudiana Bertonii</i>)	59
Cuadro N° 11. Definición operativa de variables e indicadores	76
Cuadro N° 12: Técnicas e Instrumentos de recolección de datos	80
Cuadro N° 13. Determinación del esteviosido y rebaudiosido A del cultivo in vitro de la hoja de stevia	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Clasificación de los edulcorantes utilizados en la industria de alimentos.	31
Figura N° 2. Esquema de propagación in vitro de la Stevia	47
Figura N° 3. Estructuras de esteviósidos y compuestos relacionados	51
Figura N° 4. Compuestos de los esteviósidos y compuestos relacionados	52
Figura N° 5. Síntesis de steviol partiendo de ent-kaurenato por la Hidroxilasa13-ent-kaurenato	53
Figura N° 6. Secador solar utilizado para el secado de las hojas de Stevia rebaudiana Bertoni	57
Figura N° 7. extractos de Stevia para abonar suelos	61
Figura N° 8. procesos fotosintéticos de la fresa una elevada concentración de azúcares con extracto de stevia	61
Figura N° 9. Productos edulcorados con Stevia	62
Figura N° 10. Equipo de Cromatografía Líquida Alta Eficiencia HPLC	69
Figura N° 11. Componentes básicos de un cromatografo	71

RESUMEN

En este estudio Agroindustrial de la stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) proveniente del cultivo in vitro mediante la extracción donde es una planta medicinal que se caracteriza por la acumulación de compuestos edulcorantes en sus hojas, los cuales son hasta 300 veces más dulces que la sacarosa; Hoy en día en el mundo y principalmente en América Latina se presentan diversos problemas de salud como la obesidad y el sobrepeso, sin duda, por el consumo de grasa y azúcares. Asimismo, Huancavelica es la región más pobre del país, con la tasa de desnutrición más alta en las zonas rurales y el consumo de grasas saturadas y azúcares facilitara la absorción de las grasa el principio activo denominado esteviósido y rebaudiósido A. la presente investigación se enfocó en la extracción y la determinación de edulcorantes de la hoja de stevia proveniente del cultivo in vitro donde se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional de La Molina tiene como objetivo determinar y evaluar la cantidad de edulcorante en la hoja de Stevia en cultivo in vitro , en la cual es un edulcorante natural no calórico a escala de laboratorio esto nos permite nuevas alternativas saludables de tipo natural, que pueden ser una opción para personas con problemas de salud como la diabetes, hipertensión arterial, sobre peso, entre otras enfermedades; los extractos se obtuvieron mediante el calentamiento controlado a temperaturas de 65°C de la solución de Stevia - agua y la remoción de componentes presentes en la hoja para eliminar algunos solventes orgánicos tales como bases orgánicas, sales inorgánicas, fenol, sustancias derivadas del aparato fotosintético, proteínas, aminoácidos, entre otros; mediante la adición de agentes precipitantes como el Hidróxido de Calcio (CaOH) y Carbonato de Calcio (CaCO₃) la determinación de esteviósido y rebaudiósido de la hoja de stevia en cultivo in vitro influye en la concentración de edulcorante con respecto al cultivo tradicional por estar en un medio de cultivo aséptico de agar y azúcar, se realizó un análisis de HPLC obteniendo resultado esteviosido (6.91%) y rebaudiosido (2.52%) y un total de (9.43%) en el laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los edulcorantes naturales constituyen una excelente alternativa en la industria alimenticia. Si bien, ésta industria emplea desde hace varios años productos químicos como el aspartamo, acelsufame-K, sacarina o ciclamato, la inocuidad de estas sustancias ha estado siempre como tema de discusión en los principales foros académicos alimenticios, generando desconcierto entre los consumidores de productos bajos en calorías, e incluso múltiples dudas entre las propias autoridades reguladoras, en especial cuando se habla del largo plazo de ingesta de éstas sustancias. En los últimos años se ha investigado en plantas medicinales alternativas de edulcorantes mucho más seguras y que a la vez mantengan el índice de dulzor en niveles adecuados para el consumo humano; destacan entre las sustancias más estudiadas Taumatina, Monellina y Esteviósidos, las cuales ya forman parte de muchos productos alimenticios.

La tendencia de las industrias que se ocupan de promover la salud y prevenir enfermedades, está en invertir en el desarrollo de tecnologías para la producción de alimentos con bajas calorías y bajo contenido graso que a su vez mantengan sus cualidades nutricionales. Es más común el uso de edulcorantes no calóricos cuya función sensorial sea similar a la sacarosa.

Durante cientos de años, los pueblos indígenas en Brasil y Paraguay han usado las hojas de la Stevia como edulcorante. Los indios guaraníes de Paraguay la llaman kaa jheé y lo han utilizado para endulzar el té de yerba mate durante siglos. También han usado la Stevia para endulzar infusiones y otros alimentos y lo han utilizado en medicina como cardiotónico, para la obesidad, la hipertensión y el ardor de estómago, y para ayudar a reducir los niveles de ácido úrico.

La (*Stevia rebaudiana Bertoni*) es una especie sudamericana oriunda de Paraguay, sus hojas contienen otros principios endulzantes aparte del esteviósidio como los rebaudósidos A y B. El rebaudiósidio A es 190 veces más dulce que una solución de sacarosa al 0,4% y

97

el esteviósido en forma pura es 300 veces más. Además 10 hojas secas equivalen a 1 kilocaloría.

En Japón, la Stevia se considera como endulzante alternativo desde 1984. Estudios de toxicidad en animales y en humanos revelan que el producto es muy seguro. Asimismo, los esteviósidos presentan un suave efecto hipoglucemiante y mejoran la curva de tolerancia a la glucosa en ayunas

No obstante, recientemente ha surgido nuevamente el interés por desarrollar protocolos de propagación masiva, que faciliten la obtención de lotes de producción in vitro mayores y la propagación en campo.

Por tanto, como parte de este trabajo de investigación se determino la concentración de edulcorante en la hoja de stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) proveniente de cultivo in vitro se Identifico y cuantifico los edulcorantes como el esteviósido y rebaudiósido en comparación con el cultivo tradicional como un endulzante natural con bajo poder calórico y sustituto de la sacarosa.

CAPÍTULO I

PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema:

Hoy en día en el mundo y principalmente en América Latina se presentan diversos problemas de salud como la obesidad y el sobrepeso, sin duda, por el consumo de grasa y azúcares. Asimismo, Huancavelica es la región más pobre del país, con la tasa de desnutrición más alta en las zonas rurales y el consumo de grasas saturadas y azúcares que facilitara la absorción de las grasa el principio activo denominado estevióside y rebaudiósido A. Que al endulzar los productos de manera natural revoluciona el campo de los edulcorantes dada sus bondades terapéuticas ante enfermedades como la diabetes.

El edulcorante natural de la Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) no aporta calorías al organismo, por lo que no engorda, a diferencia del azúcar resulta ideal para ayudar a perder peso, ya que reduce la sensación de hambre, el deseo de comer dulces y facilita la absorción de las grasas, la stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) es una planta considerada medicinal, pues varios estudios demuestran que puede tener efectos beneficiosos sobre la diabetes tipo II, con el tiempo, el exceso de glucosa en la sangre puede causar problemas serios puede provocar lesiones en los ojos, los riñones y los nervios la diabetes también puede causar enfermedades cardíacas,

derrames cerebrales e incluso la necesidad de amputar un miembro, ya que posee glicósidos con propiedades edulcorantes sin calorías.

1.2. Formulación del problema

¿Influye el cultivo in vitro de la planta de stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) en la composición de edulcorante de sus hojas?

1.3. Objetivos:

1.3.1. Objetivo General

- ❖ Determinar la concentración de edulcorante en la hoja de stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) proveniente de cultivo in vitro.

1.3.2. Objetivos específicos

- ❖ Analizar los edulcorantes del cultivo in vitro de la hoja de stevia.
- ❖ Identificar y cuantificar los edulcorantes como el esteviósido y rebaudiósido en el cultivo in vitro de la hoja de stevia.
- ❖ Determinar la extracción del edulcorante del cultivo in vitro de la stevia por el método descrito por Payzant John Donald.

1.4. Justificación e importancia.

Antiguamente la stevia se consideraba como una planta no aprovechable, sin embargo la stevia contienen un alto contenido de glucósidos esteviol diterpenos. El esteviósido y el rebaudiósido A, son los principales compuestos responsables de la edulcorancia y normalmente están acompañados por pequeñas cantidades de otros esteviol glicosidos. El edulcorante obtenido de esta planta, presenta efectos beneficiosos en la absorción de la grasa y regulación de la presión arterial (Jenet 1 996; Guerrero 2 005) por lo que en la actualidad se buscan alternativas de cultivo in vitro y su aprovechamiento como edulcorante. En la actualidad, en Japón el 41 % de los endulzantes consumidos provienen de (*Stevia Rebaudiana Bertoni*).

La stevia es una planta considerada medicinal en la actualidad no es aprovechada por desconocimiento y falta de producción en nuestra región.

El diagnóstico de la diabetes tipo 2 es cada vez más común en niños y adolescentes, especialmente en quienes son obesos. Algunos estudios muestran que entre el 8 y 45 % de los niños que han sido recientemente diagnosticados con diabetes tienen el tipo conocido como 2, dependiendo de la situación geográfica y el grupo racial/étnico.

Stevia es una planta considerada medicinal, pues varios estudios demuestran que puede tener efectos beneficiosos sobre la diabetes tipo II, ya que posee glucósidos con propiedades edulcorantes sin calorías. Gran número de autores coinciden en que el área de la biotecnología enfocada al cultivo de tejidos vegetales, se ha convertido en una opción atractiva y viable para promover la propagación masiva de Stevia (Rafiq *et al.* 2 007). El proyecto de investigación, tiene mucha relevancia en el aspecto social, ya que es una planta medicinal que contiene edulcorante que no aporta caloría al ser consumida por lo tanto la población al consumir este edulcorante no tendrá problemas como es la diabetes tipo II.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes :

a) Resultados experimentales.

Según Monesterolo *et al*, (2 006), realizaron sus trabajos científicos en el “proceso de extracción y purificación de compuestos endulzantes de la hoja de stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*)” A partir de los valores obtenidos sobre el índice de turbidez en muestras realizadas a los extractos de alimentación se concluye que los mejores resultados se obtiene cuando se realiza la maceración a una temperatura de 50°C, con agitación y durante cortos períodos de tiempo realizado en la Facultad Regional Villa María, Universidad Tecnológica Nacional, Grupo de Investigación en Simulación para Ingeniería Química, GISIQ, Villa María, Córdoba, Argentina, llegó a concluir lo siguiente: De acuerdo a los valores hallados en los índices de turbidez del extracto y el clarificado se concluye que hay una disminución en los sólidos disueltos, confirmando esto al observar cambio en la coloración del absorbente utilizado. A partir de las pruebas organolépticas se comprobó que existe pérdida de sustancias edulcorantes posterior a la clarificación. Esta experiencia permite también tomar conclusiones que serán de importancia para el proyecto de grado de las autores como es el caso de la selección del método a utilizar para agitar el

macerado y el método elegido para separa los sólidos del extracto que asegure la no existencia de sólidos en suspensión.

Según Soto *et al.* (2 002), menciona en su trabajo científico titulado: "**Extracción de los principios edulcorantes de la stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*)**" desarrollado en el Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ingeniería de la Universidad de Buenos Aires. El método propuesto permite aislar los glicósidos de la Stevia con un rendimiento de alrededor de 5% sobre la base de las hojas secas en el proceso sólo se usa agua y alcohol etílico como solventes, lo cual es importante teniendo en cuenta el uso alimentario del producto obtenido.

Aguirre (2 008), obtuvo "**Extracción y cuantificación de esteviósido**" desarrollado en el Laboratorio ANAGALIDE, España. Los cromatogramas fueron obtenidos con el detector UV (210 nm) y con el detector ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) en la cual el contenido total de glucósidos fue alrededor de la mitad de lo esperado. Los contenidos de Esteviósido y Rebaudiósido A fueron de 0,97 % y 5,23 % respectivamente. El Rebaudiósido C fue el pico más grande después del Esteviósido y el Rebaudiósido A. La relación Esteviósido - Rebaudiósido A fue muy buena.

2.2. Bases teórica

2.2.1 Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*)

Cuyo nombre científico es (*Stevia rebaudiana Bertoni*) conocida como hierba dulce, planta que crecía espontáneamente en el hábitat semiárido de las laderas montañosas de Paraguay. En la actualidad, se cultiva en muchos países de todo el mundo, entre ellos, países de América Latina y de Asia (FAO, 2 004).

Las hojas de Stevia han sido conocidas por los Indios Guaraníes de Paraguay como kaá hâ-é, caá-êhé, caá-hê-hê, caá-enhem, azucá-caáeiracaa, o ca-a-

yupe, todo ello traducido como "hierba dulce" y fue usado por siglos como endulzante de bebidas amargas conocidas como mates. (Tucker y Debaggio, 2 009).

También la usaban para endulzar sus comidas y como pequeña golosina que llevaban a su boca cuando en sus deambular por el campo se encontraban con ella (Martínez, 2 002).

2.2.2 Descripción botánica

Se trata de un delgado, erguido, arbusto herbáceo, perenne, alcanza 60-80 cm de altura en bosques naturales y llega hasta 120 cm bajo cultivo tecnificado. Bajo cultivo, la planta se trata normalmente como planta anual (FAO, 2 004).

Stevia es un género de unas 240 especies de hierbas y arbustos de la familia de las Compuestas (Tucker y Debaggio, 2 009).

Ésta familia incluye a plantas tan conocidas como el diente de león, el girasol, y la achicoria (Martínez, 2 002).

Cuadro N° 1. Clasificación sistemática de la Stevia.

Nombre común	Hierba dulce
Reino	Vegetal
Subreino	Tracheobionta (plantas vasculares)
División	Magnolophyta (fanerógama angiosperma)
Subdivisión	Spermatophyta (plantas de la semilla)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Serie	Multiaristae
Tribu	Eupatorieae
Orden	Campanulares (asterales)
Familia	Compuestas (Asteráceas de Monochlamydeae)
Genero	Stevia
Especie	Rebaudiana Bertoni
Nombre científico	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni ó <i>Eupatorium rabadianum</i> Bertoni ó <i>Rebaudianum</i> de <i>Eupatorium</i> .

Fuente: (Martínez, 2 002)

a). Características agronómicas

La Stevia puede cultivarse en terrenos relativamente pobres. Estas plantas pueden utilizarse para producción comercial durante varios años, 5 o 6 a lo sumo. Las raíces que quedan enterradas en el suelo permiten el rebrote de la planta cada vez que es cortada (Martínez, 2 002).

En el Perú, el número de cortes está superdotado a la zona agro ecológica, llegándose a cosechar hasta 8 cortes al año, en las zonas más bajas de Selva (EDAC, 2 008).

Se produce naturalmente en regiones tropicales y subtropicales, en los bordes de marismas o en pastizales de hasta 700 m de altitud. En los trópicos puede ser cultivado en altitudes de hasta 1 500 m. La floración ocurre en fotoperiodo crítico de 12 horas, 40-60 días después de la siembra o corte. Los días largos, sin embargo, aumentan la producción de hojas, lo que resulta en un mayor contenido de esteviósido sobre materia seca. En Japón, el rendimiento en el primer año es de 400-500 kg/ha de hojas secas, mientras que los rendimientos en los años posteriores varían entre 1,5 a 2 t/ha de hojas secas. En el oeste de Java, es posible una producción anual de 3 t/ha de hojas secas (FAO, 2 004).

Según EDAC (2 008), en el Perú, las nuevas técnicas de producción permiten mejorar sustancialmente en rendimiento y en calidad en comparación al sistema tradicional de producción no tecnificado. Obviamente, esto es posible si se aplican los conocimientos técnicos relacionados al manejo del cultivo, en condiciones que puedan desarrollar el potencial de producción que poseen, tal es así que a altitudes menores a 1 000 msnm los rendimientos alcanzan hasta las 12 t/año considerando un distanciamiento de 0,40 m entre surcos y 0,20 m entre plantas, así mismo el rendimiento está en función al mayor número de cortes, además de las características edáficas y climáticas. En tal sentido las zonas donde se recomienda masificar su producción es en la zona de Selva, y en condiciones de sierra en los valles interandinos a altitudes menores a 1 800 msnm.

Según FAO (2 004), los requerimientos agronómicos en el cultivo de la Stevia son los siguientes:

b). Hábitat

Se puede encontrar a lo largo del borde de marismas y en praderas.

c). Ambiente**i). Latitud**

Se encuentra entre el Ecuador y 50° con un óptimo entre 15° - 30°.

ii). Temperatura

Su clima natural es subtropical y semi-húmedo con temperaturas extremas entre 21 a 43°C, con un promedio de 24°C. El Rango reportado de temperatura para el crecimiento es de 15-43°C con un óptimo entre 18-30°C. No puede soportar temperaturas invernales por debajo de -6° C.

iii). Agua

El rango reportado de precipitación anual para el crecimiento de la planta es de 500-1 800 mm con un óptimo entre 1 000-1 400 mm. El exceso de lluvias durante la polinización puede reducir tanto la producción de semillas como la germinación.

iiii). Radiación

Rango e intensidad: requiere un lugar soleado y caluroso.

Fotoperiodo: es una planta de días cortos. La Floración ocurre en fotoperiodo crítico de 12 horas, 40-60 días después de la siembra o corte. Los días largos, sin embargo, promueven la producción de hojas y prolonga el período de crecimiento antes de la floración. Dado que la síntesis de esteviósidos se reduce justo en la floración o antes de la misma, una floración retrasada permite más tiempo para la acumulación de esteviósido.

iiiii). Suelo

Condiciones físicas: crece naturalmente en suelos infértiles, ácidos y arenosos luz con las capas freáticas superficiales.

Condiciones químicas: el pH óptimo del suelo se encuentra en un rango de 5 a 6.5. La planta crece en suelo con baja salinidad (<4 dS/m).

d). Distribución

Es originaria de la región norte de América del Sur, todavía se encuentra en estado silvestre en las alturas de los distritos de Amambay e Iguacu (zona fronteriza entre Brasil y Paraguay), también se encuentra en Venezuela y Colombia. Se estima que hasta 200 especies de Stevia son nativas de América del Sur, sin embargo, no hay otras plantas de Stevia que hayan mostrado la misma intensidad de dulzor (FAO, 2 004).

Esta planta fue introducida al Perú hace una década y actualmente se ha incorporado en el portafolio de cultivos en pequeñas extensiones en Cajamarca, Amazonas, San Martín, Ucayali y Apurímac de manera orgánica. La stevia no se presenta como un cultivo que desplace a cultivos tradicionales como el café, maíz, etc., sino como un rubro complementario en la diversificación productiva y una alternativa económica para el minifundio permitiendo un ingreso adicional a los agricultores (EDAC, 2 008).

e). Polinización

Es auto-incompatible y la polinización es realizada por insectos. El polen que produce la planta puede ser altamente alergénico.

f). Morfología

La Stevia es una planta con tallo anual, subleñosa, levemente pilosa en las extremidades, se ramifica formando múltiples brotes con tendencia a inclinarse (Martínez, 2 002).

La Stevia presenta la siguiente morfología según:

- **Raíces:** tiene un rizoma vigoroso y un sistema radicular superficial (FAO, 2 004). La raíz es perenne, fibrosa, filiforme y abundante formando cepa (Martínez, 2 002).
- **Tallos:** son semi-leñosos, pero débiles (FAO, 2 004).

- **Hojas:** las hojas son alternas, oval-elípticas, miden 3-6,5 cm de largo y 0,8-1,9 cm de ancho (FAO, 2 004)
- **Flores:** son pequeñas, perfectas y blancas, nacen en pequeños corimbos de 2-6 flores (FAO, 2 004). Las flores de lóbulos blancos se hallan dispuestas en pequeños capítulos terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas sueltas (Martinez, 2 007).
- **Frutos:** las semillas están contenidas en aquenios delgados de unos 3 mm de longitud. Cada aquenio tiene alrededor de 20 persistentes pappus (FAO, 2 004).
- **Semillas:** las semillas son pequeñas y el peso de mil semillas de Stevia oscila por lo general entre 0,15-0,30 g (FAO, 2 004).

g). Fisiología

Florece de enero a marzo en el hemisferio sur. La floración en condiciones de día corto debería ocurrir 54 a 104 días después del trasplante, dependiendo de la sensibilidad al fotoperiodo de los cultivares (FAO, 2 004).

La primera cosecha puede tener lugar 2 meses después de la siembra de plántones, la misma que es de unos 6 meses después de la siembra con semillas. Las cosechas siguientes se toman a intervalos de un mes y puede continuar por un período de unos 5 años (FAO, 2 004).

La reproducción natural o silvestre es por semilla, pero la viabilidad por semilla es muy pobre y variable. La reproducción por semilla no es recomendable por la gran variabilidad fenotípica, lo cual se traduce en una menor calidad de hoja (FAO, 2 004).

La reproducción se hace vegetativamente con el fin de conservar las características genéticas por medio de esquejes obtenidos de plantas adultas seleccionadas y fitosanitariamente sanas (FAO, 2 004).

2.2.3 Origen de la Stevia

Para el año de 1 887 el naturalista Dr. Moisés Bertoni, conoce de la planta a través de mineros e indios de la región de Caaguazú y Monday de la República del Paraguay, por la misma época el químico paraguayo Ovidio Rebaudi, realiza los primeros estudios del componente dulce de la hoja. En 1 904 Bertoni verifica que la planta pertenece al género *Stevia* con lo cual en 1 905 se registra definitivamente como (*Stevia rebaudiana Bertoni*). Ya en 1 908 se realiza el primer cultivo extensivo en la zona de Puerto Bertoni-Alto Paraná (Paraguay).

Entre 1 908 y 1 910 algunos científicos alemanes, entre ellos Rasennack y Karl Dietrich realizan los primeros análisis químicos y cristaliza el componente dulce de la hoja, aislando dos sustancias dulces a las que denominarían eupatrina y rebaudina. Ya en el año de 1 921, a petición de Moisés Bertoni el cristal denominado eupatorino se designo por la Unión Internacional de Química como esteviósido debido al el género de la planta. Más adelante, en 1 931 los químicos franceses Bridel y Lavielle cristalizaron el esteviósido con un 6% de rendimiento y determinaron que su poder endulzante era alrededor de 300 veces superior al azúcar de caña y rectificaron la fórmula, quedando finalmente en $C_{38}H_{60}O_{18}$. Además plantearon que el esteviósido no es asimilado por el organismo, en tanto es eliminado en su forma original.

Cuyo nombre científico es (*Stevia rebaudiana Bertoni*) conocida como hierba dulce, es nativa de Paraguay (Tucker y Debaggio, 2 009). La *Stevia* es una planta que crecía espontáneamente en el hábitat semiárido de las laderas montañosas de Paraguay. En la actualidad, se cultiva en muchos países de todo el mundo, entre ellos, países de América Latina y de Asia (FAO, 2 010). Las hojas de *stevia* han sido conocidas por los Indios Guaraníes de Paraguay como kaá háé, caá-êhé, caá-hê-hê, caá-enhem, azucá-caá eiracaa, o ca-a-yupe, todo ello traducido como "hierba dulce" y fue usado por siglos como

endulzante de bebidas amargas conocidas como mates (Tucker y Debaggio, 2 009).

También la usaban para endulzar sus comidas y como pequeña golosina que llevaban a su boca cuando en sus deambular por el campo se encontraban con ella (Martínez, 2 002).

a). Descubrimiento y extensión de su conocimiento al mundo

El descubrimiento de la hierba dulce paraguaya fue revelado al mundo por Moisés Santiago Bertoni, un científico en Paraguay. En 1 899, hizo la primera descripción botánica como especie del género *Eupatorium*, puesto que son similares, después en 1 905 se corrigió y la puso como especie del género *Stevia* en una publicación de su estudio más completo, llamándola "*Stevia rebaudiana* Bertoni" en honor a un químico paraguayo apellidado Rebaudi que fue el primero en aislar su componente activo dulce más importante (Martínez, 2 002).

En 1908, se describió la presencia de los diversos edulcorantes de la *Stevia* y esto levantó preocupaciones dentro de la comunidad comercial de los edulcorantes químicos (Martínez, 2 002).

En 1 931, dos científicos franceses, Bridel y Lavieller comenzaron a estudiar a la enigmática *Stevia*. Descubrieron una sustancia pura blanca cristalina que denominaron Esteviósidos, un glucósido diterpénico dulce que se encuentra en el extracto de *Stevia*.

En 1 955, los japoneses comenzaron a desarrollar cultivos inicialmente en Paraguay (Martínez, 2 002).

En el año de 1966 se inició en Paraguay la venta de ka'á-he'é en forma natural bajo la denominación de "Dulce té del Paraguay" propiedad del señor Luis Enrique De Gasperi. Además se registra la Patente de Invención al señor De Gásperi sobre "Utilización de Ramas y Tallos de Stevia" y otra sobre "Extracto de la hoja" (Marín, 2004).

Alrededor de 1970, los Japoneses comenzaron el cultivo de Stevia en el sur de Japón y en los países de su área, debido a que los edulcorantes artificiales estaban fuertemente regulados e incluso prohibidos a partir de los años 60 (Martínez, 2002).

Hacia 1988, los extractos de stevia habían capturado un 41 % del mercado de edulcorantes en Japón, donde se emplea en la preparación de bebidas, productos horneados y de pastelería, yogurt, helados, sidras y té, dentífricos y enjuagues bucales. La stevia se emplea también en alimentos en Corea del Sur, China, Malasia, Filipinas e Israel. En Paraguay y Brasil se emplea ampliamente como remedio para regular los niveles de insulina en la diabetes (Atencio, 2005).

Ahora, las grandes empresas han vuelto sus miradas a la stevia, en el 2007 la empresa agroindustrial Cargill y Coca-Cola han patentado un edulcorante derivado de la stevia conocido como Truvia. (Tucker y Debaggio, 2009).

2.2.4 Edulcorantes

Los edulcorantes son aditivos alimentarios que confieren sabor dulce a los alimentos. Una de las características de los edulcorantes es que pueden ser sustituidos entre sí, sobre todo en la industria de alimentos y bebidas. Aunque dicha sustitución no es perfecta, por ejemplo en industrias como la confitería, chocolatería y de repostería se utilizan edulcorantes en estado sólido, mientras

que en la industria láctea y de bebidas se pueden utilizar edulcorantes líquidos; El sabor de los edulcorantes y los riesgos de salud pública son otros factores que inciden en su preferencia. Independientemente de lo anterior, el azúcar es un producto de gran importancia para el consumo humano por su alto contenido energético. El azúcar proporciona en promedio el 12% de los hidratos de carbono, los cuales son elementos productores de energía en el cuerpo humano (Pérez, 2 011).

En los países desarrollados el consumo de azúcar de mesa (sacarosa) supera los cuarenta kilos por persona al año. Por otra parte, existen motivos por los cuales su uso debe ser limitado y/o eliminado de la dieta de muchas personas (caries dentales, alimentos de bajo contenido calórico, para diabéticos o por motivos de economía), sin embargo el hombre no parece dispuesto a renunciar al placer del sabor dulce, por lo que ha buscado sustancias capaces de sustituir al azúcar (Pérez, 2 011).

2.2.5 Ingesta diaria admisible de los edulcorantes

Se entiende como ingesta diaria aceptable (IDA) la cantidad de aditivo alimentario que puede consumirse en la dieta diariamente durante toda la vida sin riesgos para la salud. Por el momento, no existen datos suficientemente fiables que demuestren que la ingesta diaria de edulcorantes artificiales pueda ser perjudicial en cantidades moderadas. No obstante, el incremento de estos aditivos en determinados productos, especialmente bebidas refrescantes y un consumo cada vez mayor, puede comprometer los niveles de ingesta diaria de modo que se excedan los límites recomendables. El efecto a largo plazo del consumo diario de edulcorantes continúa siendo objeto de investigaciones médicas en todo el mundo desde hace varios años, por lo menos 25 años atrás. De hecho, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), fundamentándose en el resultado

de diversas investigaciones, avalan los beneficios de los endulzantes artificiales no calóricos para determinados grupos de población. Concretamente, en diversos estudios se señala que su consumo no causa riesgos en niños, mujeres embarazadas o en período de lactancia, diabéticos y personas que deben controlar su peso o mantenerlo (Chan, *et al.* 2 000).

Los niveles de consumo diario de estos productos son expresados mediante el valor de IDA (Ingesta Diaria Admisible) que representa la cantidad de sustancia que puede ser consumida todos los días durante toda la vida de una persona sin producir daño a la salud como lo indica el Cuadro N° 2.

Cuadro N° 2. Ingesta diaria admisible de edulcorante.(mg/kg/día)

Edulcorante	FAO/OMS	EFSA
Acesulfame de K+.	0 - 15	0 - 9
Aspartame.	0 - 40	0 - 40
Ciclamato de Na/Ca.	0 - 11	0 - 7
Sacarina de Na/Ca.	0 - 5	0 - 5
Sucralosa.	0 - 15	0 - 10

Fuente: (Alonso, 2 010)

La misma se expresa en mg/kg de peso corporal/día. Esta IDA es estipulada por los organismos internacionales regulatorios sobre alimentos, estableciendo por ejemplo para la Sacarina un IDA de 0-5 mg/kg/día. "Edulcorantes Naturales" (Alonso, 2 010).

2.2.6 Poder edulcorante

El poder edulcorante (PE) de los sustitutos del azúcar con respecto a la sacarosa como se muestra en el cuadro N° 3, son de sumo interés para la industria de alimentos. El poder edulcorante (PE) se define como: "gramos de

sacarosa que hay que disolver en agua para obtener un líquido de igual sabor que la disolución de 1gramo de edulcorante en el mismo volumen" (Pérez, 2 011).

Cuadro N° 3. Poder edulcorante de los sustitutos del azúcar, con respecto a la sacarosa.

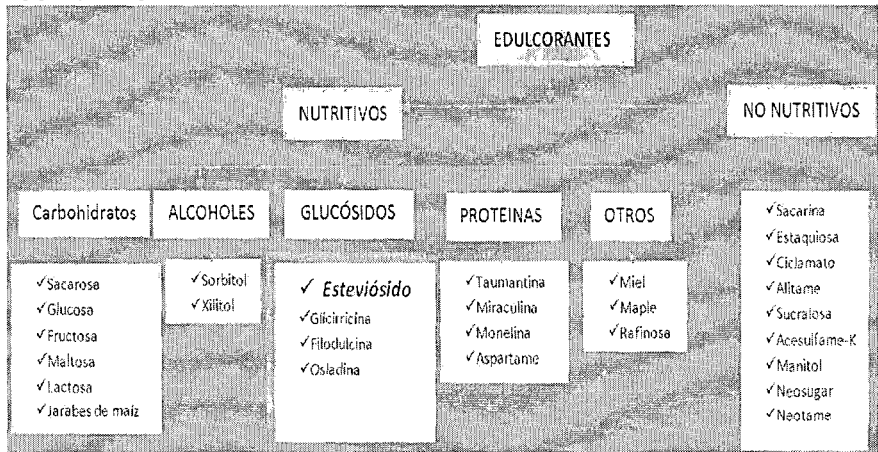
Compuesto	P.E	Compuesto	P.E
Lactosa	0,4	Ciclamato	30 - 80
Dulcitol	0,4	Glicirricina	50 - 100
Neosugar	0,4 - 0,6	Aspartame	100 - 200
Maltosa	0,5	Acesulfame-K	130 - 200
Sorbitol	0,5	Sacarina	200 - 700
D-glucosa	0,7	Dulcina	250
D-xilosa	0,7	Esteviósido	300
Manitol	0,7	Narangina	350
Glicerol	0,8	Filodulcina	400
Sacarosa	1,0	Sucralosa	600 - 800
Xilitol	1,0	Hernandulcina	1 000
Jarabe invertido	1,05	Alitame	2 000
Fructosa en solución	15 -1,25	Neohespiridina	2 000
Fructosa cristalizada	1,8	Monelina	2 000-2 500
Licasina	25 - 50	Taumantina	2 500

Fuentes:(Pérez, 2 011)

2.2.7 Clasificación de los edulcorantes

Los edulcorantes utilizados en la industria de alimentos se encuentran divididos en 2 grandes grupos: (Alonso, 2 010) edulcorantes calóricos o nutritivos y edulcorantes no calórico o no nutritivo, y se clasifican como lo muestra la figura N° 1.

Figura N° 1. Clasificación de los edulcorantes utilizados en la industria de alimentos.



Fuente: Énfasis en la Alimentación, 2 011.

a). Edulcorantes calóricos o nutritivos

Son los que consumidos aportan 4 kilocalorías por gramo, tienen un valor calórico por unidad de peso idéntico al de la sacarosa (azúcar de mesa). Los edulcorantes naturales se encuentran presentes en los productos lácteos, en las frutas y en las hortalizas, pero se extrae básicamente de la caña de azúcar y de la remolacha azucarera. Actualmente se encuentran en el mercado una variedad de edulcorantes que son utilizados de acuerdo a sus características y para los usos específicos que se requieran en la elaboración de los diferentes alimentos (Alonso, 2 010).

El Cuadro N° 4 describe algunos de estos edulcorantes y sus respectivos usos.

Cuadro N° 4. Descripción de edulcorantes calóricos y sus usos.

PRODUCTO	DESCRIPCIÓN	USOS
Jarabe de maíz de alta	Este jarabe se fabrica mediante la isomerización de la dextrosa en el almidón de maíz. Además sinergiza el poder edulcorante de la sacarosa y de otros edulcorantes no nutritivos, de ahí que se use industrialmente.	Ha reemplazado al azúcar en muchos alimentos y bebidas. Por su mayor poder edulcorante y solubilidad, le permite incorporarse fácilmente a los productos, realzándoles el sabor, color y estabilidad.
Sacarosa	Se obtiene a partir de varias plantas. En climas tropicales y subtropicales puede ser extraída de la caña de azúcar. En lugares templados es común extraerla de la remolacha azucarera.	Principalmente es usada para dar sabor a los alimentos, para hacer jaleas y mermeladas, bebidas carbonatadas, bebidas de fruta, caramelos, yogures, condimentos, alimentos enlatados y envasados. Entre otros, también es usada para ayudar a la fermentación de algunas bebidas alcohólicas.
Fructosa	Es el azúcar de la fruta, caracterizada por endulzar el doble de la azúcar común. Su poder energético es de 4 kilocalorías por gramo, en otras palabras se puede describir como un producto light.	Se usa para mermeladas, bebidas, helados y se puede conseguir en las dietéticas solo que no se usa masivamente por su alto costo.
Lactosa	Se le llama también azúcar de la leche. La lactosa se trata con lactasa para la obtención de mezclas de glucosa y galactosa, que a su vez pueden ser isomerizadas por tratamiento con glucosa isomerasas. Estos hidrolizados de lactosa tienen un	Uno de los usos de la lactosa consiste en su transformación en lactulosa, que es empleada en la elaboración de productos para la alimentación infantil, así como en

	<p>poder edulcorante considerable. También se utiliza la lactosa en la obtención por vía enzimática de galacto-oligosacáridos</p>	<p>leches fermentadas y productos en polvo con contenidos en lactulosa del 4 al 8%. También se destina parte de la lactosa a la producción de lactitol que puede ser utilizado en alimentación. También se utiliza en productos de bollería, sopas y otros productos deshidratados.</p>
Jarabe de malta	<p>El jarabe de la malta se obtiene del almidón como materias primas, a través de la licuefacción de la amilasa, y β-amilasa, sacarificación sinérgica de la enzima de desconexión, obteniendo maltosa refinada del 70% de los productos del azúcar del almidón.</p>	<p>El jarabe de la maltosa tiene función similar a la glucosa líquida en la industria de alimentos, también se utiliza en caramelos, bebidas, líquidos, leche malteada, tortas, bebidas y otros aspectos como dulcificantes nutritivos.</p>
Miel	<p>Se trata de un fluido dulce y viscoso producido por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de plantas. Es rica en fructosa y glucosa. Su poder endulzante es dos veces mayor que el azúcar de caña.</p>	<p>La miel es utilizada como edulcorante sustitutivo del azúcar, también posee un gran poder antibiótico y emoliente, por lo que ha sido utilizada desde siempre en el tratamiento de heridas, quemaduras, úlceras, etc., debido a su contenido en una sustancia de efecto antimicrobiano denominada inhibida.</p>

Fuente: (Alonso, 2 010)

b). Edulcorantes no calóricos o no nutritivos y no calóricos nutritivos

Un sustituto del azúcar o edulcorante no calórico es un aditivo para los alimentos que aumenta el efecto del azúcar, pero que usualmente tiene menos energía. Algunos sustitutos del azúcar son naturales y algunos son sintéticos. Aquellos que no son naturales en general son conocidos como edulcorantes artificiales. Una clase importante de sustitutos del azúcar son conocidos como edulcorantes de alta intensidad (Alonso, 2 010).

Los extractos naturales como el de Stevia, aunque es no calórico, aporta otro tipo de nutrientes, por lo que se clasifica también como edulcorante no calórico nutritivo. Los edulcorantes intensivos tienen una dulzura varias veces superior a la del azúcar común de mesa. Como resultado, mucho menos edulcorante es requerido y la contribución y energía es a menudo insignificante. La sensación de dulzor causada por estos componentes es a veces notablemente diferente de la sacarosa, de manera que frecuentemente éstos son usados con mezclas complejas que alcanzan una sensación de dulzor más natural. Si la sacarosa (u otro azúcar) reemplazada ha contribuido a la textura del producto, entonces frecuentemente también se necesita un agente de relleno. Esto puede ser visto en bebidas suaves etiquetadas como "dietéticas" o "light", las cuales contienen edulcorantes artificiales y frecuentemente tienen una sensación al paladar notablemente diferente, o en los sustitutos del azúcar de mesa, que mezclan maltodextrinas como un edulcorante intenso para alcanzar una sensación de textura satisfactoria. (Alonso, 2 010).

Algunos edulcorantes no azúcares son Poliols, también conocidos como "alcoholes de azúcar". Éstos son en general, menos dulces que la sacarosa, pero tienen propiedades de volumen similares y pueden ser usados en un amplio rango en productos alimenticios. Puesto que con todos los productos alimenticios, el desarrollo de una formulación para

reemplazar la sacarosa, es un complejo proceso de patentado. (Alonso, 2010).

El cuadro N° 5 muestra una breve descripción de edulcorantes conocidos como no calóricos nutritivos que son obtenidos de fuentes naturales.

Sin embargo existen otros edulcorantes que son obtenidos de forma sintética, los cuales son representados en el cuadro N° 6

Cuadro N° 5. Edulcorantes no calóricos nutritivos de origen natural.

PRODUCTO	DESCRIPCIÓN	USOS
Taumatina	La Taumatina representa a un conjunto de proteínas (polipéptidos) extraídas de la pulpa que rodea las semillas de una planta originaria de África Occidental. Es considerada la sustancia más dulce del planeta (1 600 veces más que una solución de sacarosa al 10%), La ingesta diaria de Taumatina es de 2 mg/día según la FDA.	Mezclada con glutamato, puede utilizarse como potenciador del sabor. Bebidas a base de café, gomas de mascar, aperitivos productos bajos en grasa, yogures, postres, bebidas alcohólicas, etc.
Monelina	Esta proteína se encuentra en la pulpa del fruto de la especie tropical <i>Dioscoreophyllum cuminsi</i> . Es aproximadamente 1 000 veces más dulce que el azúcar.	La Monelina no se emplea en bebidas dado que pierde la capacidad edulcorante con el tiempo.
Miraculina	Esta planta pertenece a la familia de las Sapotáceas, y es oriunda de África Occidental. No tiene sabor dulce intenso por sí misma, pero modifica profundamente los sabores	Por el momento, no tiene aplicaciones industriales.

	al entrar en contacto con las papilas gustativas, transformando el sabor ácido en dulce.	
Brazzeina	<p>Proteína proveniente de los frutos secos y ahumados. De pentadiplandra brazzeana.</p> <p>Caracterizada por ser 1 000 veces superior en dulzor a la sacarosa, y termoestable. Junto al Acesulfame de K, prolonga el sabor de éste.</p> <p>Comercialmente se le conoce con el nombre de Sweet.</p>	Utilizado en la industria de alimentos y farmacéutica a nivel mundial como edulcorante natural no calórico en bebidas, comidas y medicamentos.
Sorbitol	<p>Alcohol Polihídrico, aislado del rizoma de Polypodium vulgare, es aproximadamente 3000 veces más dulce que la sacarosa. Se encuentra en forma natural en ciertas bayas y frutas. Se clasifica como edulcorante nutritivo porque cada gramo contiene 2,4 calorías, bastante menos que las 4 de la sacarosa.</p>	Es el edulcorante que contienen generalmente los chicles sin azúcar. El sorbitol se emplea en muchos productos alimenticios dietéticos.
Glicirricina	<p>Obtenida en el año 1 809 del rizoma de la especie Glycyrrhiza glabra, conocida como regaliz. Es originaria del sur de Europa. Su poder endulzante es 60 veces mayor que el de la sacarosa.</p>	Se utiliza para edulcorar alimentos y bebidas. Se emplea también en tabletas y para aromatizar el tabaco.

Neohesperidina dihidrochalcona	La neohesperidina dihidrochalcona se obtiene por modificación química de una sustancia presente en la naranja amarga (<i>Citrus aurantium</i>). Es entre 250 y 1 800 veces más dulce que la sacarosa, y tiene un sabor dulce más persistente, similar al del regaliz. Se degrada en parte por la acción de la flora intestinal.	Es utilizado por la industria de alimentos como aditivo para la elaboración de diferentes productos como goma de mascar, caramelos, bebidas carbonatadas, bebidas no carbonatadas, yogurt, helados, postres, edulcorantes de mesa. Tiene asignado el código de aditivo E-959 en el listado de la Unión Europea.
Esteviósido	La <i>Stevia rebaudiana bertonii</i> es una especie sudamericana originaria del Paraguay, sur de Brasil y noreste de Argentina. Se la conoce mundialmente como yerba dulce o 'ka-á-he-é'. Las hojas de esta especie contienen otros principios endulzantes como son los rebaudiósido A y B. El esteviósido en forma pura es 300 veces más dulce que una solución al 0,4% de sacarosa. En cuanto a calorías, 10 hojas secas equivalen a 1 kilocaloría	Edulcorante de mesa, en bebidas, pastelería, confitería, yogurt, chicles, bebidas carbonatadas, bebidas dietéticas, jugos, néctares, entre otros. También en productos farmacéuticos por ser bactericida en pastas dentales, jarabes para la tos, medicamentos para personas diabéticas, etc.

Fuente: (Alonso, 2 010)

Cuadro N° 6. Edulcorantes no calóricos o no nutritivos de origen sintético.

PRODUCTO	DESCRIPCIÓN	USOS
Sacarina	Es casi 300 veces más dulce que el azúcar, no aporta energía, proporciona un sabor dulce intenso inmediato, pero deja un sabor residual intensamente amargo, es muy estable a los procesos de la industria de alimentos, no se le conoce ninguna interacción o reacción con otros alimentos, es 100% soluble en agua, Ingestión diaria admisible: 5 mg por kg de peso corporal.	Se emplea en varios alimentos y bebidas dietéticas.
Ciclamatos	Son 30 veces más dulces que el azúcar, proporcionan textura y sensación viscosa en la boca, por lo que se usan en mezclas con otros endulzantes que no tienen esta característica, sabor dulce limpio e intenso que se detecta de forma un poco retardada, el sabor es dulce residual ligero, ingestión diaria admisible: de 0 a 11 mg por kg de peso corporal.	En México, a partir de 2006 la Secretaría de Salud permitió de nuevo la utilización de ciclamatos en alimentos y bebidas no alcohólicas.
Sucralosa	Se considera 600 veces más dulce que el azúcar, posee un sabor dulce limpio, prolongado sabor dulce residual en la boca, se utiliza sola o en combinación con otros endulzantes, no aporta energía (calorías), muy estable en todos los procesos y condiciones utilizados en la	Se usa en bebidas refrescantes, néctares de frutas, concentrados de bebidas, edulcorantes de mesa, productos lácteos, de panificación, entre otros.

	industria de alimentos.	
Alitame	Es 2 000 veces más dulce que el azúcar, sabor dulce limpio parecido al del Aspartame, proporciona 4 kilocalorías por gramo, pero por ser tan intensamente dulce se utiliza en cantidades muy bajas por lo que su contribución energética es insignificante	Tiene muy pocas aplicaciones en la industria alimenticia debido a que no es muy estable a los procesos de la industria de alimentos como es el caso del horneado o la pasteurización.
Neotame	Es por lo menos 7 000 veces más dulce que el azúcar, por lo que su manejo es difícil por las cantidades extremadamente pequeñas que se utilicen, su perfil de sabor es muy similar al del Aspartame.	Es más estable que el Aspartame a diferentes niveles de pH y a altas temperaturas por lo que sirve como sustituto del azúcar para la elaboración de diferentes productos alimenticios combinado con otros aditivos.
Aspartame	Es cerca de 200 veces más dulce que el azúcar, sabor dulce intenso, de detección en la boca un poco retardada, deja un sabor dulce residual más intenso que el azúcar, que dura en la boca largo tiempo y en ocasiones se asocia a sabor metálico o extraño, poco estable a altas temperaturas y a ciertos valores de pH, puede reaccionar con otros componentes de los alimentos.	Se emplea en la gran mayoría de productos light como principal sustituto del azúcar (glucosa)
Acesulfame Potásico	Es casi 200 veces más dulce que el azúcar, puede tener un sabor residual amargo en concentraciones altas, por lo que	Se usa en bebidas refrescantes, néctares de frutas, concentrados de

	<p>regularmente se usa en combinación con otros endulzantes.</p> <p>Muestra características de sinergia que al combinarse con otros endulzantes, mejoran las características de los componentes de la mezcla, rápida detección en la boca, muy estable a los procesos de la industria de alimentos, no proporciona energía (calorías).</p>	<p>bebidas, edulcorantes de mesa, productos lácteos, de unificación, pastas de dientes enjuagues bucales, y productos farmacéuticos entre otros.</p>
--	--	--

Fuente: (Snarff, 2 006).

2.2.8 Cultivo In Vitro de la stevia

La conclusión generalizada a la que autores como Ahmed y colaboradores (2 007) han llegado con respecto al cultivo tradicional de Stevia (*stevia rebaudiana Bertoni*) es que las semillas de esta especie generan porcentajes de germinación tan bajos que su reproducción sexual se convierte en un trabajo poco viable, a lo que además se agrega la heterogeneidad de las poblaciones en cuanto a características de importancia como los niveles de producción de esteviósido (Sivaram y Mukundam, 2 003); se añade también que su reproducción asexual, lograda a través de brotes o estacas, limita las producciones a un número muy bajo de individuos regenerados. La necesidad de obtener poblaciones de Stevia, morfológica y genéticamente uniformes, es un tema que se plantea desde varias décadas atrás, y seguirá discutiéndose mientras se encuentre en juego la cantidad y calidad de los glucósidos (Suárez y Salgado, 2 008).

Por lo anteriormente expuesto, un gran número de investigadores, sobre todo en Medio Oriente, proponen el estudio del comportamiento in vitro de esta planta medicinal, de manera que se planteen, evalúen y optimicen protocolos enfocados en su introducción y multiplicación, lo que tendrá por objetivo final

la comercialización de productos naturales que aprovechen los compuestos edulcorantes de la especie, en distintas industrias (Alvarenga, 2 005).

La micropropagación garantiza la producción masiva de plantas libres de enfermedades y patógenos, aptas para la producción comercial de valiosos compuestos secundarios (Alvarenga, 2 005).

En cultivo in vitro se ha empleado la organogénesis directa mediante protocolos de cultivo de ápices meristemáticos y de segmentos nodales, y también existen estudios acerca de la embriogénesis somática en este cultivo (Uddin *et al.*, 2 006).

El 2 007 se publican varias investigaciones en el campo, una de ellas corresponde a la micropropagación de esta planta, a partir de medio con sales y vitaminas M & S suplementados con 0,5; 1; 2; 3 y 4 mg/l de BAP y 0,25 y 0,5 mg/l de AIA, separadamente y en combinación, donde el mejor nivel de brotación se obtuvo con únicamente 2 mg/l de BAP. Posteriormente, para la inducción de raíces, se emplea nuevamente el medio con sales y vitaminas M & S al 2% de sacarosa, adicionado con 0,25;0,5;1 y 1,5 mg/l de ANA y de AIB, de forma separada, obteniéndose el mejor resultado con 0,5 mg/l de ANA (Rafiq *et al.* 2 007).

En el Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR, se ha trabajado el cultivo in vitro de micro estacas con una yema axilar o apical de Stevia en medio sólido con las sales y vitaminas M y S, adicionado con 2 mg/l de Pantotenato de Calcio y 0,5 mg/l de AG. La introducción se realiza de igual manera con estacas desinfectadas, en medio semi-sólido con sales y vitaminas M & S sin reguladores (Alvarenga, 2 005).

La información anteriormente expuesta corresponde únicamente a las metodologías de establecimiento y multiplicación in vitro planteadas por algunos autores, no obstante, actualmente se conoce de una gran cantidad de información referente a estudios cuyo enfoque es la composición bioquímica de *S. rebaudiana*, sus propiedades y cualidades, la extracción y purificación de los edulcorantes, y su aprovechamiento comercial.

2.2.8.1 Propagación de Stevia

La Stevia se reproduce sexualmente por aquenios, observándose alta heterogeneidad en las poblaciones resultantes. La planta es de polinización cruzada y gran parte de sus aquenios son estériles, livianos y de fácil dispersión por el viento. La floración no es uniforme, lo mismo que la maduración de la semilla, siendo la recolección lenta y difícil. Las semillas deben guardarse en condiciones de baja humedad, baja temperatura, preferentemente en la oscuridad y en envases herméticos (Felippe, 1977).

Esta especie puede propagarse vegetativamente por separación de hijuelos. Este método sólo puede utilizarse para pequeñas plantaciones, ya que el número de hijuelos producidos es reducido. En la base del tallo, o bajo tierra, en la primavera temprana aparecen pequeños vástagos, muchos con sus respectivas raíces que pueden separarse y plantarse en el lugar definitivo (Jordán, 1983).

Otra forma de propagación vegetativa es a través de estacas; método que convenientemente ajustado podría ser usado a escala comercial. El cultivo de tejidos es otro método de propagación vegetativa que permite obtener plantaciones más uniformes, además de la rápida multiplicación clonal (Marcavillaca, 1985).

2.2.8.2 Propagación in vitro y Cultivo de Tejidos

La propagación in vitro o micropropagación se define como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en las plantas de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas "limpias", contrario a la propagación vegetativa no aséptica o convencional (Ayerbe, 1 990).

Las ventajas de la micropropagación en comparación con sistemas convencionales son: el incremento acelerado del número de plantas, reducción del tiempo de multiplicación, necesita superficie reducida para muchas plantas, mayor control de la sanidad, fácil transporte para intercambio internacional de materiales y la posibilidad de multiplicar rápidamente especies en peligro de extinción. (Ayerbe, 1 990).

2.2.8.3 Fases de la micropropagación

La propagación in vitro consta de cinco etapas: la etapa 0 o inicial para seleccionar una planta madre; la etapa I de iniciación o establecimiento para el cultivo inicial o primario; la etapa II de multiplicación de brotes; la etapa III de enraizamiento o pre transplante para producir una planta autotrófica que sobreviva en las condiciones de transplante del suelo y la etapa IV de transferencia final al medio ambiente (Ayerbe, 1 990).

a) Etapa inicial (Selección de la planta madre)

George (1 993) expone que la planta donante debe ser típica de la variedad o de la especie y estar in vitro y responder apropiadamente. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de (célula, órgano o tejido) a establecer en condiciones in vitro.

Los materiales (explantes) que han mostrado tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemático jóvenes como yemas axiliares o adventicias, embriones, semillas o plántulas, y tejidos meristemáticos como el cambium de las plantas leñosas.

b) Etapa I: (Establecimiento del cultivo aséptico)

En esta etapa los principales procesos a controlar son el aislamiento y la esterilización de los explantes. Es indispensable que se tenga un método eficiente para eliminar esporas, tejidos fungosos, bacterias y otros contaminantes sin dañar el tejido y reducir la capacidad de regeneración del explante. Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en el laboratorio.

La desinfección requiere el empleo de sustancias químicas, que son tóxicas para los microorganismos pero relativamente inocuas para el material vegetal, tales como Hipoclorito de Sodio y de Calcio, además se emplean algunos alcoholes (Etilíco Metílico o isopropílico) en diferentes concentraciones, la efectividad de estas sustancias es esencialmente una respuesta tiempo-concentración, en el cual la efectividad para desinfectar aumenta con ambos factores, pero también aumenta la capacidad para dañar el tejido, en consecuencia se debe de buscar un equilibrio de acuerdo al explante de que se trate (Hertmann y Kester, 1987). Otra sustancia química es el Cloruro de Mercurio ($HgCl_2$) empleando en bajas dosis y por corto tiempo; sin embargo, su uso es poco

recomendable debido a su alta toxicidad (Dodds y Roberts, 1985).

c) Etapa II: (Multiplicación)

Esta etapa generalmente comprende dos periodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera implica el empleo de reguladores de crecimiento, para favorecer la diferenciación celular. La segunda fase requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación (Dodds, 1985)

d) Etapa III: (Enraizamiento)

En esta etapa, se produce la formación de raíces adventicias en los brotes regenerados. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones in vitro como ex vitro.

En el primer caso pueden emplearse reguladores de crecimiento (auxinas) en el medio de cultivo para promover la rizogénesis. Asimismo, los nutrientes del medio se pueden reducir a la mitad o a la cuarta parte de la composición original y la sacarosa reducir de 1-2 %. En el enraizamiento ex vitro, puede hacerse uso de sustratos como perlita o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua.

La auxina más utilizada en esta etapa es el AIB (ácido 3-indolbutírico), que puede utilizarse a concentraciones de 1 a 10mg/L durante pocas horas. Alternativamente se pueden emplear niveles más bajos de auxinas (0,1 a 1mg), pero manteniendo la inducción por un periodo más prolongado (3 a 7 días). Luego los vastagos, se transfieren a un medio de cultivo

basal desprovisto de reguladores de crecimiento para permitir el desarrollo de las raíces.

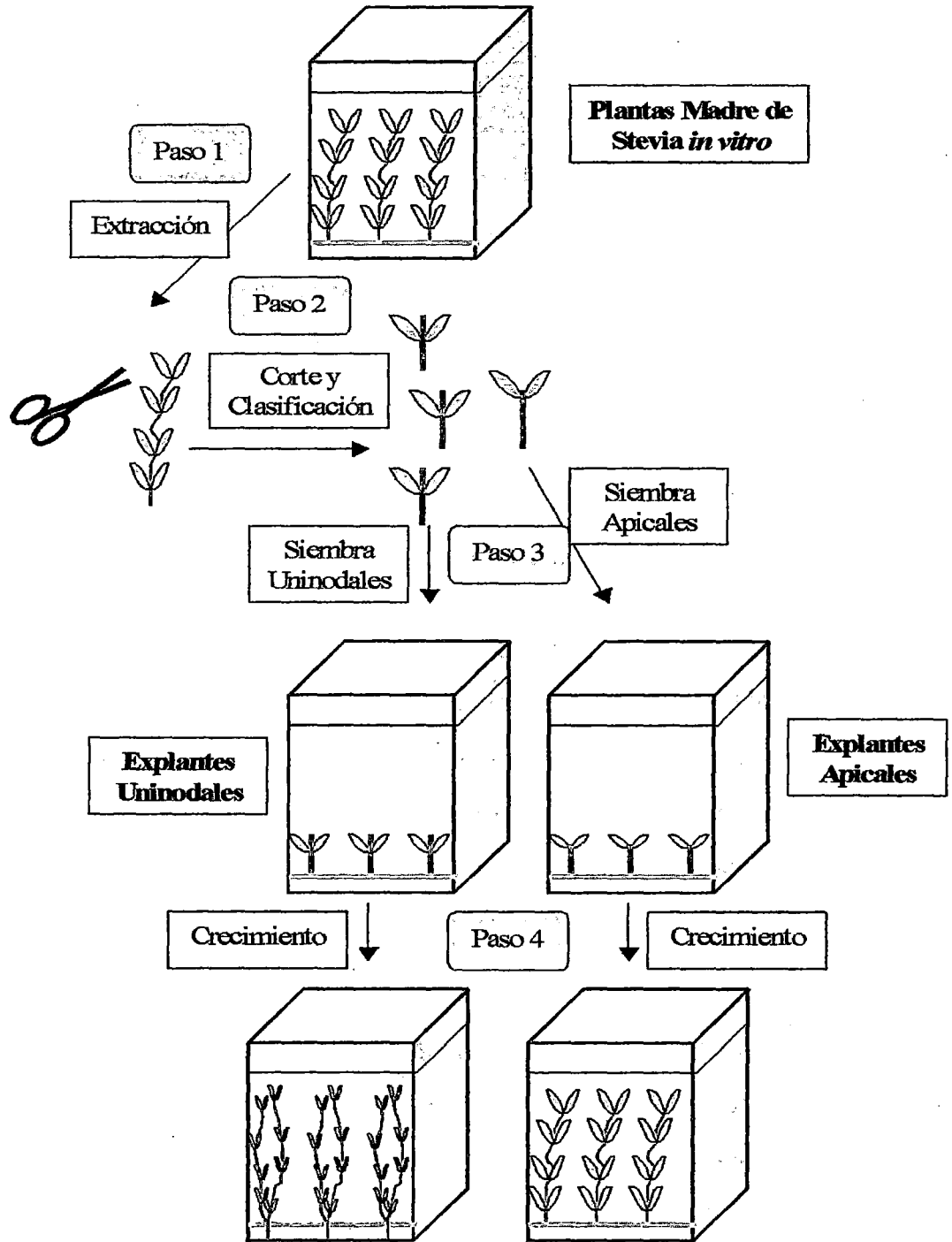
e) Etapa IV: (Aclimatación)

Incluye la transferencia de las plántulas del medio aséptico de cultivo al ambiente de un invernadero. Al principio de esta etapa las plántulas pueden estar enraizadas o no.

En cualquiera de los casos para que puedan sobrevivir deben de pasar por la etapa de aclimatación, en la que deben de volverse autótrofas, desarrollar las raíces brotes funcionales y aumentar su resistencia a la desecación y al ataque de organismo patógenos.

Para ello es importante considerar ciertas condiciones como el mantenimiento elevado de humedad relativa para evitar la deshidratación, y la protección contra diversos organismo patógenos, por considerar algunos (Hartman y Kester, 1 987)

Figura N° 2. Esquema de propagación in vitro de la Stevia.



Fuente: INIAP, 2 002

Existen varias vías generales para realizar la multiplicación clonal como son: la multiplicación de brotes de yemas terminales o laterales; la organogénesis directa e indirecta; embriogénesis somática; el micro injerto; cultivo de embriones y esporas (Ayerbe, 1 990).

Los factores que determinan el éxito del sistema de micropropagación depende de la planta que dona el explante (mientras más joven y menos diferenciado el tejido, mejor será la respuesta in vitro), el explante (partes embrionarias, brotes jóvenes y ápices meristemáticos), los factores físicos (luz y temperatura) y el medio de cultivo por su composición química y forma física (Ayerbe, 1 990).

2.2.9 Tiamina

Las vitaminas tienen funciones catalíticas en reacciones enzimáticas; la tiamina o B1 es importante para las células de las plantas (Smith, 2 000). Se encuentra generalmente en dos formas, una forma "libre" la cual es tiamina y en la forma "enlazada" llamada pirofosfato de tiamina (Devlin, 1 975).

A menudo se afirma que ciertas plantas crecen más rápido, o que quizás tienen mayor productividad, cuando se les proporcionan vitaminas exógenas, especialmente la vitamina B, ya sea rociándolas, humedeciendo la vegetación o bien ocasionalmente del suelo (Salisbury, et. al. 2 000).

Aparentemente la tiamina estimula al sistema radicular de la mayoría de vegetales, que a su vez no sintetizan una cantidad suficiente en la raíz para suplir sus propias necesidades. Hay que destacar que es importante saber el nivel óptimo de Tiamina en los medios usados para propagación in vitro, ya que por su función fisiológica en los vegetales es una opción viable para suprimir hormonas de crecimiento y enraizamiento (Devlin, 1 975).

2.2.10 Kinetina

La Kinetina o 6-furfurilaminopurina es un compuesto que fue obtenido por Miller en 1955 y se ubica dentro del grupo de las citoquininas. Es el descubrimiento más importante en la búsqueda de compuestos que podrían inducir a las células a multiplicarse.

La Kinetina no se puede considerar un producto natural de la biosíntesis de la planta ya que se obtiene a partir de la deoxiadenosina que es un producto de la degradación del ADN. Ésta hormona tiene varios efectos en diversos sistemas de crecimiento vegetal, ya que parece afectar la translocación de compuestos solubles nitrogenados. Entre sus efectos fisiológicos están la habilidad de promover la división y elongación celular, además de romper la dormancia (Devlin, 1975; Ayerbe, 1990).

2.2.11 Composición química de la Stevia: (*stevia rebaudiana* Bertoni)

Hasta la fecha, se encuentran diez diferentes compuestos químicos, responsables del sabor dulce de la planta: esteviósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F, dulcosida A, rubusosida y steviolbiosida. La mayor concentración del efecto dulce proviene del esteviósido y del rebaudiosida A.

El resultado es que Stevia y extractos de Stevia son considerados inocuos en su uso como edulcorante de mesa bajo ciertas condiciones.

El Organismo Europeo de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda una dosis máxima diaria de 4 mg por kilogramo de peso corporal, para estar seguros, la misma dosis máxima es recomendada por la Organización Mundial de Salud (OMS).

Cuadro N° 7. Composición nutricional de la stevia en estado natural

ANALITO	VALOR (g/100g)
Carbohidratos	60
Fibra	15
Polipeptido	16
Lipidos	4
Potasio	1
Calcio	1
Magnesio	1
Fosforo	1
Cromo	<0,01
Cobalto	<0,01
Hiero	<0,01
Magnesio	<0,01
Selenio	<0,01
Zinc	<0,01

Fuente: (Llanos, 2 006).

Cuadro N° 8. Nombres químicos de los componentes de la hoja de Stevia.

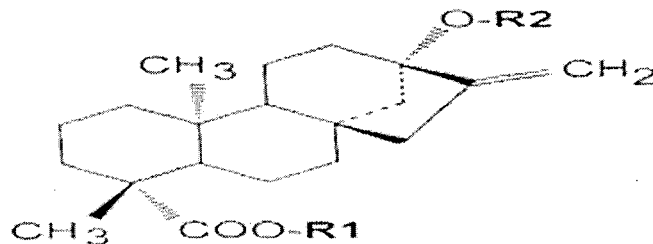
Nombre	Estructura Química
Esteviósidos	13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil) oxi] ácido Kaur-16-en-18oico, β-D-glucopiranosil Éster
Rebaudiósido A	13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-3-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil) oxi] ácido Kaur-16-en-8-oico, β-D-glucopiranosil éster.
Rebaudiósido B	13-[(2-O-a-L-ramnopiranosil-3-O-β-D-glucopiranosil) oxi] ácido Kaur-16-en-18-oico, β-D-glucopiranosil éster.
Dulcósido A	13-[(2-O-a-L-ramnopiranosil-β-D-glucopiranosil) oxi] ácido Kaur-16-en-18oico, β-D-glucopiranosil éster.

Fuente: (European Stevia Asociación eustas 2 006).

a). Los componentes dulces de la (*Stevia rebaudiana Bertoni*).

La Stevia contiene una mezcla de edulcorantes en las hojas como se observa en la figura 3 en la cual el esteviósido se encuentra en general, en mayor concentración.

Figura N° 3. Estructuras de esteviósidos y compuestos relacionados



Fuente: (European Stevia Asociación, eustas 2006).

Figura N° 4. Compuestos de los esteviósidos y compuestos relacionados.

Compound name	R1	R2
1 steviol	H	H
2 steviolbioside	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
3 stevioside	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
4 rebaudioside A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
5 rebaudioside B	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
6 rebaudioside C (dulcoside B)	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
7 rebaudioside D	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
8 rebaudioside E	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
9 rebaudioside F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
10 dulcoside A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1)

Fuente: (European Stevia Association eustas 2 006)

El contenido en edulcorantes puede variar entre el 4% y el 20% del peso de la hoja seca dependiendo en la variedad y las condiciones de crecimiento, pero es alrededor del 10% en la mayoría de los cultivos realizados sobre terreno. La biosíntesis de steviol, la aglicona de esteviósidos, sigue el camino del 2-C-MetilD-eritritol-4-fosfato recientemente aclarado, tal y como ocurre con todos los terpenoides formados en los tejidos de las plantas.

Hasta la formación del ent-kaurenato la síntesis de steviol es similar a la de las giberelinas, un grupo de hormonas vegetales. En la Stevia está presente una 13 hidroxilasa que hidroxila el ent-kaurenato en su posición para dar lugar a steviol.

Así como también algunas especies de stevia tienen hojas dulces, no hay otras especies a parte de *Stevia rebaudiana Bertoni* que posean tal intensidad edulcorante; sin embargo, también se pueden encontrar esteviósidos en hojas de frambuesa, *Rubus suavissimus* S. (Tucker y Debaggio, 2 009).

La Stevia es, en su forma natural, diez a quince veces más dulce que el azúcar común de mesa, mientras que los extractos de Stevia tienen una potencia endulzante de cien a trescientas veces mayor que la del azúcar. Y, mejor aún, la Stevia no afecta el metabolismo de la glucosa en la sangre (Atencio, 2 005).

2.2.13 Propiedades de la Stevia

Atencio (2 005) enumera las siguientes propiedades de la Stevia:

- a). Posee propiedades hipoglucémicas, mejora la tolerancia a la glucosa y es por eso que es recomendado para los pacientes diabéticos.
- b). Reduce la ansiedad por la comida y, así, el cuerpo almacena menos grasas.
- c). La Stevia disminuye también el deseo por tomar dulces y grasas, que suele desembocar en el aumento de peso corporal y está relacionado con la ansiedad.
- d). La Stevia retarda la aparición de la placa de caries. Es por eso que se usa para hacer enjuagues y como componente de la pasta de dientes.
- e). Es un hipotensor suave que baja la presión arterial cuando está demasiado alta. Tiene efecto vasodilatador, diurético y cardiotónico (regula la presión y los latidos del corazón). Estudios demostraron que una sola dosis de extracto líquido produjo una disminución del 9.5% de la presión arterial sistólica, actividad que podría fortalecer el corazón y el sistema cardiovascular. Otros estudios permitieron descubrir que el uso de Stevia

durante 30 días, daba como resultado la disminución de la presión sistólica.

f). Es un diurético de acción leve y mejora las funciones gastrointestinales.

g). Colabora en la desintoxicación del organismo a causa del tabaco y el alcohol. Para aprovechar este beneficio, se puede preparar un té que reduce el deseo hacia estos dos tóxicos.

h). Previene e inhibe la reproducción de bacterias y organismos infecciosos y mejorar la resistencia frente a resfríos y gripes. Los estudios que se realizaron para comprobar su actividad antibiótica demostraron su capacidad de combatir la bacteria *E. coli*, *Stafilococcus aureus*, y *Crynebacterium differiae*, así como también su poder contra el hongo *Cándida albicans* productor frecuente de vaginitis en la mujer.

i). Es adecuada para bajar el nivel de acidez de la sangre y de la orina, y para problemas de acidez de estómago. Análisis de laboratorio han demostrado, que la Stevia es extraordinariamente rica en hierro, manganeso y cobalto. No contiene cafeína y posee efectos antioxidantes comparables al conocido té verde.

j). La Stevia natural, sin refinar, contiene más de 100 fitonutrientes y aceites volátiles identificados. Esto era bien conocido por los nativos guaraníes que, desde los tiempos pre-colombinos, la usaban para endulzar sus medicamentos y bebidas o simplemente masticaban sus hojas para disfrutar el dulce sabor.

k). Diversas investigaciones realizadas en referencia al excesivo consumo de azúcar refinada en los niños, asocian éste a problemas de hiperactividad, cambios repentinos de humor, problemas de conducta e irritabilidad, además de los conocidos problemas dentales. El uso de la hierba dulce ayudaría a bajar los niveles de azúcar refinada.

2.2.14 Cosecha de la Stevia

Según muchos agricultores de la planta de Stevia, el mejor momento para poder realizar el corte de las ramas de la planta es cuando están a punto de florecer, justo antes que el botón comienza a florar, al realizar el corte en esta etapa se asegura obtener la mayor cantidad del contenido de glucósido de las hojas. Se recomienda hacer el corte a unos 5 -10 cm del suelo y por la mañana con el propósito que la planta pueda secarse por efecto del sol, ya sea directamente al sol, en secadores solares (como en el caso de Torres J.) o en secadores automatizados.

Según el proceso realizado por (Torres, 2 012) se juntan las ramas recién cortadas y se llevan directamente al desecador solar, donde se controla la temperatura del equipo con un termómetro. Se deja reposar en este equipo las partes de la planta hasta alcanzar una humedad del 12%, lo cual asegura que la hoja está lista para pasar al proceso de molido y que no será propensa posteriormente al ataque de hongos. Cuidando de esta forma su vida de anaquel y la calidad de la cosecha.

a). Corte y secado natural de la Stevia

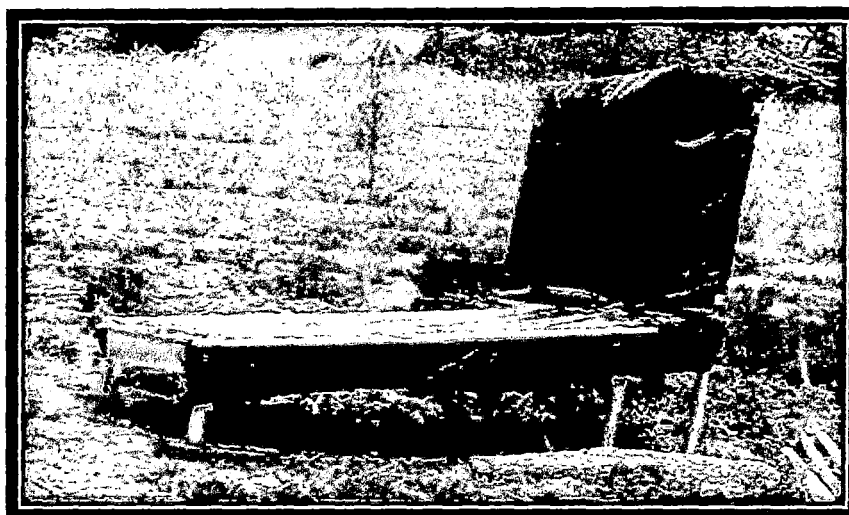
Para obtener hojas secas de buena calidad, se debe tener en cuenta factores que inciden o pueden afectar la calidad del producto y la disponibilidad de elementos mínimos necesarios que se analizan en los siguientes literales (Guía del emprendedor, 2 004).

b). Proceso de secado de la Stevia

Del proceso de secado depende la calidad del producto final, las hojas se debe de secar hasta el punto de facilitar su manipulación, con una humedad menor igual a 12%. En el proceso de secado se debe evitar el contacto directo con el ya que esta exposición directa puede llegar a alterar las propiedades de la hoja las condiciones de intensidad solar son

bajas y la humedad relativa es alta, necesario utilizar secadores artificiales provistos de un sistema de calefacción ventilación como el que se presenta en la figura 6 logrando mediante este equipos un secado más uniforme. (Landázuri ; Tigreiro, 2 009)

Figura Nº 6: Secador solar utilizado para el secado de las hojas de (*Stevia rebaudiana Bertoni*).



Fuente: (Torres 2 012)

2.2.15 Industrialización de la Stevia

En este apartado se tratará sobre la industrialización del tallo y hoja de Stevia. Los tallos de la Stevia, no se deben descartar. Se recomienda, cuando estén bien secos, cortarlos en trozos de 1 a 2 pulgadas y ensacarlos, almacenándolos en lugar seco y protegido de lluvia, animales y del sol. Estos tallos contienen un alto porcentaje de antioxidantes y son requeridos por la industria japonesa y alcanza precios en el mercado internacional de hasta \$700 dólares la TM.

También se pueden utilizar como fuente de materia orgánica, incorporándose al terreno, como fuente de fibra para la alimentación animal y como cobertor para la misma plantación de Stevia (Zubiate, 2 007).

a) Envasarse en bolsas plásticas transparentes: El envasado de las hojas secas seleccionadas de Stevia, debe realizarse en un ambiente totalmente limpio, el personal deberá poner en práctica las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). El envasado se efectuará sobre mesas, en envases de polipropileno, grado alimenticio y el peso estará de acuerdo a los pedidos (10;20;50 grs, etc.),deberá de utilizarse para el caso una balanza digital y cerrar con máquina selladora (Zubiate, 2 007).

b) Envasarse como té o mate filtrante: Las hojas secas deben ser molidas con molino de cuchilla y luego de martillos a mesh 20, posteriormente se irradian y se llevan a una máquina sachetetera que efectúa el resto del servicio. Los sachets filtrantes se envasan en cajitas impresas y troqueladas de cartón de 20 ó 25 unidades (Zubiate, 2007).

c) Molerse y convertirse en hoja micro pulverizada (azúcar de Stevia): Las hojas bien secas se muelen en un molino hasta alcanzar mesh 80 ó más, según requerimiento, luego se irradian y se envasan en bolsas de papel o plástico, constituyéndose en un insumo para la industria (Zubiate, 2 007).

d) Preparación de extractos concentrados de Stevia: Los extractos se obtienen macerándose en agua en la proporción de 1 a 6, es decir 1kgr de hojas por 6 litros de agua, por espacio de 2 días; luego se filtra, se prensa y al residuo seco se le añade 2 litros de agua, se hierve por 20 minutos y se macera por 2 días más. Al final se juntan los 2 líquidos resultantes, se filtra y se evapora a baja temperatura el líquido, hasta obtenerse 1 litro de extracto

concentrado de Stevia de color oscuro muy dulce que contiene aproximadamente 10% de esteviósidos.

Se puede ir evaporando y concentrando este producto para alcanzar mayores concentraciones. El residuo seco sirve como fertilizante, combustible, alimento para animales. La Irradiación: Es un proceso por el cual los productos son sometidos a la acción de rayos biocidas que elimina bacterias, hongos y virus en muy corto tiempo y sin empleo de productos químicos ni calor. Este tratamiento asegura la entrega de productos naturales al mercado con baja carga bacteriana y sin contaminante químicos. Existen otros tratamientos como fumigaciones a las hojas con productos químicos (óxido metilico, dióxido de azufre, etc.) que pueden o no ser aceptados por el mercado, el producto, en este caso, deja de ser orgánico. Seguidamente se presenta en el cuadro 2,7 parámetros de calidad que deberán de tener las hojas de Stevia (Zubiate, 2 007).

Cuadro N° 10. Parámetros generales de calidad de la hoja de *Stevia rebaudiana Bertoni*.

Parámetros	
Humedad	<11%
Cantidad de hoja negra y palillo	<8%
Cantidad de elementos extraños	<0,5%
Glicósidos totales	>10%
Cantidad de rebaudiósido-A	> 60%

Fuente: (FIAGRO, 2 011).

De acuerdo con Nasser (2 011) de FIAGRO los parámetros generales recién citados en el cuadro 10 son susceptibles a cambios, por lo que únicamente representan una información general sobre los parámetros de calidad de la hoja de Stevia.

2.2.16 Diversas aplicaciones de la Stevia

Otras disciplinas son conocedoras desde hace siglos de los grandes beneficios de la Stevia. En agricultura, la Stevia se emplea como activador de cultivos, ya que ayuda a obtener frutos más grandes y más dulces, y para mejorar la calidad del césped en jardinería o en campos de golf. El mundo de la cosmética emplea la Stevia para elaborar cremas y productos para el cuerpo, como jabones y lociones. Las cremas elaboradas a base de extracto de Stevia son rejuvenecedoras. Es un excelente desinfectante y antioxidante, y elimina las bacterias y los hongos, algo muy útil en medicina para tratar las enfermedades de la piel. La Stevia también es beneficiosa para los animales, ya sean mascotas, animales de granja o caballos de carreras.

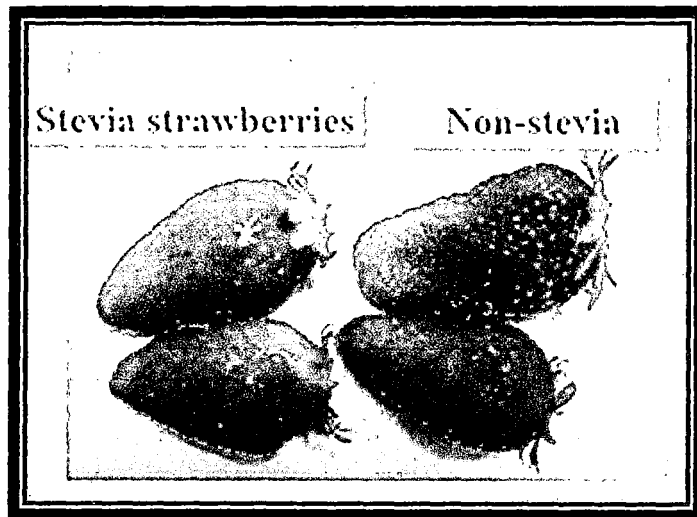
Según los autores (Landázuri;Tigrero, 2 009) el sector agropecuario también se ha beneficiado de sus propiedades; al momento se utilizan extractos de Stevia para abonar suelos, como se muestra en la figura N° 7. Con el fin de estimular los procesos fotosintéticos de los cultivos y obtener una elevada concentración de azúcares en los frutos como lo muestra la figura 8; además aplicando el extracto en el agua de riego se enriquece la población de los microorganismos beneficiosos (antagonista) del suelo. Con la aplicación al suelo del tallo finamente pulverizado se logra recuperar un suelo contaminado con los fertilizantes químicos, transformándolo en un suelo fértil.

Figura Nº 7. Extractos de Stevia para abonar suelos.



Fuente: (Landázuri y Tigreiro, 2 009)

Figura Nº 8. Procesos fotosintéticos de la fresa una elevada concentración de azúcares con extracto de stevia



Fuente: (Landázuri y Tigreiro, 2 009)

Según Escalante *et al.* (2 003) la utilización de Stevia como aditivo alimentario fue incorporada, según el artículo 1 398 inciso 64,3 del código alimentario argentino y está aceptado por el FDA de los Estados Unidos como suplemento dietario.

2.2.17 Características antibacterianas de extracto de Stevia

La investigación ha demostrado que el concentrado líquido de la Stevia inhibe el crecimiento y la reproducción de bacterias dañinas y de otros organismos infecciosos, incluyendo los que sean un problema para las industrias de alimento y del cosmético.

La Stevia también posee uso medicinal, pues sus propiedades terapéuticas son utilizadas para: tratamiento de la diabetes, por no aumentar los niveles de glucosa en sangre; obesidad, por no aportar calorías al ser metabolizada; acidez estomacal por ser antiácida; anticaries, por no ser fermentada por las bacterias orales; etc.

Figura Nº 9. Productos edulcorados con Stevia.

INDUSTRIA DE ALIMENTOS (Edulcorante)			
Mermeladas.		Caramelos	
Chicles		Helados	
Jugos de fruta		yogurt	
Gaseosas		Dentríficos	
Jarabes		galletas	

Fuente: (Escalante, 2 003).

Los extractos de Stevia pueden encontrarse de varias formas:

- a. Como un líquido denso de color oscuro y que es el resultado de hervir las hojas en agua, en esta forma se potencian los sabores de los alimentos a los que se le añaden.
- b. Otro tipo de líquido es el obtenido a través del macerado de las hojas en agua destilada o en una mezcla de licor alcohólico (apto para el consumo humano) y agua.
- c. Una tercera forma de presentación es un líquido obtenido desde el esteviósido disuelto en agua.

Todos los métodos anteriores, son totalmente naturales.

2.2.18 Ventajas y usos de la Stevia

I. Aspectos nutricionales:

Aparte de los constituyentes dulces: esteviósido, rebaudiósido y dulcósido. Otros componentes nutricionales: ácido ascórbico, betacaroteno, calcio, cromo, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, flúor, zinc, selenio, cobalto y proteína.

II. Aspectos terapéuticos:

Usado tradicionalmente entre la medicina herbaria brasilera y paraguaya, y en tiempos modernos clínicamente en casos de: Diabetes, cardiotónico y protector cardiovascular, hipertensión, diurético, obesidad, ácido úrico, como antioxidante, antiviral y bactericida. No tiene contraindicaciones comprobado clínicamente. Hoy considerada por los mismos japoneses como poderoso antioxidante, 5 veces superior a su té verde. (European Stevia Association, eustas 2 006)

III. Aspectos industriales:

- a. Endulzante inocuo desde salsas, encurtidos y confites hasta gaseosas.
- b. Reduce costos de producción por ser 300 veces más eficiente que la sacarosa.
- c. Tiene poder sinérgico, potencializa la dulzura y el sabor.
- d. Los productos congelan rápidamente y demoran más en descongelar.
- e. No fermenta ni reacciona con otros componentes presentes en los alimentos.
- f. Aceptado por FDA de USA como aditivo alimentario inocuo desde 1 997.
- g. Aceptado como sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS por sus siglas en inglés) de la FDA en Diciembre 2 008.

IV. Aspectos medioambientales:

- a. Restaura la salud del suelo donde se cultiva.
- b. Estimula el crecimiento de raíces.
- c. Activa la habilidad reproductora de las células vegetales.
- d. Desintoxica la tierra de residuos agrotóxicos.
- e. Su cultivo es muy promisorio, tanto por su buen precio internacional, como opción en ciertos países de remplazo de cultivos ilícitos (European Stevia Association, eustas 2 006).

2.2.20 Glucósidos de esteviol

Los glucósidos de esteviol son componentes naturales de la planta (*Stevia rebaudiana Bertoni*). El interés de los glucósidos de esteviol radica en sus propiedades edulcorantes y sus principales componentes son el esteviósido y el rebaudiósido. El producto se obtiene de las hojas de (*Stevia rebaudiana Bertoni*). Las hojas se procesan con agua caliente y el extracto acuoso se concentra y purifica ulteriormente. El producto final puede presentarse desecado por pulverización. Las preparaciones de glucósidos de esteviol son unos polvos solubles en agua, entre 200 y 300 veces más dulces que la

sacarosa, blancos o blancos ligeramente amarillentos, cristalinos, inodoros o con un ligero olor característico (Kuznesof y Wallin, 2 008).

Los extractos de Stevia suelen contener un elevado porcentaje de los glucósidos esteviósido y rebaudiósido A y cantidades más pequeñas de otros glucósidos de esteviol como rebaudiósido C, dulcósido A, rubusósido, esteviolbiósido y rebaudiósido B. La composición de los extractos depende de las hojas, en la que influyen el suelo, el clima, y los procesos de extracción y purificación empleados. Las impurezas que aparecen en los extractos de hojas de Stevia son materiales vegetales característicos, como pigmentos y sacáridos (Kuznesof y Wallin, 2 008).

El extracto líquido de Stevia puede ser aplicado directamente como endulzante en un producto alimenticio sin que se aprecie alguna diferencia organoléptica frente al elaborado con steviósido comercial obtenido por un procedimiento tradicional (Zeiger, 2 007).

Los extractos de glicósido de esteviol tienen muchas aplicaciones como edulcorantes en la elaboración de bebidas a base de fruta y leche, postres, yogur, golosinas, productos de confitería, productos a base de fruta, productos marinos procesados, encurtidos, como edulcorantes de mesa y complementos dietéticos (Kuznesof ; Wallin, 2 008).

Los extractos son adecuados para cocer, puesto que son termoestables, a diferencia de algunos edulcorantes artificiales como el aspartame. Sin embargo, no son adecuados para determinados productos de confitería como los que llevan chocolate o los glaseados, ya que carecen de propiedades emulsionantes (Kuznesof y Wallin, 2 008).

En algunos países de América del Sur y de Asia se utilizan desde hace muchos años, extractos de las hojas de Stevia machacadas en agua como edulcorante. También se sabe que las hojas de Stevia se utilizan para hacer té dulce en varios países alrededor del mundo (Kuznesof y Wallin, 2 008).

2.2.20 Esteviósido

El esteviósido fue identificado por los franceses Bridel y Lavieille en 1931; no obstante, las hojas de esta especie contienen otros principios endulzantes como los rebaudiósidos A y B. El rebaudiósido A es 190 veces más. El esteviósido en forma pura es 300 veces más dulce que una solución al 0,4% de sacarosa (Alonso, 2 010).

Los experimentos con insectos herbívoros han concluido que el esteviósido es anti-comestible: muchos insectos prefieren pasar hambre antes que comer las hojas de Stevia. El esteviósido tiene propiedades que regulan el crecimiento de las plantas, similares a las giberelinas (Tucker y Debaggio, 2 009).

Los esteviósidos no fermentan, no se oscurecen por cocción y son muy estables al calor y ácidos. Tiene sabor detectable en un umbral de 0,002%, pero grandes cantidades de hojas provocan un sabor amargo (Tucker y Debaggio, 2 009).

Estudios hechos por el departamento de Endocrinología y Metabolismo de Aarhus University Hospital de Dinamarca revelaron que el esteviósido actúa estimulando en forma directa las células beta del páncreas generando así una secreción considerable de insulina (Atencio, 2 005).

El esteviósido presenta sabor amargo, dejando un resabio dulce en altas concentraciones. Los estudios de toxicidad tanto en animales como en

humanos revelan que el producto es muy seguro. Asimismo, los esteviósidos presentan efecto hipoglucemiante suave y mejoran la curva de tolerancia a la glucosa en ayunas (Alonso, 2 010).

2.2.21 Rebaudiósido A

De toda la mezcla de glucósidos de steviol, el rebaudiósido A se encuentra entre el 20 y el 70 por ciento (Kuznesof y Wallin, 2 008).

Estudios complementarios realizando pruebas sensoriales, determinaron que el rebaudiósido A tiene el mejor sabor y es más cercano al azúcar (Jaramillo y Rogel, 2 007).

De todos los glucósidos de steviol, el Rebaudiósido A ó rebiana tiene una dulzura sin notas de sabor amargo o metálico. Por ello tiene que ser extraído de la planta mediante un proceso utilizando solamente agua mientras que el etanol de grado alimentario se utiliza para purificar aún más el extracto en rebiana en un proceso similar a la forma de extraer la esencia de vainilla (Baker, 2 010).

2.2.22 Propiedades de los glucósidos de steviol

Según Llanos (2 006), citado por Jaramillo y Rogel (2 006), entre las principales propiedades de los principios activos son:

- a). Resistencia al calor; su estructura no se modifica por exposición a altas temperaturas, es decir no pierde su poder edulcorante al someterla a procesos como pasteurización, esterilización y cocción. Se ha llegado hasta 238 °C conservando sus características.
- b). Alta solubilidad en agua y en soluciones hidroalcohólicas.
- c). Resistencia al pH, es estable en un rango amplio de 3 a 11 aún a 100°C.
- d). El steviósido y el rebaudiósido A son inodoros.

2.2.23 Cromatografía de Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

La cromatografía líquida de alta eficacia es una técnica analítica de separación que se utiliza con gran frecuencia debido a su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, a su alta sensibilidad e idoneidad para la separación de especies y a su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, la ciencia y la sociedad. Este método físico de separación es basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. Los componentes atraviesan dicha fase a distintas velocidades y se van separando, luego pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y el tipo de compuesto (Scott, 2 003).

La respuesta del detector en función del tiempo se recoge en una gráfica denominada cromatograma, el eje horizontal corresponde al volumen o al tiempo equivalente, Normalmente se mantiene constante la velocidad de flujo (volumen/tiempo) para que el tiempo pueda ser siempre representado en el eje horizontal. El eje vertical es proporcional a la respuesta que se produce en el detector a medida que el líquido efluente del soporte cromatográfico pasa a través de él. La separación de los componentes depende del ancho de los picos y del espacio de tiempo entre los picos (Yost *et al*, 1 980)

2.2.25 Determinación de la concentración de esteviósido en el extracto de stevia por HPLC.

Se determinó la concentración del esteviósido en el extracto final de stevia mediante la cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, este análisis se realizó con el objetivo de constatar, que se obtuvo el esteviósido durante la extracción de los glicósidos de stevia asistida por ultrasonido.

Se utilizó el equipo La Chrom Elite-Hitachi , equipado con una bandeja de muestras automática, una bomba cuaternaria y un diodo detector de arreglo matriz. La columna analítica fue Phenomenex Luna C18 (25 cm x 4,6 mm; 5 micras I.D.) La separación se realizó con un sistema eluyente metanol-agua (63: 35) como fase móvil, la velocidad de flujo fue de 2 ml/min y la longitud de onda de detección fue de 219 nm.

Figura N° 10. Equipo de Cromatografía Líquida Alta Eficiencia HPLC.



Fuente:(Yost *et al*, 1 980)

Este estándar se llevó a una concentración conocida, se tomaron 4,6 mg de esteviósido y se diluyó en 10 ml de agua destilada (460 ppm), para llevar a cabo este análisis, se volvió a diluir la muestra hasta 230 ppm. El extracto se filtró a través de un filtro de 0,45 micras antes de su uso en el análisis por HPLC. Debido a la alta concentración de esteviósido, que tenía la muestra con respecto a la concentración del estándar, se utilizó un factor de dilución de 0,04 el volumen de inyección de la muestra de glicósidos de stevia en el equipo fue de 10 μ L.

2.2.25 Caracterización del steviosido en una muestra.

El volumen de muestra utilizado para la determinación del esteviósido por HPLC (10 μ L), tuvo un efecto positivo con respecto a la precisión de los datos, un incremento de este volumen puede ocasionar el aumento del ensanchamiento del pico cromatográfico, lo cual, causaría una pérdida de eficiencia en la columna. El metanol como solvente utilizado, impidió que se presentara alguna variación en el análisis relacionada con la alteración de la muestra y la fase móvil debido a la baja reactividad que presenta, ésta es una propiedad del solvente.

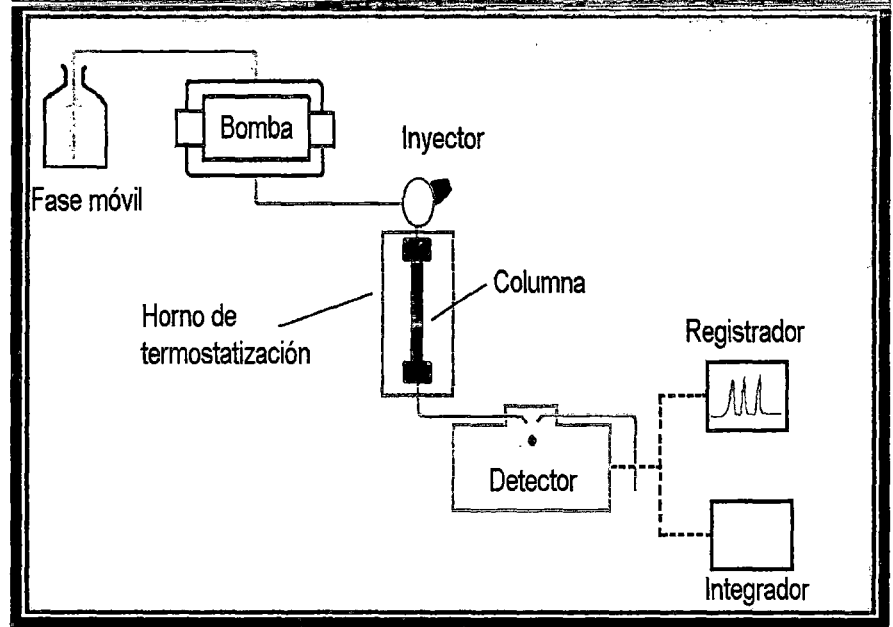
En esta investigación no se identificaron los demás componentes encontrados en el extracto, se adquirió sólo el estándar de esteviósido debido a que es uno de los dos compuestos de interés de la stevia y se encuentra en alta proporción en el extracto.

El tiempo de retención sirvió como base para la obtención del pico, sin embargo, para otros análisis esto a veces no resulta suficiente. En esta experiencia no se produjo superposición de picos durante el análisis del estándar y del extracto obtenido en el experimento porque, según estudios y análisis realizados el Esteviósido se lee en un tiempo de retención diferente al Rebaudiósido A, el cual es otro componente influyente y de alta concentración en el extracto analizado, el tiempo de retención del Rebaudiósido A es aproximadamente en 15 minutos, por esta razón no se registra en el cromatograma y no interfiere con la detención del esteviósido.

Afectación del pH, es decir, al momento de realizar la prueba de HPLC, la fase móvil o la muestra pudieron provocar un cambio en el pH, la presencia de otros glicósidos en el extracto o que el pico registrado fuera un isómero, esta última se puede confirmar por la técnica gases masa, realizada mediante un equipo que predice el tipo de compuesto en una muestra. Sin embargo diferentes pruebas de HPLC realizadas muestran el tiempo de retención del esteviósido

en un rango aproximado con la mayor área bajo la curva, además se reitera que la interferencia de otros glucósidos en la muestra retrasa el tiempo de retención.

Figura 11. Componentes básicos de un cromatografo.



Fuente : (Scott, 2 003).

Las hojas contienen una compleja mezcla de glucósidos naturales diterpénicos dulces (steviol-glicósidos o glucósidos de steviol): esteviósido (4-13%), esteviolbiosido (trazas), rebaudiósido A (2-4%), rebaudiósido B (trazas), rebaudiósido C (1-2%), rebaudiósido D (trazas), rebaudiósido E (trazas) y dulcosido A (0,4-0,7%) (8,9). El mayor contenido de esteviósido se encuentra en las hojas, lo que sugiere que estas sirven como el tejido principal para la síntesis y acumulación primaria de glucósidos de steviol (Scott, 2 003).

2.2.26 Métodos de extracción de los componentes activos de la Stevia

El extracto de Stevia se puede obtener por la difusión de los componentes activos presentes en las hojas en un líquido. Generalmente se utiliza agua, aunque también puede usarse solventes orgánicos. Las hojas se procesan con agua caliente y el extracto acuoso se concentra y purifica ulteriormente (Kuznesof y Wallin, 2 008).

a. Método descrito por Payzant John Donald. (1 999)

Este método tiene como objeto obtener los principales glucósidos de la planta (esteviósido, rebaudiosido A), libre de otras sustancias, con el fin de tener un producto final con un mejor sabor que el obtenido por otros procesos. La primera parte del proceso se basa en la patente de Giovanetto (1988) que se describe a continuación.

Las hojas de stevia son mezcladas con agua cuya temperatura puede estar entre la temperatura ambiente y 65°C. Luego se pasa a un proceso de filtración para obtener un extracto acuoso, el cual es tratado con hidróxido de calcio (también se puede usar óxido del calcio, carbonato de calcio, u otras sales básicas de calcio) para conseguir un precipitado remueven ácidos orgánicos, bases orgánicas, sales inorgánicas, fenol, sustancias derivadas del aparato fotosintético, proteínas, aminoácidos, entre otros.

El precipitado es tratado con resinas de intercambio iónico de ácido fuerte (ejemplo de marcas: Dowex 50 W, Rohm y Haas IRA 120), luego con resinas de intercambio iónico de base débil (ejemplo de marcas: Dowex WGR, Dowex MWA1,

Rohm y Haas IR4B, Rohm y Haas IRA93). El tratamiento con estas resinas puede repetirse varias veces hasta obtenerse la calidad deseada.

Por último se filtra y se calienta el precipitado para obtener un producto con 107 g de esteviósido y un nivel de pureza del 70% (70% combinación de glucósidos, 25% polisacáridos, 5% aceites); al comienzo del proceso se tenía 1kg de hojas de stevia.

A partir del producto obtenido del proceso descrito anteriormente se continua con el proceso patentado de Payzant (1 999), que busca obtener un nivel de pureza mayor (obtener solo esteviósido y rebaudiosido A).

El producto entonces es disuelto en agua y aplicado a una columna de resina de 1 pulg de diámetro que contiene resina Amberlite XAD-7. La resina es enjuagada con metanol para obtener los glucósidos y una mínima parte de otras sustancias, que fueron atraídos. Este líquido es calentado para eliminar el metanol y obtener un producto con 95% de glucósidos.

Lo obtenido en el paso anterior es mezclado con un solvente orgánico como metanol anhidrido, la solución es enfriada con el fin de precipitar el esteviósido, el cual es recuperado por un proceso de filtración. El líquido filtrado sigue al siguiente paso que consiste en calentarlo y luego es enfriado para obtener por precipitación el rebaudiosido.

A con un grado de pureza del 79%. Se disuelve con metanol para luego calentar la mezcla y posteriormente enfriarla generando la precipitación del rebaudiosido A con un grado de pureza del 95%.

b. Método descrito por Dobberstein (1 982)

Primero se realiza una extracción con un solvente de polaridad intermedia, menor a la del agua, y a la de los alcanos bajos pero mayor al de los alquenos, se recomienda como primer solvente el uso de líquido

haloalqueno bajo, o preferiblemente el cloroformo. La extracción se realiza poniendo en contacto las hojas de stevia finamente trituradas con el solvente a temperatura ambiente o a altas temperaturas. La proporción del solvente es de 10 a 60 litros por 1 kilogramo de hojas. En este proceso se remueven las impurezas de baja polaridad.

Luego se realiza una segunda extracción con un solvente de alta polaridad como el agua o los alcanos bajos (preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbón, ej: metanol). Es preferible usar los alcanos bajos ya que el solvente se puede utilizar en el siguiente proceso. La extracción es similar a la primera pero aquí se obtienen los glucósidos.

El extracto es introducido a una columna cromatográfica con fase estacionaria a base de silica para capturar los glucósidos. Luego se introduce en la columna un solvente de polaridad mayor al primer solvente utilizado, pero con una polaridad menor al segundo (se puede usar 1-propanol), con el fin de enjuagar y capturar los glucósidos adheridos a la fase estacionaria.

c. Método descrito por Kienle (1 982)

Este método utiliza el gas de dióxido de carbono para remover sustancias no deseadas (cutículas de cera, clorofila, y otros pigmentos), con el fin de mejorar el sabor, ya sea de las hojas, del extracto o de los cristales de stevia.

El dióxido de carbono es llevado a condiciones supercríticas (presión arriba de 73 bar y temperatura superior a 31°C), para ser conducido a un recipiente que contiene el material a tratar.

Al terminar el proceso de extracción el gas es separado del recipiente y se lleva a presiones por debajo de 72bar y a temperaturas entre 25 a 50°C con el fin de regenerar el dióxido de carbono. El gas regenerado es

enfriado hasta la temperatura de licuefacción para ser retornado al inicio del proceso donde nuevamente es llevado a las condiciones supercríticas. La masa de dióxido de carbono puede variar entre 5 a 100kg por cada kilogramo del material a tratar (hojas, extracto o cristales de stevia).

d. Método descrito por Alvarez y Couto (1984) Goto (1997)

Se mezcla agua hirviendo con las hojas de stevia hasta obtener el extracto el cual es filtrado al vacío. Luego se mezcla con alcohol isobutílico (Merck P.A. 99,99%) manteniendo la proporción de 40:60 (v/v), hasta que se complete la fase de separación. Después el extracto butanólico es centrifugado a 3.500 rpm (Solvall, RT 600D) por 15 minutos y el resultado es calentado a 80°C para pasar a través de una cama de carbón activado (1g de carbón activado por cada 100ml de extracto). Finalmente, el extracto es concentrado en un rota evaporador por 24 horas para alcanzar la cristalización de los glucósidos. Los cristales son lavados con metanol (Merck P.A.99, 9%) y secados en un horno de circulación de aire.

2.3. Hipótesis

Hi: El cultivo in vitro de Stevia influye en la concentración de edulcorante en sus hojas respecto al cultivo tradicional.

2.4. Variables de estudio

2.4.1 Independiente:

- ❖ Hojas de stevia del cultivo in vitro.

2.4.2 Dependiente:

- ❖ El grado y cantidad de edulcorante

2.5 Definición operativa de variables e indicadores.

Cuadro N°11. Definición operativa de variables e indicadores

Nominal	Definición Operativa	Indicadores	Escala
Hoja de stevia del cultivo in vitro.	Hoja de stevia	Tamaño, Cantidad de hojas	7 – 10 mm. 7 – 14 unid.
Dependiente Grado de edulcorante	Extracción de edulcorante	❖ esteviósido y rebaudiósido	❖ esteviósido de 5 a 10 %. ❖ rebaudiósido de 2 a 4 %.

CAPITULO III

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION.

3.1. Ámbito de estudio:

El estudio se desarrolló de la extracción y análisis de edulcorante de la stevia proveniente del cultivo in vitro en el laboratorio de la Universidad Nacional de la Molina.

3.2. Tipo de investigación: Aplicada

Debido a que se encuentra estrechamente vinculada con la investigación básica, ya que depende de sus descubrimientos y aportes teóricos. Se distingue por tener un propósito práctico inmediato bien definido, es decir, se investiga para transformar productos y producir cambios en un determinado sector para su consumo.

3.3. Nivel de investigación: Descriptivo

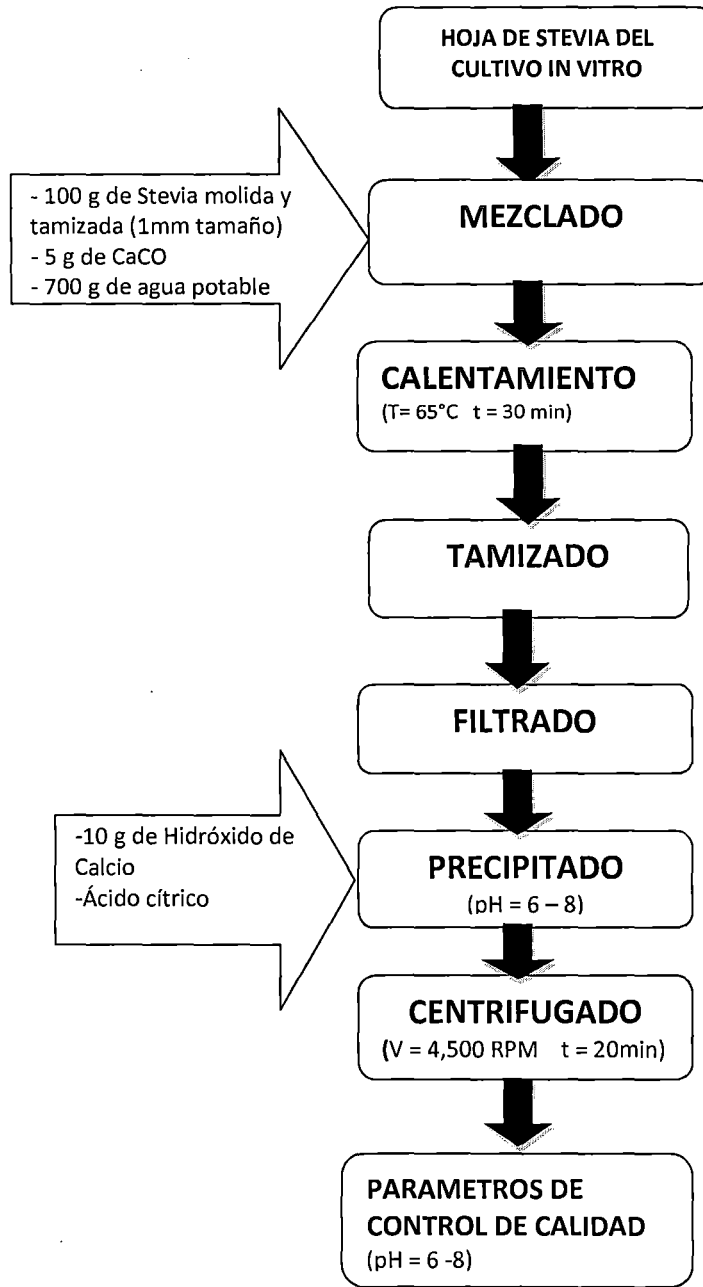
Porque la investigación propuesta está orientada a describir y definir la validez de un hecho para la modificación de una situación problemática.

3.4. Método de investigación: Comparativo y Correlacional.

Porque se van a manipular deliberadamente variables independientes (posibles causas), para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes (supuestos efectos), dentro del proceso a desarrollar.

3.5. Diseño de investigación: La presente investigación se diseñó y se desarrolló de la siguiente manera:

Figura 11: Diagrama de flujo en la Obtención de edulcorante del cultivo in vitro



Fuente: Laboratorio del IBT-UNALM (2014)

3.5.1. Proceso de extracción de edulcorante proveniente del cultivo in vitro de la hoja de stevia

- I. Se coloca en un recipiente de acero inoxidable 100 g de hojas secas de Stevia molida y tamizada de 1mm de tamaño de partícula aprox., 5 gr de Carbonato de Calcio y 700 ml de agua potable cuya densidad a 25°C es de 1,0 g/cm³ por esa razón se utiliza la masa del agua de 700 g a 25°C, se procede a mezclar y se deja reposar por 24 horas, pasadas las 24 horas se calienta la mezcla hasta 65°C durante media hora. En seguida retirar el recipiente y dejar enfriar por 15 minutos aproximadamente.
- II. Colar la mezcla en un tamiz, para la 1era clarificación, luego se pasa la fase líquida por una tela de filtrar a fin de obtener un líquido más puro, posteriormente pasar la fase sólida retenida en el tamiz en la tela de filtrar para extraer la mayor cantidad de extracto contenido en la mezcla.
- III. Pesar 10 g Hidróxido de Calcio y adicionar al líquido obtenido en el filtrado para precipitarlo donde se remueven los compuestos orgánicos, bases orgánicas, sales inorgánicas, fenol, proteínas, aminoácidos, entre otros. Adicionar ácido cítrico en pequeñas cantidades para conseguir un pH de 6,5 a 7,5; posteriormente dejar reposar por 48 horas la fase líquida para sedimentar los compuestos orgánicos.
- IV. Pasadas las 48 horas se observa que hay una separación de dos fases una liviana y otra concentrada, la de interés es la parte liviana (Extracto) y se obtiene por decantación de la fase concentrada.
- V. La fase concentrada se centrifuga por 20 min a una velocidad de 4 500 RPM para aumentar el rendimiento del extracto, pasados los 20 min se recogen los livianos y se mezcla con la 1era fase liviana y se miden los °Brix dando el valor de 6-8 °Brix, en seguida se medir el pH dando valores de 6,5-7,5, la densidad, y aspectos organolépticos como el olor, sabor, color.

3.5.2. Determinación de esteviosido y rebaudiosido de la stevia

Para la determinación del % de esteviosido y rebaudiosido se realizó mediante la determinación del HPLC en el laboratorio de Biotecnología industrial de la Universidad Nacional la Molina

3.6. Población, muestra, muestreo:

3.6.1. Población

El presente trabajo de investigación tubo como población a las hojas del cultivo in vitro de la stevia que se obtuvo del laboratorio de Biotecnología vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Huancavelica.

3.6.2. Muestra

Se empleó 100 g. de hojas de stevia proveniente del cultivo in vitro para realizar la extracción y determinación de esteviosido y rebaudiosido.

3.6.3. Muestreo

Se realizó un muestreo no probabilístico.

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

3.7.1. Técnicas

La presente investigación "Extracción de edulcorante a partir de la hoja de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) proveniente de cultivo in vitro", para el efecto se utilizó lo siguiente:

Cuadro 13: Técnicas e Instrumentos de recolección de datos

Técnicas	Instrumentos	Recolección de datos
Observación directa	Ficha de observación.	❖ Cantidad de hojas. ❖ Lugar del cultivo in vitro de la stevia
Recolección de información	Libros y formatos impresos.	❖ Obtención de edulcorante de la stevia.
Obtención de edulcorante	Equipo de laboratorio HPLC.	❖ esteviósido y rebaudiósido

3.7.2. Instrumentos

3.7.2.1. Materiales

- Vasos de precipitación
- Tubo de vidrio de diámetro interior de 2,5 cm
- Mechero
- Soporte metálico con malla de asbesto
- Recipiente de acero inoxidable
- Recipientes plásticos
- Embudo
- Manta de filtro
- Colador o tamiz de porosidad
- Cucharas de acero inoxidable
- Cucharas medidoras

3.7.2.2. Equipos

- bomba que impulso un caudal de extracto a 6,6 ml/min
- refractómetro
- pH metro
- Cromatográfico (Agilent serie 1 100) con calibración de 10-ml y detección a 210 nm

3.7.2.3. Reactivo

- Hidróxido de calcio
- Carbonato de calcio
- Acido cítrico
- Hojas secas molidas y tamizada.

3.7.3. Recolección de datos

Para la recolección de datos se utilizará hojas blancas y después la ayuda del software.

3.8. Procedimiento de recolección de datos:

La evaluación de este trabajo se procederá de la siguiente manera:

- El lugar de obtención del cultivo in vitro,
- La extracción y determinación de edulcorante.

3.8.1. Procedimiento para la identificación y cuantificación por HPLC

Una vez que se tiene el concentrado (aproximado de 50 ml) se coloca en un rotavapor, para así tener un residuo, este procedimiento se llevará a cabo a 70 °C. Luego será analizado por medio del HPLC y así conocer las cantidades encontrados.

3.9. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

3.9.1. Determinación y cuantificación del esteviosido y rebaudiosido.

Para la determinación y cuantificación de esteviosido y rebaudiosido se utilizó del HPLC; las concentraciones fueron calculadas por determinación del peso del extracto durante el tiempo de extracción. La técnica de HPLC, fue aplicada para corroborar la presencia de los glicósidos como el esteviósido y rebaudiosido en la muestra analizada, como resultado de la extracción de las hojas de stevia proveniente del cultivo in vitro.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Presentación de resultados

4.1.1. Presentación de resultados de la determinación de esteviosido y rebaudiosido del cultivo in vitro de la hoja de stevia

En el Cuadro N°14 muestran los valores en % del esteviosido y rebaudiosido ;así también indican la suma total de la hoja del cultivo in vitro de la stevia.

En los valores encontrados resulto en mayor proporción el esteviosido llegando a 6,91% mientras que el rebaudiosido se obtuvo 2,52% (Anexo 01).

Cuadro N°14 Determinación del esteviosido y rebaudiosido del cultivo in vitro de la hoja de stevia

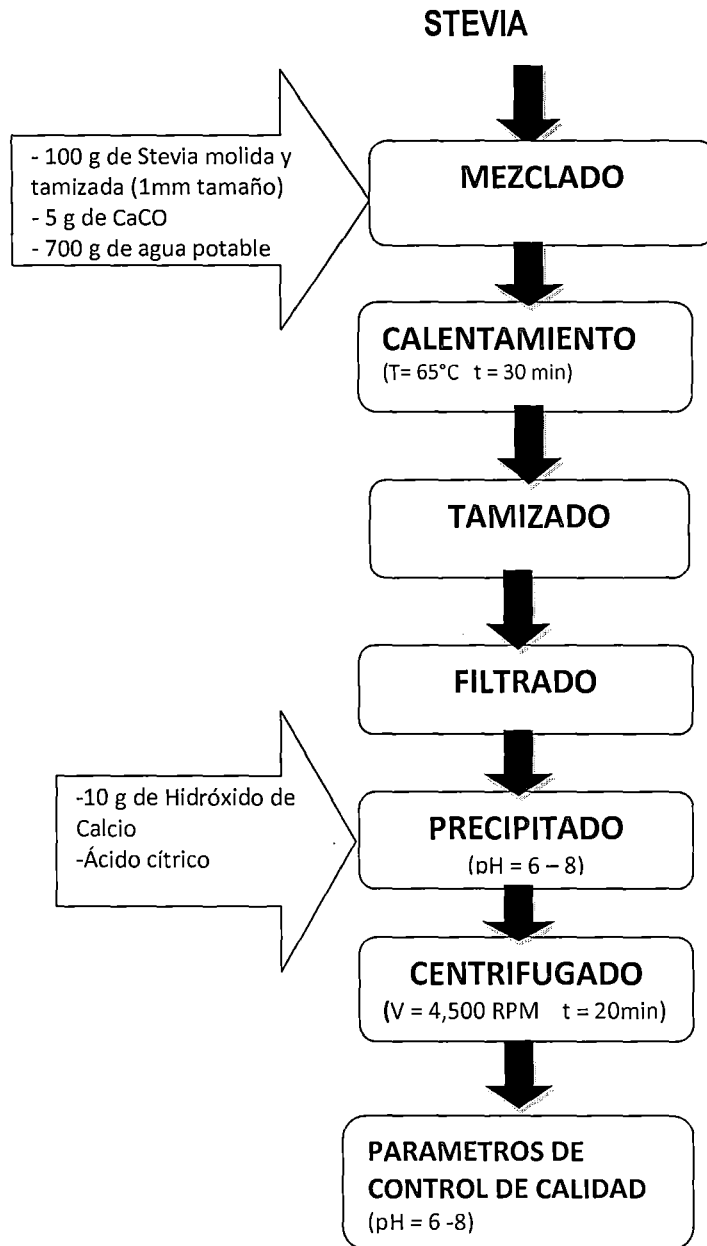
Muestra	Esteviosido (%)	Rebaudiosido (%)	Total
Hojas de stevia del cultivo in vitro	6,91	2,52	9,43

Fuente: Laboratorio del IBT-UNALM (2014)

4.1.2. Utilización del método en la extracción de las hojas de stevia proveniente del cultivo in vitro por el método descrito por Payzant John Donald.

Este método tiene como objeto obtener los principales glucósidos de la planta (esteviósido, rebaudiosido A), libre de otras sustancias, con el fin de tener un producto final con un mejor sabor que el obtenido por otros procesos.

Figura 12: Diagrama de flujo en la Obtención de edulcorante del cultivo in vitro de la stevia por el método descrito por Payzant John Donald.



Fuente: Laboratorio del IBT-UNALM (2014)

4.2. Discusión.

4.2.1 Determinación del % de esteviosido y rebaudiosido:

En la presente investigación el contenido de Esteviósido en la Stevia proveniente del cultivo In vitro fue de 6,91%.

Según (Scott, 2003) establece que las hojas contienen una compleja mezcla de glucósidos naturales diterpénicos dulces (steviol-glicósidos o glucósidos de steviol): esteviósido (4-13%),

Así mismo en la presente investigación el contenido de rebaudiósido en la Stevia proveniente del cultivo In vitro fue de 2,52%.

Del mismo modo (Scott, 2003) establece que el Esteviolbiosido (trazas), rebaudiósido A (2-4%).

Así mismo (Scott, 2003) señala el Rebaudiósido B (trazas), rebaudiósido C (1-2%), rebaudiósido D (trazas), rebaudiósido E (trazas) y dulcosido A (0,4-0,7%) (8,9). El mayor contenido de esteviósido se encuentra en las hojas, lo que sugiere que estas sirven como el tejido principal para la síntesis y acumulación primaria de glucósidos de steviol.

4.2.1 Método extracción de las hojas de stevia.

El método descrito por Payzant John Donald demostró obtener los principales glucósidos de la planta (esteviosido, rebaudiosido A), libre de otras sustancias, con el fin de tener un producto final con un mejor sabor que el obtenido por otros métodos.

Según Kienle (1982) señala su método sobre la extracción este método utiliza el gas de dióxido de carbono para remover sustancias no deseadas (cutículas de cera, clorofila, y otros pigmentos), con el fin de mejorar el sabor, ya sea de las hojas, del extracto o de los cristales de de stevia.

El dióxido de carbono es llevado a condiciones supercríticas (presión arriba de 73 bar y temperatura superior a 31°C), para ser conducido a un recipiente que contiene el material a tratar. Al terminar el proceso de extracción el gas es separado del recipiente y se lleva a presiones por debajo de 72 bar y a temperaturas entre 25 a 50°C con el fin de regenerar el dióxido de carbono. El gas regenerado es enfriado hasta la temperatura de licuefacción para ser retornado al inicio del proceso donde nuevamente es llevado a las condiciones supercríticas. La masa de dióxido de carbono puede variar entre 5 a 100kg por cada kilogramo del material a tratar (hojas, extracto o cristales de stevia).

Según Alvarez y Couto (1984) Goto (1997) señala en su método sobre la extracción mezcla agua hirviendo con las hojas de stevia hasta obtener el extracto el cual es filtrado al vacío. Luego se mezcla con alcohol isobutílico (Merck P.A. 99,99%) manteniendo la proporción de 40:60 (v/v), hasta que se complete la fase de separación. Después el extracto butanólico es centrifugado a 3.500 rpm (Solvall, RT 600D) por 15 minutos y el resultado es calentado a 80°C para pasar a través de una cama de carbón activado (1g de carbón activado por cada 100ml de extracto). Finalmente, el extracto es concentrado en un rota evaporador por 24 horas para alcanzar la cristalización de los glucósidos. Los cristales son lavados con metanol (Merck P.A.99,9%) y secados en un horno de circulación de aire.

CONCLUSIONES

- ❖ Durante el desarrollo de la investigación se lograron analizar los edulcorantes presentes en las hojas de Stevia proveniente del cultivo In Vitro, donde se obtuvo como resultado la presencia, de los más importantes edulcorantes, el Esteviósido y al Rebaudiósido
- ❖ Se logro identificar y cuantificar, los edulcorantes más importantes presentes en las hojas de Stevia provenientes del cultivo In Vitro, obteniéndose resultados como: cantidad de Esteviósido 6,91% Rebaudiósido 2,52 y siendo en total la cantidad de 9.43%.
- ❖ Así mismo esta investigación se determinó la cuantificación y determinación del Esteviósido y Rebaudiósido, mediante el HPLC, equipo que utilizado para brindar resultados a partir de cromatogramas de identificación y cuantificación de la presencia de los edulcorantes presentes en las hojas de Stevia provenientes del cultivo In Vitro.

RECOMENDACIONES

- ◆ La utilización del extracto de stevia representa una alternativa como edulcorante ofreciendo beneficios como la disminución en la ingesta de calorías.
- ◆ Promover el uso de glucósidos de Stevia en otros productos alimenticios dirigidos especialmente a personas que controlan su peso o padezcan Diabetes.
- ◆ El iniciar la micropropagación in vitro de Stevia y la extracción del edulcorante, para aprovechar su contenido de glucósidos, sería conveniente para la salud humana.
- ◆ Incentivar el consumo de productos que sean endulzados con glucósidos de Steviol por sus propiedades nutracéuticas que presenta.
- ◆ Experimentar la stevia proveniente del cultivo in vitro en la elaboración de otros productos.
- ◆ Realizar las pruebas de extracción con los métodos descritos en el presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguirre, X. Evaluación de un sistema de producción in vitro y en invernadero de plantas de stevia rebaudiana Bertoni España 2008.
- Alonso, J. Edulcorantes naturales. La Granja. Buenos Aires Argentina 2010. Pp. 3-12. ISSN: 13903799. Vol.12 (2).
- Alvarenga, S. Optimización del cultivo y procesamiento de Stevia rebaudiana para la obtención de un edulcorante natural. CONICIT. San José, Costa Rica. 2005. : http://www.conicit.go.cr/boletin/boletin67/cultivo_salvarenga.html
- Alvares E. recomendaciones técnicas para una producción sostenible de Ka a He e en el Paraguay Instituto agronomía Nacional, Asunción, Paraguay 1984. pp.7-50.
- Atencio, F. Enciclopedia práctica de las medicinas alternativas. Primera edición. Editorial Ediciones LEA S.A. Buenos Aires, Argentina 2005.
- Ayerbe, L. Cultivo In vitro de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, 1990.ES. Pp.: 66-67, 98-99, 112-117, 128-133.
- Baker, M. Developing a sustainable supply. Sweeteners and the wellness debate. Panamá 2010. Disponible en http://truvia.com/pdfs/ECM_Truvia.pdf.
- Chan P, Tomlinson B, Chen YJ "Alternativa Edulcorantes"2000 <http://articulos.sld.cu/diabetes/files/2009/la-estevia-una-alternativa-a-los-edulcorantes.pdf>
- Devlin, R. Plant Physiology. 3ra. Ed. New York, EU. 1975. Pp.: 451.
- Dodds J. Roberts L. somatic embryogenesis in: Experiments in plant Tissue cultura. Second edition Cambridge University Press. New York EEUU. 1985 Pp 122- 126
- EDAC, Manual técnico de producción de stevia de la Equipo de desarrollo agropecuario de Cajamarca-Perú (EDAC). 2008 Disponible en www.incagro.gob.pe/apcaa-files/.../Manual_T_cnico_de_Stevia.pdf.

- Énfasis en la Alimentación" (2011)
<http://www.alimentacion.enfasis.com/adjuntos/24/documentos/000/057/0000057204.pdf>.
- Escalante, B., Flores, A., Quintana, G. "Elaboración de Jarabe Simple y Pasta Dental Incorporando Stevia Como Edulcorante." Universidad de El Salvador. Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. El Salvador 2003.
- European Stevia Association, eustas "Componentes Botánicos Dulces" 2006.
http://www.eustas.org/esp/botanic_esp.htm.
- FAO. Stevia rebaudiana. Plant. Editado por Ecocrop. 2004. Disponible en
<http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=10084>.
- FAO. Steviol Glycosides. "Combined Compendium of Food Additive Specifications".2010.Disponible en <http://www.fao.org/ag/agn/jecfaadditives/details.html?id=898>.
- Felipe G. Stevia rebaudiana Bert: uma revisao. Ciencia e Cultura. II Seminario Brasileiro sobre Stevia rebaudiana (Bert).Bertoni Resumos ITAL Campinas Instituto de Tecnología de Alimentos, Sao Paulo 1977.
- FIAGRO "Charla de Negocio en El Salvador con el Cultivo de Stevia" 2011,
http://www.fiagro.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2165:charla-oportunidades-de-negocio-en-el-salvador-con-el-cultivo-de-stevia.
- George E. Plant propagation by tissue cultura, Part: the Technology.2ed exegetics Limited. Edington, wils, england 1993. pp21-33.
- Goto, A. Influencia do Rebaudiosideo a na solubilidade eno sabor do Esteviosideo. Departamento de química Universidade Estadual de Maringa, Parana, Brasil. 1997. pp.3-5.
- Guerrero, R. Planta endulzante con mucho futuro. Nicaragua 2005.
- Guía del emprendedor "Conozca Más Sobre la Yerba Dulce" 2004.
<http://www.guiadelemprendedor.com.argentina/yerba-dulce.html>
- Hertmann H. Kester D. propagación de plantas: principios y prácticas. Ed. CECSA, Mexico 1987. Pp 760

- INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). Benítez J.; Navarrete J. Aplicación del Sistema Autotrófico-Hidropónico SHA (Técnica Argentina) en variedades mejoradas del Ecuador, para la obtención de semilla pre básica de papa. Quito . 2002 EC. 6 p.
- Jaramillo G, Rogel M. Producción de yogur usando microorganismos probióticos y endulzado con edulcorante no calórico proveniente de la Stevia rebaudiana Bertoni. Quito Ecuador 2007.
- Jenet A. Die Substoffpflanze Stevia rebaudiana Bert 1996.
- Jordán M. La propagación de ka'a he'e *Stevia rebaudiana* Bertoni. Primer Simposio Nacional de la Stevia (ka'a he'e). Asunción, 1983. PA. 29 p.
- Kienle, U. Method of making a natural sweetener based on Stevia rebaudiana, and use thereof. 1982. Unites States Patent. 5.112.610.
- Kuznesof M, Wallin H. Steviol glycosides (INS 960) - Fact Sheet, FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2008. Disponible en http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/FACTSHEET_%20STEVIOLE%20GLYCOSIDES_final1.pdf.
- Landázuri, P., Trigueros, J. "Stevia rebaudiana bertoni, una Planta Medicinal", boletín técnico . Boletín técnico. Edición especial. Ecuador 2009.
- Llanos G. producción y comercialización de stevia rebaudiana Bertoni Portoviejo Ecuador 2006 pp 1-73
- Marcavillaca M. Micropropagación "In-Vitro" de Stevia rebaudiana Bertoni por medio de segmentos nodales y meristemas. 1985
- Marín W. Sondeo de mercado de la Stevia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Colombia. 2004. Disponible en http://www.minambiente.gov.co/documentos/347_Sondeo_del_Mercado_de_Stevia.pdf.
- Martínez P. La Hierba Dulce. Historia, Usos y Cultivo de la Stevia rebaudiana Bertoni. Primera edición. Albacete, España. 2002.
- Merck. Hoja técnica acetonitrilo Grado HPLC. Alemania. 2008.

- Monesterolo V, Macia E. Resultados experimentales del proceso de extracción y purificación de compuestos endulzantes de la hoja de stevia rebaudiana Córdoba, Argentina 2006.
- Nasser, G."El Salvador Stevia-cultivo de la Stevia rebaudiana bertonii, Planta Conocida en el Paraguay Como Ka á he é". Fundación para la Innovación Tecnológica Agropecuaria (FIAGRO). El Salvador 2011.
- Payzant, J. et al. Method of extracting selected sweet glycosides from the Stevia Rebaudiana plant. 1999. United States Patent. 5.962.678.
- Pérez, Y. "Definición y Clasificación de Edulcorantes", 2011. <http://educacionquimica.wordpress.com/2011/06/13/la-quimica-de-los-alimentos-definición-y-clasificación-de-edulcorantes>.
- Rafiq, M.; Dahor, M; Mangrio, S.; Naqvi, H; Qarshi, I. In vitro clonal propagation and biochemical analysis of field established Stevia rebaudiana Bertoni. *Pak. J. Bot.* Pakistán. 2007. 39 (7): 2476-2474.
- Salisbury, F.; Ross, C. Fisiología de las plantas. Ed. Paraninfo S.A. Madrid, ES. 2000 Pp.: 176. Yang, 1979 y 1981;
- Scott, R. Principles and Practice of Chromatography. Chrom-Ed Book Series. 2003. Book 1. Pdf. Consultado el 20 de sep. de 2007. Disponible en: <http://www.chromatographyonline.org/1/contents.html>
- Sivaram, L.; Mukundan, U. In vitro culture studies on Stevia rebaudiana. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. Mumbai, India. 2003. 39 (5): 520-523.
- Snarff "Monografías Nutrición y Dieta" <http://www.todomonografias.com/nutricion-y-dietetica/edulcorantes> (2006)
- Soto, A. y Del Val, S. Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*. Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos 2002. 20:5-9
- Suárez, I.; Salgado, J. Propagación in vitro de Stevia rebaudiana Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. Temas Agrarios. Córdoba, Argentina. 2008. 13 (1): 40-48

- Torres, J.G."Entrevista técnica: Stevia Cultivo y Producción". Cojutepeque, El Salvador 2012.
- Tucker, A. y Debaggio, T. The enciplopedia of herbs. A comprehensive reference to herbs of flavor and fragrance. Segunda edición. Editorial Timer Press. Londres, Inglaterra 2009.
- Uddin, M.; Hossain, M.; Haque, M.; Belal, M.; Ahmed, R.; Baten, A. *In vitro* propagación of *Stevia rebaudiana* Bert. In Bangladesh. African Journal of Biotechnology. Shah Jalal, Bangladés. 2006. 5(13): 1238-1240
- Yost, R.W., Etre, L.S y Conlon R.D. Practical Liquid Chromatography: An Introduction. Norwalk (CT): Parkin-Elmer.1st edición, 255pp 1980.
- Zeiger, E.; Taiz, L. Fisiología Vegetal. España, Publicaciones Universidad Jaume. 2007 1338 p
- Zubiarte F. Manual del cultivo de la stevia (yerba dulce) revista de ciencias agrarias de la Molina –Perú Vol. 2007 1 pp77-88

ARTICULO CIENTIFICO

24

“EXTRACCION DE EDULCORANTE APARTIR DE LA HOJA DE STEVIA (*Stevia rebaudiana Bertoni*) PROVENIENTES DE CULTIVO INVITRO”

Mildor, LLACTA HUAROC

“Escuela Académico Profesional de Agroindustria – Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional de Huancavelica-Perú”

Ciudad Universitaria de Común Era – Acobamba.

Email: mildor10@hotmail.com

RESUMEN

En este estudio Agroindustrial de la stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) proveniente del cultivo in vitro mediante la extracción, hoy en día en el mundo y principalmente en América Latina se presentan diversos problemas de salud como la obesidad y el sobrepeso, sin duda, por el consumo de grasa y azúcares. Asimismo, Huancavelica es la región más pobre del país, con la tasa de desnutrición más alta en las zonas rurales y el consumo de grasas saturadas y azúcares facilitara la absorción de las grasa el principio activo denominado esteviósido y rebaudiósido A. la presente investigación se enfocó en la extracción y la determinación de edulcorantes de la hoja de stevia proveniente del cultivo in vitro donde se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional de La Molina tiene como objetivo determinar y evaluar la cantidad de edulcorante en la hoja de Stevia en cultivo in vitro , los extractos se obtuvieron mediante el calentamiento controlado a temperaturas de 65°C de la solución de Stevia - agua y la remoción de componentes presentes en la hoja para eliminar algunos solventes orgánicos tales como bases orgánicas, sales inorgánicas, fenol, sustancias derivadas del aparato fotosintético, proteínas, aminoácidos, entre otros; mediante la adición de agentes precipitantes como el Hidróxido de Calcio (CaOH) y Carbonato de Calcio (CaCO₃) la determinación de esteviósido y rebaudiósido de la hoja de stevia en cultivo in vitro influye en la concentración de edulcorante con respecto al cultivo tradicional por estar en un medio de cultivo aséptico de agar y azúcar, se realizó un análisis de HPLC obteniendo resultado esteviosido (6.91%) y rebaudiosido (2.52%) y un total de (9.43%) en el laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agrària la Molina.

ABSTRACT

In this Agroindustrial study of the stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) coming from the cultivation in vitro by means of the extraction, today in day in the world and mainly in Latin America diverse problems of health like the obesity and the overweight are presented, without a doubt, for the consumption of fat and sugar. Also, Huancavelica is the poorest region in the country, with the rate of higher malnutrition in the rural areas and the consumption of saturated fats and sugar it facilitated the absorption of the fat the principle active denominated esteviósido and rebaudiósido A. the present investigation it was focused in the extraction and the determination of edulcorantes of the stevia leaf coming from the cultivation in vitro where it was made in the Laboratory of Industrial Biotechnology of the National University of The Molina he/she has as objective to determine and to evaluate the quantity of edulcorante in the leaf of Stevia in cultivation in vitro, the extracts were obtained by means of the heating controlled to temperatures of 65°C of the solution of Stevia - it dilutes and the removal of present components in the leaf to eliminate some such organic solvents as organic bases, you leave inorganic, fenol, derived substances of the apparatus fotosintético, proteins, amino acids, among others; by means of the addition of agents precipitantes like the Hidróxido of Calcium (CaOH) and Carbonate of Calcium (CaCO₃) the esteviósido determination and rebaudiósido of the stevia leaf in cultivation in vitro influence in the edulcorante concentration with regard to the traditional cultivation to be in a means of aseptic cultivation of agar and sugar, he/she was carried out an analysis of HPLC obtaining esteviosido (6.91%) and rebaudiosido (2.52%) and a total of (9.43%) in the laboratory of the Institute of Biotechnology of the Agrarian National University the Molina.

Palabras claves: *Stevia; cultivo in vitro, extracción, edulcorantes, esteviósido, rebaudiósido.*

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los edulcorantes naturales constituyen una excelente alternativa en la industria alimenticia. Si bien, ésta industria emplea desde hace varios años productos químicos como el aspartamo, acelsufame-K, sacarina o ciclamato, la inocuidad de estas sustancias ha estado siempre como tema de discusión en los principales foros académicos alimenticios, generando desconcierto entre los consumidores de productos bajos en calorías, e incluso múltiples dudas entre las propias autoridades reguladoras, en especial cuando se habla del largo placidos de ingesta de éstas sustancias. En los últimos años se ha investigado en plantas medicinales alternativas de edulcorantes mucho más seguras y que a la vez mantengan el índice de dulzor en niveles adecuados para el consumo humano; destacan entre las sustancias más estudiadas Taumatina, Monellina y Esteviósidos, las cuales ya forman parte de muchos productos alimenticios.

La tendencia de las industrias que se ocupan de promover la salud y prevenir enfermedades, está en invertir en el desarrollo de tecnologías para la producción de alimentos con bajas calorías y bajo contenido graso que a su vez mantengan sus cualidades nutricionales. Es más común el uso de edulcorantes no calóricos cuya función sensorial sea similar a la sacarosa.

La (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es una especie sudamericana oriunda de Paraguay, sus hojas contienen otros principios endulzantes aparte del esteviósido como los rebaudósidos A y B. El rebaudiósido A es 190 veces más dulce que una solución de sacarosa al 0,4% y el esteviósido en forma pura es 300 veces más. Además 10 hojas secas equivalen a 1 kilocaloría.

Por tanto, como parte de este trabajo de investigación se determino la concentración de edulcorante en la hoja de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) proveniente de cultivo in vitro se Identifico y cuantifico los edulcorantes como el esteviósido y rebaudiósido en comparación con el cultivo tradicional como un endulzante natural con bajo poder calórico y sustituto de la sacarosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ámbito de estudio

El estudio se desarrolló de la extracción y análisis de edulcorante de la stevia proveniente del cultivo in vitro en el laboratorio de la Universidad Nacional de la Molina.

MATERIALES

Las hojas de Stevia proveniente del cultivo in vitro se adquirió del laboratorio Biotecnología vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Huancavelica. Se coloca en un recipiente de acero inoxidable 100 g de hojas secas de Stevia molida y tamizada de 1mm de tamaño, 5 gr de Carbonato de Calcio y 700 ml de agua potable se procede a mezclar y se deja reposar por 24 horas, pasadas las 24 horas se calienta la mezcla hasta 65°C durante media hora. Pesar 10 g Hidróxido de Calcio y adicionar al líquido obtenido en el filtrado para precipitarlo donde se remueven los compuestos orgánicos, bases orgánicas, sales inorgánicas, fenol, proteínas, aminoácidos, entre otros. Adicionar ácido cítrico en pequeñas cantidades para conseguir un pH de 6,5 a 7,5; posteriormente dejar reposar por 48 horas la fase líquida para sedimentar los compuestos orgánicos. Pasadas las 48 horas se observa que hay una separación de dos fases una liviana y otra concentrada, la de interés es la parte liviana (Extracto) y se obtiene por decantación de la fase concentrada. La fase concentrada se centrifuga por 20 min a una velocidad de 4 500 RPM para aumentar el rendimiento del extracto, pasados los 20 min se recogen los livianos y se mezcla con la 1era fase liviana y se miden los °Brix dando el valor de 6-8 °Brix, enseguida se medir el pH dando valores de 6,5-7,5, la densidad, y aspectos organolépticos como el olor, sabor, color. La determinación de esteviósido y rebaudiósido de la hoja de stevia en cultivo in vitro, se realizó un análisis de HPLC en el laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

MÉTODOS

Obtención de edulcorante del cultivo in vitro de la stevia

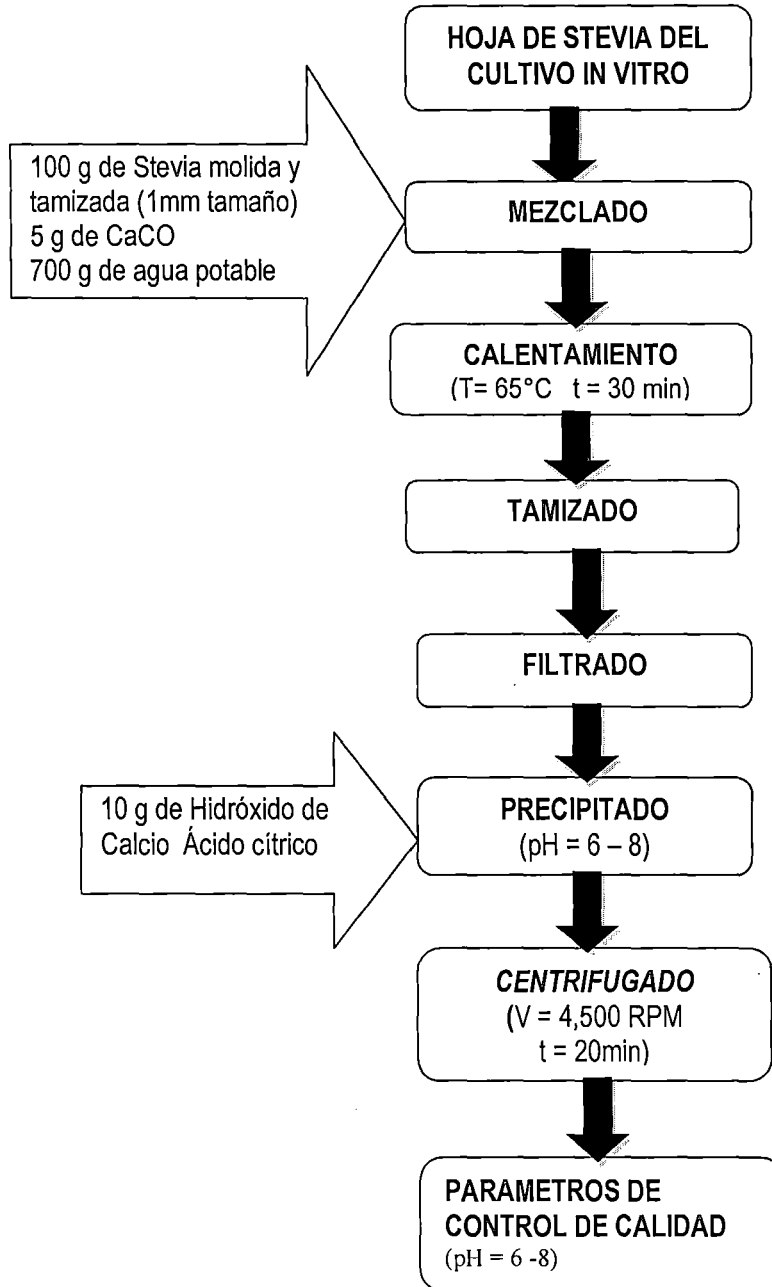


Figura Nº 1. Diagrama de flujo en la Obtención de edulcorante del cultivo in vitro de la stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*).

Utilización del método en la extracción de las hojas de stevia proveniente del cultivo in vitro por el método descrito por Payzant John Donald.

Este método tiene como objeto obtener los principales glucósidos de la planta (esteviosido, rebaudiosido A), libre de otras sustancias, con el fin de tener un producto final con un mejor sabor que el obtenido por otros procesos.

Procedimiento para la identificación y cuantificación por HPLC

Una vez que se tiene el concentrado (aproximado de 50 ml) se coloca en un rotavapor, para así tener un residuo, este procedimiento se llevará a cabo a 70 °C. Luego será analizado por medio del HPLC y así conocer las cantidades encontrados.

Determinación y cuantificación del esteviosido y rebaudiosido.

Para la determinación y cuantificación de esteviosido y rebaudiosido se utilizo del HPLC; las concentraciones fueron calculadas por determinación del peso del extracto durante el tiempo de extracción. La técnica de HPLC, fue aplicada para corroborar la presencia de los glicósidos como el esteviosido y rebaudiosido en la muestra analizada, como resultado de la extracción de las hojas de stevia proveniente del cultivo in vitro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de esteviosido y rebaudiosido del cultivo in vitro de la hoja de stevia

En el Cuadro N° 1 muestran los valores en % del esteviosido y rebaudiosido; así también indican la suma total de la hoja del cultivo in vitro de la stevia.

En los valores encontrados resultado en mayor proporción el esteviosido llegando a 6,91% mientras que el rebaudiosido se obtuvo 2,52%.

Cuadro N° 1. Determinación del esteviosido y rebaudiosido del cultivo in vitro de la hoja de stevia:

Muestra	Esteviosido (%)	Rebaudiosido (%)	Total
Hojas de stevia del cultivo in vitro	6,91	2,52	9,43

Fuente: Laboratorio del IBT-UNALM (2014)

Utilización del método en la extracción de las hojas de stevia proveniente del cultivo in vitro por el método descrito por Payzant John Donald.

Este método tiene como objeto obtener los principales glucósidos de la planta (esteviósido, rebaudiosido A), libre de otras sustancias, con el fin de tener un producto final con un mejor sabor que el obtenido por otros procesos.

Determinación del % de esteviosido y rebaudiosido:

En la presente investigación el contenido de Esteviósido en la Stevia proveniente del cultivo In vitro fue de 6,91%.

Según (Scott, 2003) establece que las hojas contienen una compleja mezcla de glucósidos naturales diterpénicos dulces (steviol-glicósidos o glucósidos de steviol): esteviósido (4-13%),

Así mismo en la presente investigación el contenido de rebaudiósido en la Stevia proveniente del cultivo In vitro fue de 2,52%.

Del mismo modo (Scott, 2003) establece que el Esteviolbiosido (trazas), rebaudiósido A (2-4%).

Así mismo (Scott, 2003) señala el Rebaudiósido B (trazas), rebaudiósido C (1-2%), rebaudiósido D (trazas), rebaudiósido E (trazas) y dulcosido A (0,4-0,7%) (8,9). El mayor contenido de esteviósido se encuentra en las hojas, lo que sugiere que estas sirven como el tejido principal para la síntesis y acumulación primaria de glucósidos de steviol.

Método extracción de las hojas de stevia.

El método descrito por Payzant John Donald demostró obtener los principales glucósidos de la planta (esteviósido, rebaudiosido A), libre de otras sustancias, con el fin de tener un producto final con un mejor sabor que el obtenido por otros métodos.

Según Kienle (1982) señala su método sobre la extracción este método utiliza el gas de dióxido de carbono para remover sustancias no deseadas (cutículas de cera, clorofila, y otros pigmentos), con el fin de mejorar el sabor, ya sea de las hojas, del extracto o de los cristales de stevia.

El dióxido de carbono es llevado a condiciones supercríticas (presión arriba de 73 bar y temperatura superior a 31°C), para ser conducido a un recipiente que contiene el material a tratar. Al terminar el proceso de extracción el gas es separado del recipiente y se lleva a

presiones por debajo de 72 bar y a temperaturas entre 25 a 50°C con el fin de regenerar el dióxido de carbono. El gas regenerado es enfriado hasta la temperatura de licuefacción para ser retornado al inicio del proceso donde nuevamente es llevado a las condiciones supercríticas. La masa de dióxido de carbono puede variar entre 5 a 100kg por cada kilogramo del material a tratar (hojas, extracto o cristales de stevia).

Según Alvarez y Couto (1984) Goto (1997) señala en su método sobre la extracción mezcla agua hirviendo con las hojas de stevia hasta obtener el extracto el cual es filtrado al vacío. Luego se mezcla con alcohol isobutilico (Merck P.A. 99,99%) manteniendo la proporción de 40:60 (v/v), hasta que se complete la fase de separación. Después el extracto butanólico es centrifugado a 3.500 rpm (Sollvall, RT 600D) por 15 minutos y el resultado es calentado a 80°C para pasar a través de una cama de carbón activado (1g de carbón activado por cada 100ml de extracto). Finalmente, el extracto es concentrado en un rota evaporador por 24 horas para alcanzar la cristalización de los glucósidos. Los cristales son lavados con metanol (Merck P.A.99,9%) y secados en un horno de circulación de aire.

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de la investigación se lograron analizar los edulcorantes presentes en las hojas de Stevia proveniente del cultivo In Vitro, donde se obtuvo como resultado la presencia, de los más importantes edulcorantes, el Esteviósido y al Rebaudiósido; se logro identificar y cuantificar , los edulcorantes más importantes presentes en las hojas de Stevia provenientes del cultivo In Vitro, obteniéndose resultados como: cantidad de Esteviósido 6,91% Rebaudiósido 2,52 y siendo en total la cantidad de 9.43%. Así mismo esta investigación determinó la cuantificación y determinación del Esteviósido y Rebaudiósido, mediante el HPLC, equipo que utilizado para brindar resultados a partir de cromatogramas de identificación y cuantificación de la presencia de los edulcorantes presentes en las hojas de Stevia provenientes del cultivo In Vitro.

RECOMENDACIONES

- ◆ La utilización del extracto de stevia representa una alternativa como edulcorante ofreciendo beneficios como la disminución en la ingesta de calorías.
- ◆ Promover el uso de glucósidos de Stevia en otros productos alimenticios dirigidos especialmente a personas que controlan su peso o padezcan Diabetes.
- ◆ El iniciar la micropropagación in vitro de Stevia y la extracción del edulcorante, para aprovechar su contenido de glucósidos, sería conveniente para la salud humana.
- ◆ Incentivar el consumo de productos que sean endulzados con glucósidos de Steviol por sus propiedades nutraceuticas que presenta.
- ◆ Experimentar la stevia proveniente del cultivo in vitro en la elaboración de otros productos.
- ◆ Realizar las pruebas de extracción con los métodos descritos en el presente investigación.

LITERATURA CITADA

- Alvares E. recomendaciones técnicas para una producción sostenible de Ka a He e en el Paraguay Instituto agronomía Nacional, Asunción, Paraguay 1984. pp.7-50.
- Goto, A. Influencia do Rebaudiosideo a na solubilidade eno sabor do Esteviosideo. Departamento de química Universidade Estadual de Maringa, Parana, Brasil. 1997. pp.3-5.
- Kienle, U. Method of making a natural sweetener based on Stevia rebaudiana, and use thereof. 1982. Unites States Patent. 5.112.610.
- Merck. Hoja técnica acetonitrilo Grado HPLC. Alemania. 2008.
- Payzant, J. et al. Method of extracting selected sweet glycosides from the Stevia Rebaudiana plant. 1999. United States Patent. 5.962.678.
- Scott, R. Principles and Practice of Chromatography. Chrom-Ed Book Series. 2003. Book 1. Pdf. Consultado el 20 de sep. de 2007. Disponible en: <http://www.chromatographyonline.org/1/contents.html>

ANEXO



RESULTADOS DE ANÁLISIS*

CLIENTE: Mildor LLacta Huaroc

R.U.C.:

MUESTRA: Hojas de Estevia

MUESTRA	Esteviosido (%) ^(**)	Rebaudiosido A (%) ^(**)	Total (%)
Hojas de estevia	6.91	2.52	9.43

* Promedio de tres repeticiones

** Método: Kolb, N., Herrera, J., Ferreira, D. y Uliana, R. (2001). Analysis of sweet diterpene glycosides from stevia rebaudiana: Improved HPLC method J. Agri. Food Chem 49: 4538-4541.

Advertencia:

- El muestreo y las condiciones de manejo de las muestras hasta su ingreso a los Laboratorios del IBT -UNALM son de responsabilidad del solicitante
- Los resultados son válidos sólo para muestra recibida

Fecha de realización de los ensayos: de 13/01/14 al 15/01/14

La Molina, 15 de Enero del 2014



David Campos Gutiérrez
Dr. David Campos Gutiérrez
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

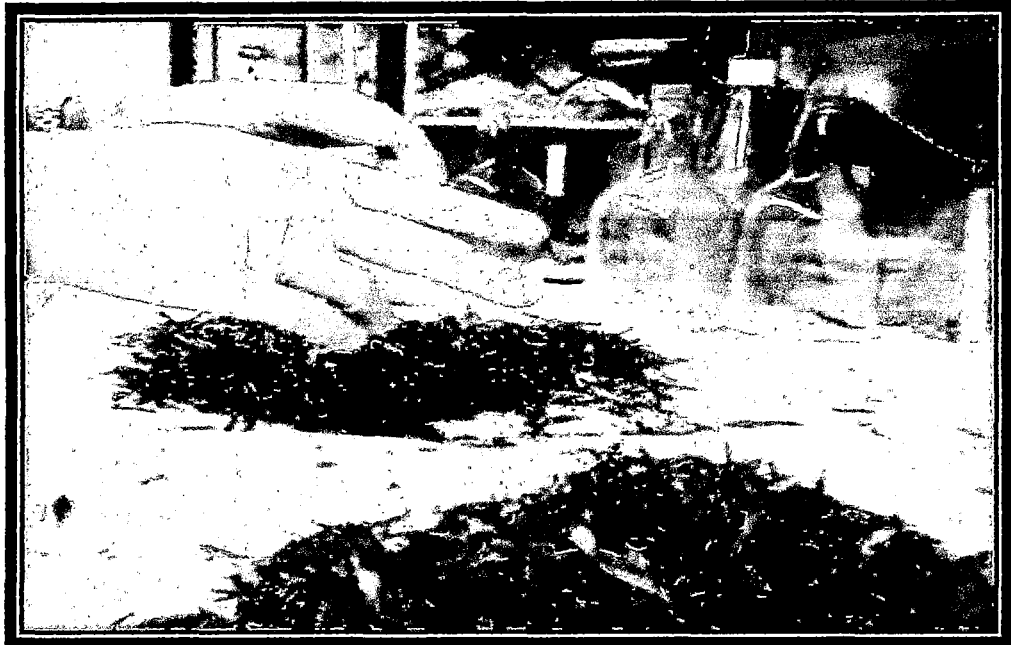
Anexo N° 02: Testimonio Fotografico



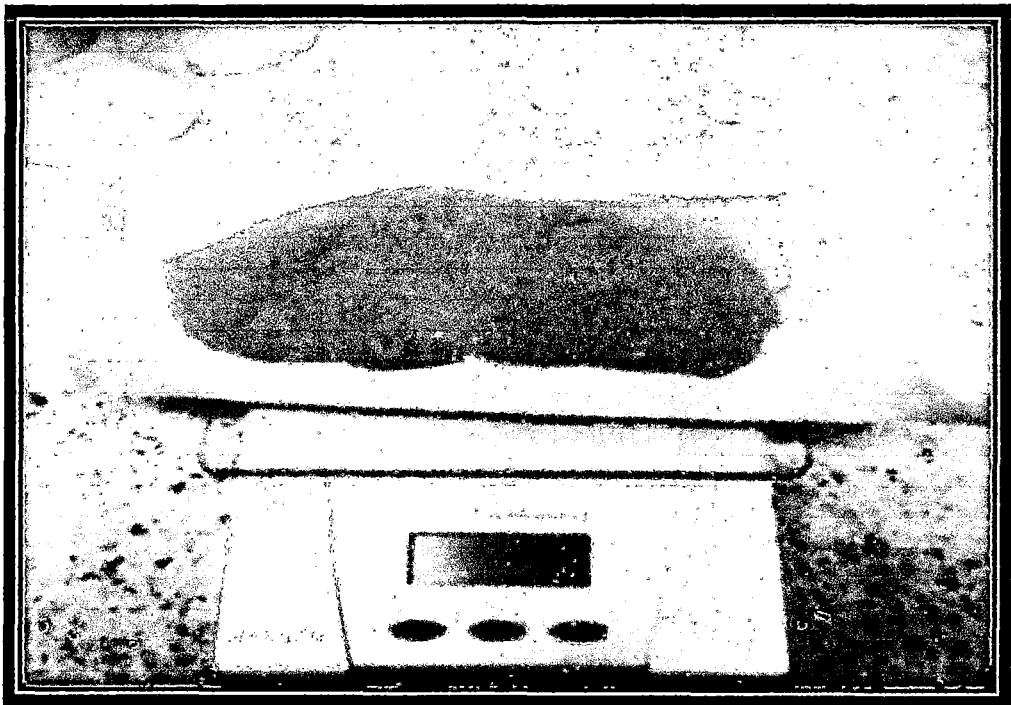
Fotografia N° 01: Stevia en cultivo in vitro



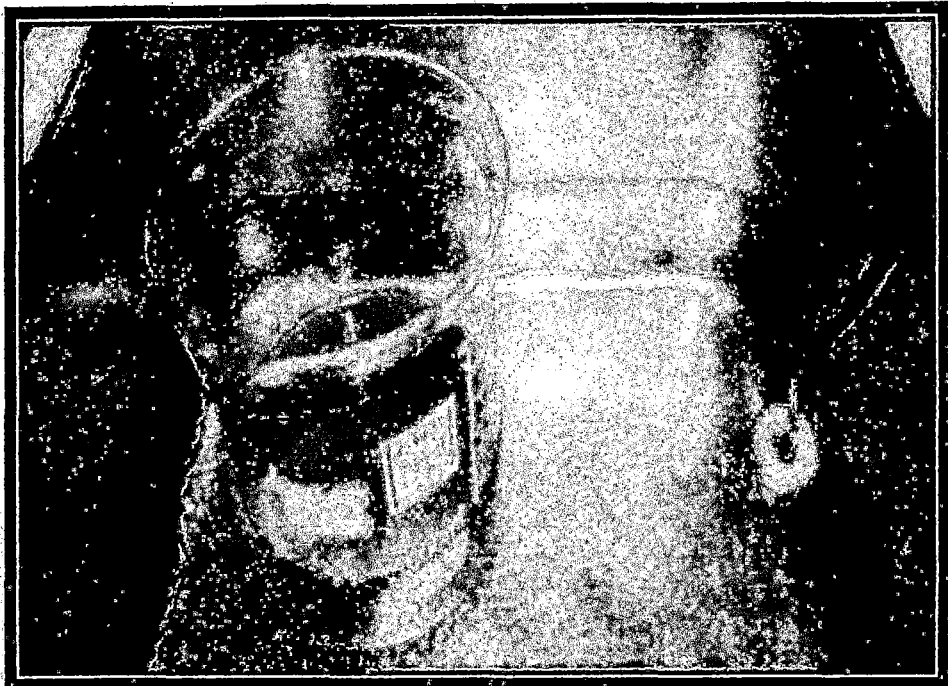
Fotografia N° 02: Stevia en cultivo in vitro



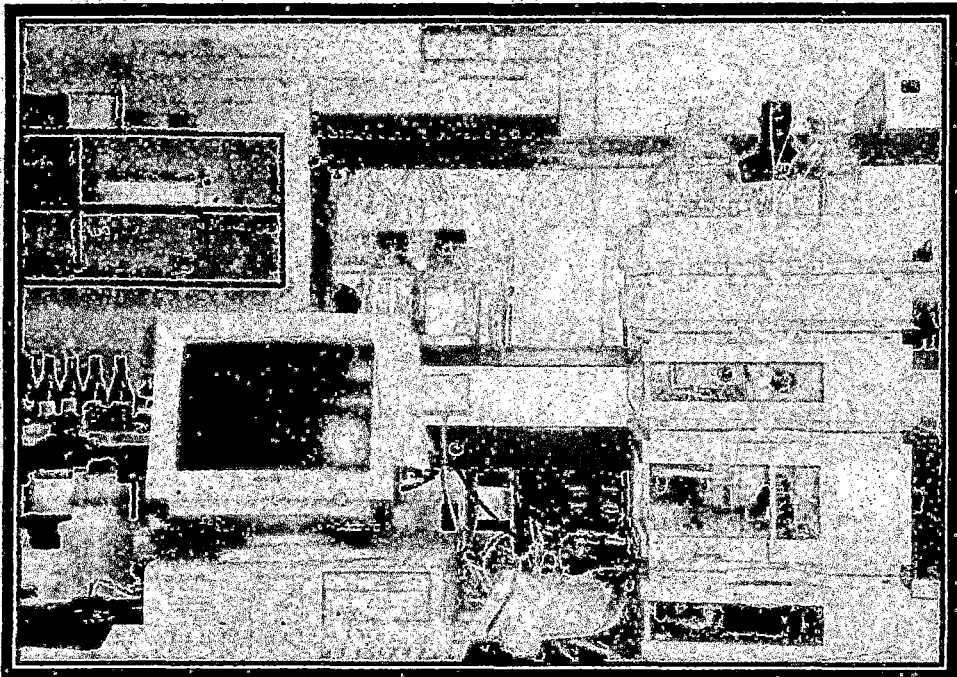
Fotografía N° 03: Hojas de stevia provenientes del cultivo in vitro



Fotografía N° 04: Polvo molido de las hojas de stevia



Fotografia N° 05: Extraccion del edulcorante provenientes del cultivo in vitro



Fotografia N° 06:Equipo de HPLC