

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
ESCUELA DE POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA
QUÍMICA



**“EXTRACCION DE ESTEVIOSIDO Y REBAUDIOSIDO A
MEDIANTE ULTRASONIDO DE LAS HOJAS DE STEVIA (*Stevia
rebaudiana bertonii*)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
INGENIERÍA QUÍMICA**

AUTORES

JORGE LUIS SANDOVAL SULCA

ANDERSON PASTOR SANTA CRUZ TENORIO

ASESOR

DR. JUAN TAUMATURGO MEDINA COLLANA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Ingeniería y Tecnología

Callao, 2023

PERÚ

SANDOVAL MELCA

SANTA CRUZ TIVORIO

Dr. MEDINA COLLANA



Document Information

Analyzed document	TESIS STEVIA - CORRECCION DE OBSERVACIONES - SANDOVAL Y SANTA CRUZ.pdf (D179359368)
Submitted	2023-11-20 21:32:00
Submitted by	
Submitter email	fq.posgrado@unac.edu.pe
Similarity	14%
Analysis address	fq.posgrado.unac@analytic.urkund.com

Sources included in the report

W	URL: http://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/2020/IND-PRI-MAJ-2019.pdf?sequence=1 Fetched: 2023-10-26 23:18:18	1
W	URL: http://library.co/document/tinipoc-extraccion-cuantificacion-compuestos-presen-rebaudon.. Fetched: 2021-11-30 23:32:19	7
SA	TALLER+28+890DIVERSIDAD.pdf Document TALLER+28+890DIVERSIDAD.pdf (D14237079)	1
W	URL: http://scielo.els.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000500001 Fetched: 2022-01-05 02:57:00	1
W	URL: http://hemerotecauad.edu.co/index.php/iaa/article/download/2336/2665?inline=1 Fetched: 2023-03-12 05:48:27	15
SA	Universidad Nacional del Callao / Revista N°23 Artículo 2 Zola Diaz V8 260721.docx Document Revista N°23 Artículo 2 Zola Diaz V8 260721.docx (D10767548) Submitted by: director@unac.edu.pe Receiver: director@unac@analytic.urkund.com	2
SA	Universidad Nacional del Callao / 04-Articulo_ Trabajo de Investigacion-Zola Diaz Cordova.docx Document 04-Articulo_ Trabajo de Investigacion-Zola Diaz Cordova.docx (D8387679) Submitted by: director@unac.edu.pe Receiver: director@unac@analytic.urkund.com	7
W	URL: http://repositorioinstitucional/buapm/bitstream/handle/20.500.12371/6217/689015T.pdf Fetched: 2022-08-26 17:03:23	1
SA	Tesis stevia completa.pdf Document Tesis stevia completo.pdf (D116619840)	1
W	URL: http://iaa.unm.edu/bitstream/handle/20.500.12055/1150/DOCCH08T.pdf Fetched: 2023-11-20 21:32:00	13
SA	TESIS FINAL MIRANDA CYNTHIA.docx Document TESIS FINAL MIRANDA CYNTHIA.docx (D22862463)	4
SA	1423536410_PROYECTO- STEVIA.docx Document 1423536410_PROYECTO- STEVIA.docx (D1185210)	3
W	URL: http://repositorio.cibcr.ucaipn.mx/jspui/bitstream/LITER_CIBIRCOM/099/1/Chapan020-ho-325.. Fetched: 2023-11-20 21:32:00	3
W	URL: http://ru.uuc.edu.ar/bitstream/handle/11086/2555/Texto%20de%20Fernando%20Barrera%20vaquez.pdf Fetched: 2023-11-20 21:32:00	6

INFORMACIÓN BÁSICA

FACULTAD: Ingeniería Química

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN: POSGRADO – Facultad de Ingeniería Química

TÍTULO: “Extracción de esteviosido y rebaudiósido A mediante ultrasonido de las hojas de Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*)”

AUTORES/ CODIGO ORCID /DNI:

Bachiller Jorge Luis Sandoval Sulca/ CODIGO ORCID: 0000-0002-1472-3571/

DNI: 41035792

Bachiller Anderson Pastor Santa Cruz Tenorio/ CODIGO ORCID: 0009-0002-

2411-5454 / DNI: 44201570

ASESOR/ CODIGO ORCID / DNI:

Dr. Juan Taumaturgo Medina Collana/ CODIGO ORCID: 0000-0002-3625-8308/

DNI: 06213328

LUGAR DE EJECUCIÓN: Laboratorio de Operaciones Unitarias – LOPU FIQ

UNAC

UNIDAD DE ANÁLISIS:

Hojas de Stevia proveniente del Fundo Nuevo Horizonte - Tingo María

Departamento de Huánuco.

TIPO / ENFOQUE / DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:

Investigación de tipo aplicada, cuantitativo y diseño experimental.

TEMA OCDE

2.04.01 Ingeniería Química

HOJA DE REFERENCIA DEL JURADO Y APROBACIÓN

DR. RODRIGUEZ TARANGO OSCAR JUAN : PRESIDENTE

DRA. AVELINO CARHUARICRA CARMEN GILDA : SECRETARIA

MG. ROJAS ROJAS GLADIS ENITH : MIEMBRO

MG. ROJAS ROJAS VICTORIA YSABEL : MIEMBRO

DR. MEDINA COLLANA JUAN TAUMATURGO : ASESOR

ACTA: 65-2023

LIBRO: 01

FOLIO 67

FECHA DE SUSTENTACIÓN 08 DE DICIEMBRE 2023

DEDICATORIA

La presente tesis la dedicamos a Dios, por ser el inspirador y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A nuestros padres, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo nos impulsaron a continuar y llegar a cumplir hoy un sueño más.

AGRADECIMIENTO

A Dios, tu amor y bondad no tienen fin, gracias por ser la fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarnos una vida llena de aprendizajes, experiencias y felicidad.

A nuestras familias, a quienes amamos y han sido nuestro apoyo y soporte constante, gracias a su amor, calidez y paciencia, lo difícil se hizo más sencillo y llevadero.

A la vida que es hermosa y una de las principales características de esta hermosura es que la podemos compartir y disfrutar con quienes amamos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
RESUMO	9
INTRODUCCIÓN	10
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	12
1.1. Descripción de la realidad problemática.....	12
1.2. Formulación del problema.....	13
1.2.1. <i>Problema general</i>	13
1.2.2. <i>Problemas específicos</i>	13
1.3. Objetivos	13
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	13
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	13
1.4. Justificación	13
1.5. Delimitantes de la investigación (teórica, temporal, espacial).....	14
1.5.1. <i>Delimitación teórica</i>	14
1.5.2. <i>Delimitación temporal</i>	14
1.5.3. <i>Delimitación espacial</i>	14
II. MARCO TEÓRICO	15
2.1 Antecedentes	15
2.1.1 <i>Antecedentes internacionales</i>	15

2.1.2 <i>Antecedentes nacionales</i>	18
2.2 Bases teóricas	19
2.2.1 <i>Stevia</i>	19
2.2.2 <i>Métodos y técnicas de extracción de los glucósidos de la Stevia</i>	25
2.3 Marco Conceptual	32
2.4 Definición de términos	33
III. HIPOTESIS Y VARIABLES	35
3.1 Hipótesis general y específica.....	35
Hipótesis general	35
Hipótesis específica	35
3.1.1 Operacionalización de variables.....	35
IV. METODOLOGÍA DEL PROYECTO.....	37
4.1 Diseño metodológico	37
4.2 Método de investigación	37
4.3 Población y muestra.....	38
4.3.1 Población	38
4.3.2 Muestra	38
4.4 Lugar de estudio y periodo desarrollado	38
4.5 Técnicas e instrumentos para la recolección de la información	38
4.6 Análisis y procesamiento de datos	40
4.7 Aspectos éticos en investigación.....	40
V. RESULTADOS	41
5.1 Resultados descriptivos.....	41
5.1.1 Resultados de la determinación de humedad de las hojas de stevia	41

5.1.2 Resultados descriptivos de la extracción de esteviósido y rebaudiósido A de hojas de stevia mediante ultrasonido	41
5.2 Resultados inferenciales	49
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	54
6.1 Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados.	54
6.2 Contrastación de los resultados con otros estudios similares.	55
6.3 Responsabilidad ética de acuerdo con los reglamentos vigentes	56
VII. CONCLUSIONES	57
VIII. RECOMENDACIONES.....	58
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
X. ANEXOS.....	65
Anexo 1: Matriz de consistencia: Extracción de Esteviosido y Rebaudiósido A mediante ultrasonido de hojas de Stevia	66
Anexo 2: Vista funcionamiento del equipo y accesorios en pruebas	67
Anexo 3: Resultados de laboratorio para determinación de esteviósido	68
Anexo 4: Resultados preliminares de laboratorio para determinación de esteviósido	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Stevia.....	21
Tabla 2. Principales glicósidos de la Stevia.....	22
Tabla 3. Composición de glucósidos en hojas de Stevia deshidratada	24
Tabla 4. Ventajas y desventajas del uso de técnicas y métodos para la extracción glucósidos de la Stevia	27
Tabla 5 Operacionalización de las variables	36
Tabla 6 Parámetros y niveles para el diseño experimental	38
Tabla 7 Diseño experimental.	39
Tabla 8 Variables, dimensiones e indicadores del estudio	41
Tabla 9 Humedad de las hojas de stevia analizadas.....	41
Tabla 10 Resultados de análisis de laboratorio	42
Tabla 11 Efectos principales para señales a ruido (SN) del esteviósido	42
Tabla 12 Efectos principales para medias del esteviósido	43
Tabla 13 Efectos principales para señales a ruido del rebaudiósido A.....	45
Tabla 14 Efectos principales para medias del rebaudiósido A	46
Tabla 15 Coeficientes de modelos estimados para Relaciones SN.....	49
Tabla 16 Resumen del modelo	49
Tabla 17 Análisis de Varianza de Relaciones SN.....	49
Tabla 18 Coeficientes de modelos estimados para Medias.....	50
Tabla 19 Resumen del modelo	50
Tabla 20 Análisis de Varianza de Medias.....	50
Tabla 21 Coeficientes de modelos estimados para Relaciones SN.....	51
Tabla 22 Resumen del modelo	51

Tabla 23 Análisis de Varianza de Relaciones SN.....	51
Tabla 24 Coeficientes de modelos estimados para Medias.....	52
Tabla 25 Resumen del modelo	52
Tabla 26 Análisis de Varianza de Medias.....	53
Tabla 27 Análisis de varianza	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del estevioso	23
Figura 2. Estructura del rebaudiósido A	23
Figura 3. Diagrama de técnicas y métodos de extracción de estevioso y rebaudiósido A	26
Figura 4. Principio del funcionamiento del equipo ultrasonido Branson.	29
Figura 5. Diagrama de técnicas de análisis de Stevia	30
Figura 6 Efectos principales para relaciones SN del estevioso	43
Figura 7 Efectos principales para medias del estevioso	44
Figura 8 Distribución de residuos para relaciones SN del estevioso	44
Figura 9 Distribución de residuos para medias de los valores obtenidos del estevioso	45
Figura 10 Efectos principales para relaciones señales a ruido del rebaudiósido A	46
Figura 11 Efectos principales para medias en la extracción del rebaudiósido A	47
Figura 12 Distribución de residuos para relaciones SN del rebaudiósido	47
Figura 13 Distribución de residuos para medias de los valores obtenidos del rebaudiósido	48
Figura 14 Matriz de estevioso - rebaudiósido	48

INDICE DE ABREVIATURAS

EAU: Extracción asistida por ultrasonido

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

HPLC: Cromatografía en capa fina de alto rendimiento

JECFA: Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios

LIQ: Líquido

OMS: Organización Mundial de la Salud

SOL: Sólido

SN: Señal de ruido

TEMP: Temperatura

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo general efectuar la extracción de esteviosido y rebaudiósido A mediante ultrasonido a partir de hojas de Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*). Respecto a la metodología, el estudio se elaboró bajo un enfoque cuantitativo, nivel explicativo y el diseño experimental considerando el método Taguchi de nueve experimentos. Las muestras consistieron en hojas de Stevia provenientes del Fundo Nuevo Horizonte - Tingo María del departamento de Huánuco las cuales fueron acondicionadas a través del secado, molienda y tamizado; asimismo, se consideraron como parámetros de operación a la relación solido-liquido: 20, 40 y 60 g/L, temperatura: 50, 60 y 70°C y granulometría: 10, 20 y 40 mallas y para la extracción se utilizó un equipo ultrasónico marca Branson modelo CPX2800 de 2.8 L de capacidad y potencia 250 Watts. El análisis y cuantificación de los extractos se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Agraria – La Molina encontrándose que los valores de relación solido-líquido de 60 g/L, la granulometría próxima a 20 mallas y la temperatura en el rango de 60 a 70 °C maximizan la obtención de elevadas concentraciones de esteviosido y rebaudiósido A. Se concluyó que con una relación solido-liquido de 60 g/L, 70°C de temperatura y 20 mallas se obtiene 0.916 g/L de esteviosido y 5.961 g/L de rebaudiósido A.

Palabras clave: Esteviosido, Extracción, Rebaudiósido A, Stevia, Ultrasonido.

RESUMO

O objetivo geral desta pesquisa foi extrair esteviosídeo e rebaudiosídeo A por ultrassom de folhas de Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*). Quanto à metodologia, o estudo foi realizado sob abordagem quantitativa, nível explicativo e o delineamento experimental considerando o método Taguchi de nove experimentos. As amostras consistiram de folhas de Stevia provenientes da Fazenda Nuevo Horizonte - Tingo María do departamento de Huánuco que foram acondicionadas por secagem, moagem e peneiramento; Da mesma forma, foram considerados como parâmetros operacionais a relação sólido-líquido: 20, 40 e 60 g/L, temperatura: 50, 60 e 70°C e granulometria: 10, 20 e 40 mesh, e para extração foi utilizado equipamento da marca Branson. modelo ultrassônico CPX2800 com capacidade de 2,8 L e potência de 250 Watts. A análise e quantificação dos extratos foi realizada no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Agrária - La Molina, constatando-se que os valores de relação sólido-líquido de 60 g/L, a granulometria próxima de 20 malhas e a temperatura na faixa de 60 a 70 °C maximizam a obtenção de altas concentrações de esteviosídeo e rebaudiosídeo A. Concluiu-se que com relação sólido-líquido de 60 g/L, temperatura de 70 °C e 20 malhas, 0,916 g/L de esteviosídeo e 5,961 g /L de rebaudiosídeo A.

Palavras-chave: Esteviosídeo, Extração, Rebaudiosídeo A, Estévia, Ultrassom

INTRODUCCIÓN

Los productos dulces han sido consumidos por el hombre desde el inicio de su historia y el azúcar ha sido el edulcorante de mayor consumo. En los últimos años la biotecnología ha introducido en el mercado mundial los edulcorantes artificiales bajos en calorías a base de componentes químicos, los cuales surgieron para satisfacer las necesidades de personas con limitaciones respecto al consumo de azúcar y calorías en su dieta. Por otro lado, desde hace algunas décadas se han explorado otras alternativas como son los edulcorantes naturales cuyos beneficios son similares a los de los edulcorantes artificiales, pero con un valor agregado de no causar efectos nocivos en la salud.

Dentro de las alternativas de edulcorantes naturales amigables con la salud, se encuentra la Stevia, la cual es una planta más dulce que el azúcar y no tiene calorías, su poder de edulcoración es 30 veces mayor que el azúcar y el extracto alcanza de 200 a 300 veces más. Las hojas tienen el mayor contenido de esteviosido y rebaudiósido A, que son sus principales principios activos y son los compuestos responsables de la edulcoración y normalmente están acompañados por pequeñas cantidades de otros esteviolglicósidos.

Actualmente, se utilizan diferentes técnicas de extracción para la obtención de esteviosido y rebaudiósido A. Entre estas, la extracción con disolventes orgánicos es el método más empleado.

Asimismo, los métodos convencionales de extracción, basados principalmente en el uso de agua caliente y disolventes orgánicos, forman problemas como la degradación de compuestos, elevado gasto de disolventes, problemas ambientales y largos periodos de operación (1). Ante ello, diversas investigaciones realizadas durante los últimos años han tratado de solucionar estos problemas, aplicando técnicas de extracción verde, como, por ejemplo, extracciones con fluidos supercríticos, extracciones asistidas por ultrasonidos, extracciones asistidas por microondas y extracciones asistidas por enzimas (1, 2, 3).

Dentro de las tendencias agroindustriales que buscan obtener compuestos bioactivos a partir de plantas, se distinguen los métodos de extracción verde por ser amigables con el ambiente. Por tal motivo, y teniendo

en cuenta la amplia variedad de técnicas existentes para la obtención de glucósidos a partir de la *Stevia rebaudiana bertonii*, se hace necesario utilizar métodos de extracción que permitan optimizar el proceso, minimizando el uso de disolventes orgánicos, ofreciendo una alternativa limpia y amigable con el ambiente para mejorar la disponibilidad de los compuestos a extraer (4).

Para abarcar completamente el problema de investigación, el estudio se organizó por capítulos:

El Capítulo I, expone el planteamiento del problema, en él se describe la realidad problemática en el cual actualmente debido al aumento de problemas de salud ocasionado por malos hábitos alimentarios, en el caso particular de alimentos con altos contenidos de azúcares, existe la tendencia al uso de edulcorantes de origen natural amigables con la salud de los consumidores, también se detallan las formulaciones de los problemas, los objetivos, la justificación y delimitantes de la investigación. Seguidamente se presenta el Capítulo II, el cual contiene los fundamentos teóricos, antecedentes de la investigación y las definiciones de términos básicos. En cuanto Capítulo III contiene las hipótesis y variables. Esta sección comprende la hipótesis general y específicas, así como la definición conceptual y operacionalización de las variables en estudio.

El Capítulo IV, se enfoca al diseño metodológico, donde se desarrollan los aspectos siguientes: tipo y diseño del estudio, método de investigación, población y muestra con la que se desarrolló la investigación, lugar de estudio, técnicas e instrumentos para la recolección de la información y el análisis y procesamiento de datos. En relación al Capítulo V, se presentan los resultados descriptivos e inferenciales todo ello obtenido del proceso de la recolección de datos. Seguidamente en el Capítulo VI se realiza la contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados, así como la contrastación de los resultados con otros estudios similares.

Finalmente se presentan las conclusiones y recomendaciones en función al desarrollo del aspecto analítico y reflexivo de la información que se ha recogido producto del análisis de las muestras. Luego se exponen las referencias bibliográficas, y los anexos.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Descripción de la realidad problemática

Actualmente en el mundo debido al aumento de problemas de salud ocasionado por malos hábitos alimentarios, es mayor la tendencia al reemplazo de algunos alimentos ricos en azúcares, grasas y carbohidratos por otros con menor contenido de los mismos, y en el caso particular de alimentos con altos contenidos de azúcares, existe la tendencia al uso de edulcorantes de origen natural amigables con la salud de los consumidores.

La Stevia es un edulcorante natural que está tomando mucho auge en el mundo por las bondades que presenta; sin embargo, en países de Sudamérica, la mayor parte se comercializa como hoja seca, y su procesamiento se limita a la elaboración de filtrantes y/o extractos acuosos y comprimidos. Además de extractos en polvo de glucósidos de esteviol de 85% a 95% de pureza (5). En esa misma línea, en el país se viene incentivando la siembra de la planta y la adaptabilidad de la planta ha sido probada en zonas agroecológicas andinas como: San Ignacio y Chota, pertenecientes al Departamento de Cajamarca, así como en la Región San Martín, Amazonas y Huánuco (6). Sin embargo, si bien se viene promocionando su cultivo se carece de técnicas de extracción sencillas que promuevan un valor agregado a dicho producto.

Respecto a las técnicas de extracción de glucósidos de esteviol, Lima *et al.* demostraron la pertinencia en la aplicación de ultrasonidos con agua como disolvente para obtener una extracción verde más eficiente (7). Por ello, el propósito de este trabajo de investigación fue la extracción de los glucósidos (esteviosido y rebaudiósido A) mediante ultrasonido a partir de hojas de Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*) procedente del Fundo Nuevo Horizonte - Tingo María - Departamento de Huánuco, determinando así los factores más adecuados de operación como la relación sólido-líquido, la temperatura de operación del ultrasonido y la granulometría de las hojas de Stevia para su realización.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Qué concentración de esteviosido y rebaudiósido A se obtendrá utilizando la extracción mediante ultrasonido, a partir de hojas de Stevia (Stevia Rebaudiana Bertoni)?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál es el porcentaje de humedad de las hojas de stevia para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A de las hojas de stevia mediante ultrasonido?
- ¿Cuáles son los parámetros adecuados de relación sólido-líquido, temperatura de operación del ultrasonido y granulometría de las hojas de Stevia para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Extraer esteviosido y rebaudiósido A mediante ultrasonido de hojas de Stevia (Stevia Rebaudiana Bertoni).

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de humedad de las hojas de stevia para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A de las hojas de stevia mediante ultrasonido
- Determinar los parámetros adecuados de relación sólido-líquido, temperatura de operación del ultrasonido y granulometría de las hojas de Stevia para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A

1.4. Justificación

Los resultados de la presente investigación son un aporte novedoso al conocimiento de las operaciones y/o técnicas de extracción de esteviolglicosidos de las hojas de stevia, dentro de las cuales están emergiendo las técnicas de extracción denominadas de “extracción verde” que usan solventes como el agua o metanol generando un elevado rendimiento respecto a las técnicas de extracción clásicas; tal es el caso de la técnica emergente de extracción asistida por ultrasonido. Ante ello resulta muy importante determinar las condiciones y factores que caracterizan esta innovadora técnica de extracción de esteviósidos;

contribuyendo así a su desarrollo, difusión como alternativa viable, de tecnología limpia, eco amigable y su fomento en nuestro país.

Por otro lado, la presente investigación brinda una alternativa para la extracción de estevioso y rebaudiósido A de las hojas de stevia, a través de una tecnología sencilla, practica y de fácil transferencia tecnológica (ultrasonido), proponiendo un valor agregado a los agricultores y productores de las hojas de stevia.

Asimismo, actualmente las personas debido al ritmo acelerado de vida, malos hábitos alimenticios vienen consumiendo grandes cantidades de azúcar, conllevando con el pasar del tiempo a que presenten problemas en su salud; por lo que es necesario que exista una tendencia al reemplazo de estos azúcares de altos contenidos calóricos, por edulcorantes naturales y de bajo poder calórico como la stevia.

1.5. Delimitantes de la investigación (teórica, temporal, espacial).

1.5.1. Delimitación teórica

La presente investigación está enmarcada dentro de la teoría de tecnología de alimentos (inocuidad, entre otros) específicamente dentro de las tecnologías emergentes, tratamiento de productos naturales y la teoría de análisis químico cuantitativo: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

1.5.2. Delimitación temporal

Debido a que las hojas de stevia se pueden obtener entre seis y siete cortes al año, la extracción de estevioso y rebaudiósido A mediante ultrasonido se puede realizar en cualquier época del año. La investigación se efectuará entre los meses de julio y agosto de 2023.

1.5.3. Delimitación espacial

Las muestras provendrán del fundo Nuevo Horizonte - Tingo María Departamento de Huánuco, la tecnología del procesamiento es aplicable en la zona costa, sierra y selva del país

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

2.1.1 Antecedentes internacionales.

El artículo científico titulado: "Ultrasound-assisted Extraction Process of Glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves. Chemical Engineering Transactions", desarrolló un proceso de extracción verde apto para fines industriales, utilizando agua como disolvente y técnica de ultrasonidos para obtener un alto rendimiento de glucósidos en el extracto de *Stevia*, realizaron extracciones por lotes con recirculación y montajes continuos a 45 ° C y estudiaron los efectos de la potencia del ultrasonido (a 20 kHz), el tiempo de extracción / tiempo de residencia y la concentración de hojas; asimismo los sólidos solubles y la concentración de glucósidos de *Stevia* las analizaron mediante los ° BX y HPLC respectivamente. En su estudio determinaron que el uso de ultrasonido es interesante para lotes con una concentración más baja de esteviol a extraer, demostraron la pertinencia en la aplicación de ultrasonidos para obtener una extracción verde de glucósidos de esteviol más eficiente, sin embargo, los resultados dependen mucho de la composición de las hojas de *Stevia* (7).

El artículo científico titulado: "Chemical composition of dried *Stevia Rebaudiana* Bertoni leaves and effect of ultrasound-assisted extraction on total steviosides content in extract. Sciendo", analizó algunas de las principales composiciones químicas de las hojas secas de *Stevia rebaudiana bertonii* y determinaron la influencia de factores individuales sobre el contenido obtenido de los esteviosidos totales, incluida la relación disolvente/material, temperatura y tiempo de extracción por ultrasonido – extracción asistida con solución acuosa de etanol como solvente. Concluyeron que con este método podría aplicarse como una extracción ambiental amigable debido a la disminución de ultrasonidos, temperatura y tiempo, y las condiciones óptimas de extracción fueron la concentración de etanol 70% (v / v), relación sólido-líquido de 1: 100 (g / ml), una temperatura de 75 °C y un tiempo de extracción de 30 minutos (8).

El artículo científico titulado: “Separation of steviol glycosides from *Stevia Rebaudiana* using different aqueous extraction techniques. Borneo international Journal of Biotechnology”, comparó las diferentes técnicas de extracción de hojas de *Stevia* utilizando diferentes tecnologías como la alta presión y ultrasonidos en la extracción de glucósidos de esteviol mediante extracción de agua caliente, extracción de líquido presurizado y extracción asistida por ultrasonido, cuantificaron los rendimientos de glucósidos de esteviol mediante dos marcadores químicos, rebaudiósido A y esteviosido de *Stevia rebaudiana bertonii* usando alto análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Utilizaron el método experimental y concluyeron que, entre las 3 técnicas de extracción acuosas, la extracción por agua caliente mostró la mayor cantidad de glucósidos de esteviol extraídos (1,110 mg) seguido de la extracción asistida por ultrasonido (427,5 mg) y extracción por líquido presurizado (247,5 mg), siendo la técnica más eficiente para la extracción de *Stevia* por agua caliente (9).

El artículo científico titulado: “Steviol glycosides and polyphenols extraction from *Stevia Rebaudiana Bertonii* leaves using maceration, microwave, and ultrasound-assisted techniques. Separation Science and Technology”, experimento los efectos del solvente, la extracción asistida por microondas y técnicas de la extracción asistida por ultrasonido sobre la recuperación de glucósidos de esteviol y compuestos antioxidantes de las hojas de *Stevia*, determinando las condiciones óptimas de extracción para cada una de las técnicas. Utilizaron el método experimental investigando los efectos de las variables del proceso utilizando la metodología de superficie de respuesta y para el análisis la técnica de HPLC, concluyeron que los más altos contenidos de glicósidos de esteviol, fenólicos y flavonoides, así como la capacidad antioxidante fueron obtenidos por extracción asistida por ultrasonido; y los tiempos de extracción fueron 16, 43 y 112 min para extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido y extracción por maceración respectivamente (10).

El artículo científico titulado: “Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia Rebaudiana Bertonii* and identification of extracts.

Food and Bioproduct Processing”, estudió e indicó las condiciones óptimas de extracción de carbohidratos de *Stevia* asistida por ultrasonido, comparándolo con los resultados obtenidos por los métodos clásicos, aplicaron el método experimental. Concluyeron que la extracción óptima fue a una temperatura de funcionamiento de 68 °C, una potencia sónica de 60 W y un tiempo de extracción de 32 min., asimismo usando la extracción asistida por ultrasonido el rendimiento de los extractos aumentó en un factor de 1,5 a la temperatura de extracción más baja (68 °C) y el tiempo de extracción (32 min) se acortó sustancialmente en comparación con el de la extracción clásica, por último realizaron el análisis de los componentes de los extractos con la técnica de HPLC encontrando que la cantidad relativa de rebaudiósido A aumentó en los extractos asistidos por ultrasonido en comparación con los extractos obtenidos por el proceso clásico y los extractos asistidos por ultrasonido tuvieron mejor calidad (11).

El artículo científico titulado: “Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. International Agrophysics”, realizó un procedimiento de extracción eficaz para maximizar el rendimiento de glucósidos de esteviol y compuestos fenólicos totales, así como anti-actividad oxidante en extractos de *Stevia*. Compararon la extracción asistida por ultrasonido con la extracción por solvente convencional, utilizando disolventes como el agua (100 °C por 24h) y etanol al 70% (70 °C por 30 minutos). Concluyeron que la extracción asistida por ultrasonido de ingredientes funcionales de las hojas de *Stevia rebaudiana bertoni* dio como resultado mayores rendimientos de extracción de glucósidos de esteviol y compuestos fenólicos en comparación con los métodos convencionales, además, concluyeron que la extracción asistida por ultrasonido acortó el tiempo de extracción de los glucósidos de esteviol y compuestos fenólicos, asimismo, las condiciones óptimas para el máximo rendimiento de glucósidos de esteviol, fenoles totales y flavonoides fueron los siguientes: tiempo de extracción 10 min y temperatura 81,2 °C (2).

El artículo científico titulado: “Extracción de esteviosido y rebaudiosido A por métodos no convencionales. XXVII Reunión Científica Tecnológica, Forestal y Agropecuaria Tabasco”, planteó la extracción del esteviosido y rebaudiósido-A

combinando dos métodos no convencionales, empleando una extracción enzimática y una extracción por ultrasonificación, de igual forma se aplicó una extracción enzimática asistida por ultrasonido. La cuantificación se realizó por HPLC logrando la separación e identificación del esteviosido a un tiempo de 5.6 min. y del rebaudiósido A a un tiempo de 5.35 min. Concluyeron que la extracción enzimática obtuvo el mayor rendimiento de glucósidos de esteviol, al usar 0.5 % de la combinación de celulasa, hemicelulasa y pectinasa a una temperatura de 50 °C por un lapso de 60 minutos. Bajo las condiciones anteriores lograron un rendimiento de 13.9 % mayor al obtenido por el método convencional. El uso de ultrasonido a temperatura ambiente, con una frecuencia de 44 kHz y por un lapso de 60 minutos mostró un rendimiento de 10.4 % menor al método enzimático, pero 2.9 % mayor al método convencional. El método de extracción enzimática asistida por ultrasonido demostró tener menor rendimiento en comparación con el método convencional (4.9 %) y los no convencionales (17.1 %), debido a una posible inactivación enzimática a las condiciones expuestas en su investigación (12).

2.1.2 Antecedentes nacionales

La tesis titulada: “Determinación del método óptimo de extracción de esteviosido y rebaudiósido de las hojas de Stevia (*Stevia Rebaudiana bertonii*) a nivel piloto en el laboratorio de Operaciones y procesos Unitarios de la Universidad Nacional del Callao”, comparó los métodos de secado por atomización y método de extracción con columnas de intercambio iónico utilizando resinas catiónicas y aniónicas para la extracción de los glucósidos de la Stevia. Utilizó en método experimental y como resultado de la investigación concluye que el producto obtenido por atomización es de color oscuro, el cual se humedeció en poco tiempo, en cambio, el polvo obtenido por el método de intercambio iónico es un polvo blanco, el cual se conservó más tiempo sin humedad, además tiene buena apariencia, menos olor a hierba y sabor dulce, lo que lo convierte en un buen prospecto de industrialización (13).

La tesis titulada: “Obtención de un extracto concentrado de Stevia (*Stevia Rebaudiana Bertonii*)”, investigó métodos de extracción del esteviosido por medio acuoso, hidroalcolico y alcohólico. Utilizó el método experimental y como

resultado de su investigación concluye que, el solvente que mejor funcionó fue el agua en ebullición a 85°C con agitación durante 15 minutos, obteniéndose un extracto con 7 ° Brix, exento de sabor amargo respecto a la extracción con alcohol y agua a temperatura ambiente, asimismo los parámetros óptimos para el tratamiento con vapor a las hojas de Stevia fueron, 120 ° C por un tiempo de 30 minutos y 1.5 lb/pulg² de presión, lográndose eliminar los aceites esenciales, desnaturalizar la clorofila y otros compuestos orgánicos que influyen en el sabor. Además, al realizar una extracción acuosa y con métodos naturales no existe necesidad de recuperar el disolvente y se evita la manipulación de sustancias tóxicas y se abarata considerablemente el proceso de obtención del esteviosido (5).

La tesis titulada: "Extracción de Esteviosido por columnas de intercambio iónico a partir de hojas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), investigó la extracción de esteviosido por columnas de intercambio iónico a partir de hojas de Stevia (*Stevia rebaudiana bertoni*), utilizó el método experimental y como resultado de su investigación concluyó que, la relación de materia prima/solvente y tiempo influye de manera significativa en el rendimiento, donde el punto óptimo de extracción es de 1/16.5 y 55 min, mientras que la variable temperatura no influye de manera significativa al proceso de extracción del esteviosido, pero para obtener un máximo rendimiento su punto óptimo es de 42°C. Asimismo, el tipo de deshidratación no tiene un efecto significativo en cuanto al rendimiento total del proceso de extracción del esteviosido, pero sí influye en cuanto a la apariencia del producto final siendo la mejor muestra tratada por el proceso de atomización, obteniendo un rendimiento final de 7.36% (14).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Stevia.

La Stevia fue usada desde la época precolombina por los guaraníes de la región, que la denominan kaé heé o "hierba dulce", como edulcorante para el mate y otras infusiones; asimismo, durante la década de 1970 los investigadores japoneses identificaron otros principios edulcorantes en las hojas de Stevia

además del esteviosido entre los cuales tenemos a los rebaudiósidos A, B, C, D y E, dulcósido A y B y otros de menor importancia (15).

En cuanto a las características botánicas, Zañon realiza la clasificación taxonómica de la Stevia, así como Goyal y Samsher refieren que en las 154 especies identificadas del género Stevia existen varios compuestos edulcorantes, sin embargo, la *Stevia rebaudiana bertonii* es la más dulce de todas (16, 17).

Por otro lado, respecto a las características de la Stevia, la planta crece hasta una altura de 1 m, la hoja verde tiene un peso de 20 g, el tiempo de vida de la planta es de 6 a 8 años y su rendimiento en promedio por hoja seca es de 8000 kg/Ha/año. En la tabla 1 se describe la clasificación mediante categorías taxonómicas para la planta de la Stevia (18).

En cuanto a la composición química de la Stevia, dentro de los principales componentes de las hojas de *Stevia rebaudiana bertonii* existe una mezcla compleja de diterpenos labdánicos, triterpenos, estigmasterol, taninos, aceites volátiles y ocho glicósidos diterpénicos dulces: esteviosido, esteviolviésido, rebaudiósidos A, B, C, D, E y dulcósido A (19); también, estos compuestos son glucósidos derivados del diterpeno esteviol (entero-13- hidroxikaureno-16-en-19-oicoacido) que se forman mediante la sustitución del átomo de hidrogeno del grupo carboxilo con glucosa, xilosa y ramnosa para formar un éter (20); asimismo los dos principales agentes edulcorantes el esteviosido y el rebaudiósido A, son termoestables incluso hasta 200°C, haciéndolos más adecuados para su uso en alimentos cocinados o sometidos a altas temperaturas (21). En la tabla 2 se describen los principales componentes de la Stevia y sus respectivos pesos moleculares.

Tabla 1.*Clasificación taxonómica de la Stevia*

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

Nota. Adaptado de Zañon (2000).

Por otro lado, las hojas de *Stevia* contienen básicamente esteviosido y rebaudiósido A, siendo este último más dulce y con menor sabor amargo que el esteviosido; sin embargo, el esteviosido se encuentra en mayor proporción y es más estable que los demás glicósidos, además de ser el segundo con mayor poder edulcorante. El rebaudiósido E es casi tan dulce como el esteviosido, el rebaudiósido D es casi tan dulce como el rebaudiósido A, en cuanto a los otros glicósidos son menos dulces que el esteviosido y están en menor proporción (todos suman el 1%) (19). Asimismo, las hojas de esta especie contienen otros principios endulzantes como los rebaudiósidos A y B. El esteviosido en forma pura es 300 veces más dulce que una solución al 0,4% de sacarosa (22).

Tabla 2.*Principales glicósidos de la Stevia*

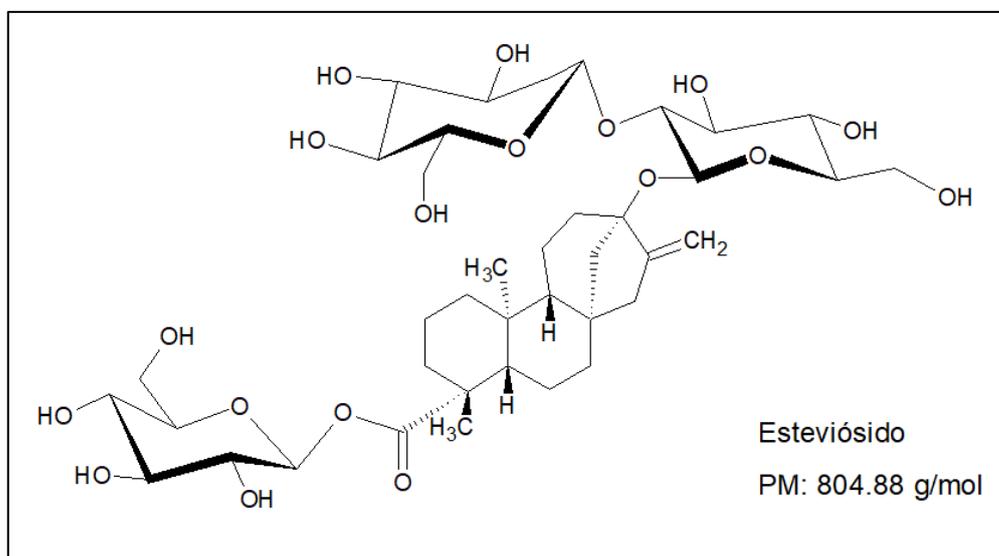
Componente	R1	R2	Peso Molecular
Esteviosido	β -Glc	β -Glc- β -Glc (2—1)	804.88
Rebaudiósido A	β -Glc	β -Glc- β -Glc (2—1) β -Glc (3—1)	967.01
Rebaudiósido B	H	β -Glc- β -Glc (2—1) β -Glc (3—1)	804.87
Rebaudiósido C	β -Glc	β -Glc- β -Glc- α - Rha (2—1) β Glc (3—1)	951.03
Rebaudiósido D	β -Glc- β -Glc (2—1)	β -Glc- β -Glc (2—1) β -Glc (3—1)	1129.17
Rebaudiósido E	β -Glc- β -Glc	β -Glc- β -Glc (2—1)	966.43
Rebaudiósido F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl (2—1) β -Glc (3—1)	936.98
Dulcósido A	β -Glc	β -Glc- α -Rha (2—1)	788.87
Rubosósido		β -Glc	642.7316
Steviolbiosido		β -Glc- β -Glc (2—1)	642.73

Nota. Tomado de Aranda *et al.* (2014)

En otro estudio, Tucker y Debaggio indicaron que los esteviosidos no fermentan, no se oscurecen por cocción y son muy estables al calor y ácidos. Tienen sabor detectable en un umbral de 0,002%, pero grandes cantidades de hojas provocan un sabor amargo (23). En la figura 1 se describe la estructura del esteviosido que contiene 38 carbonos, 60 hidrógenos y 18 oxígenos, cuyo nombre completo es 13-O-beta-soforosil-19-O-beta-glucosil-steviol desarrollado en el software Chems sketch.

Figura 1.

Estructura del esteviosido

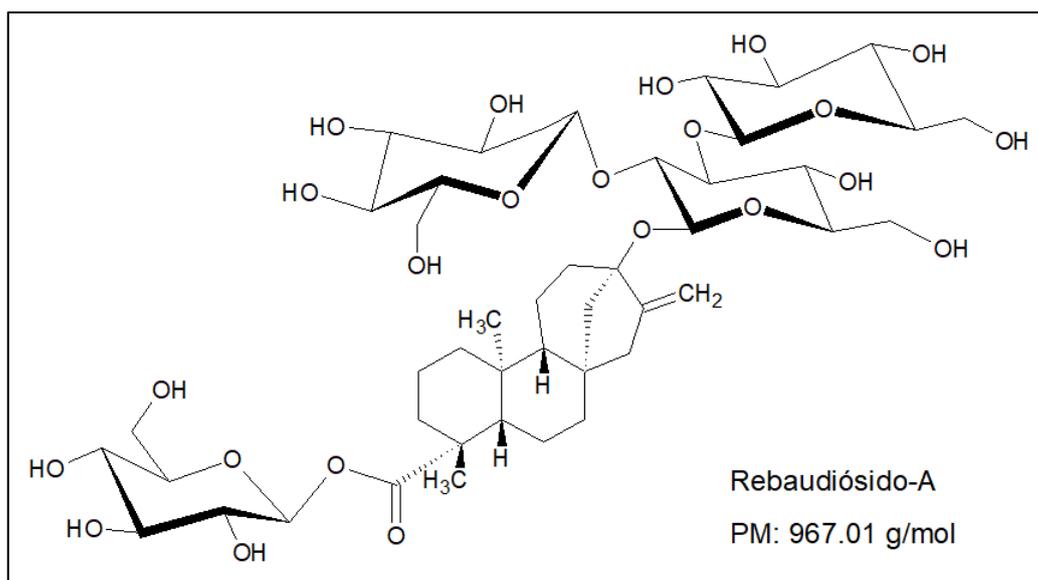


Nota. Elaborado por los autores en el software Chems sketch.

Por otro lado, en la figura 2 se describe la estructura del rebaudiósido A, que contiene 44 átomos de carbonos, 70 de hidrógeno y 23 oxígeno desarrollado en el software Chems sketch.

Figura 2.

Estructura del rebaudiósido A



Nota. Elaborado por los autores en el software Chems sketch.

En la tabla 3 se describe los contenidos de glucósidos (esteviosido, dulcósido A y rebaudiósido A, B, C, D y E) en hojas de Stevia deshidratada según autores.

Tabla 3.

Composición de glucósidos en hojas de Stevia deshidratada

Tipo de glucósido	(Bursać et al., 2018)	(Brandle et al., 1998)
Esteviosido	4-13%	9.1%
Rebaudiósido A	2-4%	3.8%
Rebaudiósido C	1-2%	0.6%
Dulcósido A	0.4-0.7%	0.3%
Rebaudiósido B	Trazas	Trazas
Rebaudiósido D	Trazas	Trazas
Rebaudiósido E	Trazas	Trazas

Nota. Tomado de Martinez (2018).

En cuanto a las propiedades fisicoquímicas del esteviosido, Díaz mencionó que su estructura no se modifica por su exposición a altas temperaturas y por lo tanto no pierde su poder edulcorante. Posee una estabilidad térmica alta, con un punto de fusión entre 192-210 °C. Es altamente soluble en agua y en soluciones hidroalcohólicas. Es estable en un rango amplio de pH, 3 a 9. Por encima de pH 9 se produce una pérdida del dulzor (13).

Con respecto al rebaudiósido A, es un edulcorante natural no calórico, es 200 a 300 veces más potente que el azúcar y a elevada pureza es también conocido como rebiana uno de los principales componentes dulces de la Stevia. Asimismo, es uno de los glucósidos de esteviol más apreciado ya que se considera que tiene atributos sensoriales más favorables de los cuatro principales glucósidos, por lo que es funcional en una amplia gama de bebidas y alimentos y muy adecuado para la mezcla con otros edulcorantes no calóricos o de carbohidratos (24).

También, como un polvo seco el rebaudiósido A es estable durante al menos dos años a temperatura ambiente y en condiciones de humedad

controlada. En solución, es más estable entre los valores de pH 4-8 y notablemente menos estable por debajo de pH 2 y su estabilidad disminuye con el aumento de la temperatura (24).

Además, el rebaudiósido A es estable en distintas matrices alimentarias durante varias semanas de almacenamiento y en el caso de las bebidas carbonatadas el rebaudiósido A es estable en los rangos de pH de 4 a 6 y a temperaturas de 5°C a 25°C, hasta por 26 semanas. El rebaudiósido A resiste temperaturas más altas que el esteviosido pues el rango de temperaturas donde se encuentra el mayor contenido es de 160 °C - 210 °C y flujos de alimentación bajos de 1.4-1.6 kg/h, incluso a 220 °C aún se pueden encontrar contenidos altos de rebaudiósido A (25).

Por otro lado, la Stevia es aceptada por la Administración de Alimentos y Medicamentos – FDA de EE. UU, como aditivo alimentario inocuo desde 1997, por lo que el cultivo de Stevia es una práctica innovadora rentable, pues presenta condiciones prometedoras en los mercados nacionales e internacionales (22).

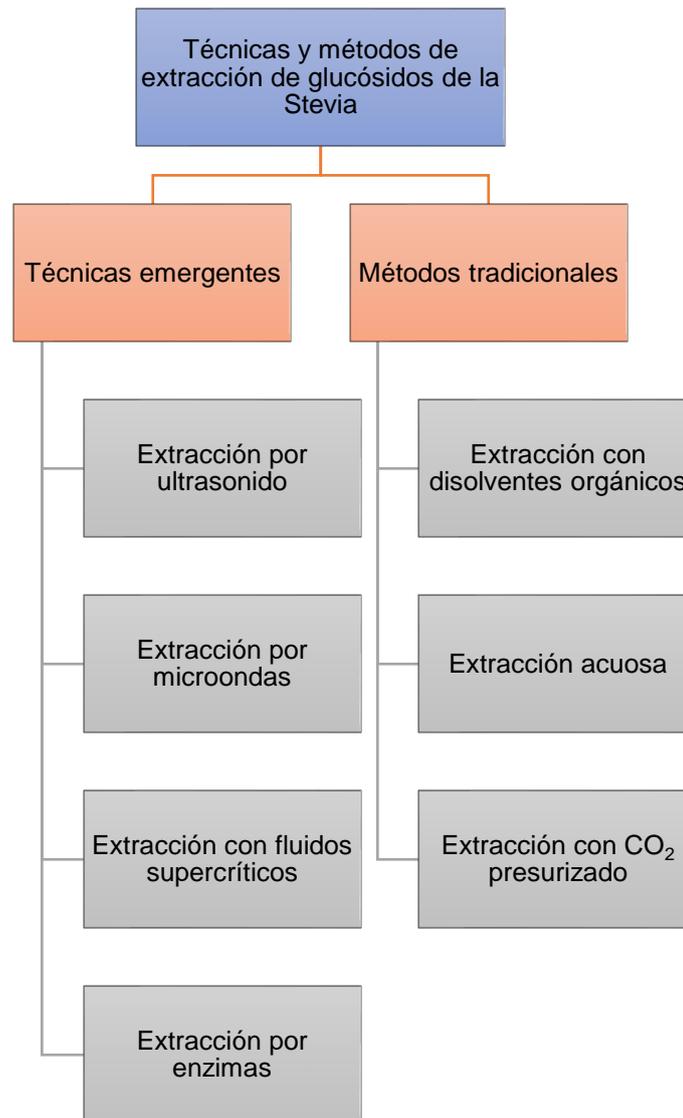
2.2.2 Métodos y técnicas de extracción de los glucósidos de la Stevia.

Respecto a la extracción de los glucósidos de la Stevia (esteviosido y rebaudiósido A), existen técnicas tradicionales como las que refiere Domínguez y Juárez, donde los compuestos dulces propios de las hojas de Stevia, se extraen con agua caliente o alcoholes realizando un tratamiento previo a las hojas con disolventes no polares, tales como cloroformo o hexano para eliminar los aceites esenciales, lípidos, clorofila y otras sustancias no polares, luego el extracto se aclara mediante precipitación con soluciones salinas o alcalinas, posteriormente se concentra y se disuelve de nuevo en metanol para la cristalización de los glucósidos. Sin embargo, actualmente existen técnicas emergentes de extracción, cuyos rendimientos son superiores comparados con los métodos tradicionales de extracción y se realizan principalmente utilizando solvente como al agua o metanol. Tal es el caso de la extracción asistida por ultrasonido que es una tecnología con potencial uso en la extracción de glucósidos de Stevia la cual produce rendimientos significativos y únicamente

requiere una buena definición de las condiciones experimentales óptimas, que permitan la mejor extracción con un gasto energético justo (26). En la figura 3 se describen las técnicas y métodos de extracción de esteviósidos, considerando a las tradicionales y emergentes.

Figura 3.

Diagrama de técnicas y métodos de extracción de esteviosido y rebaudiósido A



Nota. Adaptado de Domínguez y Juárez (2020)

Por otro lado, en la tabla 4 se presentan las ventajas y desventajas del uso de las técnicas y métodos para la extracción glucósidos de la Stevia.

Tabla 4.

Ventajas y desventajas del uso de técnicas y métodos para la extracción glucósidos de la Stevia

	Descripción	Ventajas	Desventajas
Técnicas emergentes	Extracción por ultrasonido	Altos rendimientos, fácil manejo y proceso rápido y seguro, uso moderado de solvente, calidad superior y amigable con el medio ambiente	Paso de filtración requerido y posible degradación de los analitos a alta frecuencia
	Extracción por microondas	Rápido, fácil manejo y uso moderado de solvente	Riesgo de explosión (el solvente puede absorber la energía de microondas), alto costo y paso de filtración requerido
	Extracción con fluidos supercríticos	Posee propiedades de disolvente que se parecen a las de un líquido, pero también exhibe propiedades de transporte parecidas a la de un gas, no solo puede disolver solutos, sino que también es miscible con los gases ordinarios y puede penetrar en los poros de los sólidos, rendimientos mayores, requiere menos energía, utiliza disolventes no hostiles con el medio ambiente, no es necesario filtrar y alta selectividad.	Muchos parámetros para optimizar, debido a la naturaleza del proceso, se requieren presiones elevadas para llevar a cabo la extracción, alto costo, a compresión del solvente requiere medidas elaboradas de recirculación para reducir costos energéticos y disuelven pocos compuestos no polares.
	Extracción por enzimas	Más seguro, amigable con el medio ambiente, menor consumo energético y reducción de la cantidad de solvente utilizada durante la extracción.	Bajo rendimiento, altos costos, largo periodo de incubación, costo de energía extra utilizada para los tratamientos de secado y alto costo de las enzimas.
Métodos tradicionales	Extracción con disolventes orgánicos	Sencillos de realizar, rápido, seguro y no es necesario filtrar.	Alto costo, se obtienen productos contaminados con otras sustancias, riesgo de explosión e incendio característicos de muchos disolventes orgánicos volátiles (Martínez 2003), son tóxicos al inhalarlos y al contacto con la piel y dependiendo del tiempo de exposición será la gravedad de los efectos y posible degradación de los analitos termolábiles
	Extracción acuosa	Extracción simultánea de componentes solubles en agua (proteínas y carbohidratos), seguro y amigable con el medio ambiente, económico, condiciones operacionales leves, menor costo de operación	Bajo rendimiento.
	Extracción con CO2 presurizado	Alto rendimiento, ecológicamente limpio, fácil retiro y reciclaje del solvente, bajas temperaturas de extracción, mayor coeficiente de difusión y una menor viscosidad que los líquidos	Costos de operación elevados, disuelve pocos compuestos no polares, las altas presiones dificultan la adición continua de sólidos al extracto, el uso de cosolventes puede alterar la polaridad del CO2, pero a la vez estos cosolventes pueden quedar en el extracto, requiriendo una operación de separación posterior.

Nota. Adaptado de Domínguez y Juárez (2020).

El proceso de ultrasonido. El ultrasonido es el nombre que reciben las ondas de sonido con frecuencias mayores a aquellas que pueden ser detectadas por el oído humano. El ultrasonido maneja ondas con frecuencias entre 16KHz y 20MHz, las cuales al ser aplicadas pueden llegar hasta 5MHz en gases o hasta 500MHz en líquidos y sólidos. Según el The sonochemistry Centre (2006), el ultrasonido es utilizado por la posibilidad de realizar evaluaciones no invasivas ni destructivas y por ser fuente de energía; asimismo, sus aplicaciones pueden dividirse en ultrasonido de señal y de potencia (27).

Al respecto, Mulet *et al.* refieren que el ultrasonido de señal es utilizado para monitorear un proceso o producto y son señales de ultrasonido de baja intensidad y el ultrasonido de potencia son señales de alta intensidad que se utilizan para modificar un proceso o un producto, con una frecuencia más baja o mayor potencia producen cambios físicos y químicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación, las cuales aparecen, crecen y colapsan dentro del líquido (28).

En consecuencia, una de las características del ultrasonido que tiene un efecto considerable sobre el rendimiento y la velocidad de extracción es la frecuencia. Sin embargo, estos efectos dependen de la naturaleza del material vegetal a extraer. Por su parte, un aumento en la potencia del ultrasonido genera una mayor recuperación del producto. Una explicación para este efecto es que, cuanto mayor es la amplitud de la onda de ultrasonido que se propaga en el medio más violentamente colapsan las burbujas, debido al incremento de la potencia. Por otro lado, la distribución de las ondas ultrasónicas dentro de un extractor es también un parámetro clave en el diseño del equipo, la intensidad del ultrasonido disminuye abruptamente a medida que aumenta la distancia de la superficie radiante; asimismo, la intensidad de ultrasonido es atenuada con un aumento de partículas sólidas. Para evitar ondas estacionarias o la formación de regiones con sólidos libres, normalmente se utiliza agitación (29).

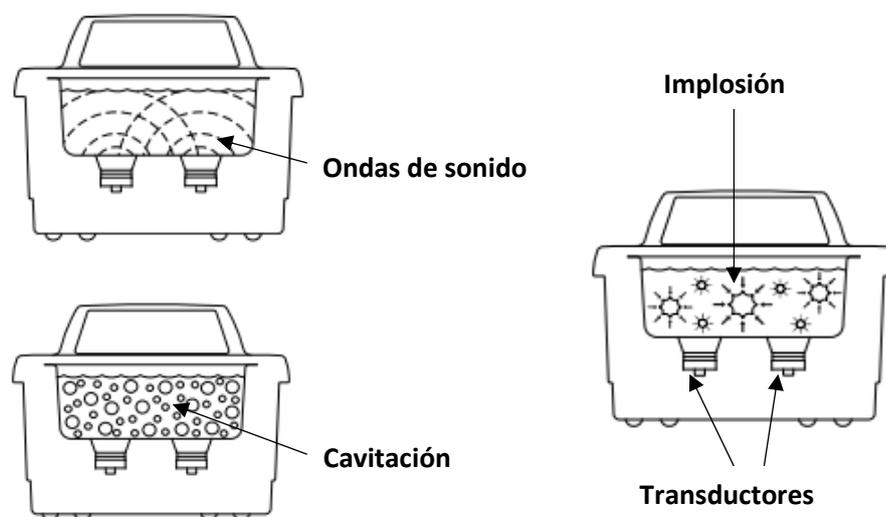
Respecto a los principios de funcionamiento del ultrasonido Lucena señala que la técnica de extracción asistida por ultrasonidos - EAU, también llamada sonoquímica, trata de compresiones y expansiones en forma de onda longitudinal a través de un medio mecánico produciéndose burbujas, llenas de vapor o gas debido

a la acción del campo ultrasonoro dentro de un líquido y cuyo tiempo de vida es del orden de un microsegundo; asimismo, a nivel molecular este fenómeno se denomina cavitación (30).

En un equipo ultrasónico, en la medida en que las ondas de sonido, provenientes de un transductor, se propagan en forma radial a través del líquido dentro del tanque, causan alternativamente presiones altas y bajas en el líquido; asimismo, durante el período de baja presión, se forman y crecen millones de burbujas microscópicas dándose origen a la cavitación o formación de cavidades, y durante el período de alta presión las burbujas se contraen y se produce una implosión, con lo cual se liberan enormes cantidades de energía. Las ondas de ultrasonido causan la ruptura mecánica de la pared celular liberando los componentes bioactivos, a su vez el calentamiento local del solvente aumenta la difusión del extracto, mejorando así la transferencia de masa a través de la interfase sólido-líquido. Los efectos mecánicos de la sonicación inducen a una mayor disolución del solvente en las paredes y membranas celulares, facilitando la liberación del contenido y mejorando la transferencia de masa (31). En la figura 4 se describe el funcionamiento del equipo ultrasónico que se utilizará en la experimentación.

Figura 4.

Principio del funcionamiento del equipo ultrasonido Branson.

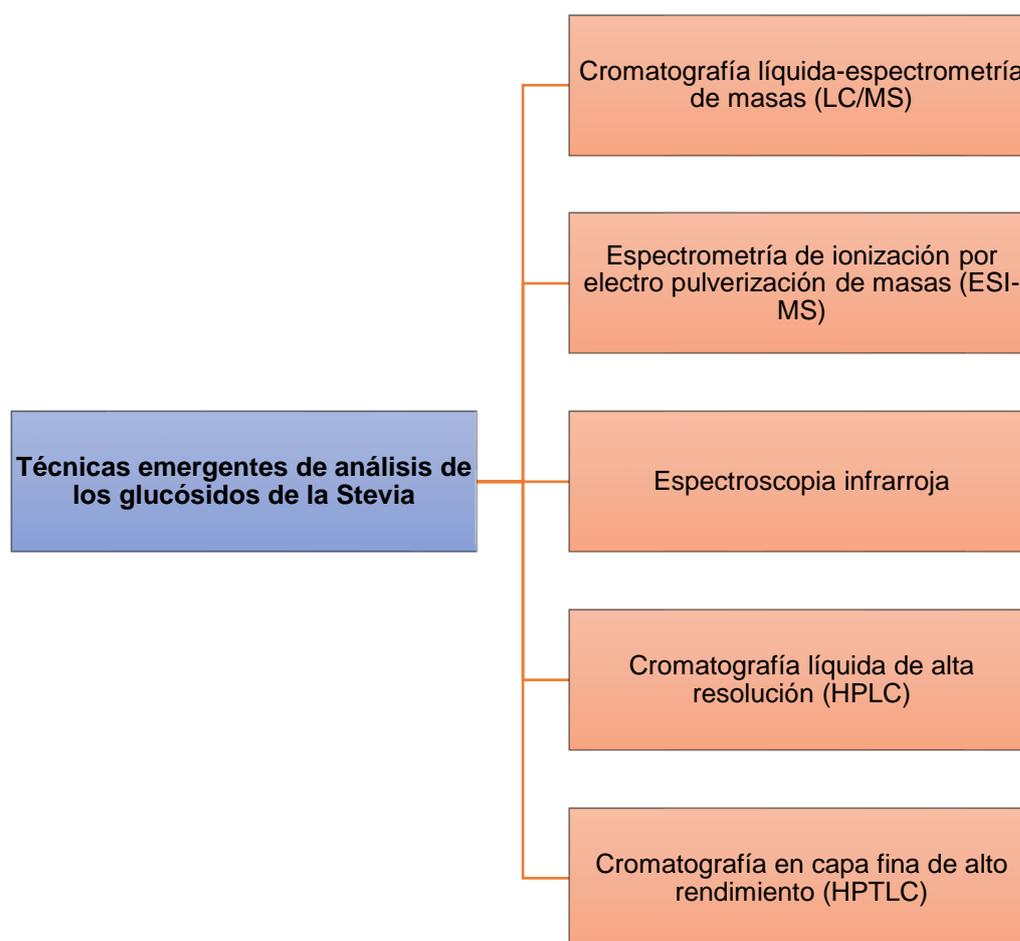


Nota. Elaborado por los autores a partir del manual Branson.

Técnicas emergentes análisis de los glucósidos de la Stevia. Actualmente existen diferentes técnicas de análisis para la determinación de glucósidos de la Stevia, sin embargo, uno de los métodos más confiables es el HPLC, ello coincide con la recomendación realizada el año 2010 por el comité de Expertos FAO/OMS en la 73ª reunión sobre Aditivos Alimenticios - JECFA (26). En la figura 5 se describen las diferentes técnicas de análisis de los glucósidos de la Stevia.

Figura 5.

Diagrama de técnicas de análisis de Stevia



Nota. Adaptado de Llacta (2014).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 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 (22). 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 (32).

Agua desionizada. En el proceso de extracción de glucósidos por ultrasonido, es imprescindible el uso del disolvente, y al ser el agua, el llamado disolvente universal, se utilizará previamente desionizada. El agua desionizada es aquella a la cual se le han quitado los cationes como los de sodio, calcio, hierro, cobre entre otros y aniones como el carbonato, fluoruro, cloruro, etc., mediante un proceso de intercambio iónico. Esto significa que al agua se le han quitado todos los iones excepto el H^+ , o más rigurosamente H_3O^+ y el OH^- , pero puede contener pequeñas cantidades de impurezas no iónicas como compuestos orgánicos (33).

Asimismo, el agua desionizada normalmente tiene una conductividad de 1,0 a 0,1 $\mu S/cm$ (es decir, una resistividad de 1,0 a 10,0 $M\Omega\text{-cm}$), y se produce mediante intercambio iónico; es considerada como un agua de alta pureza con bajo contenido en sales y muy baja conductividad. La necesidad de producción de agua con estas características para una gran cantidad de usos en la industria ha propiciado el desarrollo y avance de diferentes tecnologías de tratamiento de agua, dirigidas a la eliminación de todas las impurezas presentes en el agua (Aplebaum, 1968). Por otro lado, Ortiz menciona algunos usos del agua desionizada:

- **Industria Eléctrica:** Para la producción de energía eléctrica implica el diseño de plantas con alta disponibilidad, fiabilidad y calidad del agua producida.
- **Industria Petrolera:** Utilizada para la operación de calderas, turbinas, también es utilizada en agua para procesos.
- **Industria Farmacéutica:** Preparación de formas farmacéuticas estériles y no estériles, lavado de equipo e instrumentación.

- Investigación: Los laboratorios de investigación y desarrollo tecnológico requieren agua de muy alta calidad y pureza para eliminar variables ocultas en los resultados de los análisis (34).

2.3 Marco Conceptual

En la actualidad, para la extracción de glicósidos a partir de las hojas de Stevia (esteviosido y rebaudiósido A), existen diversas técnicas; podemos citar a la más sencilla que consiste en la inmersión de las hojas en agua caliente, pasando por los métodos industriales tradicionales de alto grado de refinado pero con elevados costos y uso de solventes e insumos químicos y por último los emergentes denominados de extracción verde, encontrándose dentro de estas la extracción asistida por la técnica de ultrasonido.

La técnica de ultrasonido es un ensayo no destructivo a través de la cual un haz sónico de alta frecuencia es introducido en el material que puede ser generalmente líquido con el objetivo de disolver, homogenizar o desgasificar. El sonido ultrasónico es el que se transmite a frecuencias que generalmente van más allá del alcance del oído humano, se encuentran comprendidas entre los 125 KHz a 20 MHz. La extracción asistida por ultrasonido utiliza ondas de alta frecuencia que alteran las propiedades físicas y químicas de la materia vegetal utilizada, con el fin de desprender el compuesto buscado de las paredes celulares. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado, el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (35). La sonicación genera formación y colapso de burbujas microscópicas que liberan grandes cantidades de energía en forma de calor, presión y esfuerzo mecánico; de esta manera se genera microturbulencia e incremento de la difusión (36).

Por otro lado, la extracción por ultrasonido es considerada una prometedora tecnología para la industria de procesamiento de alimentos. Los factores principales a tener en cuenta durante la extracción con ultrasonido son la característica de la planta (contenido de humedad y tamaño de partícula) y el disolvente empleado para la extracción. Por otra parte, hay otros factores que gobiernan la acción del ultrasonido, como son la frecuencia, presión, temperatura y tiempo de sonicación (28, 29).

2.4 Definición de términos

Aditivo Alimentario

Son sustancias químicas que son añadidos a los alimentos para conseguir características o particularidades que se han perdido a lo largo del proceso de transformación o cuando esas características no son parte del alimento tal es el caso del sabor, el color, etc. (37).

Antioxidante

Son compuestos que desarrollan una función vital en el organismo, ya que actúan como sistema de defensa en la prevención del daño oxidativo provocado por los radicales libres (38).

Biotecnología

Es toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos (39).

Componentes bioactivos

Se considera componente bioactivo de un alimento, a aquel que aporta un beneficio a la salud más allá de los considerados como nutrición básica (34).

Cromatografía

Es el nombre que se le da a un grupo de técnicas utilizadas en la determinación de la identidad de sustancias, en la separación de componentes de las mezclas y en la purificación de compuestos (40).

Disolvente

Es todo líquido que disuelve, disocia o extrae a otra sustancia que se encuentra generalmente en menor cantidad, sin provocar ningún cambio químico (41).

Edulcorante

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 (22).

Extracción

Es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla o de una fuente natural, también puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente (42).

Fitoquímica

Es la ciencia que se encarga del análisis de la composición química de las diferentes estructuras de especies vegetales (43).

Glucósidos

Son moléculas que contienen un carbohidrato unido mediante un enlace glucosídico a otra estructura distinta a carbohidrato, la cual es denominada aglicona y esta es responsable de su actividad biológica (44).

III. HIPOTESIS Y VARIABLES

3.1 Hipótesis general y específica

Hipótesis general

Mediante el ultrasonido se puede extraer 1.15 g/L de esteviosido y 3.7 g/L de rebaudiósido A, a partir de las hojas de Stevia.

Hipótesis específica

- El porcentaje de humedad de hojas de Stevia para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A mediante ultrasonido será 6%.
- Los parámetros adecuados de relación sólido -líquido, temperatura y granulometría de las hojas de Stevia para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A, serán: 60 g/L, 70 °C y 40 malla respectivamente.

3.1.1 Operacionalización de variables

En la tabla 5 se indican las definiciones conceptuales y operacionales para la variable independiente: proceso de ultrasonido y para la variable dependiente: esteviósido y rebaudiósido A, a partir de hojas de Stevia.

Tabla 5

Operacionalización de las variables

Variable	D. Conceptual	D. Operacional	Dimensión	Indicadores	Método	Técnica
Dependiente: Esteviosido y rebaudiósido A, a partir de hojas de Stevia	Glicósidos de esteviol (10).	Concentración de Esteviosido y rebaudiósido A	Concentración	Esteviosido Rebaudiósido A	Análisis químico cuantitativo a través del Método adaptado de: Kolb, N., Herrera, J., Ferreira, D. y Uliana, R. (2001)	HPLC
	Edulcorante que contiene esteviósidos y rebaudiósidos A, B, C, D y E, dulcócido A y B (15)	Edulcorante que contiene esteviósidos y rebaudiósidos A con un porcentaje de humedad promedio del 6%	Humedad	% humedad	Instrumental	Secado
Independiente: Proceso de ultrasonido	Proceso que utiliza ondas de sonido con frecuencias mayores a aquellas que pueden ser detectadas por el oído humano (27).	Parámetros del proceso de ultrasonido	Relación solido-liquido	<ul style="list-style-type: none"> • 20 g/L • 40 g/L • 60 g/L 	Analítico cuantitativo	Gravimetría y volumetría
			Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> • 50 °C • 60°C • 70°C 	Instrumental	Termometría
			Granulometría	<ul style="list-style-type: none"> • 10 malla • 20 malla • 40 malla 	Gravimetría	Tamizado

IV. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

4.1 Diseño metodológico

El presente estudio corresponde a una investigación de tipo aplicada, que según Esteban está orientada a resolver los problemas que se presentan en los procesos de producción, distribución, circulación, y consumo de bienes y servicios de cualquier actividad humana (45). El estudio por su enfoque corresponde al cuantitativo, que se caracteriza por el uso de la estadística para el análisis y presentación de los resultados y así responder al problema de investigación (46). Por el nivel de conocimiento la investigación es explicativa que está dirigido a responder por las causas de los eventos y fenómenos físicos o sociales. Se enfoca en explicar por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se manifiesta, o por qué se relacionan dos o más variables (46). Por su diseño el estudio es experimental, que hace referencia a una investigación en la que se manipulan deliberadamente una o más variables independientes (supuestas causas antecedentes) para analizar las consecuencias que tal manipulación tiene sobre una o más variables dependientes (supuestos efectos consecuentes) dentro de una situación de control para el investigador (46).

En ese orden de ideas el estudio buscó determinar a través de la experimentación las condiciones óptimas de relación entre las hojas de Stevia y agua, temperatura de operación y granulometría de las hojas para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A; asimismo, demostrando la relación existente entre estas variables para explicar el comportamiento de este fenómeno.

4.2 Método de investigación

La presente investigación consta de las siguientes etapas:

Etapa 1: Recolección de la materia prima

Etapa 2: Acondicionamiento de la materia prima (secado)

Etapa 3: Molienda de hojas de Stevia

Etapa 4: Tamizado de las hojas de Stevia molidas

Etapa 5: Disolución en agua desionizada del pulverizado de hojas de Stevia.

Etapa 6: Exposición de la mezcla a ultrasonido

Etapa 7: Filtración de la mezcla

Etapa 8: Trasvase y traslado del concentrado de cada una de las soluciones filtradas.

Etapa 9: Análisis de Glucósidos de Stevia (esteviosido y rebaudiósido A), se realizará en laboratorio externo.

Cabe precisar que se utilizó en el diseño experimental la metodología Taguchi, asimismo, en la tabla 6 se consideran los parámetros descritos.

Tabla 6

Parámetros y niveles para el diseño experimental

Parámetros	Unidad	Niveles		
		Bajo	Medio	Alto
Relación solido-liquido	g/L	20	40	60
Temperatura	°C	50	60	70
Granulometría	Malla US	10	20	40

4.3 Población y muestra

4.3.1 Población

La población que se consideró en el presente estudio serán las hojas de Stevia producidas en el Fundo Nuevo Horizonte - Tingo María en el departamento de Huánuco.

4.3.2 Muestra

Posterior a la molienda de las hojas de Stevia se tomaron muestras de 360 gramos, con las cuales se prepararon las soluciones en las concentraciones en concordancia al diseño experimental.

4.4 Lugar de estudio y periodo desarrollado

La extracción se realizó en un ambiente próximo al Fundo Nuevo Horizonte - Tingo María en el departamento de Huánuco y los análisis de cuantificación del esteviósido y rebaudiósido A se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Agraria – La Molina.

4.5 Técnicas e instrumentos para la recolección de la información

Al respecto se separaron las etapas de selección y acondicionamiento de materia prima, extracción de glucósidos de la Stevia y condiciones del análisis del

esteviósido y rebaudiósido A. El diseño experimental se realizó utilizando el método Taguchi como puede observarse en la tabla 6.

Tabla 7

Diseño experimental.

N°	Relación sólido-líquido (g/L)	Temperatura (°C)	Granulometría (Malla)
1	20	50	10
2	20	60	20
3	20	70	40
4	40	50	20
5	40	60	40
6	40	70	10
7	60	50	40
8	60	60	10
9	60	70	20

Nota. Numero de ensayos a realizar aplicando el método Taguchi.

En ese orden de ideas a continuación se presentan las etapas realizadas para la recolección de la información.

Etapas 1: Recolección de materia prima, se realizó manualmente. La materia prima usada consistió en hojas de *Stevia rebaudiana bertonii*, que fueron trasladadas desde el fundo nuevo horizonte – Tingo María – Departamento de Huánuco.

Etapas 2: Acondicionamiento de la materia prima, se secaron a la sombra por 3 días con remoción permanente, seguidamente se tomó parte de la materia prima y se completó el secado hasta 0% de humedad en una estufa de marca Cromtek a temperaturas menores a los 70° C para evitar el deterioro de los componentes.

Etapas 3: Molienda de hojas de Stevia, se procedió a realizar el molido de las hojas secas de Stevia, haciendo uso de un molino metálico marca Corona.

Etapas 4: Tamizado de las hojas de Stevia molidas. Posterior a la molienda, el producto se pasó por tamices de malla 10, 20 y 40 US, siendo las muestras de 360 gramos.

Etapa 5: Disolución en agua desionizada del pulverizado de hojas de Stevia. Se disolvió en cantidad suficiente de agua desionizada para obtener las concentraciones de 20,40 y 60 g/L.

Etapa 6: Exposición de la mezcla a ultrasonido. La mezcla fue expuesta a sonicación con una agitación constante en un equipo de ultrasonido marca Branson modelo CPX2800 de 2.8 litros de capacidad con una potencia máxima de 250 W por 1 0 min a 50, 60 y 70°C de temperatura.

Etapa 7: Filtración de la mezcla. Para la filtración (separación del material sobrenadante del líquido) se utilizó papel de filtro de celulosa con la ayuda de matraces de 250 ml, embudos, baguetas y demás material de vidrio.

Etapa 8: Trasvase y traslado del concentrado de cada una de las soluciones filtradas. Se procedió a trasvasar el concentrado de cada una de las soluciones filtradas a frascos de vidrio debidamente rotulados manteniendo la cadena de frío a través del uso de un cooler y refrigerantes adecuados.

Etapa 9: Análisis de Glucósidos de Stevia (esteviosido y rebaudiósido A). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio del Instituto de Biotecnología – Biotecnología Industrial y Bioprocesos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, que utilizara el método analítico de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) para determinar la concentración de los analíticos (esteviosido y rebaudiósido A) tal como se realizó en las pruebas preliminares (ver anexo).

4.6 Análisis y procesamiento de datos

Los datos fueron analizados mediante el software Excel y el software Minitab versión 21.1.0. a través de los cuales se pudieron visualizar la distribución de los datos mediante graficas de distribución, así como la correlación de los mismos.

4.7 Aspectos éticos en investigación

Los autores reconocen que el comportamiento ético en la investigación refuerza la integridad del estudio, resaltando su impacto positivo en la sociedad. En ese sentido, asumen la responsabilidad por la veracidad y originalidad de la presente tesis, garantizando que no se han alterado protocolos, métodos ni los resultados obtenidos durante el proceso investigativo.

V. RESULTADOS

5.1 Resultados descriptivos

A continuación, se presentan los resultados descriptivos teniendo en cuenta a las variables, dimensiones e indicadores descritos en la tabla 8.

Tabla 8

Variables, dimensiones e indicadores del estudio

Variables	Dimensiones	Indicadores
Dependiente: Esteviosido y rebaudiósido A, a partir de hojas de Stevia	Concentración	Esteviosido Rebaudiósido A
	Humedad	% humedad
Independiente: Proceso de ultrasonido	Relación solido-liquido	<ul style="list-style-type: none">• 20 g/L• 40 g/L• 60 g/L
	Temperatura	<ul style="list-style-type: none">• 50 °C• 60°C• 70°C
	Granulometría	<ul style="list-style-type: none">• 10 malla• 20 malla• 40 malla

5.1.1 Resultados de la determinación de humedad de las hojas de stevia

Tabla 9

Humedad de las hojas de stevia analizadas

Parámetro	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
% de humedad	7.2	7.0	7.1	7.1

5.1.2 Resultados descriptivos de la extracción de esteviósido y rebaudiósido A de hojas de stevia mediante ultrasonido

A continuación, en la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos según se planteó en el diseño experimental utilizando el método Taguchi.

Tabla 10*Resultados de análisis de laboratorio*

N°	Relación					
	solido- liquido (g/L)	Temperatura (°C)	Granulometría (Malla)	Esteviosido (g/L)	Rebaudiosido A (g/L)	Total (g/L)
1	20	50	10	0.266	1.881	2.148
2	20	60	20	0.322	2.076	2.398
3	20	70	40	0.261	1.737	1.998
4	40	50	20	0.544	3.530	4.074
5	40	60	40	0.588	3.602	4.190
6	40	70	10	0.533	3.680	4.212
7	60	50	40	0.788	5.123	5.911
8	60	60	10	0.727	5.034	5.761
9	60	70	20	0.916	5.961	6.876

Nota. Reportado por Instituto de Biotecnología de la Universidad Agraria la Molina.

Análisis descriptivo de la variable respuesta (esteviosido) Vs. relación solido-liquido; temperatura y granulometría

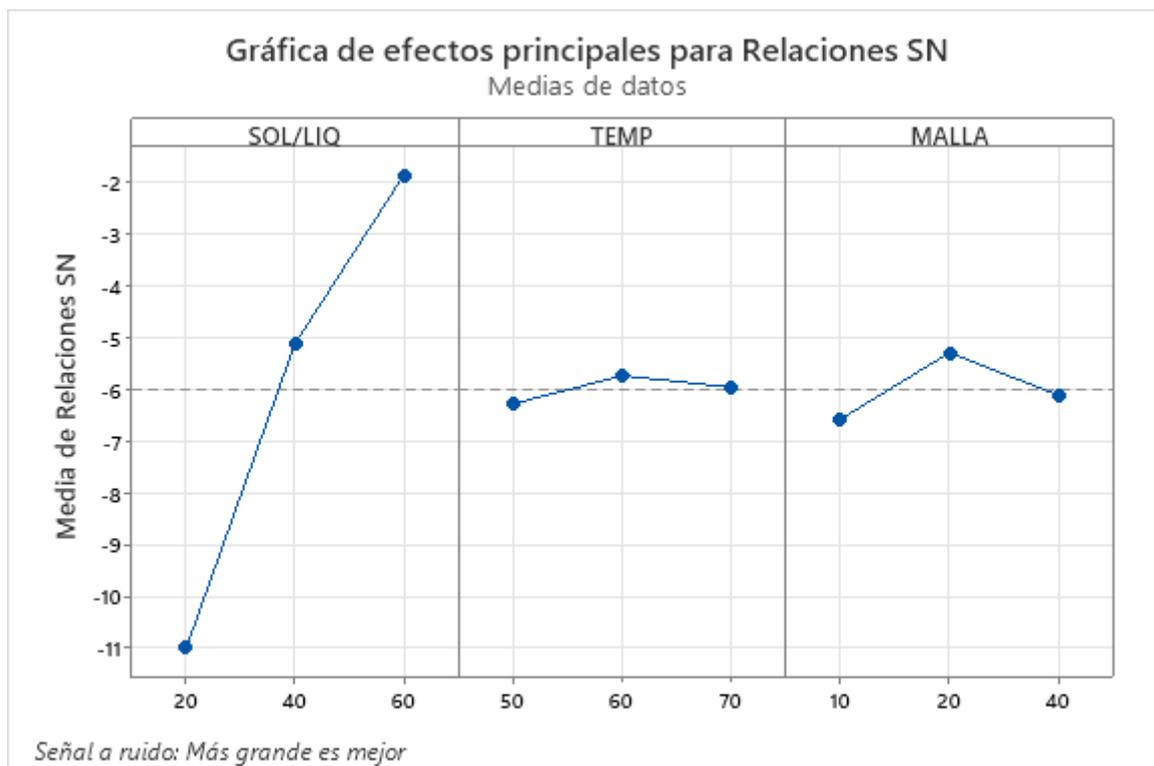
Tabla 11*Efectos principales para señales a ruido (SN) del esteviosido*

Nivel	SOL/LIQ	TEMP	MALLA
1	-11.004	-6.287	-6.579
2	-5.122	-5.742	-5.298
3	-1.867	-5.965	-6.116
Delta	9.137	0.545	1.281
Clasificar	1	3	2

Nota. Valores reportados en Minitab para SN: más grande es mejor.

Figura 6

Efectos principales para relaciones SN del esteviósido



Nota. Valores reportados en Minitab para SN: más grande es mejor.

En la tabla 11 y figura 6 se verifica que los valores de relación SOL/LIQ = 60 g/L maximizan la obtención de elevadas concentraciones de esteviósido, seguidamente realiza lo mismo la granulometría (20 mallas) y finalmente la temperatura (60 °C).

Tabla 12

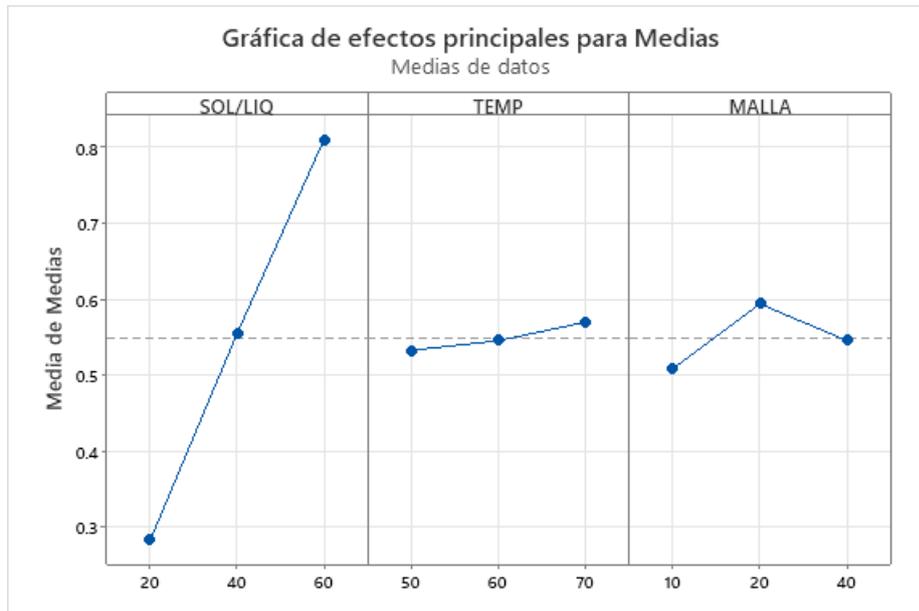
Efectos principales para medias del esteviósido

Nivel	SOL/LIQ	TEMP	MALLA
1	0.2830	0.5327	0.5087
2	0.5550	0.5457	0.5940
3	0.8103	0.5700	0.5457
Delta	0.5273	0.0373	0.0853
Clasificar	1	3	2

Nota. Valores reportados en Minitab para el ítem máximo (más grande es mejor)

Figura 7

Efectos principales para medias del esteviósido

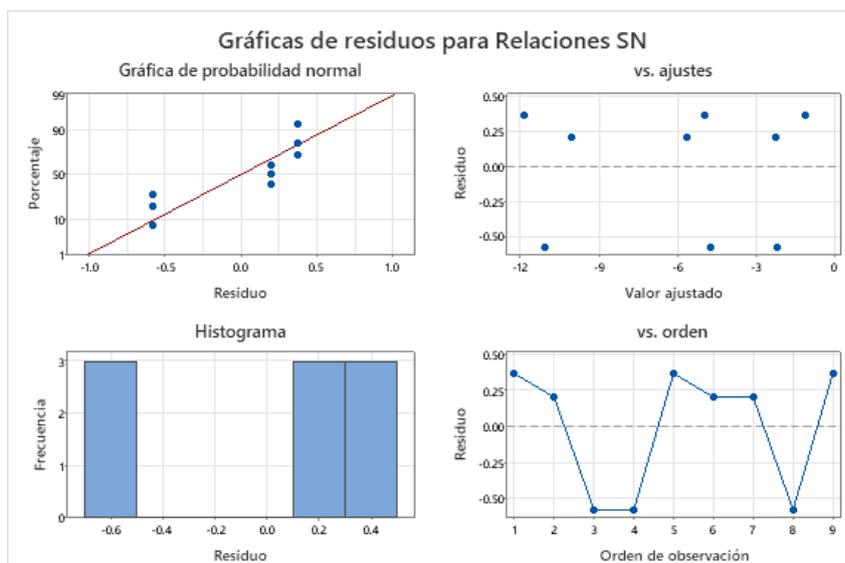


Nota. Valores reportados en Minitab para SN: más grande es mejor.

En la tabla 12 y figura 7 se verifica que los valores de relación SOL/LIQ = 60 g/l maximizan la obtención de elevadas concentraciones de esteviósido, seguidamente realiza lo mismo la granulometría (20 mallas) y finalmente la temperatura (70 °C).

Figura 8

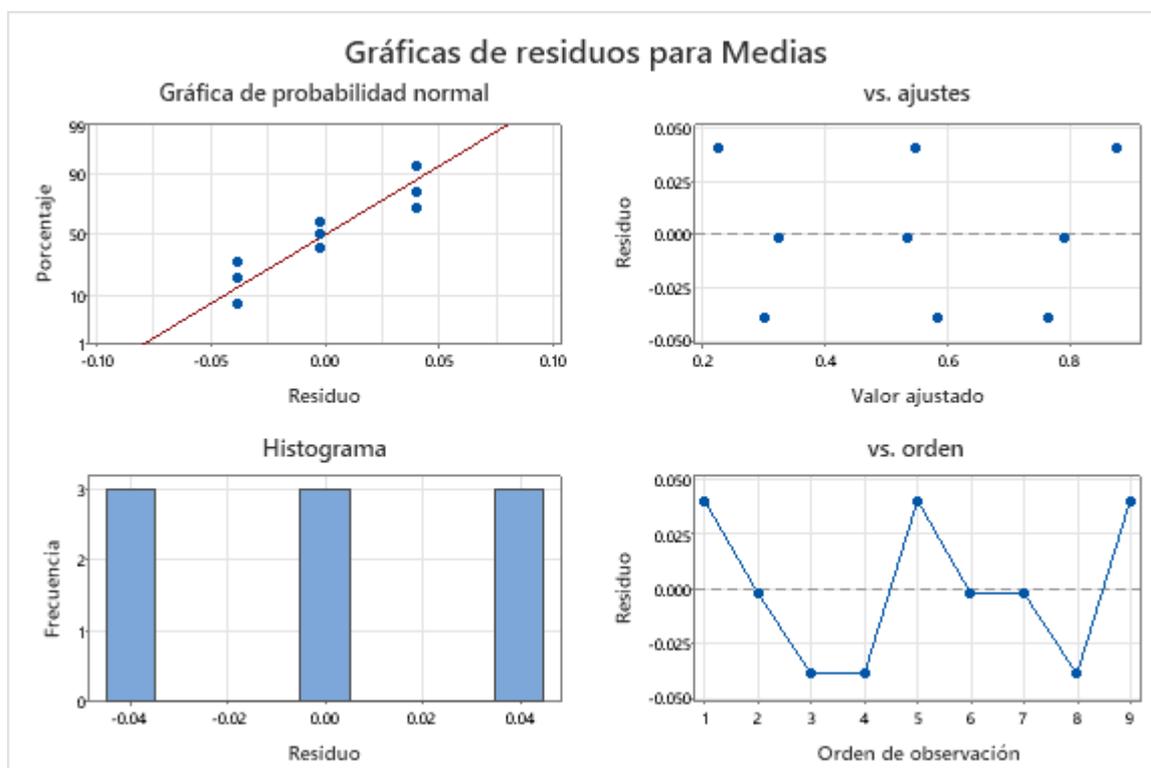
Distribución de residuos para relaciones SN del esteviósido



Nota. Valores reportados en Minitab para SN: más grande es mejor.

Figura 9

Distribución de residuos para medias de los valores obtenidos del esteviósido



Nota. Valores reportados en Minitab para SN: más grande es mejor.

Análisis descriptivo de la variable respuesta (rebaudiósido A) Vs. relación solido-liquido; temperatura y granulometría

Tabla 13

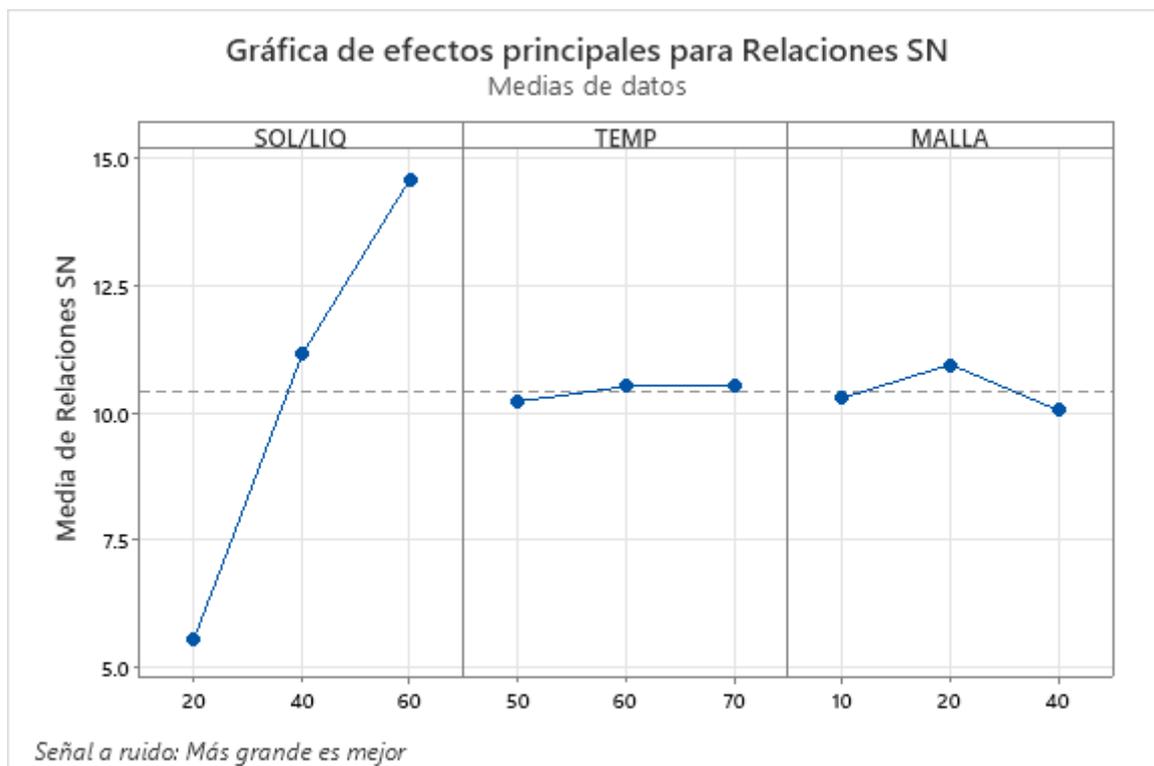
Efectos principales para señales a ruido del rebaudiósido A

Nivel	SOL/LIQ	TEMP	MALLA
1	5.543	10.211	10.281
2	11.134	10.505	10.935
3	14.578	10.540	10.039
Delta	9.036	0.329	0.896
Clasificar	1	3	2

Nota. Valores reportados en Minitab para el ítem máximo (más grande es mejor)

Figura 10

Efectos principales para relaciones señales a ruido del rebaudiósido A



Nota. Valores reportados en Minitab para SN: más grande es mejor.

En la tabla 13 y figura 10 se verifica que los valores que maximizan la obtención de elevadas concentraciones de rebaudiósido A es la relación solido-liquido (SOL/LIQ = 60 g/l) seguido de la granulometría (20 mallas) y finalmente la temperatura (60 a 70 °C).

Tabla 14

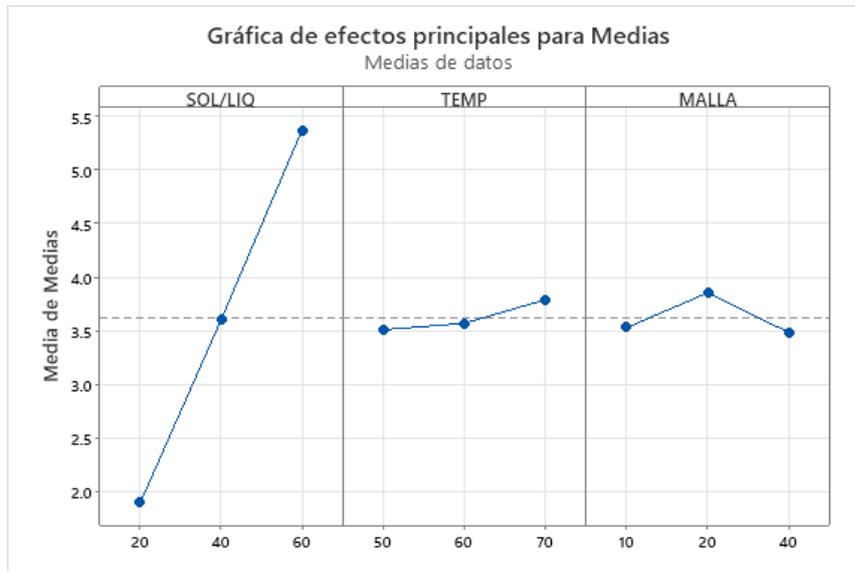
Efectos principales para medias del rebaudiósido A

Nivel	SOL/LIQ	TEMP	MALLA
1	1.898	3.511	3.532
2	3.604	3.571	3.856
3	5.373	3.793	3.487
Delta	3.475	0.281	0.368
Clasificar	1	3	2

Nota. Valores reportados en Minitab para SN: más grande es mejor.

Figura 11

Efectos principales para medias en la extracción del rebaudiósido A

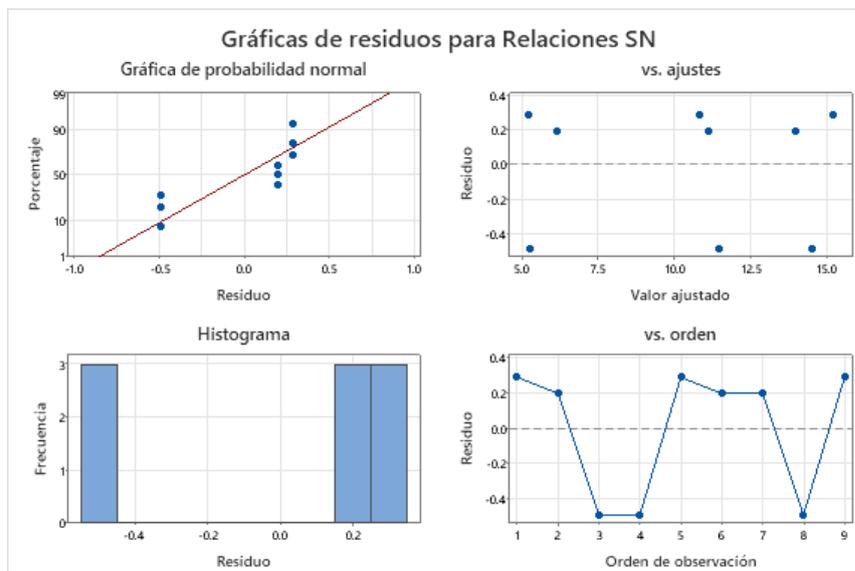


Nota. Valores reportados en Minitab para SN: más grande es mejor.

En la tabla 13 y figura 11 se verifica que la relación solido-liquido (60 g/l) provoca una mayor variación sobre la concentración del rebaudiósido A, seguidamente de la granulometría (20 mallas) y finalmente la temperatura (70 °C). Vale precisar que se debería controlar el parámetro solido-líquido para obtener mayores concentraciones de rebaudiósido A.

Figura 12

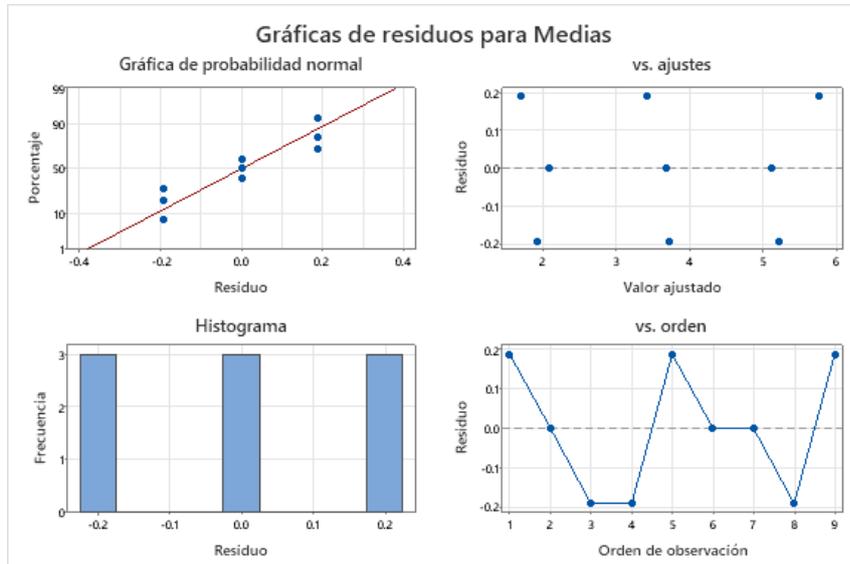
Distribución de residuos para relaciones SN del rebaudiósido



Nota. Valores reportados en Minitab para SN: más grande es mejor.

Figura 13

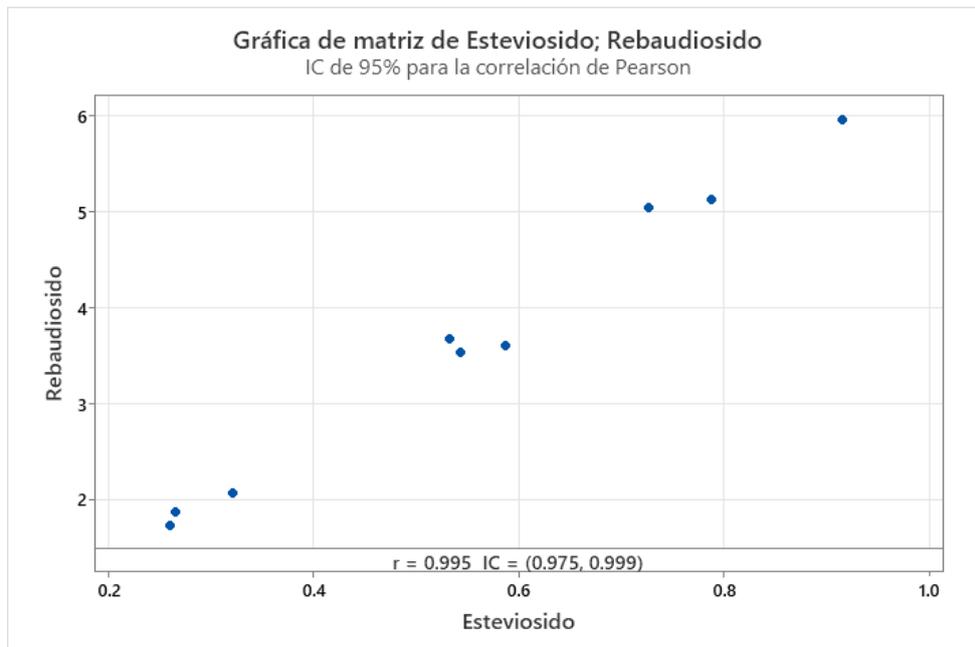
Distribución de residuos para medias de los valores obtenidos del rebaudiósido



Análisis descriptivo de la correlación entre las variables respuestas (esteviósido Vs. rebaudiósido A)

Figura 14

Matriz de esteviósido - rebaudiósido



En la figura 13 se verifica que existe un alto grado de correlación ($r = 0.975$) entre componentes esteviósido y rebaudiósido A.

5.2 Resultados inferenciales

Análisis de modelo lineal: Relaciones SN vs. SOL/LIQ; TEMP; MALLA para el esteviósido

Tabla 15

Coefficientes de modelos estimados para Relaciones SN

Término	Coef	EE del coef.	T	P
Constante	-5.9977	0.2926	-20.500	0.002
SOL/LIQ 20	-5.0065	0.4138	-12.100	0.007
SOL/LIQ 40	0.8757	0.4138	2.116	0.169
TEMP 50	-0.2889	0.4138	-0.698	0.557
TEMP 60	0.2561	0.4138	0.619	0.599
MALLA 10	-0.5814	0.4138	-1.405	0.295
MALLA 20	0.7000	0.4138	1.692	0.233

Se verifica que la relación sólido -líquido (SOL/LIQ 20) presenta un valor de $p = 0.007$ que es menor al valor de significancia $\alpha = 0.05$; es decir la relación SOL/LIQ 20 resulta ser significativa

Tabla 16

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)
0.8777	98.84%	95.37%

Tabla 17

Análisis de Varianza de Relaciones SN

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
SOL/LIQ	2	128.683	128.683	64.3416	83.52	0.012
TEMP	2	0.450	0.450	0.2252	0.29	0.774
MALLA	2	2.526	2.526	1.2631	1.64	0.379
Error residual	2	1.541	1.541	0.7704		
Total	8	133.201				

Se verifica que la relación sólido -líquido (SOL/LIQ) presenta un valor de $p = 0.012$ que es menor al valor de significancia $\alpha = 0.05$; es decir la relación SOL/LIQ resulta ser significativa. En otros términos, los factores de TEMP y MALLA no son

significativos, pero si lo es la relación SOL/LIQ. En ese sentido, se debería considerar rangos mayores a los valores asignados a las variables TEMP y MALLA.

Análisis de modelo lineal: Medias vs. SOL/LIQ; TEMP; MALLA para el esteviósido

Tabla 18

Coefficientes de modelos estimados para Medias

Término	Coef	EE del coef.	T	P
Constante	0.549444	0.02292	23.974	0.002
SOL/LIQ 20	-0.266444	0.03241	-8.221	0.014
SOL/LIQ 40	0.005556	0.03241	0.171	0.880
TEMP 50	-0.016778	0.03241	-0.518	0.656
TEMP 60	-0.003778	0.03241	-0.117	0.918
MALLA 10	-0.040778	0.03241	-1.258	0.335
MALLA 20	0.044556	0.03241	1.375	0.303

Se verifica que la relación solido -liquido (SOL/LIQ 20) presenta un valor de $p = 0.014$ que es menor al valor de significancia $\alpha = 0.05$; es decir la relación SOL/LIQ 20 resulta ser significativa

Tabla 19

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)
0.0688	97.85%	91.40%

Tabla 20

Análisis de Varianza de Medias

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
SOL/LIQ	2	0.417260	0.417260	0.208630	44.13	0.022
TEMP	2	0.002155	0.002155	0.001077	0.23	0.814
MALLA	2	0.010987	0.010987	0.005493	1.16	0.463
Error residual	2	0.009455	0.009455	0.004727		
Total	8	0.439856				

Se verifica que la relación solido -liquido (SOL/LIQ) presenta un valor de $p = 0.022$ que es menor al valor de significancia $\alpha = 0.05$; es decir la relación SOL/LIQ

resulta ser significativa. En otros términos, los factores de TEMP y MALLA no son significativos, pero si lo es la relación SOL/LIQ.

Análisis de modelo lineal: Relaciones SN vs. SOL/LIQ; TEMP; MALLA para el rebaudiósido A

Tabla 21

Coefficientes de modelos estimados para Relaciones SN

Término	Coef	EE del coef.	T	P
Constante	10.4185	0.2457	42.401	0.001
SOL/LIQ 20	-4.8758	0.3475	-14.031	0.005
SOL/LIQ 40	0.7159	0.3475	2.060	0.176
TEMP 50	-0.2073	0.3475	-0.596	0.611
TEMP 60	0.0860	0.3475	0.248	0.828
MALLA 10	-0.1375	0.3475	-0.396	0.730
MALLA 20	0.5169	0.3475	1.488	0.275

Se verifica que la relación sólido -líquido (SOL/LIQ 20) presenta un valor de $p = 0.005$ que es menor al valor de significancia $\alpha = 0.05$; es decir la relación SOL/LIQ 20 resulta ser significativa

Tabla 22

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)
0.7371	99.15%	96.59%

Tabla 23

Análisis de Varianza de Relaciones SN

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
SOL/LIQ	2	124.770	124.770	62.3848	114.81	0.009
TEMP	2	0.195	0.195	0.0976	0.18	0.848
MALLA	2	1.290	1.290	0.6451	1.19	0.457
Error residual	2	1.087	1.087	0.5434		
Total	8	127.342				

Se verifica que la relación solido - liquido (SOL/LIQ) presenta un valor de $p = 0.009$ que es menor al valor de significancia $\alpha = 0.05$; es decir la relación SOL/LIQ resulta ser significativa

Análisis de modelo lineal: Medias vs. SOL/LIQ; TEMP; MALLA para el rebaudiósido A

Tabla 24

Coefficientes de modelos estimados para Medias

Término	Coef	EE del coef.	T	P
Constante	3.62489	0.1100	32.957	0.001
SOL/LIQ 20	-1.72689	0.1555	-11.102	0.008
SOL/LIQ 40	-0.02089	0.1555	-0.134	0.905
TEMP 50	-0.11356	0.1555	-0.730	0.541
TEMP 60	-0.05422	0.1555	-0.349	0.761
MALLA 10	-0.09322	0.1555	-0.599	0.610
MALLA 20	0.23078	0.1555	1.484	0.276

Se verifica que la relación solido -liquido (SOL/LIQ 20) presenta un valor de $p = 0.008$ que es menor al valor de significancia $\alpha = 0.05$; es decir la relación SOL/LIQ 20 resulta ser significativa

Tabla 25

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)
0.3300	98.84%	95.34%

Tabla 26*Análisis de Varianza de Medias*

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
SOL/LIQ	2	18.1119	18.1119	9.05596	83.18	0.012
TEMP	2	0.1320	0.1320	0.06598	0.61	0.623
MALLA	2	0.2426	0.2426	0.12131	1.11	0.473
Error residual	2	0.2178	0.2178	0.10888		
Total	8	18.7042				

Se verifica que la relación solido -liquido (SOL/LIQ) presenta un valor de $p = 0.012$ que es menor al valor de significancia $\alpha = 0.05$; es decir la relación SOL/LIQ resulta ser significativa.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados.

Respecto a la hipótesis específica 1, en la cual se planteó que el porcentaje de humedad de hojas de Stevia para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A mediante ultrasonido sería 6%, se tiene que la humedad promedio de las hojas de Stevia provenientes del Fundo Nuevo Horizonte - Tingo María en el departamento de Huánuco fue 7.1%

En otra parte, respecto a la hipótesis específica 2, en la cual planteó que los parámetros adecuados de relación sólido -líquido, temperatura y granulometría de las hojas de Stevia para la extracción de esteviósido y rebaudiósido A, serían: 60 g/L, 70 °C y 40 malla respectivamente, se tiene de los resultados que la relación solido-liquido (SOL/LIQ = 60 g/l) maximiza la obtención de elevadas concentraciones de esteviósido y rebaudiósido A; asimismo, valores de temperatura en el rango de 60 a 70 ° C y malla en el intervalo de 10 a 20 resultan ser significativos en la obtención de dichos glucósidos; sin embargo resulta necesario realizar experimentos en los parámetros temperatura y malla para determinar sus valores que optimicen la extracción.

Finalmente, respecto a la hipótesis general para la contrastación se utilizó la prueba estadística ANOVA de un solo factor, para lo cual se tiene:

Ho: Mediante el ultrasonido no puede extraer 1.15 g/L de esteviosido y 3.7 g/L de rebaudiósido A, a partir de las hojas de Stevia.

Ha: Mediante el ultrasonido se puede extraer 1.15 g/L de esteviosido y 3.7 g/L de rebaudiósido A, a partir de las hojas de Stevia.

Nivel de confianza: 95%

Nivel de significancia, $\alpha = 0.05$, (5%)

Regla de decisión:

Si $p \geq \alpha$ se acepta **Ho**

Si $p < \alpha$ se rechaza **Ho**

Tabla 27*Análisis de varianza*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	42.56	42.563	35.57	0.000
Error	16	19.14	1.197		
Total	17	61.71			

De los resultados de la prueba para muestras relacionadas, se observa el valor p (nivel de significancia) es igual a 0.000 y es menor de 0.05; por tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna, por lo que se concluye que mediante el ultrasonido se puede extraer 1.15 g/L de esteviosido y 3.7 g/L de rebaudiósido A, a partir de las hojas de Stevia.

6.2 Contratación de los resultados con otros estudios similares.

El porcentaje de humedad promedio de las hojas de Stevia provenientes de la zona de estudio fue 7.1%, pudiendo ser este valor influenciado debido a factores propios de la zona como: condiciones climáticas (temperatura y presencia de vapor de agua ambiental, etc.), características y naturaleza del suelo, entre otros. En concordancia con este hallazgo, Lima et al. (2021) en su estudio determinaron que el uso de ultrasonido es interesante para lotes con una concentración más baja de esteviol a extraer, demostraron la pertinencia en la aplicación de ultrasonidos para obtener una extracción verde de glucósidos de esteviol más eficiente, sin embargo, los resultados dependen mucho de la composición de las hojas de Stevia.

Asimismo, del análisis de los resultados se obtuvo que los valores de relación sólido-líquido de 60 g/L, la granulometría próxima a 20 mallas y la temperatura en el rango de 60 a 70 °C maximizan la obtención de elevadas concentraciones de esteviósido y rebaudiósido A, considerando la extracción con el equipo ultrasónico Branson a una potencia de 250 W. Este aspecto se acentúa aún más con el análisis realizado por Liu et al. (2010) quienes estudiaron e indicaron las condiciones óptimas de extracción de carbohidratos de Stevia asistida por ultrasonido y concluyeron que la extracción óptima fue a una temperatura de funcionamiento de 68 °C, una potencia sónica de 60 W y un tiempo de extracción de 32 min. Asimismo, usando la extracción

asistida por ultrasonido el rendimiento de los extractos aumentó en un factor de 1,5 a la temperatura de extracción más baja (68 °C) y el tiempo de extracción (32 min) se acortó sustancialmente en comparación con el de la extracción clásica.

En otra parte, la relación solido-liquido provoca una mayor variación sobre las concentraciones del esteviósido y rebaudiósido, seguidamente de la granulometría y finalmente la temperatura. Por tanto, se debe controlar adecuadamente este parámetro para obtener mayor extracción de dichos glucósidos de la Stevia. Al respecto en su estudio Zlabur et al. concluyeron que la extracción asistida por ultrasonido de ingredientes funcionales de las hojas de Stevia dio como resultado mayores rendimientos de extracción de glucósidos de esteviol en comparación con los métodos convencionales, además, la extracción asistida por ultrasonido acortó el tiempo de extracción de los glucósidos de esteviol.

Vale precisar que según los hallazgos, resulta necesario realizar experimentos en los parámetros temperatura y malla para determinar sus valores que optimicen la extracción; así también considerar variaciones de tiempo de extracción (en este estudio se consideró un tiempo de extracción constante de 10 min), toda vez que según un estudio realizado por Mehmet et al. (2020) sobre los efectos de las variables del proceso encontraron altos contenidos de glicósidos de esteviol, fenólicos y flavonoides, a un tiempo de 43 min. de extracción asistida por ultrasonido.

6.3 Responsabilidad ética de acuerdo con los reglamentos vigentes

La presente investigación consideró los aspectos éticos descritos en el código de ética de investigación de la Universidad Nacional del Callao, aprobado por Resolución N° 260-2019-CU (47). Así también, se respetaron los derechos de autor, dando crédito a través de las citas y referencias bibliográficas.

VII. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos de la caracterización de las hojas de Stevia provenientes del Fundo Nuevo Horizonte - Tingo María en el departamento de Huánuco y los análisis de cuantificación de estevósido y rebaudiósido A, realizados en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Agraria – La Molina, se puede concluir que:

- Se logró extraer estevósidos de hojas de Stevia (Stevia Rebaudiana Bertoni) aplicando la técnica de ultrasonido, encontrándose que, con una relación sólido-líquido de 60 g/L, 70°C de temperatura y 20 mallas se obtiene 0.916 g/L de estevósido y 5.961 g/L de rebaudiósido A; asimismo, las características del equipo utilizado fueron: dispositivo de ultrasonido marca Branson modelo CPX2800 de 2.8 L de capacidad y potencia 250 Watts.
- Se determinó el porcentaje de humedad de las hojas de Stevia provenientes del Fundo Nuevo Horizonte - Tingo María en el departamento de Huánuco para la extracción de estevósido y rebaudiósido A de hojas de stevia mediante ultrasonido, encontrándose que las mismas presentan un porcentaje de humedad promedio de 7.1%.
- Se determinó que el parámetro adecuado de relación sólido-líquido que optimiza la extracción de estevósido y rebaudiósido A es 60 g/L, temperatura de operación del ultrasonido se encontró en el rango de 60 a 70 °C y granulometría de las hojas de Stevia debe ser próxima a la malla 20.

VIII. RECOMENDACIONES

- Que, se realice la extracción de esteviosidos y rebaudiósido A de las hojas de stevia mediante ultrasonido, considerando los parámetros no considerados como tiempo de operación y potencia de equipo ultrasónico.
- Que, los resultados de la tesis, se repliquen a los diversos productores de hojas de stevia y los mismos consideren la extracción de glucósidos como una alternativa eco amigable.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OLIVEIRA, D., ANGONESE, M., GOMES, C., Y FERREIRA, R. (2016). Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. *The Journal of Supercritical Fluids*, 111, 55-62. Recuperado el 10 de octubre de 2021
2. ZLABUR, J., VOCA, S., DOBRICEVIC, N., BRNCIC, M., DUJMIC, F., Y BRNCIC, R. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *International Agrophysics*, 29(02), 231-237. Recuperado el 10 de octubre de 2021
3. BARRERA, F. (2015). Métodos alternativos para la extracción y purificación de productos naturales de interés para la industria farmacéutica. Recuperado el 10 de octubre de 2021, de <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/2555/Tesis%20Fernanda%20Barrera%20Vazquez.pdf>
4. KOUBAA, M., ROSELLÓ-SOTO, E., ZLABUR, J., JAMBRAK, A., BRNCIC, M., GRIMI, N., Y BARBA, F. (2015). Current and new insights in the sustainable and green recovery of nutritionally valuable compounds from *Stevia Rebaudiana* Bertoni. *Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 6835-6846. Recuperado el 10 de octubre de 2021
5. GALARZA, N. (2011). Obtención de un extracto concentrado de tevia (*Stevia Rebaudiana* Bertoni). Huancayo.
6. DIAZ, Z. (2012). Estudio Experimental para la determinación del rendimiento de esteviosido en las hojas de *Stevia Rebaudiana* Bertoni en el caserío Ricardo Palma. Ucayali
7. LIMA, M., BAILLON, F., ESPITALIER, F., HASTOY, C., Y BOUTIÉ, P. (2021). Ultrasound-assisted Extraction Process of Glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves. *Chemical Engineering Transactions*, 1459-1464.

8. YEN, N., Y QUOC, L. (2021). Chemical composition of dried Stevia Rebaudiana Bertoni leaves and effect of ultrasound-assisted extraction on total steviosides content in extract. *Sciendo*, 1-7.
9. SAW, C., BIN, M., Y BINTI, N. (2020). Separation of steviol glycosides from Stevia Rebaudiana using different aqueous extraction techniques. *Borneo international Journal of Biotechnology*, 77-87.
10. MEHMET, F., GÖRGÜÇ, A., UYGUN, Ö., Y BIRCAN, C. (2020). Steviol glycosides and polyphenols extraction from Stevia Rebaudiana Bertoni leaves using maceration, microwave, and ultrasound-assisted techniques. *Separation Science and Technology*.
11. LIU, J., LI, J.-W., Y TANG, J. (2010). Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from Stevia Rebaudiana Bertoni and identification of extracts. *Food and Bioproduct Processing*, 215-221.
12. RIOS, C., ROSAS, M., LOPEZ, V., CABRERA, H., RIOS, C., Y RODRIGUEZ L. (2015). Extracción de estevioso y rebaudiosido A por métodos no convencionales. XXVII Reunión Científica Tecnológica, Forestal y Agropecuaria Tabasco.
13. DIAZ, Z. (2014). Determinación del método óptimo de extracción de estevioso y rebaudiosido de las hojas de Stevia (*Stevia Rebaudiana bertoni*) a nivel piloto en el laboratorio de Operaciones y procesos Unitarios de la Universidad Nacional del Callao. Callao.
14. GONZALES, C (2010): Extracción de estevioso por columnas de intercambio iónico a partir de hojas de Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*).
15. DACIW, M. G. (2002). Stevia rebaudiana UNQ. Buenos Aires: Serie digital ciencia y tecnología, Universidad Nacional de Quilmes.
16. ZAÑÓN, A. C. (2000). Yerba Dulce, informe agronómico sobre el cultivo de Stevia Rebaudiana. Medellín: Secretaría de Agricultura de Antioquia.

17. GOYAL, K., Y SAMSHER, A. (2009). Stevia (Stevia rebaudiana) a biosweetener. A review. *International journal of sciences and nutrition*, 61:1-10.
18. RODRIGUEZ, P. (1998). Yerba dulce (Estevia Rebaudiana B). Argentina.
19. CRAMER, B., Y IKAN, R. (1987). Progress in the chemistry and properties of rebaudiosides. Elsevier, 45.
20. CHATURVEDULA, S., Y UPRETI, M. (2011). Diterpene glycosides from Stevia rebaudiana. *Molecules*, 3552-3562.
21. LEMUS, R., VEGA, A., ZURA, L., & AH-HEN, K. (2012). Stevia Rebaudiana Bertoni. A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects, 21-28.
22. LLACTA, M. (2014). Extracción de edulcorante a partir de la hoja de Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni). Acobamba - Huancavelica - Perú: Universidad Nacional de Huancavelica. Recuperado el 10 de octubre de 2021, de <http://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/108/TP%20%20UNH%20AGROIND%20%200023.pdf>
23. TUCKER, A., Y DEBAGGIO, T. (2009). The encyclopedia of herbs. Londres, Inglaterra: Timber press.
24. GALICIA, L. (2017). Análisis de efectos en la cristalización del Glucósido de Esteviol (Rebaudiosido A) para la maximización del tamaño D (2,1) y masa formada como sustituto edulcorante de la sacarosa. Recuperado el 10 de octubre de 2021, de http://repositorios.orizaba.tecnm.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/259/2017_Tesis_Lorena_Stephanie_Galicia_Contreras.pdf
25. CHAPARRO, I. (2017). Cuantificación del esteviosido y rebaudiosido A después del secado por aspersión de extracto acuoso de Stevia rebaudiana. Recuperado el 10 de octubre de 2021, de Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo:

http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx/jspui/bitstream/LITER_CIIDIROAX/299/1/Chaparro%20Hdz.%2C%20I..pdf

26. DOMÍNGUEZ, C., Y JUAREZ, P. (2020). Cuantificación de esteviosido y rebaudiosido A en Stevia Rebaudiana cultivada en sustratos orgánicos. Recuperado el 10 de octubre de 2021, de Universidad Autonoma del Estado de Morelos: <http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/1150/DOBCNH03T.pdf>
27. DELGADO, J. (2011). Aplicación del ultrasonido en la industria de los alimentos. Bogotá, Colombia.
28. MULET, A., BENEDITO, J., BON, J., Y SAN JUAN, N. (1999). Ultrasonidos de baja intensidad en tecnología de alimentos. Food Science and Technology International, 285-297.
29. BARRERA, F. (2015). Métodos alternativos para la extracción y purificación de productos naturales de interés para la industria farmacéutica. Recuperado el 10 de octubre de 2021, de <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/2555/Tesis%20Fernanda%20Barrera%20Vazquez.pdf>
30. LUCENA, N. (2019). Extracción de productos naturales asistida por ultrasonidos. Jaén: Universidad de Jaén. Química Inorgánica y Orgánica. Recuperado el 10 de octubre de 2021, de <http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/10191/1/TFG%20Noelia%20Lucena%20MuNoz.pdf>
31. ROJAS, T., FUENTES CAMPOS, M. E., CONTRERAS LOPEZ, E., GÓMEZ, S., Y MUÑOZ JÁUREGUI, A. (2019). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (*Corryocactus brevisstylus*).

32. TOLEDO, F. (2011). Informe sobre la utilización de Cromatografía de Alta Eficacia (HPLC) en el estudio de los Polisacáridos Mucilaginosos de Aloe vera (AVMP). Las Palmas de Gran Canaria.
33. AGUILAR, D (2011). Evaluación del proceso de producción de agua desmineralizada en un complejo mejorador de crudo extrapesado.
34. ORTIZ, V. (2018). Estrés oxidativo en ratas obesas mantenidas con cáscara o pulpa de variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) en la dieta. Recuperado el 11 de octubre de 2021, de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3764/ortiz-rojas-viviana-judit.pdf>
35. GAO, M., Y LIU, C. (2005). Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology y Biotechnology*, 1461-1463.
36. SHIRSATH, S. R., SONAWANE, S. H., Y GOGATE, P. R. (2012). Chemical Engineering and Processing: process Intensification Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations. A review of current status, 10-23.
37. COAQUIRA, F. Y. (2018). Determinación de la concentración del colorante tartrazina (E-102) en papillas procesadas para bebés expandidas en la ciudad de Arequipa–2017.
38. ESTÉVEZ, R (2016). Antioxidantes alimentarios: mecanismos de oxidación electroquímica, medida electroquímica de capacidad antioxidante y composición en tés, infusiones y especias.
39. BISANG (2009). Biotecnología y desarrollo
40. PÁSSARO, C., RIVERA, C., ROMÁN, M., CARDONA, L., GOMÉZ, D., QUICENO, J., Y ROJAS, L. (2016). Guía sobre principios Básicos de cromatografía y sus aplicaciones. Rionegro-Antioquia.

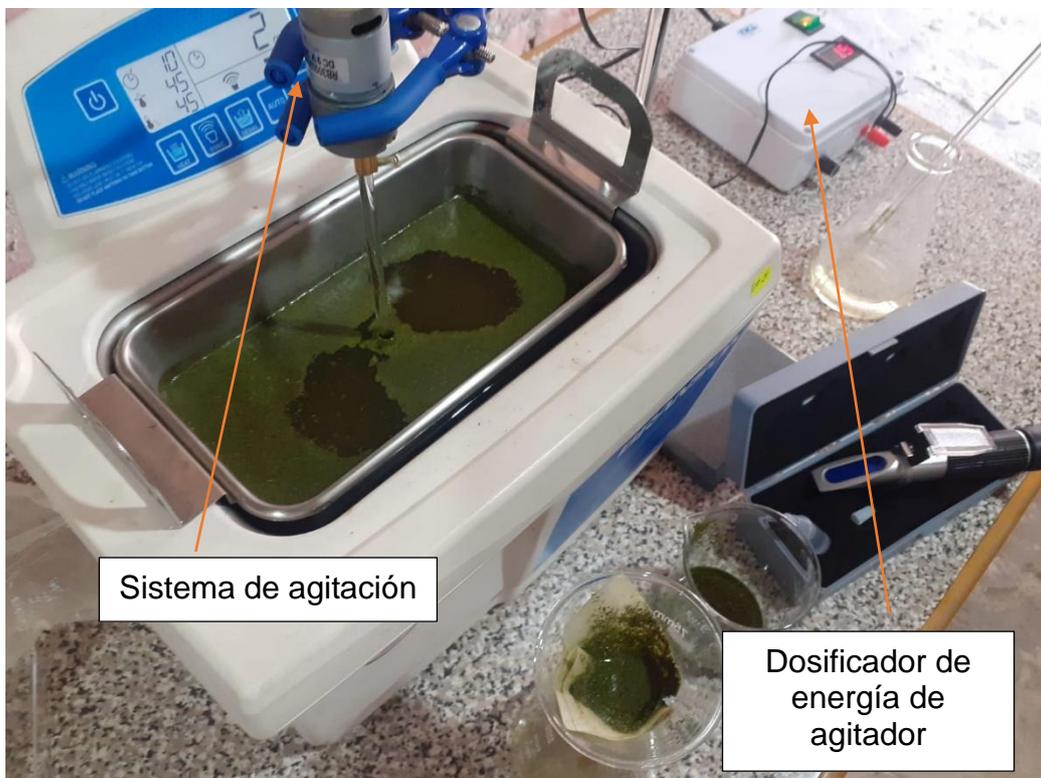
41. LEAL (2021). Disolventes biobasados derivados de glicerol: síntesis, propiedades y aplicaciones
42. MEJIA, E. (2011). Aguacate (*Persea americana* Miller). Colombia.
43. PHILLIPSON (2007). "Phytochemistry and Pharmacognosy" *Phytochemistry* 68(22-24):2960-72. doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2007.06.08
44. MIRANDA (2022). Análisis de las características fitoquímicas, propiedades farmacológicas, usos y aplicaciones más comunes de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).
45. ESTEBAN, N. (2018). Tipos de investigación. Universidad Santo Domingo de Guzmán. <http://repositorio.usdg.edu.pe/handle/USDG/34>
46. HERNÁNDEZ–SAMPIERI Y MENDOZA (2018). Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. McGraw Hill México. <http://repositorio.uasb.edu.bo/handle/54000/1292>
47. CÓDIGO DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN UNAC (2019). <https://www.unac.edu.pe/images/transparencia/documentos/resoluciones-consejo-universitario/2019/260-19-CU%20C%C3%93DIGO%20DE%20%C3%89TICA%20DE%20INVESTIGACI%C3%93N%20CORREGIDO%2003-06-19.pdf>

X. ANEXOS

Anexo 1: Matriz de consistencia: Extracción de Esteviosido y Rebaudiósido A mediante ultrasonido de hojas de Stevia

Problema General	Objetivo general	Hipótesis general	Variables	Dimensiones	Indicadores	Metodología
¿Qué concentración de esteviosido y rebaudiósido A se obtendrá utilizando la extracción mediante ultrasonido, a partir de hojas de Stevia (<i>Stevia Rebaudiana Bertoni</i>)?	Extraer esteviosido y rebaudiósido A mediante ultrasonido de hojas de Stevia (<i>Stevia Rebaudiana Bertoni</i>).	Mediante el ultrasonido se puede extraer 1.15 g/L de esteviosido y 3.7 g/L de rebaudiósido A, a partir de las hojas de Stevia	Variable dependiente: Y: Esteviosido y rebaudiósido A extraídos a partir de hojas de Stevia	Concentración	Esteviosido (g/100 ml) Rebaudiósido A (g/100 ml)	Tipo: Aplicada Enfoque: Cuantitativo Diseño: Experimental
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Especifica:	Variable independiente	Dimensiones	Indicadores	Nivel: Explicativo (causa-efecto) Muestra: 360 g de hojas de Stevia
• ¿Cuál es el porcentaje de humedad de las hojas de stevia para la extracción de esteviosido y rebaudiósido A de hojas de stevia mediante ultrasonido?	• Determinar el porcentaje de humedad de las hojas de stevia para la extracción de esteviosido y rebaudiósido A de hojas de stevia mediante ultrasonido	El porcentaje de humedad de hojas de Stevia para la extracción de esteviosido y rebaudiósido A mediante ultrasonido será 6%.	X: Proceso de ultrasonido	Humedad hojas de stevia	% humedad	
• ¿Cuáles son los parámetros adecuados de relación sólido-líquido, temperatura de operación del ultrasonido y granulometría de las hojas de Stevia para la extracción de esteviosido y rebaudiósido A?	• Determinar los parámetros adecuados de relación sólido-líquido, temperatura de operación del ultrasonido y granulometría de las hojas de Stevia para la extracción de esteviosido y rebaudiósido A	Los parámetros adecuados de relación sólido-líquido, temperatura y granulometría de las hojas de Stevia para la extracción de esteviosido y rebaudiósido A, serán: 60 g/L, 70 °C y 40 malla respectivamente.		<ul style="list-style-type: none"> • Relación sólido-líquido • Temperatura • Granulometría 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 g/L • 40 g/L • 60 g/L • 50°C • 60°C • 70°C • 10 malla • 20 malla • 40 malla 	

Anexo 2: Vista funcionamiento del equipo y accesorios en pruebas



Anexo 3: Resultados de laboratorio para determinación de esteviosido



Universidad Nacional Agraria La Molina

Instituto de Biotecnología
Biotecnología Industrial & Bioprocesos
Av. La Molina s/n. La Molina Apdo. 12056. Lima-Perú. Telf. 614-7800 Anexo 436
<http://www.lamolina.edu.pe/institutos/ibt/>
ibtbi@lamolina.edu.pe



RESULTADOS DE ANÁLISIS*

CLIENTE: Jorge Luis Sandoval Sulca

MUESTRA: Extracto de Stevia

MUESTRA	Esteviosido (g/L)	Rebaudiosido A (g/L)	Total (g/L)**
PS1	0.266	1.881	2.148
PS2	0.322	2.076	2.398
PS3	0.261	1.737	1.998
PS4	0.544	3.530	4.074
PS5	0.588	3.602	4.190
PS6	0.533	3.680	4.212
PS7	0.788	5.123	5.911
PS8	0.727	5.034	5.761
PS9	0.916	5.961	6.876

* Promedio de tres repeticiones

** Método adaptado de: 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


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

Anexo 4: Resultados preliminares de laboratorio para determinación de estevósido



Universidad Nacional Agraria La Molina

Instituto de Biotecnología
Biotecnología Industrial & Bioprocesos
Av. La Molina s/n. La Molina Apdo. 12056. Lima-Perú. Telf. 614-7600 Anexo 436
<http://www.lamolina.edu.pe/institutos/ibt/>
ibt@lamolina.edu.pe



RESULTADOS DE ANÁLISIS*

CLIENTE: Jorge Luis Sandoval Sulca

MUESTRA: Extracto de estevósido

MUESTRA	Estevósido (g/100 ml) ^(**)	Rebaudiosido A (g/100 ml) ^(**)	Total (g/100 ml)
M01	0.12	0.38	0.50
M02	0.11	0.37	0.48

* Promedio de tres repeticiones

** Método adaptado de: 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

La Molina, 25 de agosto del 2021


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