

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**Extracción y cuantificación de compuestos activos presentes en la
stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), mediante procesos físicos**

POR:

ANGÉLICA REYES SÁNCHEZ

TESIS

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Mayo 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Extracción y cuantificación de compuestos activos presentes en la stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) mediante procesos físicos.


TESIS

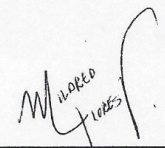
POR:

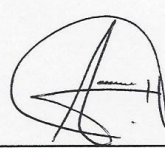
ANGÉLICA REYES SÁNCHEZ

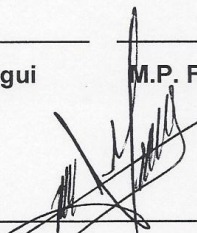
Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial
para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS


M.C. María Hernández González
Presidente


M.C. Mildred Inna Flores Verástegui
Vocal


M.P. Francisco Hernández Centeno
Vocal


Dr. José Dueñez Alarís
Coordinador de División de Ciencia Animal



Buenvista, Saltillo, Coahuila, México,
Mayo de 2015

DEDICATORIA

A DIOS, por que tus manos nunca han soltado las mías, incluso cuando he intentado soltarme de las tuyas, tu insistencia conmigo ha logrado esto. TE AMO.

A mi FAMILIA, con ustedes todo, sin ustedes nada, la libertad, confianza y apoyo incondicional, hace que este logro sea por y para ustedes también. Y siempre lo han sabido ¡LOS AMO!

Papás: Felipe y Francisca: su labor conmigo es infinita y así también el agradecimiento y deuda que tengo hacia ustedes. Esto es algo que también anhelaban. ¡Lo logramos! Y todos ustedes, siempre mi palanca: Rigo, Pau, Roge, Chino, Javier, Honorio, Gaspar, Rosi, Lau y Camis. Cuñadas y sobrinos.

A mis amigos dentro y fuera de la Universidad. Gracias por compartir tantos momentos de aprecio conmigo. Confieso no haber entendido a veces pensamientos y actuaciones, también sé que no comprenden en ocasiones las mías. Y como quiera reímos y lloramos juntos, por lo tanto esta travesía sin ustedes no sería igual. ¡¡Los quiero!!



Que esté perdiendo, no significa que esté perdido

Christ Martin

AGRADECIMIENTOS

A mi gran “ALMA TERRA MATER,” Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por la oportunidad brindada para disfrutar de su labor inigualable de abrigo, preparación y acompañamiento durante esta etapa de formación.

Al Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, personal docente que lo conforma, su paciencia, conocimiento y sobre todo experiencia, son base fundamental para el logro de esta etapa. ¡Maestra Mildred Gracias!

A la M.C. María Hernández González, por el tiempo y conocimiento invertido en este proyecto. Maestra su experiencia y actitud son fuente de motivación para seguir adelante.

A la M.C. Mildred Inna Flores Verástegui, su paciencia de enseñanza y espera, hacen que logros como éste sean posibles.

Al M.P. Francisco Hernández Centeno, por el tiempo y apoyo brindado en la realización del presente trabajo. ¡Maestro Gracias!

A la generación I.C.T.A. 2008-2012, el hecho de haberlos conocido, hacen que todos formen parte de este logro. ¡Gracias compañeros!

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
1. JUSTIFICACIÓN	13
2. HIPOTESIS	15
2.1 HIPOTESIS NULA	15
3. OBJETIVO GENERAL.....	15
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO	16
1.1 EDULCORANTES.....	16
1.1.2 DEFINICIÓN DE EDULCORANTE	17
1.1.3 CUALIDADES QUE DEBE POSEER UN BUEN EDULCORANTE	18
1.1.4 CLASIFICACIÓN DE EDULCORANTES.....	18
1.2 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE EDULCORANTES EN VOLUMEN E INTENSIVOS	19
1.2.2 EDULCORANTES EN VOLUMEN.....	20
1.2.3 EDULCORANTES INTENSIVOS.....	21
1.3 EDULCORANTES MÁS COMUNES	21
1.4 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS EDUCORANTES EN GENERAL	22
1.5 GENERALIDADES DE LA STEVIA	23
1.5.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	24
1.5.3 CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS.....	25
1.5.3.1 CLIMA	26
1.5.3.2 SUELOS.....	27
1.5.4 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	27
1.5.4.1 CONTENIDO DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES	29
1.5.4.2 PODER EDULCORANTE	29
1.5.5 FORMAS DISPONIBLES EN EL MERCADO.....	30

1.5.6	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DE LA STEVIA.....	32
1.5.6.1	EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DE LA STEVIA CON SOLVENTES.....	32
1.5.7	TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN.....	33
1.5.8	PROPIEDAD ANTIMICROBIANA.....	33
1.5.8.1	FLORA BACTERIANA BUCAL.....	34
1.5.9	VENTAJAS Y APLICACIONES.....	34

CAPITULO II

METODOLOGÍA.....36

2.1	ETAPA I: MOLIENDA DE LA STEVIA Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS.....	36
2.2	ETAPA II: PURIFICACIÓN.....	37
2.3	ETAPA III: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE LA STEVIA.....	37
2.3.1	CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	37
2.3.2	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	38
2.4	ETAPA IV: PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS.....	38
2.4.1	VIABILIZACIÓN DE LA CEPA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	38
2.4.2	APLICACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN MEDIO SÓLIDO.....	38
2.4.3	EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA ANTIMICROBIANA MEDIANTE SEGUIMIENTO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	39

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES.....40

3.1	ETAPA I: EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE STEVIA (EXTRACCIÓN CON AGUA).....	40
3.2	ETAPA II. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS ..	41
3.2.1	CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	41
3.2.2	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES.....	42
3.3	ETAPA IV: PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS.....	43
3.3.1	VIABILIZACIÓN DE LA CEPA DE <i>S. aureus</i>	43
3.3.2	APLICACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN MEDIO SÓLIDO.....	43

3.3.3 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA ANTIMICROBIANA, MEDIANTE SEGUIMIENTO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL.....	44
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFIA	47
ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Edulcorantes intensivos	19
Tabla 2. Edulcorantes en volumen.....	20
Tabla 3. Ventajas y desventajas de los edulcorantes	23
Tabla 4. Superficies mínimas destinadas a la producción de stevia en los principales países productores.....	26
Tabla 6. Demanda anual estimada de Stevia en 2006 en toneladas	30
Tabla 7. Formas disponibles y aplicaciones de la Stevia	31
Tabla 8. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de la Stevia.....	25
Figura 2. Núcleo del steviol	28
Figura 3. Cuantificación de azúcares reductores presentes en los extractos de stevia.....	41
Figura 4. Cuantificación de fenoles totales presentes en los extractos de stevia	42
Figura 5. Células de la cepa de <i>S. aureus</i> utilizada, vista en caja Petri y al microscopio óptico a 40x.....	43
Figura 6. Nulo halo de inhibición con 1ml de extracto de stevia	44
Figura 7. Efecto antimicrobiano de extractos de stevia a diferentes concentraciones...	45

RESUMEN

Los edulcorantes como parte de la alimentación, en la actualidad son cuestionados respecto a los efectos atribuidos en diversas patologías como: obesidad, diabetes y caries, entre otras; cada vez son más numerosos los padecimientos relacionados al respecto.

Hoy en día el origen es un factor determinante para la aceptación del consumidor. Algunos de ellos provienen de extractos naturales y otros son sintéticos o mejor conocidos como artificiales; cada uno con ventajas y desventajas, aunque bien es sabido que en el mercado actual se preconiza lo “natural” debido a los factores anteriormente mencionados.

Es por ello que el presente trabajo enfocó su atención en la evaluación de la capacidad edulcorante, antioxidante y antimicrobiana del edulcorante natural mejor conocido como *Stevia rebaudiana* Bertoni. Mediante tratamientos térmicos a temperaturas de 80°C y 100°C se extrajeron los compuestos activos de la stevia (edulcorantes y antioxidantes), obteniendo un mayor contenido de edulcorante a 100°C (0.37mg/ml) y de antioxidante a 80°C (0.28mg/ml).

Para la medición de la capacidad antimicrobiana con *Staphylococcus aureus*, se trabajó con extractos a 80°C con el fin de no modificar en exceso, el contenido de compuestos antioxidantes presentes, obteniendo así nula diferencia significativa en la curva de crecimiento en comparación con la muestra testigo sin extracto.

Palabras clave: Stevia, compuestos activos, *Staphylococcus aureus*.

Correo Electronico; angelica reyes sanchez, anzhelik4@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Siempre han existido diversos temas en constante debate relacionados a la salud, uno de ellos el consumo excesivo de azúcar (200 g por persona al día), consecuencia de su alta disponibilidad en diversos alimentos, acto que conlleva a la aparición de enfermedades ya bien conocidas como crónico-degenerativas, lo que se considera una amenaza para la sociedad.

En el mercado existen diversidad de edulcorantes, mismos que se encuentran en productos más dulces y con menos calorías, pero muchos de ellos, a pesar de su gran aceptación en los mercados de suplementos dietéticos, generan fuerte controversia sobre los efectos que su consumo pueda traer a la salud humana, ya sea por su uso intenso o frecuente (Marín, 2004).

Existen diversos tipos de clasificación de los edulcorantes: en base a su origen, poder edulcorante y aporte calórico. Este último es el que permite evidenciar las características del mismo y define el uso que la industria alimentaria le da. Entre los edulcorantes nutritivos o calóricos se incluyen el azúcar tradicional, los azúcares refinados, jarabe de alta fructuosa, edulcorantes derivados del maíz, miel, entre otros; luego se ubican los edulcorantes con un menor valor calórico (polioles o alcoholes de azúcar) como el sorbitol, manitol, xilitol, isomaltosa y los hidrolizados hidrogenados de almidón así como los nuevos endulzantes tagatosa y trehalosa.

Por último, los edulcorantes no nutritivos o no calóricos se han posicionado en el centro de atención de la industria de aditivos para alimentos y suplementos dietéticos, que a su vez, han originado controversia en torno a los riesgos de su consumo; entre ellos se encuentran: sacarina, ciclamato, aspartame, acesulfame-K, sucralosa, neotame y stevia¹ (único edulcorante de origen natural).

Hoy en día la procedencia de un edulcorante es un factor que determina la incidencia de la aceptación del consumidor, ya que ahora éste busca productos lo más natural posible.

¹ Marín 2004

La stevia, como edulcorante “natural”, se considera un producto nutracéutico o funcional; es decir, posee propiedades que inciden en la nutrición y salud humana, atractivos por su origen natural, puesto que se encuentran en la forma más biodisponible y generalmente pueden ser administrados a largo plazo, sin riesgos de efectos colaterales (Pérez, 2006).

En este caso, la stevia posee ciertos nutrientes como vitaminas, minerales, proteínas y micronutrientes como calcio, cromo, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio, flúor, zinc, selenio y cobalto.

Así mismo, posee propiedades medicinales y terapéuticas que la hacen apropiarse de su característica “funcional”. Un ejemplo de ello es el tratamiento de la diabetes: los compuestos activos presentes en la stevia tienen una acción hipoglicémica que mejora la circulación pancreática, por lo tanto, aumenta la producción de insulina, reduciendo la glucosa de la sangre, además de la hipertensión. Se le atribuyen también otras propiedades como: regulador de la digestión, antiácida, no crea placa dental, anticaries, diurética, antioxidante, antirreumática y antimicrobiana (Trujillo-Mota, 2010).

En este contexto de propiedades, presenta una que la hace aún más atractiva: su efecto bactericida, que ha sido probado en bacterias que afectan las mucosas bucales y en hongos que causan la vaginitis en la mujer. Algunos de estos microorganismos son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Henao & Trujillo, 2007), *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans*. Se reportan diversos resultados de inhibición de acuerdo a los solventes empleados en la extracción del rebaudiosido A y el esteviósido (Vitery *et al.* 2010).

De toda la planta de stevia (*S. rebaudiana* Bertoni) las hojas son de mayor utilidad, pues en su estado natural reportan ser 30 veces más dulces que el azúcar de mesa; en su forma líquida es 70 veces más dulce que el azúcar normal y el extracto refinado, mejor conocido como esteviósido, presenta un poder edulcorante de 200 a 300 veces más que el azúcar común (Ramírez *et al.*, 2011)

En México es considerada un cultivo innovador y rentable por sus numerosas propiedades, se habla de su dominio en el mercado incluso como para sustituir a edulcorantes sintéticos tales como: aspartame, sucralosa y acesulfame K, por

mencionar algunos, que son los que presentan mayor auge y aceptación. Tal es el caso, que el incremento en la demanda en el mercado nacional e internacional y la nula disponibilidad de materia prima, ha dado lugar a iniciativas para aumentar la superficie del cultivo por parte de las autoridades gubernamentales, de industriales, empresarios particulares y del sector social.

Los lugares que presentan mayor potencial de cultivo stevia, son los estados del pacífico (Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Colima, Guerrero, Oaxaca y Chiapas), algunas regiones del golfo de México en los estados de Tamaulipas y Veracruz, y con menor posibilidades en Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo, pero a pesar de la aptitud, actualmente no se tienen superficies de cultivos considerables, por lo cual México aún no aparece en los registros estadísticos oficiales. (Ramírez *et al.* 2011).

Las formas disponibles de la stevia en el mercado son diversas (suplementos dietéticos, polvo, líquido e infusión herbal, etcétera) y cada uno cumple la función de nutracéutico o funcional, siempre y cuando éste no haya sido purificado o refinado. Además está promovido como un aditivo seguro, pues en diciembre del 2008 la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos aprobó el uso de extractos de stevia de alta calidad en alimentos y bebidas.

La legislación mexicana, por medio del “Reglamento de la Ley Federal de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios”, expedido en 1999, lo incluye en el grupo 12 de aditivos como: los “edulcorantes no nutritivos” y lo define como “sustancia natural o sintética, que puede sustituir parcial o totalmente el dulzor del azúcar” (Ramírez *et al.*, 2011).

En base a esto la presente investigación, indaga sobre las características y funciones de los edulcorantes, haciendo énfasis en la stevia, posteriormente en el segundo capítulo, se explica el proceso de laboratorio, que consiste en la extracción, purificación, cuantificación y la evaluación de la eficiencia antimicrobiana de los compuestos activos de los extractos de stevia. Por último, se presenta el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el proceso de laboratorio y las respectivas conclusiones de la investigación.

1. JUSTIFICACIÓN

En México, el consumo total de azúcar y edulcorante es de 5.8 millones de toneladas por año, lo que corresponde a 44 kg por persona, cifra que se estima irá en aumento año tras año. En un comunicado emitido por el IMSS en 2008, se indica que México ocupa el 1er lugar mundial en obesidad infantil, y el 2do lugar mundial con mayor número de personas con sobrepeso y obesidad. Actualmente las personas con obesidad, son propensos a padecer enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, aumento en los triglicéridos e incluso colesterol.

Los edulcorantes bajos en calorías, tanto artificiales como naturales, han tenido un auge importante, ya que la sociedad está cada vez más atenta a cuidar su salud respecto a la presencia de las enfermedades crónico-degenerativas antes mencionadas, pero sin renunciar al sabor dulce que estos proporcionan.

En referencia a los edulcorantes artificiales, éstos han venido decreciendo en popularidad debido a otros daños a la salud que el uso de algunos de ellos conlleva. Un ejemplo es el caso del aspartame, acerca del cual, en febrero de 1994, el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos publicó una lista de reacciones negativas a raíz de su consumo, entre las cuales se encuentran: dolores de cabeza, migraña, náuseas, espasmos musculares, depresión, fatiga, irritabilidad, insomnio, pérdida de la audición, dificultades respiratorias, ataques de ansiedad y pérdida de memoria, entre otras (Ramírez *et al*, 2011).

Todo lo anterior ha propiciado la incursión en el mercado de otros edulcorantes, principalmente de origen natural (González-Moralejo, 2011). Relacionado a esto surge el edulcorante de Stevia como una alternativa al uso de azúcares de mesa y de edulcorantes artificiales debido a que, además de ser de bajo aporte calórico es también natural (Espert, *et al*, 2011).

Actualmente en el mercado se ofertan productos de stevia, promoviéndola como edulcorante natural, debido a que el consumidor lo busca; sin embargo, no pone mayor

atención en el producto que adquiere, ya que algunos productos son refinados, o bien son complementados con otro tipo de edulcorantes o compuestos para mejorar el sabor y apariencia. Bien se sabe que los azúcares refinados son nocivos, esta operación convierte a un nutriente en un antinutriente, puesto que en el proceso de refinación el alimento es separado en sus componentes, por lo se pierden algunos de sus nutrientes complementarios (González-Moralejo 2011).

En relación a la extracción y purificación de los compuestos activos de stevia, existen diversos métodos; a nivel industrial aplican los que les permita obtener buen rendimiento y sabor, mas estos métodos requieren el empleo de compuestos químicos en la etapa de purificación y extracción, tales como los solventes orgánicos (etanol, metanol, hexano etcétera.) (Soto & Del Val, 2002), además del empleo de otros compuestos para completar la purificación. En cada proceso de extracción se pierden propiedades que hacen dejar de reconocerlo como edulcorante 100% natural. Para llamarlo así, debe conservar todas sus propiedades ya que no sólo se reconoce por su poder edulcorante (PE), también por todas sus propiedades y elementos que benefician a la salud (González-Moralejo, 2011). Las condiciones de almacenamiento son punto crítico para mantener el poder edulcorante de los extracos obtenidos. Según Pelayo (2010), menciona que: un almacenamiento a altas temperaturas (como los que se alcanzan durante el horneado), podría tener lugar la degradación sustancial de los edulcorantes.

Por todo lo anterior, el objetivo de la presente investigación es valorar la extracción y rendimiento sin el empleo de procesos químicos, disolventes orgánicos, u otros compuestos que puedan alterar las propiedades que hacen llamarlo “natural”.

De esta manera, se presenta información respaldada aún y cuando el rendimiento obtenido es mínimo, ya que al utilizar otros métodos, que incluyen el refinamiento, el rendimiento es considerable pero no conserva las propiedades que lo hacen ser natural principalmente porque, como cita González-Moralejo (2011), la stevia sin refinar se usa como bactericida, tema que es objeto de investigación en el presente trabajo, por lo cual no es conveniente emplear métodos de refinamiento para aumentar el rendimiento y así hacer posible la evaluación de sus propiedades antimicrobianas.

2. HIPOTESIS

La obtención de esteviósidos y rebaudiosidos, presentes en la hoja de stevia, es posible mediante tratamientos de tipo físico, manteniendo sus propiedades edulcorantes, antioxidantes y antimicrobianas.

2.1 HIPOTESIS NULA

La extracción de esteviósidos y rebaudiosidos presentes en la hoja de la stevia mediante procesos físicos causa afectaciones en sus propiedades.

3. OBJETIVO GENERAL

Extraer y evaluar propiedades de los compuestos activos presentes en los extractos de stevia obtenidos mediante procesos físicos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extraer los compuestos activos de la stevia (esteviósido y rebaudiosido) mediante tratamientos térmicos.
- ✓ Evaluar el poder edulcorante de los extractos obtenidos.
- ✓ Identificar y cuantificar los compuestos con actividad antioxidante presente en los extractos obtenidos.
- ✓ Evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

El siguiente capítulo establece los conceptos básicos que dan soporte a la investigación y que permiten identificar el contexto general de los edulcorantes, así como, características, propiedades, ventajas, desventajas, y aplicaciones que la industria le da. Posteriormente se describe más a detalle el edulcorante principal de esta investigación: *Stevia rebaudiana* Bertoni.

1.1 EDULCORANTES

El hombre siempre ha tenido una afinidad única por los sabores dulces, se tienen referencias de que hace 2,000 años probablemente el primer edulcorante empleado haya sido la miel de abeja y posterior a esto se descubren otros edulcorantes, en esa época todos de origen natural (García *et al*, 2004). Hoy en día, existe un incremento en el consumo de sacarosa, mejor conocida como azúcar de mesa, misma que se obtiene principalmente de la caña de azúcar y de la remolacha. Si bien se sabe que su valor energético es alto y el valor nutritivo es escaso, se ha demostrado que el consumo ha aumentado en las últimas décadas 15 veces más, lo cual es contradictorio pues son conocidas las graves consecuencias que genera el consumir azúcar en exceso (Campoy, 2006).

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. La implicación del área biotecnológica se debe a que existen edulcorantes que no son azúcares (proteínas-alcoholes), los cuales tienen un método de obtención a través de procesos mediados por este tipo de catalizadores, lo que ha sido la principal aportación de esta área del conocimiento a la producción de sustitutos del azúcar (García *et al*, 2004).

El incremento en el consumo de azúcar es difícil de entender y evitar para muchos, ya que desconocen que el azúcar se esconde en muchos otros alimentos, tales como: bollería, batidos, bebidas, conservas, confituras, chicles, chocolates, dulces, embutidos, flanes, helados, licores, mermeladas, natillas, pan, pasteles, quesos, salsas, tartas, yogures, zumos etcétera; por lo tanto, cuando se consume alguno de los productos anteriores, y en exceso, se es inconsciente de la gran cantidad de azúcar presente, ignorando así los daños colaterales a la salud (Ramírez *et al*, 2011).

Mucha de la información acerca de los edulcorantes aún se desconoce y es probable que sea la causa de su consumo excesivo, a continuación se hará un breve recorrido por el mundo de los edulcorantes para conocer más acerca de ellos.

1.1.2 DEFINICIÓN DE EDULCORANTE

Un edulcorante es cualquier compuesto químico, natural o artificial, que proporcione sabor dulce al alimento (Meléndez, 2008). Debido a que los extractos o polvos obtenidos de la stevia se comercializan como edulcorantes, quedan automáticamente incluidos en dicha clasificación, por lo cual su comercialización debe cumplir los lineamientos establecidos para ese grupo de aditivos (Ramírez, *et. al.*, 2011).

Se sabe que no existe una relación directa entre la composición química de una molécula y su capacidad de endulzar, por lo cual se dice que el sabor dulce aparece en moléculas concretas, pero sin saber de manera precisa a qué molécula atribuirle dicho sabor.

Diversos estudios acerca de los edulcorantes han concluido que:

- Existen sustancias químicamente definidas que presentan el sabor dulce y amargo, ya sea al mismo tiempo o uno detrás del otro.
- Debe existir una relación concreta entre los grupos OH- y NH-2 para que se haga presente el sabor dulce, ya que tienen una influencia muy importante en la sensación sávida, pero actúan de diferente forma.

- El poder edulcorante (PE), se establece tomando la sacarosa como referencia, y asignando el valor 1 al sabor dulce de una disolución acuosa de sacarosa, de 30g/l a 20°C. (Campoy, 2006)

1.1.3 CUALIDADES QUE DEBE POSEER UN BUEN EDULCORANTE

Un edulcorante natural o artificial debe tener ciertas características para ser empleado por la industria alimenticia, algunas de ellas: ser inocuo, la intensidad de dulzor debe percibirse y desaparecer rápidamente, tiene que ser lo más parecido posible al azúcar común y sin dejar sabor residual. Debe resistir las condiciones del procesamiento del alimento en el que se va a utilizar, así como a los tratamientos a los que se someterá (Herrera, *et. al.*, 2012).

Para entender más a detalle este tema, a continuación se presentan los tipos de edulcorantes.

1.1.4 CLASIFICACIÓN DE EDULCORANTES

Existen diversas clasificaciones de edulcorantes principalmente por su origen:

- Naturales²: simplemente extraídos de una materia prima (Azúcar o sacarosa, glucosa, jarabe invertido, jarabes de alta fructosa, miel de abeja o de maíz, lactosa, maltosa, mezclas de azúcares de seis carbonos o concentrados de jugos de fruta y stevia³).
- Químicos: obtenidos mediante un proceso de síntesis química (Sacarina, aspartame, acesulfame-K y sucralosa. Su PE es de 200 a 1,000 veces mayor que la sacarosa)
- Biotecnológicos: polialcoholes, obtenidos mediante un proceso enzimático o fermentativo (Isomaltol , mezcla de glucosa, sorbitol y glucosa y maltitol, Lactitol, Xilitol , Eritritol, Sorbitol, etcetera)

² García *et al* (2004); García *et al.* (2013)

³ Edulcorante de gran impacto en el mercado por sus propiedades.

1.2 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE EDULCORANTES EN VOLUMEN E INTENSIVOS

La Tabla 1 muestra un listado de edulcorantes clasificados como intensivos, por la potencia de dulzor que presentan respecto al azúcar.

Tabla 1. Edulcorantes intensivos

Edulcorante	PE-Origen
Acesulfame K (potásico) E-950	PE 130 a 200 veces más que la sacarosa. Es estable a temperaturas elevadas, mantiene sus propiedades sensoriales en un amplio intervalo de pH, no deja residuo desagradable.
Aspartamo E-951	PE 100-200 veces más que la sacarosa. No deja resabio amargo, baja estabilidad frente al calor y el pH inferior a 2.5 y superior a 5.0, inestable en bebidas carbonatadas.
Ácido ciclámico (ciclamato) y sus sales de sodio y calcio E-952	PE 80 veces más que la sacarosa, no deja resabio amargo, es estable a la luz y al calor en un amplio intervalo de pH.
Sacarina y sales de sodio, potasio y calcio E-954.	PE 300-400 veces más que la sacarosa, resistente al calor y a la acidez, regusto amargo.
Sucralosa E-955	PE 600 veces más que la sacarosa, estable a temperaturas elevadas, perfil sabor igual que el del azúcar.
Taumatina E-957	PE 1400 a 2200 veces más que la sacarosa, estable al calor y pH.
Neoesperidina DC, E-959.	PE 250-1800 veces más que la sacarosa, estable al calor y en disolución acuosa con pH entre 1 y 7, actúa más como potenciador de sabor que como edulcorante.

(Campoy, 2006, Vidal C. et al 2004)

La Tabla 2 muestra edulcorantes, la mayoría de ellos alcoholes conocidos como edulcorantes en volumen; el dulzor en estos es ligeramente inferior al del azúcar.

Tabla 2. Edulcorantes en volumen

Edulcorante	PE-Origen
Maltitol, manitol, jarabe de maltitol, E-965	Azúcar-alcohol sintético, que se obtiene a partir de la maltosa, procedente del almidón. Presenta un PE de 0.9 veces más que la sacarosa.
Isomaltol E-953, mezcla de glucosa, sorbitol y glucosa y maltitol	Poder edulcorante de 0.5 veces más que la sacarosa valor energético 2kcal/g. Útil para diabéticos.
Lactitol E-966	Azúcar, alcohol obtenido a partir de la lactosa. Ingesta superiores a los 25g pueden tener efectos laxantes. PE 0.3 veces que la sacarosa.
Xilitol E-967	Azúcar-alcohol presente en muchos vegetales, comercialmente se obtiene a partir de polisacárido xilano, de la pulpa de la madera. PE 1.2 veces más que la sacarosa.
Eritritol E-968	Potenciador de sabor, soporte, humectante, estabilizador, espesante, agente de carga y secuestrante, productos de confitería y derivados lácteos.
Sorbitol E-420	PE 0.6 veces más que la sacarosa

Campoy (2006), Vidal et al(2004)

1.2.2 EDULCORANTES EN VOLUMEN

Tienen menor valor energético y poder edulcorante que la sacarosa. Aquí es donde la biotecnología hace presencia porque la mayoría de ellos son polialcoholes, por lo que son necesarios procesos fermentativos en los que intervienen procesos enzimáticos (catalizadores) (García *et al*, 2004).

Los edulcorantes en volumen poseen las siguientes características: baja intensidad de dulzor, aporte reducido de calorías, confieren textura, a grandes dosis producen efectos laxantes, algunos son higroscópicos y humectantes, si se ingieren en estado sólido dejan una sensación de frescura, son poco o nada cariogénicos, controlan

la cristalización de los azúcares, evitan la evaporación del agua, solubilizan los saborizantes, secuestran metales, actúan como conservadores por su efecto de presión osmótica, ayudan a rehidratar los polvos y evitan el efecto de pegajosidad (Campoy, 2006).

1.2.3 EDULCORANTES INTENSIVOS

Poseen las siguientes propiedades: alta intensidad de dulzor (ppm), aporte de calorías insignificante o nulo, ausencia de otras funciones tecnológicas (solo endulzan), apropiadas para diabéticos y no provocan caries (Campoy, 2006).

1.3 EDULCORANTES MÁS COMUNES

Existen edulcorantes que han causado mayor impacto por su PE y efectos en el mercado y la salud del consumidor. Por el origen surge discusión al preguntarse sobre los efectos que pudieran generar en el organismo, así mismo por el PE ya que el consumidor interpreta de forma errónea “bajo o cero aporte calórico” y tiende a exceder su consumo. Entre ellos encontramos:

- **La sucralosa:** se obtiene de la caña de azúcar, no presenta aporte calórico y cuya ingesta diaria máxima (IDM) es de 15 mg/kg de peso corporal.
- **La sacarina:** se deriva de una sustancia proveniente del petróleo, no presenta aporte calórico, y su IDM es de 15 mg/kg de peso corporal.
- **El aspartame:** un edulcorante encontrado en diversos productos, formado a partir de dos aminoácidos (ácido aspártico y fenilalanina), aporta 4 cal/gr y presenta una IDM de 40 mg/kg de peso corporal.
- **Ciclamato de sodio:** edulcorante artificial, formado por sales de sodio, calcio y potasio, no presenta aporte calórico, con una IDM de 11 mg/kg de peso corporal.
- **Acesulfame K:** de origen artificial, derivado del ácido acético, aporta cero calorías, su IDM es de 15 mg/kg de peso corporal.
- **Fructosa:** un edulcorante de origen natural, se extrae de frutas y miel, aporta 4cal/g, no presenta un límite de IDM.

- **Stevia:** un edulcorante de origen natural, se extrae de la planta con el mismo nombre, aporta cero calorías y su IDM de 5.5 mg/kg de peso⁴.

El tema acerca sobre los riesgos de consumo surge a partir del origen del edulcorante, se sabe que la mayoría de ellos son artificiales, es decir, pasan por diversos procesos químicos y al interactuar con el sistema del organismo del consumidor se generan posibles reacciones, algunas veces desfavorables. Debido a lo anterior, conviene indagar acerca de las ventajas y desventajas de los edulcorantes en un amplio espectro (Duran *et al*, 2013).

1.4 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS EDUCORANTES EN GENERAL

El mercado de edulcorantes ha evolucionado considerablemente y ha surgido la necesidad de productos más dulces y con menos calorías; sin embargo, esto genera controversia sobre los efectos de consumo que pueda traer a la salud humana, ya sea por su uso intenso o frecuente (Marín, 2004).

En la Tabla 3 se enlistan de manera más específica algunas ventajas y desventajas de los edulcorantes calóricos y no calóricos.

Algunos efectos nocivos a la salud relacionados con el consumo de edulcorantes son los siguientes: caries dental, acidificación de la sangre, descalcificación, arterioesclerosis, infarto de miocardio, obesidad, acné, úlcera de estómago, colesterol, tensión nerviosa, problemas de circulación, hiperexcitabilidad, degeneración hepática y diabetes (López & Peña, 2004).

Ahora bien, se observa que existe gran diversidad de información y controversia entre edulcorantes calóricos y no calóricos, así como artificiales y naturales. Se tiene que el ciclamato, la sucralosa, el aspartame y la stevia son los más cuestionados al respecto, siendo la Stevia un edulcorante que actualmente ha causado mayor impacto por su origen, poder edulcorante y el nulo aporte calórico que presenta, marcando así la

⁴ García *et al*, (2004); Ramírez *et al*, (2011).

diferencia entre el resto de los edulcorantes; esto hace que en un futuro la stevia ocupe un lugar importante dentro del mercado de los edulcorantes (Trujillo-Mota, 2010).

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los edulcorantes

CALÓRICOS		NO CALÓRICOS	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Disponibilidad.	Son fácilmente metabolizados por el organismo lo que contribuye a una rápida absorción de azúcares.	“Saludables” en el aspecto de bajo o nulo aporte calórico.	Puede generar dependencia por la intensidad de dulzor.
Se encuentran de manera natural.	Aumentan el apetito.	Disponibilidad en el mercado.	Precios más altos.
Económicos.	Aumenta la producción de triglicéridos y ácido úrico.	Opción para reducir las calorías de un alimento	Altamente disponibles en alimentos o comida rápida.
Poseen buena solubilidad.	Contribuyen a generar problemas de obesidad.	Mayor disponibilidad de alimentos libres de calorías.	Presentan diversas reacciones con el organismo y están relacionados con diversos padecimientos.

González (2013)

Por todo lo anterior, el presente trabajo centra su atención en el edulcorante natural stevia, así como en sus compuestos activos: esteviósido y rebaudiosido

1.5 GENERALIDADES DE LA STEVIA

Desde épocas precolombinas los indígenas guaraníes ya empleaban la stevia como endulzante para sus alimentos y bebidas, por tal motivo la llamaron “ka’a-hée”, que significa “hierba dulce”. En Paraguay fue descubierta en 1887 y caracterizada por el botánico suizo Moisés Santiago Bertoni (1857-1929), en 1905 recibió el nombre científico de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Existe otro número significativo de variedades de la planta, pero la *Stevia rebaudiana* Bertoni es la única que posee la propiedad endulzante que le confiere el principio activo conocido como esteviósido y rebaudiosido, descrito en 1921 por la unión internacional de química (Marín, 2004).

En su forma natural, la hoja de stevia de buena calidad es hasta 30 veces más dulce que el azúcar común de mesa (sacarosa), mientras que los extractos de stevia tienen una PE de 100 a 300 veces mayor que el azúcar (Ramírez, *et al*, 2011; López & Peña, 2004).

1.5.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La stevia es una especie perteneciente a la división Fanerógama (plantas con flores y semillas), clase Dicotiledónea, orden Campanulales y familia Asteraceae. Es una hierba perenne que alcanza los 80 cm de altura (Herrera *et al*, 2012). Crece en estado silvestre en forma de planta aislada con tallo erecto, subleñoso y pubescente. Durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo, llegando a producir hasta 20 tallos en tres a cuatro años. Puede alcanzar hasta 90 cm de altura en su hábitat natural y en los trópicos puede llegar a tener alturas superiores a 100 cm, la raíz es pivotante, filiforme y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie (Larrañaga & Nerea, 2011).

Las hojas son elípticas, ovales o lanceoladas, algo pubescentes; presentan disposición opuesta en sus estados juveniles, y alternas cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica previa a la floración, la hoja es el órgano con mayor contenido del edulcorante. La flor es hermafrodita, pequeña y blanquecina; corola tubular, pentalobulada, en capítulos pequeños, terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas (Herrera, *et al*, 2012).

La planta es autoincompatible (protandria), por lo que la polinización es entomófila; se dice que es de tipo esporofítico y clasificada como apomíctica obligatoria. Físicamente se encuentra como se observa en la Figura 1.



Figura 1. Planta de la stevia

1.5.3 CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS

Ésta es una especie semiperenne por lo cual la vida útil del cultivo puede durar entre 5 y 6 años, con 2 o 3 cortes anuales; el rendimiento anual de hoja seca en Paraguay oscila entre 1,500 y 2,500 kg/ha en condiciones de temporal y alrededor de 4,300 kg/ha con riego. (Herrera *et al*, 2012).

En cuanto a densidad se refiere, existen diversas recomendaciones con un intervalo de entre 50,000 y 120,000 plantas/ha, Ramírez *et al* (2011) menciona algunas de ellas:

- De 80 a 100,000 plantas/ha con espaciamientos entre líneas de 45 a 60 cm.

- Para altos rendimientos se sugiere 160,000 plantas/ha, con riesgo de no ser económicamente viable.
- En hileras simples, de 95,200 (70 x 20 cm) a 100,000 (80 x 12.5 o 50 x 20 cm) plantas/ha.
- En hileras dobles, de 100,000 (70 x 30 x 20 cm) a 121,212 (89 x 30 x 15) plantas/ha.

En relación a lo anterior, la Tabla 4 muestra a los diversos países encabezan la lista de producción, los cuales destinan cierta superficie para su cultivo.

Tabla 4. Superficies mínimas destinadas a la producción de stevia en los principales países productores

Productor	Cantidad (tm de cristal)	Cantidad (kg/hojas)	Superficie (ha)
China	2.700	27,000,000	10,800
Paraguay	200	2,000,000	800
Bolivia	25	250,000	100
Brasil	12.5	125,000	50
Argentina	52.5	525,000	210

González-Moralejo 2011

Cabe destacar que Japón es el país con mayor cantidad de fábricas procesadoras y extractoras de esteviósido y esto hace que se convierta en principal proveedor de China. (Herrera *et al*, 2012).

1.5.3.1 CLIMA

La región donde crece la planta de stevia es subtropical, semihúmeda, con una altura de 1,400 a 1,800 msnm, donde se presentan lluvias que se distribuyen regularmente durante todo el año. La temperatura más apropiada para el cultivo de esta especie es de 15 a 30°C, con un límite inferior de -3°C.

Se desarrolla mejor donde la estación de crecimiento es larga, la intensidad de luz es alta, con temperaturas tibias, riesgos mínimos de heladas luego de la brotación y sin períodos de larga sequía.

1.5.3.2 SUELOS

Se puede cultivar en suelos muy variados, en su estado natural, la planta crece en suelos tanto de baja fertilidad, ácidos, de tipo arenoso, como hasta orgánicos y con alta humedad. Algunos autores recomiendan tierras areno-arcillo-humífera-ferruginosa o simplemente arena humífera. Se desarrolla bien en suelos colorados del Alto Paraná. Se adapta bien a suelos arcillosos con buen drenaje, no así a lugares con exceso de humedad. Prospera bien en suelos de desmonte, no así en tierras recién desmontadas con mucha materia orgánica, por problemas de enfermedades. La planta crece naturalmente en suelos de pH 4-5, pero crece bien entre 6.5-7.5, siempre que no sean salinos (Herrera *et al*, 2012).

1.5.4 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

En 1982, Tanaka aisló cuatro glicósidos dulces adicionales, presentes en menor porcentaje, a los cuales denominó rebaudiósidos A, C, D y E, encontrándose en mayor cantidad a los rebaudiosidos A; dichos compuestos son los que le confieren el intenso sabor dulce. Estos componentes y otros como diterpenos, triterpenos, taninos, estigmasterol y aceites volátiles, son quienes resaltan su diferencia química en comparación con los demás edulcorantes.

Se dice que es una molécula muy compleja, que contiene 38 carbonos, 60 hidrógenos, y 18 oxígenos, su nombre completo es 13-O-beta-soforosil-19-O-beta-glucosil-steviol. Los glucósidos consisten en una estructura central diterpeno con una variedad de radicales sustitutos, los cuales incluyen a la glucosa, rhamnosa y/o xilosa. Su estructura central se presenta en la Figura 2, donde los radicales R1 y R2 pueden ser glucosa (glu), xilosa (xyl) o ramnosa (ram) (Ramírez, *et al*, 2011).

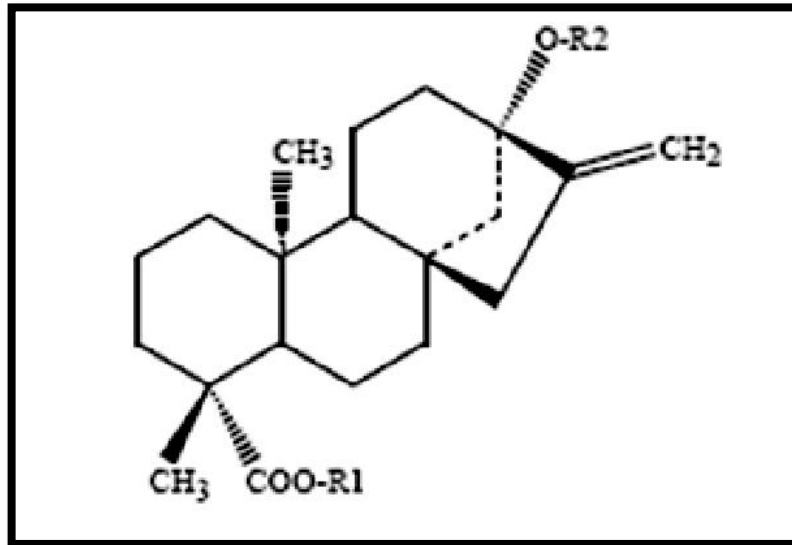


Figura 2. Núcleo del steviol

Además de contener los compuestos químicos mencionados anteriormente, la hoja de stevia en su estado natural posee gran cantidad de nutrientes, que en orden de concentración son:

- Más del 50%: carbohidratos de fácil asimilación.
- Más del 10%: fibras, polipéptidos (proteínas vegetales).
- Más del 1%: lípidos, potasio.
- Entre el 0.3 y 1%: calcio, magnesio y fósforo.
- Menos del 0.01%: cromo, cobalto, hierro, manganeso, selenio, silicio, zinc. Indicios de ácido ascórbico, aluminio, beta caroteno C, estaño, riboflavina, vitamina B1.
- Varios aceites esenciales.

En general, la stevia presenta características como: estabilidad al calor (198-200°C), tiene un pH en un rango de 3 a 9, no se fermenta y es de 200 a 300 veces más dulce que la sacarosa.

Como se mencionó en un apartado anterior, el rebaudiósido A es el que presenta las mejores propiedades sensoriales (es más dulce y menos amargo) y lo que lo hace diferente de los otros cuatro (Delgado, *et al*, 2009).

1.5.4.1 CONTENIDO DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Como ya se ha visto, la stevia contiene un sinnúmero de compuestos benéficos, tal es el caso de su contenido de antioxidantes, mismos que son reportados en un estudio (Espert *et al* 2011). En este se analizó concretamente la actividad antioxidante total, contenido en fenoles y flavonoides de extracciones acuosas (método convencional) de hojas deshidratadas de stevia, donde se lograron valores de actividad antioxidante (131 mg trolox eq./g Stevia a 90 °C 20 min), de fenoles totales (98 mg AG eq./g Stevia a 70 °C 20 min) y de flavonoides (67 mg catequina eq./g Stevia a 100 °C 20 min) superiores a los presentados por los extractos obtenidos por otras técnicas más novedosas como ultrasonidos (91 mg trolox eq./g Stevia a 70 °C 5 min; 79 mg AG eq./g Stevia a 70 °C 20 min; 36 mg catequina eq./g Stevia a 90 °C 20 min) y microondas (108 mg trolox eq./g Stevia; 87 mg AG eq./g Stevia; 48 mg catequina eq./g Stevia a 1,98 W/g de infusión 5 min).

Existen referencias bibliográficas que mencionan que los compuestos antioxidantes poseen la propiedad de inhibir el crecimiento y metabolismo de algunos microorganismos (Henaó &Trujillo 2007).

1.5.4.2 PODER EDULCORANTE

El poder edulcorante del compuesto activo depende de la forma en la que se encuentre la planta; es decir, en su forma natural es 10 a 15 veces más dulce que el azúcar común de mesa, y el extracto en su forma líquida tiene un poder endulzante aproximadamente 70 veces mayor que la sacarosa, mientras que los extractos refinados de Stevia, llamados esteviósido (polvo blanco conteniendo 85-95% de esteviósido) son 200 a 300 veces más dulce que la sacarosa (Ramírez *et al*, 2011).

1.5.5 FORMAS DISPONIBLES EN EL MERCADO

En el ámbito de su comercialización, se menciona que el 18 de Septiembre de 1995 la FDA (Food and Drug Administration) anunció que la stevia podía venderse y consumirse como suplemento dietético y no como aditivo alimenticio (endulzante). Cabe mencionar que en junio de 2004, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación concluyó que la stevia es inocua, veredicto que abrió amplias posibilidades de evaluar su ingreso al Códex Alimentario Mundial.

Un dato importante menciona que el 70% del total de la producción mundial de stevia se utiliza para procesar cristales de esteviósidos, mientras que el 30% restante es destinado a usos de las hojas en su estado natural (fresco o seco), es decir, sin un procesamiento industrial (Trujillo-Mota, 2010). Los extractos de la hoja pueden ser procesados ya sea en forma de polvo o en forma líquida (González-Moralejo 2011). En base a ello la demanda de stevia ha incrementado considerablemente a nivel mundial, (como se observa en la tabla 6), así mismo de manera general, el consumo de edulcorantes.

Tabla 6. Demanda anual estimada de Stevia en 2006 en toneladas

País	Consumo de azúcar refinado (80%)	Consumo de edulcorantes naturales y artificiales (20%)	Demanda estimada de Stevia
EE UU	8,424,000	2,106,000	1,264
UE	16,475,000	4,118,750	2,471
China	9,500,000	2,375,000	1,425
Japón	2,535,000	633,750	380
México	4,900,000	1,225,000	735
España	303,580	75,895	46

González-Moralejo 2011

Este edulcorante podría sustituir al resto de su clase, en la formulación de comidas, tortas, pasteles y bebidas en general. Actualmente es adicionado a bebidas de bajo contenido calórico (refrescos), caramelos, goma de mascar, pastelería, yogurt, dulces, encurtidos, salsas, productos medicinales y de higiene bucal (Razo, 2011).La

stevia es empleada en diversas áreas y en diferentes presentaciones, como se describe en la Tabla 7.

Tabla 7. Formas disponibles y aplicaciones de la Stevia

PRESENTACIÓN	DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO
Hojas	Tiene un sabor muy suave y licoroso. Esta es la forma más sencilla, natural y no procesado de la stevia. Usadas para preparar salsas, con mayor preferencia para un té herbario y consumo directo, no se disuelven. Se pueden adquirir sueltas o en sacos de té. Son de 15 a 30 veces más dulce que el azúcar.
Hojas secas	Presentan un PE de 10 a 15 veces más dulce que el azúcar. Su proceso de secado mediante un deshidratador, tiene las mismas aplicaciones que el la hoja fresca, además es empleada en la industria para la extracción del esteviósido y su tiempo de almacenamiento es mayor.
Hojas molidas o en polvo	Pueden encontrarse a granel y en saquitos de té. Presenta un color verdoso, se usa como realzador de sabor y como edulcorante en el té, ensaladas, frutas, café, etc. Las hojas molidas de stevia no se disuelven.
Subproductos	Las partes restantes de la planta, incluyendo tallos, semillas, flores e incluso hojas que no fueron seleccionadas para la industrialización, pueden ser usadas para la alimentación de animales o fertilizantes.
Extracto líquido oscuro	Jarabe concentrado hecho de las hojas secas a base de agua y alcohol. Usado como edulcorante de bebidas.
Extracto líquido claro	Una solución de cristales de esteviósido disueltos en agua, alcohol o glicerina. Usado como edulcorante en bebidas.
Polvo con 40%-50% de glucósidos	Las hojas de stevia se procesan a través de uno de los varios métodos de extracción, normalmente con una base de agua o alcohol etílico. El polvo resultante, blanquecino, tiene 40%-50%de glucósidos dulces y es 100 veces más dulce que el azúcar. Usado como edulcorante de comidas y bebidas.
Polvo con 85%.97% de glucósidos	Mayor concentración que la anterior, mismo proceso, normalmente es 200-300 veces más dulce que el azúcar. Se usa principalmente como edulcorante. Sabor, dulzura y costo de los diversos polvos, probablemente dependan del grado de refinamiento y de la calidad de la planta usada.

González-Moralejo, 2011

1.5.6 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DE LA STEVIA

De manera tradicional es muy simple la extracción de los componentes principales de la stevia; para su industrialización existen diversas formas de extraerlos y ello dependerá del estudio que se requiera realizar (Trujillo-Mota, 2010).

A continuación se muestra una breve descripción del proceso de extracción industrial más común; el proceso se compone de las siguientes etapas:

- i. Extracción con agua o con solventes orgánicos
- ii. Filtración
- iii. Precipitación de impurezas
- iv. Purificación con resinas de intercambio iónico
- v. Cristalización
- vi. Secado

1.5.6.1 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DE LA STEVIA CON SOLVENTES

Las hojas deben estar finamente trituradas y colocadas en un recipiente para ser tratadas con diversos solventes, entre los cuales se encuentran: agua, alcohol metílico, solución buffer; posteriormente se someten a purificación con solventes orgánicos.

Existen dos métodos donde se obtiene un mejor resultado en cuanto a la obtención de los compuestos activos de la stevia; se muestra mayor preferencia por estos, pues son los que permiten mayor rendimiento en los extractos (aunque los costos son muy elevados) conocidos como: extracción por intercambio iónico y extracción por adsorción cromatográfica. Así mismo, existen otros como: precipitación selectiva, fluidos supercríticos y extracciones Soxhlet y por reflujo, por mencionar algunos (Delgado *et al*, 2009).

Para cada método de extracción se requieren diversos procesos que al final generan aspectos favorables y desfavorables como los que se enlistan en la Tabla .8.

Tabla 8. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción

Método	Ventajas	Desventaja
Extracción por solvente	Velocidad de extracción	Arrastre de compuestos en general; clorofila, antioxidantes etcetera.
Adsorción cromatográfica	Rendimientos considerables, resultados confiables.	Equipos costosos, emplean diversidad de compuestos químicos, que de alguna u otra forma intervienen en la composición del extracto.
Extracción por intercambio iónico		

Razo (2011)

1.5.7 TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN

Existen diversas técnicas de purificación de los extractos de la stevia, entre ellas se encuentran: combinación de membranas filtrantes de distintos tamaños de poros, zeolitas modificadas con distintos iones metálicos, columnas de intercambio, resinas y columnas de carbón activado (Soto& Del Val, 2002).

Hay que tener en cuenta, que una cantidad mayor a 2 g de carbón activado, logra aclarar completamente el extracto, pero a la vez hace perder todo su dulzor. (Delgado *et al*, 2009).

1.5.8 PROPIEDAD ANTIMICROBIANA

Un agente antimicrobiano es el que por separado o mezclado con otra sustancia entre sí es capaz de inhibir, retardar o detener los procesos de fermentación, enmohecimiento, putrefacción y otras alteraciones bilógicas de los alimentos y bebidas (Henaó & Trujillo, 2007).

La propiedad bactericida es atribuida a la stevia sin ningún tipo de refinamiento, principalmente su efecto en bacterias causantes de la caries dental y problemas de

enciás, así como de la garganta irritada. También se le atribuyen propiedades antifúngicas con hongos que causan la vaginitis en la mujer (*Candida albicans*). También actúa especialmente contra bacterias tales como: *Stafilococcus aureus* y *Corynebacterium ditteriae* (González-Moralejo, 2011; Lazandúri & Tigrero, 2009).

1.5.8.1 FLORA BACTERIANA BUCAL

Se sabe que las lesiones dentales son tan antiguas como el origen del hombre, un problema muy común es la caries dental, misma que es causada por un microorganismo conocido como *Streptococcus mutans*. El efecto de este microorganismo es que conduce a cavitación y alteraciones del complejo dentino-pulpar.

Streptococcus mutans fue aislado por J. Clarke en 1924, dando la siguiente descripción: produce ácido de manera muy rápida en un medio donde el pH inicial es de 7.0, obteniendo un pH de 4.2 antes de las 24 horas, fermenta diferentes hidratos de carbono e hidroliza algunos aminoácidos. Otro punto importante es que *S. mutans* se adhiere a la superficie de los dientes, y este es un factor importante para el inicio de la formación de la caries (Vitery *et al*, 2010). Respecto a los efectos que produce dicho microorganismo, se relaciona con algunas propiedades de la stevia, mismas que actúan contra dichas reacciones, tales como fermentar azúcares y producción de ácido, lo contrario a la stevia, pues no es fermentable y es antiácida.

1.5.9 VENTAJAS Y APLICACIONES

Diversos estudios catalogan a la stevia como el edulcorante del futuro al ser 100% natural y con cero calorías, es decir, no metabolizado en el organismo y poseer un potente poder edulcorante, pero sobre todo al no causar ningún efecto nocivo a la salud. Entre sus beneficios se encuentran la aptitud para diabéticos, es hipotensora (recomendada para personas con tensión alta, pues la reduce), sirve para el cuidado facial, para problemas de acidez de estómago, es adecuada para bajar el nivel de

acidez de la sangre y de la orina, también ayuda a bajar de peso porque no tiene calorías.

Es soluble en agua fría o caliente, sin nutrientes, sin calorías, se puede hornear (es estable a los 200 °C), no se fermenta, no crea placa dental, es anti-caries, y no tiene efectos tóxicos. Su IDA (Ingesta Diaria Admisible) es muy baja debido a su alto poder edulcorante, su ingesta en el peor de los casos es de 4.4 g/día o aproximadamente 75mg/kg de peso corporal (Herrera *et al*, 2012).

Un aspecto que capta la atención de los investigadores es el efecto bactericida que fue descubierto en Paraguay, donde utilizan la stevia sin refinar, ya que se observa un efecto inhibitor en el crecimiento de bacterias, sobre todo las que producen las caries y los problemas de encías, también para aliviar el problema de la garganta irritada.

Un estudio reportado por Galperin menciona acerca del efecto de la adición de esteviósido sobre un cultivo de bacterias orales. Los resultados obtenidos indicaron que no favorece la propagación bacteriana y por ello se preconiza su empleo en caramelos y gomas de mascar. (Galperin, 1984; Rivero & Casadiego 2011).

CAPITULO II

METODOLOGÍA

La presente investigación de llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila. El método comprende cuatro etapas; comienza con la extracción y cuantificación de los compuestos activos de la stevia y se concluye con la prueba de capacidad antimicrobiana de los extractos en cepas de *Stevia aureus*.

2.1 ETAPA I: MOLIENDA DE LA STEVIA Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS

En un molino de la marca Thomas Scientific 800-3452100, con una malla N° 2, se realizó la molienda de la stevia, misma que fue proporcionada en forma deshidratada (seca), con el fin de romper los tejidos para facilitar la liberación de los compuestos activos de la planta.

Para el proceso de extracción se trabajaron 2 tratamientos: 80 °C y 100 °C con un total de 5 muestras para cada temperatura.

En matraces de 250 ml se colocaron 100ml de agua destilada y se calentaron en parrillas de agitación, hasta alcanzar las temperaturas antes mencionadas; una vez logrado esto, se adicionó 1 g de stevia y se mantuvieron a dicha temperatura durante una hora.

2.2 ETAPA II: PURIFICACIÓN

La purificación fue mediante filtración, lo anterior con la finalidad de mantener el origen natural y libre de contacto con compuestos químicos.

Se procedió a una primera filtración con tela de muselina para retirar el precipitado de mayor tamaño, seguida de una segunda filtración con papel filtro #1 para retener completamente los residuos. De las muestras ya libres de componentes visibles se guardaron 10 ml de cada una en tubos de ensayo cubiertos con papel aluminio para evitar la oxidación de los posibles antioxidantes presentes. Estas muestras fueron empleadas en la evaluación de eficiencia antimicrobiana en medio de cultivo líquido.

Posteriormente se realizaron dos procesos de filtración a través de papel filtro #42 y carbón activado, se procedió al resguardo de las muestras de la misma forma que las anteriores para su respectivo análisis. Basado en la metodología propuesta por Delgado, *et al* (2009). Estas muestras fueron las empleadas para la evaluación de la eficiencia antimicrobiana en medio de cultivo sólido.

2.3 ETAPA III: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE LA STEVIA

En esta etapa se cuantifica la concentración de azúcares reductores y fenoles totales presentes en los extractos de la stevia, en temperaturas de 80 °C y 100°C.

2.3.1 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

La cuantificación se realizó mediante la técnica de DNS, ya que la literatura la reporta como método para calcular la concentración de azúcares reductores (Bello *et al*, 2006). El método se aplicó a las diferentes muestras obtenidas: extracción a 80 °C y a 100 °C, sin filtrar y después de la primera y segunda filtración.

2.3.2 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

Para esta determinación se empleó como agente oxidante el reactivo Folin Ciocalteau,(Tighe *et al* 2014), en cada muestra obtenida, como se mencionó en el apartado anterior.

2.4 ETAPA IV: PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

En esta etapa se evalúa la eficiencia antimicrobiana de los extractos purificados y sin purificar, en medios de cultivo sólidos y líquidos.

2.4.1 VIABILIZACIÓN DE LA CEPA DE *Staphylococcus aureus*

La cepa empleada para el presente trabajo fue obtenida del cepario del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAAAN.

Se prepararon por triplicado tubos con caldo TSB y medio sólido, previamente esterilizado en autoclave a 15 lb de presión y 121 °C, durante 15 min.

Para la proliferación de la cepa del cultivo iniciador se tomaron 100 µl y se pasaron a caja Petri con medio TSB y se realizó la siembra por estriado, todo esto en la campana de flujo laminar de aire estéril. Se incubaron a una temperatura de 35 °C por 48 h. Se evaluó su morfología macroscópica y microscópica, la segunda mediante la técnica de tinción de Gram.

2.4.2 APLICACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN MEDIO SÓLIDO

La preparación del inóculo inicial se realizó a partir de la cepa previamente identificada como *Staphylococcus aureus*. El microorganismo se inoculó con un asa de cultivo en tubos con caldo TSB, posterior a esto, se incubaron a 35 °C hasta alcanzar

turbidez equivalente al tubo 4 de la escala de McFarland que equivale a 1,200,000,000 UFC aproximadamente.

Se prepararon cajas Petri con medio TSB, previamente identificadas con las muestras y tratamientos. Así mismo, se prepararon sensidiscos de papel filtro, cada uno de aproximadamente 1mm de diámetro. Todo fue previamente esterilizado en autoclave a 15 lb de presión y 121 °C, durante 15 min.

Los sensidiscos fueron sumergidos en los extractos de stevia con la primera, segunda y tercera filtración; para el tratamiento testigo se utilizó agua destilada.

Los sensidiscos fueron colocados en las cajas Petri, previamente identificadas. Se dejaron acondicionar para eliminar el exceso de humedad y para permitir la difusión de los compuestos a probar en el gel.

Una vez que las cajas estuvieron preparadas y acondicionadas, se procedió a sembrar 100 µl del inóculo previamente preparado. Posteriormente se realizaron observaciones cada 24 horas, durante 48 horas.

2.4.3 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA ANTIMICROBIANA MEDIANTE SEGUIMIENTO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

El seguimiento del desarrollo microbiano se llevó a cabo mediante la medición de turbidez generada por el crecimiento poblacional en el medio de cultivo líquido, por lo cual se prepararon tubos para cultivo con caldo TSB que fue inoculado con 100 µl del inóculo de *Staphylococcus aureus* previamente preparado, equivalente al tubo 4 de la escala de McFarland. Se identificaron tubos como testigo, y el resto se les adicionó 1 y 2 ml del extracto de stevia.

Los tubos se leyeron en un espectrofotómetro Genesys 10 UV con una longitud de onda de 540 nm a intervalos de 2 horas, hasta las 48 horas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En éste capítulo se realiza la evaluación de la significancia estadística de las diferencias encontradas en la concentración de azúcares, fenoles, y eficiencia antimicrobiana, mediante un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$).

3.1 ETAPA I: EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE STEVIA (EXTRACCIÓN CON AGUA)

Tras haber realizado la extracción durante una hora con agua a temperaturas controladas de 80 °C y 100 °C, fue posible la obtención de un lixiviado de coloración oscura, cada una con diferente intensidad de dulzor y resabio amargo, esto debido a los compuestos como glucósidos y fenoles.

La literatura reporta que: en una extracción con solventes, la presencia del rebaudiosido A, en los extractos, indica que existe un buen sabor dulce y muy poco resabio amargo, por las técnicas de purificación empleadas. (Delgado y colaboradores 2009).

Diversos autores mencionan la efectividad de usar solventes orgánicos en el proceso de extracción, sin embargo Macia & Monesterolo (2008) reportan que estos no son considerados seguros y requieren procesos posteriores de separación y purificación; por el contrario, la extracción acuosa permite conservar las propiedades que lo hacen ser lo más natural posible.

3.2 ETAPA II. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS

En este apartado se presentan de manera estadística los compuestos activos en mg/ml en cada una de las temperaturas trabajadas.

3.2.1 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

La identificación y cuantificación de los glucósidos presentes en la stevia, (responsables del sabor dulce) se pueden identificar mediante el método de extracción acuosa, evitando el uso de solventes orgánicos, y así, evitar daños a otros compuestos. Soto & Del Val (2002) menciona que: de las tres técnicas de extracción reportadas, el método de extracción acuosa es el más recomendado ya que es el único que permite obtener buen rendimiento mediante temperaturas controladas, seguida de otros procesos de purificación.

En la Figura 3 se observa que a diferentes temperaturas controladas, 80 y 100°C, y aplicando filtraciones mediante carbón activado, se obtiene la misma cantidad de azúcares. Por lo tanto, es recomendable trabajar a una temperatura de 80 °C, sin filtración con carbón activado, evitando así, el deterioro de otros compuestos presentes en la stevia.

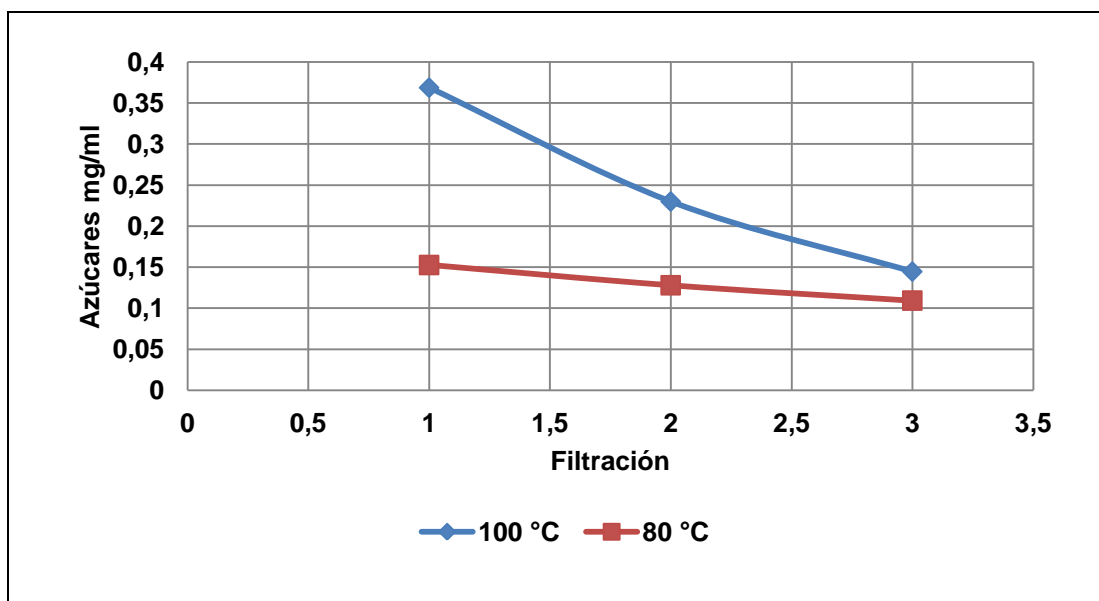


Figura 3. Cuantificación de azúcares reductores presentes en los extractos de stevia

3.2.2 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES

Se identificaron y cuantificaron los antioxidantes presentes en los extractos. Espert *et al* (2011) reportan que los compuestos fenólicos y flavonoides son los responsables de la capacidad antioxidante de plantas como té de menta o mate, y también están presentes en las hojas de la stevia.

En la Figura 4 se expone el contenido fenólico de los extractos a diferentes temperaturas, las mayores concentraciones se obtuvieron a 80 °C, comparado con las concentraciones obtenidas a 100 °C, aun con las filtraciones realizadas, lo cual es aceptable de acuerdo con lo reportado por Espert *et al* (2011) quien menciona que los tratamientos a altas temperaturas y tiempos prolongados de extracción pueden propiciar la pérdida de compuestos antioxidantes.

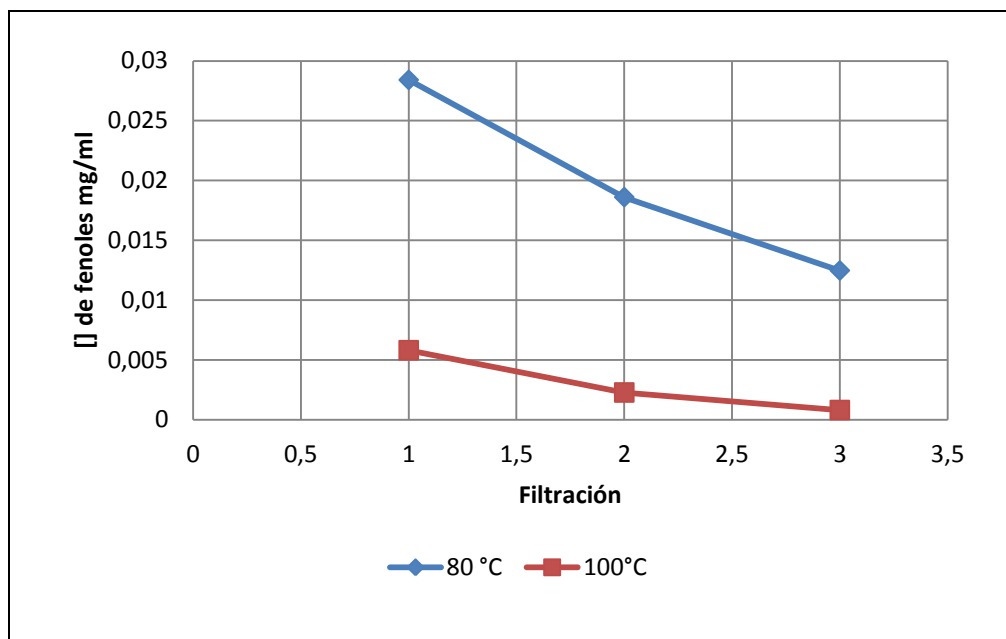


Figura 4. Cuantificación de fenoles totales presentes en los extractos de stevia

Por lo anterior, es recomendable trabajar a temperatura de 80°C, por las ventajas antes mencionadas.

3.3 ETAPA IV: PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

Esta última etapa presenta el efecto antimicrobiano a diferentes concentraciones de extracto, en medios de cultivo líquido y sólido.

3.3.1 VIABILIZACIÓN DE LA CEPA DE *S. aureus*

Se logró viabilizar la cepa de *S. aureus*, mediante las técnicas descritas anteriormente, obteniendo un cultivo puro, con la morfología característica de dicha cepa. En la Figura 5 se observa el cultivo final tras varios aislamientos.

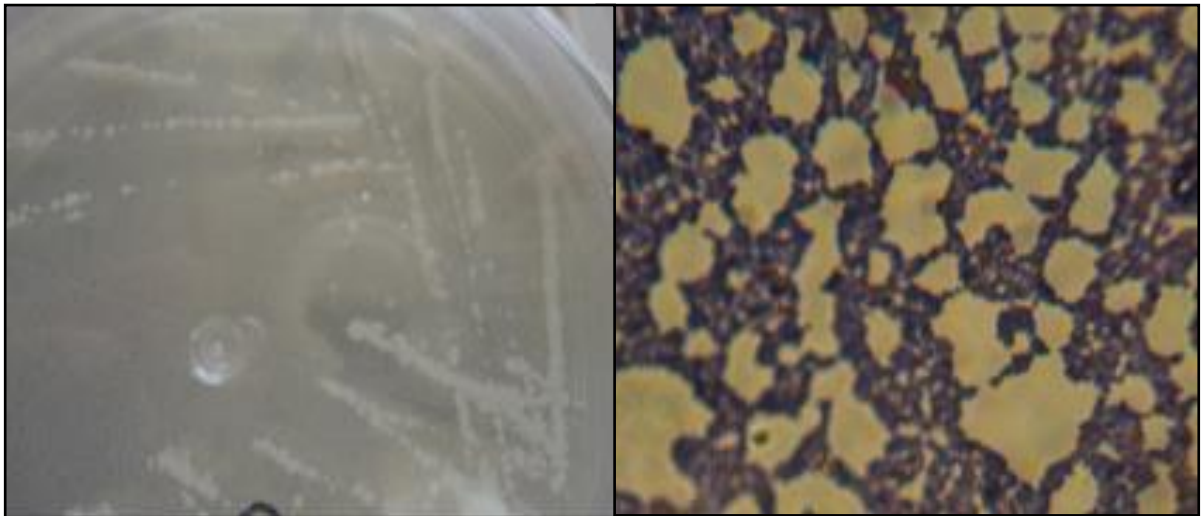


Figura 5. Células de la cepa de *S. aureus* utilizada, vista en caja Petri y al microscopio óptico a 40x

3.3.2 APLICACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN MEDIO SÓLIDO

La aplicación del antibiograma en medio sólido no brindó los resultados esperados debido a que la cantidad de extracto empleada es mínima: 1 ml. Buitrago (2008) sugirió utilizar 200 mg/ml para así obtener resultados positivos inhibiendo al microorganismo. En la Figura 6 se observa que no hay presencia de ningún halo de inhibición.

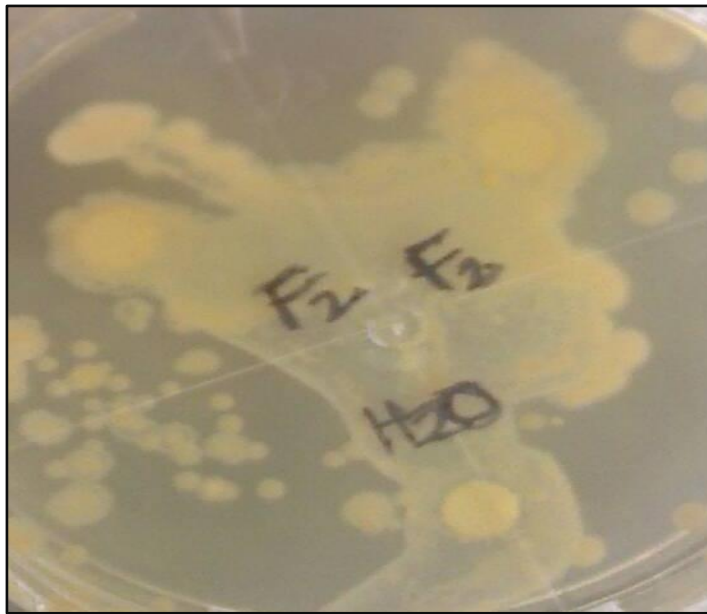


Figura 6. Nulo halo de inhibición con 1ml de extracto de stevia

Así mismo, el efecto inhibitorio es nulo, puesto que las filtraciones con carbón activado retienen diversos compuestos entre ellos fenoles y glucósidos. Para la presente prueba, se efectuaron 2 filtraciones con 2 gr de carbón activado en cada una, por lo cual las pérdidas fueron significativas como se muestra en la Figura 4.

3.3.3 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA ANTIMICROBIANA, MEDIANTE SEGUIMIENTO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL.

Diversos estudios reportan un efecto antimicrobiano de los extractos de stevia, sobre bacterias como *Entamoeba coli*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium difteriae*, y contra el hongo *Candida*, como menciona Lazandúri & Tigrero (2009).

En la Figura 7 se muestra el efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*, los extractos empleados se trabajaron a temperatura de 80 °C, sin filtración con carbón activado, únicamente con papel filtro para retener residuos de mayor tamaño, ya que, como reporta Delgado *et al* (2009) a mayor uso de carbón activado, mayor pérdida de compuestos activos.

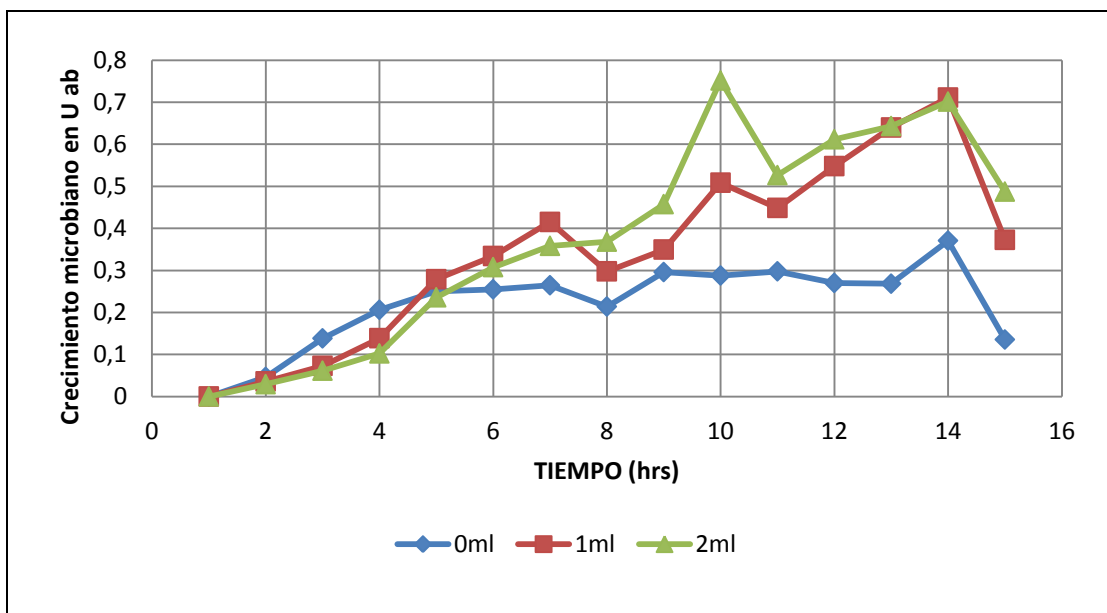


Figura 7. Efecto antimicrobiano de extractos de stevia a diferentes concentraciones

El objetivo de usar extractos sin ninguna técnica de purificación es evitar la pérdida gradual de compuestos activos, factor que determina dicho efecto en estudio, como lo reporta Lazandúri & Tigrero (2009) quienes mencionan que la propiedad bactericida es atribuida a la stevia sin ningún tipo de refinamiento.

Utilizando las concentraciones de 1 y 2 ml se observó retardo en el crecimiento bacteriano, pero no se logra obtener una inhibición total. Esto podría deberse a que los extractos de stevia no muestran acción inhibitoria al utilizar concentraciones menores de 200 mg/ml de glucósidos (Buitrago, 2008). En un estudio efectuado, al trabajar con jugo de melón (Henao & Trujillo, 2007), se concluyó que el efecto de inhibición observado fue causado por la concentración de sólidos presentes en el jugo y a la alta disponibilidad de agua y no por el poder antimicrobiano como tal de los extractos. Por otra parte, otro estudio revela que el empleo de extractos obtenidos utilizando solventes orgánicos, específicamente de metanol, hexano y acetato de etilo, muestran mejor acción inhibitoria sobre *S. aureus*, que los extractos obtenidos utilizando agua. (Tadhani & Subhasshi 2006).

CONCLUSIONES

- La extracción de los compuestos activos de la *Stevia rebaudiana* Bertoni es posible mediante tratamientos térmico no tan severos, en este caso 80°C para evitar pérdida total los compuestos.
- Mediante la aplicación de la técnica DNS, se identificó la presencia de esteviósidos y rebaudiosidos, observando así que a mayor temperatura (100°C) se obtiene mayor extracción de edulcorantes (0.37mg/ml) y otros compuestos, lo que requiere mayor tiempo de purificación y esto se traduce a pérdida gradual del PE.
- Se identificó la presencia de antioxidantes mediante la técnica de Folin Ciocalteu, obteniendo mayor contenido a temperatura de 80°C (0.28mg/ml).
- La capacidad antimicrobiana evaluada en esta investigación no presenta diferencia estadísticamente significativa en la curva de crecimiento, respecto al tubo sin extracto, debido a que, la cantidad de antioxidantes y edulcorantes presentes en los extractos empleados son mínimos en comparación con lo reportado en la literatura.

BIBLIOGRAFIA

Bello, D., Carrera, E., Díaz, M., 2006. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 Dinitrosalicílico. ICIPCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, Vol XL, N°. 2, pp. 44-50.

Buitrago, C., 2008. Actividad antimicrobiana del extracto en metanol de Stevia Rebaudiana sobre bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*) y Gram-positivas (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*) contaminantes de cavidad oral e importantes en enfermedad periodontal, Rev. De la Federación Odontológica Colombiana, ISSN 0046-354X, MAY-JUN. Disponible en: http://www.federacionodontologiacolombiana.org/index.php?option=com_content&task=view&id=42&Itemid=2

Campoy, J. A., 2006, Endulzantes naturales y artificiales. Revista DSalud N° 83, Mayo. DISPONIBLE EN: <http://www.dsalud.com/index.php?pagina=articulo&c=441>

Delgado, L., Torres, M. A., Pérez, C.A., Calero, A., 2009. Extracción y caracterización de los glicosidos de la *Stevia rebaudiana*. Revista INGENIUM, N°8, Febrero. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220525077>> ISSN 0253-5688

Duran S., Cordón K., Rodríguez M., 2013. Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso. Revista Chilena Nutritiva vol. 40, N°3.

Espert, M., Periche, A., Heredia, A., Castelló, M.L. 2011. *Aplicación de ultrasonidos o energía de microondas a la extracción de compuestos antioxidantes en infusiones en hoja de stevia.* Escuela técnica superior de ingeniería agronómica y del medio natural. Universidad Técnica de Valencia, España.

Galperin R., 1984. *Stevia rebaudiana* Bertoni: un singular edulcorante natural. Acta Farmaceutica Bonaerence Vol. 3 N°1.

García M., Quintero R., López A., 2004, Biotecnología Alimentaria, LIMUSA, México, DF. Pág. 519.

García A., García M., Casado F., García J. 2013. Una visión global y actual de los edulcorantes y aspectos de regulación. Rev. Nutr. Hosp. Vol. 28.Número 4.

Giraldo E., Catalina, Marín P., Luz Deisy, Habeych N., David Ignacio. 2005 Obtención de Edulcorantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni.Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 36.

González-Moralejo, S.A. 2011. Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la stevia rebaudiana bertoni: producción, consumo y demanda potencial. Revista Agroalimentaria, Vol. 17, N° 32, enero-junio. Pag.57-69.

González Ch. A. y cols., 2013. Posición de consenso sobre las bebidas con edulcorantes no calóricos y su relación con la salud. Rev. Mexicana de cardiología vol. 24 N°2. Pp. 55-68.

Henao, A. L., Trujillo, S., 2007. Determinación del poder antimicrobiano del rebaudiosido A, frente a los microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en condiciones de laboratorio y aplicado a una matriz alimentaria. Universidad de la Sabana, Bogotá.

Herrera F., Gómez R., Gonzales C., 2012, El cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana*), Bertoni en condiciones agroambientales de Nayarit, México, INIFAP, Folleto Técnico No. 19.

Larrañaga & Nerea, 2011. Estevia el edulcorante Natural. Presentado: IV congreso de estudiantes universitarios de ciencia, tecnología e ingeniería agronómica. Universidad Politécnica de Madrid.

Lazandázuri, P.A., Tigreiro J. O., 2009. *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal, Bol. Téc. Edición Especial, ESPE, Sangolquí, Ecuador.

López G., Peña G., 2004. Tesis: Plan Estratégico para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de edulcorante a base de Stevia. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Marín W. 2004, Sondeo de mercado de la Estevia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia.

Meléndez G. 2008. Factores Asociados con el Sobrepeso y Obesidad en el Ambiente Escolar. Panamericana, pág. 77

Monesterolo & Macía, 2008. Resultados experimentales del proceso de extracción y purificación de de compuestos endulzantes de la hoja de *Stevia rebaudiana*. Universidad Técnica Nacional, Córdoba Argentina.

Pérez, H., 2006. Nutraceuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. ICIPCA. Sobre los derivados de la caña de azucar, Vol. XL, N° 3.

Ramírez, J. G., Aviléz, W., Moguel, O. Y., Góngoras, G. S., May, C., 2011. Estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) un cultivo con potencial productivo en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste. Mérida, Yucatán, México, 88p.

Razo E. F., 2011. Diseño de una planta piloto para la industrialización de Stevia en la comunidad Cueva de los Monos, Catón Saha. TESIS. Provincia de Orellana, Región Norte de Ecuador.

Rivero D., Casadiego E., 2011. Estrategias técnicas y económicas para la producción y el procesamiento de la Stevia. Revista electrónica, facultad de ingeniería UVM, Vol. 5, N° 1. Venezuela.

Soto, A. E., Del Val, S., 2002. Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*. Revista de Ciencias Agrarias y Tecnológico de Alimentos, Vol. 20, ISSN 1666-2016.

Tadhani M.B., Subhasshi, R., 2006. In Vitro Antimicrobial Activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves, Tropical Journal of Pharmaceutical Research. Vol. 5, Número 1. Pág. 557-560.

Tigue, R., Montalba, R., Leonellina, G., Contreras, A., 2014. Efecto de dos extractos botánicos, el desarrollo y contenido de polifenoles de ají (*Capsicum annuif*). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, vol. 15

Trujillo-Mota, D.M, 2010. Mapeo y análisis preliminar de la cadena de valor de la stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Tesis de maestría, Universidad Javeriana, Bogotá.

Velázquez, G., 2006, Fundamentos de alimentación saludable, Universidad de Antioquia, Colombia.

Vitery, G. R., Escribanos, S., Gamboa, F. O., Chavarría N., Gómez, R. A., 2010. Actividad inhibitoria de la *Stevia rebaudiana* sobre *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans*. Revista Nacional de Odontología, Volumen 6, N°10, Enero-Junio.

Vidal C., Moreno B., Miserachs M., Gómez A., Olmos M., 2004. Azúcares, edulcorantes y Salud. Rev. Yogurvivo Alimentos Funcionales. Número 19.

ANEXOS

Anexo 1. Determinación de contenido fenólico

Resumen	
Rcuadrados	0.810481
Rcuadrados Adj	0.80387
Root Mean Square Error	0.004649
Respuesta de medias	0.011389
Observaciones (or Sum Wgts)	90

ANÁLISIS DE VARIANZA DE CONTENIDO FENOLICO

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
Modelo	3	0.00795032	0.002650	122.5934
Error	86	0.00185907	0.000022	Prob > F
C. Total	89	0.00980939		<.0001

Nivel			Media de cuadrados
1	A		0.01710000
2		B	0.00970000
3		B	0.00736667

Los niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes.

Anexo 2. Concentración de Azucares en mg/ml

Resumen

Rcuadrados	0.713266
Rcuadrados Adj	0.703263
Root Mean Square Error	0.052271
Respuesta de medias	0.188889
Observaciones (or Sum Wgts)	90

Análisis de varianza

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
Modelo	3	0.58451333	0.194838	71.3098
Error	86	0.23497556	0.002732	Prob > F
C. Total	89	0.81948889		<.0001

Nivel				Media de cuadrados
1	A			0.26066667
2		B		0.17900000
3			C	0.12700000

Los niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes

Anexo 3. Inhibición microbiana en Uab

Resumen

Rcuadrados	0.707523
Rcuadrados Adj	0.685025
Root Mean Square Error	0.125383
Respuesta de medias	0.313098
Observaciones (or Sum Wgts)	225

Análisis de varianza

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
Modelo	16	7.910287	0.494393	31.4480
Error	208	3.269965	0.015721	Prob > F
C. Total	224	11.180252		<.0001

NIVEL											MEDIA DE CUADRADOS
36	A										0.5942000
34	A	B									0.5169333
28	A	B									0.5158000
32		B	C								0.4764667
30			C	D							0.4241333
26				D	E						0.3675333
12				D	E						0.3458667
48					E	F					0.3316667
10					E	F					0.2988000
24					E	F					0.2932000
8						F					0.2549333
6							G				0.1490000
4							G	H			0.0908000
2								H	I		0.0371333
0									I		-0.0000000

Los niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes.