

**Optimización del blanqueamiento de un  
extracto acuoso de estevia (*Stevia rebaudiana*  
*B.*) con carbón activado y Celite 545<sup>®</sup>**

**Felipe Andrés Arguello Valle**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Optimización del blanqueamiento de un  
extracto de acuoso de estevia (*Stevia  
rebaudiana B.*) con carbón activado y Celite  
545<sup>®</sup>**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

**Felipe Andrés Arguello Valle**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2017

## Optimización del blanqueamiento de un extracto acuoso de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) con carbón activado y Celite 545®

Felipe Andrés Arguello Valle

**Resumen.** Edulcorantes no calóricos derivados de *Stevia rebaudiana* son utilizados como sustitutos de endulzantes industriales por sus beneficios nutricionales. El objetivo fue optimizar el blanqueamiento de un extracto acuoso de estevia (EAS), obtenido a través de membranas, mediante una técnica de adsorción con carbón activado y Celite 545® (tierra diatomea). El estudio constó de cuatro fases. En la fase uno se determinó el ácido idóneo a utilizar en el módulo de adsorción y en la dos se caracterizó el extracto crudo y un edulcorante comercial blanqueado; además, se determinó el pH idóneo para conducir el módulo de adsorción. En la fase tres se optimizó el blanqueamiento mediante la metodología superficie repuesta con un diseño tipo centro rotacional de segundo orden y en fase cuatro se comparó el EAS optimizado con la materia prima. Las variables independientes fueron: concentración de Celite 545® (0-1%), concentración de carbón activado (0.16-1.84%) y tiempo de adsorción (4.95-15.05 minutos). Las variables dependientes fueron acidez, densidad, color, índice de blancura (IB), índice de empardeamiento (IE) y eficiencia de decoloración (ED). Se determinó que el ácido idóneo fue el ácido cítrico con una eficiencia de decoloración de 77%. El valor óptimo se obtuvo a concentraciones de 1% de Celite 545® y 1.84% de carbón activado con 15.05 minutos de adsorción. Para determinar los puntos que optimicen el blanqueamiento del extracto acuoso de estevia, se debe dislocar el punto central de las concentraciones de Celite 545® y de carbón activado, así como del tiempo de adsorción.

**Palabras clave:** Adsorción, edulcorantes, pigmentos, superficie respuesta.

**Abstract.** Non-caloric sweeteners such as those derived from *Stevia rebaudiana* are used as substitutes for industrial sweeteners for their nutritional benefits. The aim of this study was to optimize the bleaching of an aqueous extract of stevia (EAS) obtained through membranes by an adsorption technique with activated charcoal and Celite 545® (diatomaceous earth). The study consisted of four phases. In phase one the ideal acid to be used in the adsorption module was determined, while in phase two the raw extract and a bleached commercial sweetener were characterized, in addition, the ideal pH was determined to drive the adsorption module. In phase three, bleaching was optimized using the surface response methodology central rotational type of second order composite, and in phase four the optimum EAS was compared with the raw extract. The independent variables were: concentration of Celite 545® (0-1%), activated charcoal (0.16-1.84%) and adsorption time (4.95-15.05 minutes). The dependent variables were acidity, density, color, whiteness and browning index and decolouration efficiency. It was determined that the suitable acid was citric acid with a decolouration efficiency of 77%. The optimum value was obtained at concentrations of 1% of Celite 545® and 1.84% of activated charcoal with 15.05 minutes of adsorption. To determine the points that optimize the bleaching of the aqueous stevia extract, the central point of the concentrations of Celite 545® and activated charcoal, as well as adsorption time, must be dislocated.

**Key words:** Adsorption, pigments, surface response, sweetener.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexo .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>43</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>50</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXO

Cuadros	Página
1. Ácidos utilizados en el experimento de acidificación. ....	5
2. Niveles de variables independientes para el blanqueamiento del oncentrado rico en esteviósidos (CRE). ....	9
3. Composición del diseño experimental. ....	9
4. Ajuste de los valores para cada parámetro utilizados en el módulo de adsorción y su justificación. ....	10
5. Equipo utilizado para conducir adsorción. ....	11
6. Comparación de medias para el efecto de siete ácidos en atributos y aracterísticas del color del concentrado de estevia a un pH estándar de 3.2. ....	14
7. Comparación de medias para absorbancia final ( $A_f$ ) y porcentaje de eficiencia en decoloración (ED) obtenida con siete ácidos. Absorbancia inicial de 0.608 a 420 nanómetros. ....	15
8. Compendio de parámetros: tres atributos y tres características colorimétricas más densidad y valor de acidez (pH) del edulcorante comercial blanqueado Santiveri® y el CRE intacto. ....	16
9. Probabilidades, medias y desviación estándar (DE) de atributos y características colorimétricas entre los tratamientos de acidificación previa y posterior a la adsorción. ....	17
10. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y $R^2$ de un modelo de regresión polinomial, aplicado a la densidad ( $g/cm^3$ ) del concentrado clarificado de estevia. ....	18
11. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y $R^2$ de un modelo de regresión polinomial, aplicado al pH del concentrado clarificado de estevia. ....	21
12. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y $R^2$ de un modelo de regresión polinomial, aplicado al atributo de color $L^*$ del concentrado clarificado de estevia. ....	24
13. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y $R^2$ de un modelo de regresión polinomial, aplicado al atributo de color $a^*$ del concentrado clarificado de estevia. ....	26
14. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y $R^2$ de un modelo de regresión polinomial, aplicado al atributo de color $b^*$ del concentrado clarificado de estevia. ....	30

Cuadros	Página
15. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y R <sup>2</sup> de un modelo de regresión polinomial, aplicado al índice de blancura (IB) del concentrado clarificado de estevia. ....	32
16. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y R <sup>2</sup> de un modelo de regresión polinomial, aplicado al índice de empareamiento (IE) del concentrado clarificado de estevia. ....	35
17. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y R <sup>2</sup> de un modelo de regresión polinomial, aplicado a la eficiencia en decoloración (ED) del concentrado clarificado de estevia. ....	37
18. Comparación de medias para análisis colorimétrico (atributos y características) y de absorbancia entre los productos finales y materia prima. ...	40
19. Comparación de medias de densidad y pH entre los productos finales y materia prima. ....	40

Figuras	Página
1. Representación gráfica de la gama de matices según su ángulo. ....	6
2. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de carbón activado sobre la densidad (g/cm <sup>3</sup> ) del concentrado clarificado de estevia. ....	19
3. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de celite sobre la densidad (g/cm <sup>3</sup> ) del concentrado clarificado de estevia. ....	20
4. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de celite sobre el valor de acidez (pH) del concentrado clarificado de estevia. ....	22
5. Efecto del porcentaje de celite y porcentaje de carbón activado sobre el valor de acidez (pH) del concentrado clarificado de estevia. ....	23
6. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de carbón activado sobre el valor de acidez (pH) del concentrado clarificado de estevia. ....	23
7. Efecto del porcentaje de celite y tiempo de adsorción en minutos sobre el atributo de color L* en el concentrado clarificado de estevia. ....	25
8. Efecto del porcentaje de celite y minutos de tiempo de adsorción sobre el atributo de color a* en el concentrado clarificado de estevia. ....	27
9. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de carbón activado sobre el atributo de color a* en el concentrado clarificado de estevia. ....	29
10. Efecto de la variable independiente carbón activado en el atributo b* del concentrado clarificado de estevia. ....	31
11. Efecto del porcentaje de celite y minutos de tiempo de adsorción sobre el índice de blancura (IB) del concentrado clarificado de estevia. ....	33
12. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de carbón activado sobre el índice de blancura (IB) del concentrado clarificado de estevia. ....	33
13. Efecto del porcentaje de celite y tiempo de adsorción en minutos sobre el índice de empareamiento (IE) del concentrado clarificado de estevia. ....	36

Figuras	Página
14. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de carbón activado sobre el índice de empardeamiento (IE) del concentrado clarificado de estevia. ....	36
15. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de celite sobre el porcentaje de eficiencia en decoloración (ED) del concentrado clarificado de estevia. ....	38
16. Función de utilidad para las variables independientes sobre los atributos y características colorimétricas más eficiencia en decoloración de un concentrado clarificado de estevia_.....	39

Anexo	Página
1. Fundamentación teórica de la extracción. ....	50

# 1. INTRODUCCIÓN

El incremento en el consumo de sacarosa se relaciona con problemas nutricionales y medicinales (Johnson *et al.* 2010). Desórdenes metabólicos, obesidad tipo dos e hipertensión, son solo algunas de las patologías desarrolladas por niños y adultos en todo el mundo (Anton *et al.* 2010, Jeppesen *et al.* 2002). Estas complicaciones se atribuyen parcialmente al incremento en la disponibilidad de alimentos densos energéticamente así como también a la tendencia de utilizar edulcorantes a base de fructosa en una amplia gama de bebidas ultra procesadas, de las cuales el humano moderno obtiene hasta un 44% del total de agua que necesita a diario (Barros *et al.* 2007). Se le llama edulcorante a cualquier sustancia que mimetice la sacarosa. Los edulcorantes no calóricos son necesarios como sustitutos de azúcar de mesa y endulzantes industriales de uso masivo (Rao *et al.* 2012, Daciw 2005).

*Stevia rebaudiana* es una planta nativa de Suramérica en cuyas hojas se depositan ocho glucósidos di terpenos conocidos como esteviósidos. Estos son de 100 a 300 veces más dulces que la sucrosa. Este compuesto químico y termoestable, es usado mundialmente como edulcorante, sustituto del azúcar y modificador de sabor; ya que no fermentan, son inodoros y muy solubles en agua (Giraldo *et al.* 2005). Sus ventajas sobre los edulcorantes comerciales son: bajo nivel calórico, propiedad antiviral y antibacterial, el hecho de no ser toxico o muta génico en humanos, y distintas propiedades terapéuticas (Puri *et al.* 2011).

La concentración de esteviósidos en un extracto cualquiera depende del método de extracción y las técnicas empleadas para aislarlos, purificarlos o clarificarlos. Everest Foods desarrolló un flujo de procesos que recopila aquellos pasos que más éxito han tenido en crear un edulcorante con las características comerciales deseadas (blanqueado total), implementando: extracción acuosa, doble filtrado: arena y carbón activado (remover materia orgánica suspendida) y ultra/nano filtrado para concentrar esteviósidos.

El purificado por ultra y nano filtración son operaciones unitarias delicadas que implican presión. Su función es separar compuestos por pesos. Cada membrana tiene un corte de peso molecular (CPM), un número expresado en Daltons que indica el peso molecular de un compuesto hipotético que será descartado en la separación a un porcentaje dado (Sevak *et al.* 2014). El nano filtrado es el último proceso del extracto en el procesamiento de Everest Foods, de este se recupera un concentrado rico en esteviósidos (CRE) con el perfil de dulzor deseado.

No obstante, dicho concentrado tiene una coloración pardo olivo que entorpece su perfil comercial. A pesar de la cantidad de estudios y tecnologías disponibles, es todavía demandante aislar los esteviósidos de impurezas en medios acuosos por su bajo peso



molecular (600-1500 Da) (Rao *et al.* 2012). Los responsables de la coloración son: compuestos fenólicos y pigmentos, entre ellos taninos hidrosolubles, clorofilas, xantofilas y carotenoides (Ramakrishnan *et al.* 2010). Los esteviósidos no tienen dispersión específica en el agua, se aglomeran en racimos, confiriendo amargura e interactuando con materia no deseable (Jinjang *et al.* 2012). Esta coloración le impide ser comercialmente aceptado. Es necesario conducir un proceso de blanqueamiento posterior enfocado en remover estos compuestos sin tener mayor impacto en los costos.

En virtud de su simplicidad y facilidad de empleo, la adsorción con tierras adsorbentes resulta una de las técnicas más empleadas en la remoción de color a nivel industrial. Por su mínima generación de subproducto y bajo costo (Castellar *et al.* 2013), las adsorciones se consideran como el método más eficaz para decolorar disoluciones acuosas sopesándolo ante aquellos métodos químicos, biológicos y físicos disponibles.

La adsorción es un proceso físico químico donde se transfiere, selectivamente, un componente en líquido o gas (adsorbato), a un sólido (adsorbente), en un tiempo determinado. El tiempo y la selección correcta del material adsorbente hacen la diferencia entre una buena o mala separación. Algunos atributos del adsorbente son: capacidad, selectividad o cinética de adsorción. El método de adsorción puede ser dinámico o en lotes. Conducirla a través de lotes permite medir la eficacia en eliminar compuestos específicos conociendo la cantidad de material adsorbente agregado (Ortega *et al.* 2013).

Por su área superficial (500-2000 m<sup>2</sup>/g) y grupos funcionales oxigenados, los carbones activados se emplean en diversos procesos industriales de purificación y recuperación química. Con carbón activado, Cortés *et al.* (2016) a concentraciones de 0.05% reportaron remociones de clorofila de hasta 46%; Rajab *et al.* (2009) concluyeron en la eficiencia del uso de carbón activado para remover fenoles y clorofilas en extractos de estevia; ambos obtienen productos cristalinos. En su extracto Ding *et al.* (2011) determinaron que el óptimo de carbón activado que mejora el blanqueo es de 5%. Más adelante Abelyan *et al.* (2010) sugieren un aumento de eficiencia al combinar carbón activado con arcillas. Celite es una tierra diatomea efectiva en remover impurezas; su composición es de 80-90% de sílice, 4% de arcilla y hasta 2% de óxidos de hierro. El modelo propuesto por Rajab *et al.* (2009) resulta en un producto clarificado al integrar 5% de celite.

Debido a la diferencia en la técnica de extracción y composición de la materia prima, los rangos provistos por literatura como óptimos para decolorar, son solo importantes delimitaciones en nuestro estudio; no son realmente la respuesta exacta para el extracto vegetal obtenido por Everest Foods. Se necesita experimentación preliminar para validar un rango específico. Los objetivos del estudio fueron:

- Diseñar un sistema de blanqueamiento para el extracto de estevia que no interfiera con el perfil natural del producto.
- Identificar el punto óptimo de las variables independientes que maximicen el blanqueamiento del concentrado rico en esteviósidos (CRE).
- Comparar el producto óptimo con un edulcorante comercial blanqueado y el CRE intacto.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Ubicación del estudio.**

El estudio constó de cuatro fases. Las fases uno y dos fueron preliminares. La materia prima utilizada (concentrado rico en esteviósidos: CRE) para fase uno es diferente que el utilizado en las fases dos, tres y cuatro. Las extracciones del CRE se realizaron en Everest Foods y los análisis en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ), en la Escuela Agrícola Panamericana. Ambas facilidades con sede en el departamento Francisco Morazán, Honduras. La primera fase, fue de carácter exploratorio y sirvió, a través de pruebas preliminares e investigación literaria, para establecer una técnica de blanqueado que mejor se pudiera ajustar a los límites del LAAZ y deseos de Everest Foods (“natural” y bajo en costo). Para la segunda fase se caracterizó la materia prima y se determinaron parámetros ideales para conducir la técnica de blanqueamiento. La fase tres trata de la optimización de las variables independientes en el blanqueado del extracto a través de metodología de superficie de respuesta, donde se obtuvo los valores óptimos que maximizan el blanqueado del CRE. La cuarta y última fase consistió en la comparación del concentrado de estevia clarificado obtenido con los valores óptimos derivados de fase tres, con un edulcorante comercial blanqueado y el concentrado rico en esteviósidos (CRE) intacto caracterizados en fase dos.

### **Obtención del concentrado rico en esteviósidos.**

**Preparación del extracto acuoso de estevia.** El extracto se preparó con una relación hoja seca: agua del 1:10. Esta relación es conveniente para reducir sólidos solubles pesados y evitar líquidos viscosos que dificulten el filtrado posterior. Se colocó 5 kg de hojas de estevia, secas al sol y mínimamente trituradas en un saco de fibra de polietileno. Las hojas fueron suspendidas y cocidas en una marmita con 60-65 L de agua a 75 °C de temperatura y agitación parcial. Para mejorar eficiencia de extracción, la decocción se repitió tres veces con un solo parámetro modificado, tiempo, que se estableció de tres, dos y media hora por repetición. La triple decocción continua aumenta el rendimiento de obtención de esteviósidos en el producto final (Sevak *et al.* 2014).

Se homogenizaron los caldos de las tres decocciones en un tanque pulmón. Luego de siete horas, el resultado de la decocción de las hojas fueron aproximadamente 180 L de caldo caliente (70 °C) con un pH de entre 5.70 a 5.80 según cocción con coloración pardo olivo, y, hojas cocidas sin la mínima presencia del dulce al gusto.

**Aislamiento y purificación de esteviósidos.** Después de 16 horas, el caldo se encuentra a 31 °C y pH de 5.90. Se traslada a la marmita de decocción, que se conecta por flujo semi-

continuo, a un sistema de separación que consta de dos filtros profundos (arenas y carbón activado) y un filtro laminar de nylon. Se lavaron y purgaron los filtros. La filtración dura 25 minutos y el caldo cae en un tanque pulmón (29 °C, pH de 5.70). Este es un pretratamiento para el uso de las membranas. Se logra remover sólidos suspendidos, escombros celulares, geles promotores de la formación de sustancias poliméricas y materias cerosas. El resultado son aproximadamente 170 L de caldo filtrado, libre de partículas suspendidas aparentes y todavía, de opaco color verde oscuro a 29 °C y 5.90 de pH.

**Proceso de ultra (UF) y nano (NF) filtrado.** El extracto de estevia (170 L) se sometió a UF con una membrana marca General Electric serie PW a base de poliéter sulfona, este es el material deseable para conducir UF. Su CPM es de 10 kDa. Se operó en modo de lotes, con reciclaje completo del rechazo usando la técnica de diafiltración para mantener el flujo y presión constantes. Se trabajó a una presión manométrica de 80 psi lo que garantizó una proporción óptima de salida de rechazo y permeado siendo de 70 y 30%, respectivamente. Se determinó hacer tres reciclajes del rechazo, el resultado fue un líquido amarillento claro, donde se logra eliminar pigmentos, proteínas, almidones y flavonoides de mayor peso molecular que los esteviósidos. El pH del permeado final es de 5.86 y el rechazo todavía posee una cantidad significativa de esteviósidos.

El permeado claro (60 L aproximadamente) se sometió a NF con una membrana marca General Electric serie DK, a base de poliamidas de filmes finamente compuestos, idóneo para los procesos de NF. Su CPM es de 300 Da. Se trabajó a presión manométrica de 100 psi para recolectar una solución altamente concentrada en esteviósidos. Por su peso molecular, en procesos de NF los esteviósidos fluyen a través del rechazo/concentrado y el agua sale evacuada del permeado a una proporción 80:20. De aproximadamente 60 L alimentados a NF, resultaron 4 L de concentrado rico en esteviósidos con un perfil de dulzor deseable, el permeado fueron 56 L de agua incolora y simple que se descartó. El concentrado rico en esteviósidos vuelve a tomar una coloración verde-parda opaca que podría considerarse incluso más oscura que el extracto crudo sin filtrar.

### **Fase 1. Preliminar.**

**Edulcorante comercial blanqueado Santiveri®.** En la primera visita a Everest Foods se evaluaron algunas características de un edulcorante comercial blanqueado. En Honduras no existe edulcorante comercial líquido a base de estevia que este blanqueado en su totalidad. Encontrarse con un producto de este tipo y poder extraer sus características supone un importante punto de partida para el investigador con falta de modelos y conocimiento previo. El edulcorante Santiveri® se encontraba a un pH de 3.20 y poseía dentro de sus ingredientes el ácido cítrico, ambos datos delimitaron los estudios posteriores en fase uno.

**Experimento de la acidificación.** Para determinar el ácido modificador del pH del concentrado en la optimización en fase dos, se evaluó el efecto de siete ácidos en el color del concentrado.

Para el ensayo se usaron ocho tratamientos (siete ácidos y un control). Se destinaron tres viales de 2 mL de concentrado para cada ácido, cada analito se acidificó a un pH estándar de 3.2 usando un potenciómetro Orion 3 STAR marca Thermo Scientific previamente calibrado. El valor de pH se determinó considerando el pH de un edulcorante comercial blanqueado. La cantidad de ácido usada en cada vial fue similar para cada ácido y no superó más de medio gramo por ácido. El cuadro 1 detalla los ácidos utilizados en el ensayo.

Cuadro 1. Ácidos utilizados en el experimento de acidificación.

Ácidos	Marca	Presentación
Barbitúrico	Sigma Aldrich	Polvo
Cítrico	Thomas Scientific	Granular
Benzoico	JT Baker	Granular
D-Isoascórbico	Sigma Aldrich	Polvo
L-Ascórbico	Sigma Aldrich	Polvo
Nitriotriacético	Kodak	Polvo
Tánico	Sigma Aldrich	Polvo

**Análisis del color.** Se llevó a cabo en un colorímetro Hunter L a b Modelo 45/0 en la escala CIELAB mediante el método AN 1018.00. Cada tratamiento se evaluó por triplicado, homogenizando la muestra previo a la lectura y colocando el analito en una taza especial para líquidos. Los resultados se presentaron como la media de 5 mediciones en la escala de triple estímulo ( $L^*a^* b^*$ ) donde:  $L^*$  es luminosidad (0 oscuro y 100 claro);  $a^*$  es escala rojo/verde (-60 verde y +60 rojo) y  $b$  es la escala amarillo/azul (-60 azul y +60 amarillo).

Los valores de los atributos L a b se introdujeron en las ecuaciones 1, 2, 3 y 4, propuestas por Gasmalla *et al.* (2015) y Montoya *et al.* (2012) para derivar otras características del color: matiz ( $H^\circ$ ), índice de blancura (IB) e índice de empardeamiento (IE).

$$H^\circ = \tan^{-1}[b/a] \quad [1]$$

$$IB = 100 - [(100 - L)^2 + a^2 + b^2]^{1/2} \quad [2]$$

$$IE = [100(x - 0.31)]/0.172 \quad [3]$$

Donde:

$$x = (a + 1.75L)/(5.645L + a - 3.012b) \quad [4]$$

Si se solicitara identificar el color de un objeto, la respuesta que se diera seguramente sería el del matiz ( $H^\circ$ ), este representa la percepción del color, se reporta en ángulo y se interpreta cualitativamente (Figura 1).

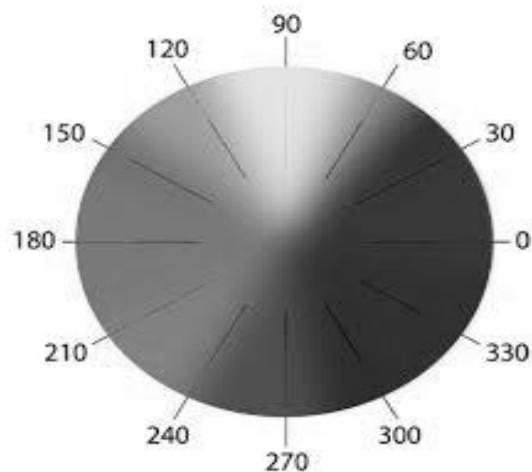


Figura 1. Representación gráfica de la gama de matices según su ángulo.

**Análisis de absorbancia.** La absorbancia de los tratamientos sometidos a acidificación fue medida con un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo GENSYS 5 UV-Visible con el método AOAC 962.13.

**Eficiencia en decoloración.** Se midió absorbancia a 420 nanómetros (nm) como un índice de impurezas de color o eficiencia de decoloración (ED). La (ED) fue calculada al determinar el porcentaje de reducción en la absorbancia de la solución usando la ecuación 5 (Fuh and Chiang 1990).

$$ED (\%) = (A_0 - A_f) / A_0 \times 100 \quad [5]$$

Donde  $A_0$  y  $A_f$  fueron las absorbancias de las muestras a 420 nm antes y después del proceso de acidificación. Para obtener una lectura viable en el espectrofotómetro se diluyó 1 mL de cada tratamiento en 3 mL de agua, sometidos a agitación en vórtex y se realizaron tres repeticiones por tratamiento. La absorbancia inicial fue de 0.608.

**Análisis estadístico.** Se utilizó un análisis de varianzas (ANDEVA) con diseño Completamente al Azar (DCA) más una separación de medias Duncan con nivel de probabilidad del 5% para determinar si existieron diferencias entre los concentrados acidificados y un control intacto, usando atributos y características colorimétricas como variables respuesta. La herramienta de análisis utilizada fue el programa estadístico SAS® versión 9.4.

**Fase 2. Preliminar. Caracterización del edulcorante comercial blanqueado Santiveri® y el CRE intacto.**

**Análisis de color.** Idéntico a fase uno.

**Análisis de densidad.** Se pesó una cantidad en un volumen dado con una pipeta volumétrica. El procedimiento se repitió tres veces a temperatura ambiente. Luego se halló el promedio de las observaciones y se calculó densidad por el cociente de la masa entre el volumen (Rosabal *et al.* 2006).

**Análisis de pH.** Se evaluaron las muestras por medio de un potenciómetro Thermo Scientific Orion 3 STAR mediante el método AOAC 981.12. Se midió por triplicado reportando los resultados para su posterior análisis.

**Comparación colorimétrica entre tratamientos previo y posteriormente acidificados para determinar valor de pH idóneo para conducir el módulo de adsorción.** Para identificar el valor de acidez idóneo al cual el extracto debe ser adsorbido para maximizar el blanqueamiento, se condujo una prueba donde seis viales de 40 mL se acidificaron antes y después de la adsorción, adsorbiéndose en tríos a dos pH distintos: 3.2 y 5.9, acidificando este último luego del módulo de adsorción para estandarizar las muestras. Se utilizaron condiciones del punto central (Cuadro 2) y los parámetros y equipos (Cuadro 4 y 5) descritos en la metodología de la fase tres.

**Análisis de color.** Similar al de fase uno excluyendo el ángulo de tono.

**Análisis estadístico.** Se utilizó un análisis discriminativo de diseño apareado con una prueba T para muestras apareada. La herramienta de análisis utilizada fue el programa estadístico SAS® versión 9.4.

### **Fase 3. Optimización del blanqueamiento del CRE.**

**Diseño experimental.** Para la evaluación de las variables independientes, % de CELITE 545®, % de carbón activado y tiempo de adsorción se aplica una metodología experimental de diseño factorial con método de superficie de respuesta central compuesto de tercer orden con una probabilidad de significancia del 10% (Rodrigues y Iemma 2015). Los parámetros del proceso fueron codificados (-1, 0, 1) y se calcularon de acuerdo a la ecuación 6.

$$xi = ( Xi - \frac{Z}{\Delta xi} ) \quad [6]$$

Dónde:

xi = Valor codificado de la variable xi.

Xi = El valor real de la variable.

Z = Valor real de la variable en el punto central.

$\Delta xi$  = Intervalo de la variable xi.

Este modelo presenta dos niveles de variables axiales, que son codificados como  $+\alpha$  y  $-\alpha$ . El valor alfa depende del número factorial ( $F=2^K$ ) del diseño del número de variables independientes ( $K=3$ ), en el caso de este experimento se define por la ecuación 7.

$$\pm \alpha = (F)^{\frac{1}{4}} = (2^k)^{\frac{1}{4}} = 1.682 \quad [7]$$

El número de tratamientos del experimento se basó en un diseño factorial completo (ecuación 8).

$$n = 2^k + 2k + m \quad [8]$$

Dónde:

$2^k$  = Número de puntos factoriales.

$2k$  = El valor real de la variable.

$m$  = Numero de repeticiones del punto central.

Los tratamientos se distribuyeron de la siguiente forma:

$2^k = 2^3 = 8$  puntos factoriales.

$2k = 2 \times 3 = 6$  puntos axiales.

$m = 6$  repeticiones del punto central.

Total = 20 unidades experimentales.

**Control.** Para este estudio los controles fueron el concentrado intacto rico en esteviósidos (CRE) intacto, resultado de la nano filtración y un edulcorante comercial blanqueado con 8.1% de concentración de rebaudiósido A (análogo de esteviósido).

La amplitud en el rango de las variables se determinó a base de literatura consultada, ensayos preliminares y experiencia del investigador. El punto central se determinó ajustando los resultados reportados por (Rajab *et al.* 2009), (Ding *et al.* 2013) y (Cortés *et al.* 2016) para % de celite, % de carbón activado y tiempo de adsorción. Cabe destacar que cada estudio propone óptimos diferentes, pero, dentro de límites similares. Por lo tanto, fue necesario hacer ajustes tomando en cuenta la novedad del sistema propuesto. Para el análisis de los resultados del estudio el método describe el efecto de la combinación de variables independientes ( $X^k$ ), la variable dependiente o la respuesta ( $Y_i$ ). La respuesta fue en función de los niveles donde las variables independientes fueron combinadas. Definidas por (Rodrigues y Iemma 2015) con la ecuación 9.

$$Y_i = F(X_1, X_2, \dots, X_k) \quad [9]$$

Cada respuesta se ajustó a través de un análisis de regresión lineal con un polinomio cuadrático de las variables ( $X_k$ ) para cada respuesta ( $Y$ ). El término general que se utilizó para predecir el efecto de cada respuesta se describe con la ecuación 10.

$$Y_i = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 + B_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad [10]$$

Donde:

$Y_i$  = Función respuesta;

$X_1, X_2$  = Valores de las variables independientes;

$B_0$  = Coeficiente relativo a la interpretación del plan con la respuesta en el eje;

$B_1, B_2, B_3$  = Coeficientes lineales estimados por el mínimo de cuadrado;

$B_{11}, B_{22}, B_{33}$  = Coeficientes de variables cuadráticas;

$B_{12}, B_{13}, B_{22}$  = Coeficiente de interacción entre las variables independientes;

$\varepsilon$  = Error experimental.

El Cuadro 2 presenta los niveles decodificados para -1, 0, +1 y para los valores axiales ( $-\alpha$  y  $+\alpha$ ) de las variables independientes del experimento.

Cuadro 2. Niveles de variables independientes para el blanqueamiento del concentrado rico en esteviósidos (CRE).

Variables	Niveles				
	-1.682	-1	0	1	+1.682
Celite (%) ( $X_1$ )	0.00	0.30	0.50	0.70	1.00
Tiempo (min) ( $X_2$ )	4.95	7.00	10.00	13.00	15.05
Carbón (%) ( $X_3$ )	0.16	0.50	1.00	1.50	1.84

El cuadro 3 describe los valores reales y codificados del diseño experimental completo con tres variables independientes. Las variables dependientes fueron: Índice de blancura y eficiencia de decoloración.

Cuadro 3. Composición del diseño experimental.

Tratamientos	Niveles Codificados			Niveles Reales		
	Celite (%) $X_1$	Tiempo de adsorción (min) $X_2$	Carbón Activado (%) $X_3$	Celite (%)	Tiempo de adsorción (min)	Carbón Activado (%)
1	-1	-1	-1	0.30	7.00	0.50
2	1	-1	-1	0.70	7.00	0.50
3	-1	1	-1	0.30	13.00	0.50
4	1	1	-1	0.70	13.00	0.50
5	-1	-1	1	0.30	7.00	1.50
6	1	-1	1	0.70	7.00	1.50
7	-1	1	1	0.30	13.00	1.50
8	1	1	1	0.70	13.00	1.50
9	-1.682	-1	0	0.00	7.00	1.00
10	1.682	-1	0	0.50	7.00	1.00
11	0	-1.682	0	0.50	4.95	1.00
12	0	1.682	0	0.50	15.05	1.00
13	0	0	-1.682	0.50	10.00	0.16
14	0	0	1.682	0.50	10.00	1.84
15©	0	0	0	0.50	10.00	1.00
16©	0	0	0	0.50	10.00	1.00
17©	0	0	0	0.50	10.00	1.00
18©	0	0	0	0.50	10.00	1.00
19©	0	0	0	0.50	10.00	1.00
20©	0	0	0	0.50	10.00	1.00

©: Punto central del experimento.



## Ensayo de la adsorción.

**Adsorbato.** El concentrado rico en esteviósidos (CRE) fue suministrado por la empresa Everest Foods usando su depurada técnica de extracción y purificación descrita anteriormente en materiales y métodos.

**Adsorbente.** Se utilizó carbón activado en polvo (PAC) marca Norit®. Este se utiliza en remoción de orgánicos y metales pesados a nivel industrial. (Ribeiro *et al.* 2001), blanqueando un aceite vegetal, determinó que el carbón en polvo tiene mayor afinidad para clorofilas, feofitinas, carotenoides y compuestos fenólicos como hidroperóxidos que sus contrapartes granulares (GAC). Para usarlo en el sistema se lavó con agua destilada y se secó en un horno de aire convectivo a 100 °C por 12 horas (Ortega *et al.* 2013).

Junto al carbón se utilizó CELITE 545®, un filtrante y purificador con capacidad de adsorber lípidos cuticulares y con cierto porcentaje de arcilla activada en su composición, lo que propulsa la eficiencia del carbón activado favoreciendo la retención de partículas en suspensión. Para usarlo en el sistema se hidrató previamente con agua destilada (Rejab *et al.* 2009).

**Estudio en lote.** El cuadro 4 detalla los parámetros de operación estandarizados, ocupados para conducir el módulo de adsorción, con su respectiva bibliografía. La reacción de adsorción se llevó a cabo utilizando agitación magnética en vasos de precipitado (Ribeiro *et al.* 2001). El equipo utilizado se detalla en el cuadro 5.

Cuadro 4. Ajuste de los valores para cada parámetro utilizados en el módulo de adsorción y su justificación.

Parámetros	Valores	Referencias
Volumen del vial (mL)	40	Monte <i>et al.</i> 2015 <sup>§</sup>
Masa de carbón activado (%)	0.16 – 1.84	Ding <i>et al.</i> 2013 <sup>§</sup> Cortés <i>et al.</i> 2016 <sup>§</sup>
Masa de celite (%)	0 – 0.7	Rejab <i>et al.</i> 2009 <sup>§</sup>
Temperatura de adsorción (°C)	25	Cortés <i>et al.</i> 2016 Ortega <i>et al.</i> 2013
pH de adsorbato	3.5	Ensayos preliminares
Velocidad de agitación	10	Máximo permitido
Tiempo de centrifugado (min)	12	Abelyan <i>et al.</i> 2010
Velocidad de centrifugado (rpm)	6,000	Máximo permitido

<sup>§</sup> Valores modificados.

Cuadro 5. Equipo utilizado para conducir adsorción.

<b>Equipo</b>	<b>Marca/Modelo</b>
Potenciómetro	Thermo Scientific/ Orion 3STAR
Agitador de plancha caliente	Thermo Scientific/Cimarec
Centrifuga	VWR/Symphony 4417R
Cronómetro	Thomas Scientific/NIST Traceable
Balanza	OHAUS/Adventurer
Bomba de vacío	BUCHI/V-710
Filtros	Whatman/1002042 Grade 2
Horno de secado	Fisher Scientific/13-247-750F

**Análisis de pH.** Se evaluaron las muestras por medio de un potenciómetro Thermo Scientific Orion 3 STAR mediante el método AOAC 981.12. Se midió por triplicado reportando los resultados para su posterior análisis.

**Análisis de densidad.** Se pesó una cantidad en un volumen dado con una pipeta volumétrica. El procedimiento se repitió tres veces a temperatura ambiente. Luego se halló el promedio de las observaciones y se calculó densidad por el cociente de la masa entre el volumen (Rosabal *et al.* 2006).

**Análisis de color.** Se utilizó la misma metodología empleada en fase uno omitiendo el análisis del ángulo de matiz (H°).

**Análisis de absorbancia.** Se utilizó la misma metodología empleada en fase uno utilizando un espectrofotómetro diferente (Agilet Technologies Carry 8454 UV-VIS) calibrado con un blanco de agua destilada.

**Análisis estadístico.** Se utilizó el programa Statistica versión 7.0 para analizar las variables independientes, obtener los coeficientes de regresión y los valores para la elaboración de gráficos de superficie de respuesta. Para denominar al modelo predictivo en la interpretación de datos,  $R^2$  debe ser mayor a 0.7 y la falta de ajuste no debe ser significativa. De incumplirse cualquiera de estos parámetros el modelo se considera tendencioso y no predictivo (Rodrigues y Iemma 2015). De igual forma se realizó un análisis de varianza (ANOVA) empleando una prueba F con 10% de nivel de significancia, por lo que un modelo de regresión es significativo cuando el valor F calculado es mayor o igual que el F tabular, mientras mayor sea el F calculado más predictivo será el modelo.

#### **Fase 4. Comparación del concentrado clarificado bajo condiciones óptimas versus edulcorante comercial blanqueado Santiveri®, CRE intacto y tratamientos del punto central.**

**Análisis de color, densidad y acidez (pH).** Se utilizó la misma metodología empleada en fase uno.

**Análisis estadístico.** Se utilizó la misma metodología empleada en fase uno. Análisis de varianza (ANDEVA) más una separación de medias Duncan para establecer diferencias significativas.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Fase 1. Preliminar.

**Efecto de la acidificación en color.** Los atributos del color del concentrado y las características derivadas de ellos (Cuadro 6) fueron, en su amplia mayoría, significativamente influenciados por el tratamiento con los distintos ácidos ( $P < 0.05$ ).

Después de la acidificación la mayoría de los valores del atributo  $L^*$  de los tratamientos aumentan en comparación al control (16.87), esto es testigo directo del efecto del pH en la degradación de compuestos fenólicos y clorofilas e indica un clarificado en la superficie del color del concentrado (Yang *et al.* 2014). Para el atributo  $L^*$  podemos aislar al ácido cítrico como el que “más claro” dejó el concentrado con un valor de 68.74 (Cuadro 6).

En comparación al atributo  $a^*$  del concentrado intacto (4.89) todos los ácidos arrastran los valores hacia el negativo, esto indica pérdida de presencia de color rojo en el concentrado. Este fenómeno se atribuye a la isomerización y degradación (principalmente en los doble enlaces) que sufren los carotenoides al acidificarse; a medida que la cantidad de doble enlaces aumenta, también la longitud de onda adsorbida resultando en tonalidades más rojizas (de la Rosa *et al.* 2010) Para el atributo  $a^*$ , cinco ácidos influyeron de igual forma en la pérdida del rojo significativamente, por lo tanto, si tuviéramos que escoger el ácido en base a los valores de  $a^*$ , escogeríamos cualquiera con la letra d de la agrupación Duncan, entre ellos, el cítrico (Cuadro 6).

Para  $b^*$  (escala amarillo/azul) con un valor inicial de 7.71, la mayoría de las muestras aumentaron su valor, o sea, se ganó color amarillo y se perdió color azul, acercándose entonces a la claridad. El amarillo en el compuesto ácido son las clorofilas de color verde degradándose por pérdida del ion magnesio a feofitinas, estas, imparten un color amarillo pardo o café (Koca *et al.* 2007) (Cuadro 6).

En las características derivadas las muestras sin tratar tienen valores iniciales de matiz ( $H^\circ$ ), índice de emparedamiento (IE) e índice de blancura (IB) de 57.40, 81.04, y 16.36 respectivamente.

Cuadro 6. Comparación de medias para el efecto de siete ácidos en atributos y características del color del concentrado de estevia a un pH estándar de 3.2.

Ácido	L*	a*	b*	H°	IE <sup>φ</sup>	IB <sup>φ</sup>
Barbitúrico	63.87 <sup>d</sup>	-2.89 <sup>d</sup>	26.10 <sup>a</sup>	96.20 <sup>bc</sup>	46.63 <sup>b</sup>	55.33 <sup>e</sup>
Cítrico	68.74 <sup>a</sup>	-3.00 <sup>d</sup>	17.12 <sup>e</sup>	99.80 <sup>b</sup>	24.26 <sup>f</sup>	64.23 <sup>a</sup>
Benzoico	4.85 <sup>f</sup>	-0.54 <sup>b</sup>	1.95 <sup>g</sup>	104.00 <sup>a</sup>	41.21 <sup>bc</sup>	4.82 <sup>g</sup>
D-Isoascórbico	67.37 <sup>bc</sup>	-2.94 <sup>d</sup>	21.68 <sup>bc</sup>	97.80 <sup>bc</sup>	33.93 <sup>ed</sup>	60.71 <sup>c</sup>
L-Ascórbico	67.96 <sup>ab</sup>	-2.89 <sup>d</sup>	19.79 <sup>d</sup>	98.20 <sup>bc</sup>	29.86 <sup>ef</sup>	62.22 <sup>b</sup>
Nitriotriacético	66.63 <sup>c</sup>	-2.72 <sup>d</sup>	21.20 <sup>c</sup>	97.20 <sup>bc</sup>	33.66 <sup>ed</sup>	60.37 <sup>c</sup>
Tánico	63.52 <sup>d</sup>	-1.87 <sup>c</sup>	22.08 <sup>b</sup>	94.80 <sup>c</sup>	38.72 <sup>cd</sup>	57.32 <sup>d</sup>
Control	16.87 <sup>e</sup>	4.89 <sup>a</sup>	7.71 <sup>f</sup>	57.40 <sup>d</sup>	81.04 <sup>a</sup>	16.36 <sup>f</sup>
CV (%)	1.74	9.22	2.41	2.71	14.47	1.86

<sup>a-g</sup> Las medias con diferente letra minúscula en la misma columna, indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

H°: Ángulo de matiz.

<sup>φ</sup> Escala adimensional.

IE: Índice de empardeamiento.

IB: Índice de blancura.

CV: Porcentaje de coeficiente de variación.

El ángulo de matiz sirvió para examinar algún cambio significativo en la gama del color que cualquier ácido pudiera generar con respecto a otro. Todos los ácidos se movieron de colores rojos (ángulos de entre 30 a 60 grados) hacia amarillo (90 a 115 grados) (Figura 1), encontrándose similitudes con los comportamientos de los atributos a\* y b\*. Ninguno de los ácidos denotó un movimiento de color brusco hacia otro color, por lo tanto, el ángulo de matiz (H°) no se usara en fase dos del estudio.

El índice de empardeamiento (IE) se redujo con todos los ácidos siendo el ácido cítrico el que más logro disminuir este factor (Cuadro 6). Al contrario, todos los ácidos aumentaron el índice de blancura (IB) del concentrado control, siendo otra vez el ácido cítrico el de mayor significancia en elevar este índice.

Guerrero *et al.* (1995) preservando puré de banano y posteriormente Yang *et al.* (2014) caracterizando un edulcorante a base de esteviósidos identificaron al IE y al atributo L\* como los factores más importantes para inferir sobre el acontecer del color en sus estudios, así mismo, tomando en cuenta la necesidad de blanquear el producto final en nuestro estudio, el IB surge como otro argumento relevante. Si tuviésemos que escoger un ácido en base a los atributos y características colorimétricas, escogeríamos el ácido cítrico según los argumentos antes expuestos.

**Efecto de la acidificación en la eficiencia en decoloración (ED).** En cuanto al porcentaje en ED los ácidos que mejor clarificaron el extracto fueron el D- Isoascórbico y cítrico (Cuadro 7). La menor absorbancia es reportada por el ácido cítrico, nitriotriacético y D-Isoascórbico. El porcentaje de decoloración presentado por los mejores ácidos (78%) fueron mayores que los presentados por Gasmalla *et al.* (2015) al usar polímeros

precipitantes. En su estudio él denomina a este porcentaje como remoción del color y sus mejores resultados rondan el 65%.

Cuadro 7. Comparación de medias para absorbancia final ( $A_f$ ) y porcentaje de eficiencia en decoloración (ED) obtenida con siete ácidos. Absorbancia inicial de 0.608 a 420 nanómetros.

Ácido	$A_f^{\varphi}$	ED (%)
Barbitúrico	0.166 <sup>ab</sup>	72 <sup>bc</sup>
Cítrico	0.136 <sup>c</sup>	77 <sup>a</sup>
Benzoico	0.178 <sup>a</sup>	70 <sup>c</sup>
D-Isoascórbico	0.133 <sup>c</sup>	78 <sup>a</sup>
L-Ascórbico	0.154 <sup>bc</sup>	74 <sup>ab</sup>
Nitriotriacético	0.153 <sup>c</sup>	74 <sup>ab</sup>
Tánico	0.173 <sup>ab</sup>	71 <sup>bc</sup>
<b>CV (%)</b>	<b>7.38</b>	<b>2.55</b>

<sup>a-c</sup> Las medias con diferente letra minúscula en la misma columna, indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

<sup>ϕ</sup> Escala adimensional.

CV: Porcentaje de coeficiente de variación.

A diferencia de eficiencia en decoloración, Fernandes *et al.* (2001) denominaron porcentaje de despigmentación a la incidencia de su tratamiento en la absorbancia de su extracto a 420 nanómetros. En su estudio, donde clarifican con una resina ácida de cactus *Cereus peruvianus*, obtienen hasta 95% de ED, porcentaje más alto que cualquier eficiencia de los ácidos de nuestro estudio (Cuadro 7). A diferencia de Gasmalla *et al.* (2015) que utilizan pH más altos, Fernandes *et al.* (2001) trabajan con pH de 3 muy similar al de nuestro estudio.

La multiplicidad de estudios y la importancia de la ED en ellos la suponen como un factor pivotal al escoger nuestro ácido. Dada la influencia del ácido cítrico en los parámetros colorimétricos y espectrofotométricos podemos aislarlo como el ácido a usar en nuestro sistema de blanqueamiento (módulo de adsorción).

## Fase 2. Preliminar.

### Caracterización del edulcorante comercial blanqueado Santiveri® y el CRE intacto.

En alimentos, caracterizar un producto final deseable y la materia prima utilizada resulta fundamental para estimar cuan certeros hemos sido al escoger un procesamiento para nuestra materia prima. Permite comparar y denotar cuanto nos estamos acercando al producto que queremos y resulta un punto de partida para justificar el comportamiento que un procesamiento cualquiera ha tenido sobre el producto inicial (Chariguaman 2015). Y es que es en demasía conocido sobre los cambios físicos y químicos que un procesamiento por acidificación y posterior exposición a tierras adsorbentes suponen en extractos acuosos

(Ribeiro *et al.* 2001). Esta caracterización sirvió para establecer comparaciones en fase cuatro con el producto optimizado. En el cuadro 8 se detalla la caracterización del edulcorante Santiveri® y el CRE intacto.

Cuadro 8. Compendio de parámetros: tres atributos y tres características colorimétricas más densidad y valor de acidez (pH) del edulcorante comercial blanqueado Santiveri® y el CRE intacto.

Producto	Parámetros							
	L*	a*	b*	H°	IE <sup>º</sup>	IB <sup>º</sup>	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	pH
Stevia Santiveri®	81.65	-1.64	1.45	139	0.28	81.52	1.0323	4.13
CRE	6.46	1.38	4.54	73	124.87	6.34	1.0088	5.90

CRE: Concentrado rico en esteviósidos.

H°: Ángulo de matiz.

º Escala adimensional.

IE: Índice de empardeamiento.

IB: Índice de blancura.

Los valores de L\* indican la claridad de un objeto, mientras más altos más claro el objeto. En nuestro estudio se desean más altos, similares a los del edulcorante comercial blanqueado (81.65). Los valores de a\* representan la escala rojo/verde, de ser positivos son rojos y de ser negativos son verdes. En nuestro estudio se necesita que tiendan a cero pues un blanco ideal exhibe valores de cero en la cromaticidad a\*. La escala de amarillo/azul es representada por los valores de b\* en nuestro estudio se prefiere valores de b\* positivos (amarillos) de preferencia que se acerquen a cero (Cuadro 8).

El ángulo de matiz (H°) advierte sobre cambios en la tonalidad real del color, en nuestro estudio se desean valores similares a los del edulcorante comercial blanqueado. Los valores de índice de empardeamiento (IE) se desean lo más bajo posible y los valores de índice de blancura deben de ser lo más alto posible para acercarnos al blanco ideal (Cuadro 8)

En cuanto a los valores de densidad obtenidos no hay mucha variación entre el CRE y el edulcorante comercial blanqueado. Se espera que no haya cambios significativos de la densidad pues se desea una densidad similar a la del agua 1 g/cm<sup>3</sup> (Cuadro 8).

#### **Comparación colorimétrica entre tratamientos previo y posteriormente acidificados para determinar valor de acidez (pH) idóneo del adsorbato en el módulo de adsorción.**

El cuadro 9 indica diferencias significativas  $P < 0.05$  para los atributos de color L\* y a\* y para las características índice de empardeamiento (IE) e índice de blancura (IB).

Para el tratamiento que se adsorbió a 3.2 de valor de acidez (pH) los valores de luminosidad fueron significativamente mayores que el tratamiento que se adsorbió a 5.9 y solo después de adsorbido se acidifico a 3.5. Esto indica que el tratamiento de acidificación previa fue

más claro (Cuadro 9). Para la escala rojo/verde ( $a^*$ ) ambos tratamientos se consideran dentro de la tonalidad roja, no obstante, el tratamiento previamente acidificado reduce más la incidencia del color rojo en el concentrado que el de posterior acidificación, y además, entrega valores de  $a^*$  más parecidos a los del edulcorante comercial blanqueado Santiveri® (-1.64) (Cuadro 8). En tanto a la escala amarillo/azul ( $b^*$ ) ambos tratamientos se encuentran en la tonalidad amarilla mas no se encuentra diferencia significativa entre ellos  $P < 0.05$  (Cuadro 9).

Más adelante, el índice de empardeamiento (IE) del tratamiento previamente acidificado es significativamente menor que el que se acidifico posterior a la adsorción (Cuadro 9). El IE indica que en el tratamiento previamente acidificado hay menor incidencia del color café. Por último, el Índice de blancura (IB) del tratamiento previamente acidificado logra acercarse más al blanco ideal con respecto al que se acidifico posterior a la adsorción.

Tomando en cuenta la superioridad que destacó el tratamiento previamente acidificado versus el acidificado posteriormente en los atributos y características del color (Cuadro 9), determinamos que el pH idóneo para conducir el módulo de adsorción a optimizar en fase tres debe ser ácido y similar a 3.2.

La razón por la cual el tratamiento adsorbido a valores de acidez más bajos denota un perfil de clarificación más deseable, es atribuible al hecho de que el perfil poroso de las tierras diatomeas (celite) aumenta, según aumente la proporción de ácidos orgánicos leves con los que interactúa, esto surte un fenómeno denominado fresado químico en los poros silicios, aluminios y férricos del celite lo que significa que estos se expanden otorgando mayor área superficial para retener impurezas (Janson 2011, Tsai *et al.* 2006).

Cuadro 9. Probabilidades, medias y desviación estándar de los atributos y características colorimétricas entre los tratamientos de acidificación previa y posterior a la adsorción.

Tratamiento	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$IE^\varphi$	$IB^\varphi$
	Media $\pm$ DE				
Previo	60.59 $\pm$ 0.16	3.47 $\pm$ 0.15	46.30 $\pm$ 0.26	128.87 $\pm$ 0.71	39.07 $\pm$ 0.11
Posterior	53.51 $\pm$ 4.24	5.86 $\pm$ 0.17	51.32 $\pm$ 0.16	183.87 $\pm$ 0.68	31.77 $\pm$ 0.08
Pr >  t	0.0188 <sup>§</sup>	0.0001 <sup>§</sup>	0.1827	0.0001 <sup>§</sup>	0.0001 <sup>§</sup>

DE: Desviación estándar.

<sup>§</sup> Diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

<sup>ϕ</sup> Escala adimensional.

IE: Índice de empardeamiento.

IB: Índice de blancura.

### Fase 3. Optimización del blanqueamiento del CRE.

**Valoración general.** Los 20 tratamientos fueron conducidos de forma estándar tomando en cuenta las condiciones y parámetros descritos en la metodología contenida en el cuadro 4 y 6 respectivamente.



**Análisis de densidad.** Del análisis para densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) se obtiene un coeficiente de variación mayor al 70% ( $R^2 = 0.76$ ), esto indica que el 76% de los datos se ajustan al modelo estadístico y solo un 24% de los datos no logran ser explicados por el modelo (Cuadro 10).

Cuadro 10. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y  $R^2$  de un modelo de regresión polinomial, aplicado a la densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) del concentrado clarificado de estevia.

<b>Variable</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>P</b>
Intercepto	1.02E + 00	1.36E - 14 $\Phi$
X <sub>1</sub> (L)	-1.21E - 03	1.40E - 01
X <sub>1</sub> (Q)	-2.05E - 03	2.49E - 02 $\Phi$
X <sub>2</sub> (L)	-1.37E - 04	8.34E - 01
X <sub>2</sub> (Q)	-2.48E - 03	1.28E - 02 $\Phi$
X <sub>3</sub> (L)	-3.87E - 04	5.66E - 01
X <sub>3</sub> (Q)	-1.08E - 03	1.43E - 01
X <sub>1</sub> ×X <sub>2</sub>	-1.04E - 03	1.95E - 01
X <sub>1</sub> ×X <sub>3</sub>	-1.10E - 03	2.39E - 01
X <sub>2</sub> ×X <sub>3</sub>	-2.75E - 03	2.06E - 02 $\Phi$
<b>Falta de ajuste</b>	2.23E - 01	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.76	
<b>F. Calculado</b>	7.3315	
<b>F. Tabular</b>	2.46	

X<sub>1</sub> = celite (%); X<sub>2</sub> = tiempo de adsorción (min), X<sub>3</sub> = carbón activado (%).

L = Efecto lineal; Q = Efecto cuadrático.

$\Phi$  Significativo (P < 0.10).

La falta de ajuste (Cuadro 10) no fue significativa por lo que el modelo se perfila para ser predictivo (Rodrigues y Iemma 2015). La expresión matemática que representa la densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) incluyó las variables independientes significativas para predecir las tendencias o comportamientos de las variables respuesta o dependientes. Esta predicción se expresa mediante la ecuación 11:

$$\text{Densidad} \left( \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right) = 1.0155804 - 0.002054X_1^2 - 0.002475X_2^2 - 0.002750X_2 \times X_3 \quad [11]$$

Para tener mayor certeza en clasificar al modelo como predictivo o tendencioso se condujo una prueba F con 10% de significancia obteniendo un valor F calculado mayor al F tabular. Este último parámetro combinado con un  $R^2$  mayor al 70% y una falta de ajuste no significativa indican que el modelo es predictivo (Cuadro 10). El que F calculado sea mayor que F tabular indica que existe validez en los datos para generar gráficas. En base al modelo (Ecuación 11) se crearon gráficos de superficie de respuesta, donde se muestra el cambio en densidad sobre el aumento o disminución del porcentaje de carbón activado y tiempo en minutos (Figura 2) y también del cambio en tiempo de adsorción (min) y porcentaje de celite (Figura 3).

La relación grafica existente entre la interacción de las variables tiempo de adsorción ( $X_2$ ) y porcentaje de carbón activado ( $X_3$ ) tiene la forma de un punto silla (Figura 2), este se entiende de forma que la multitud de interacciones comprenden un área más grande del “vecindario” o región experimental que no está completamente delimitada. Así se describe que cuando la variable tiempo de adsorción se encuentra entre 12 y 8 minutos se maximiza la densidad estando el carbón activado entre 0.8 y 1.2% y decrece al aumentar la cantidad de tiempo.

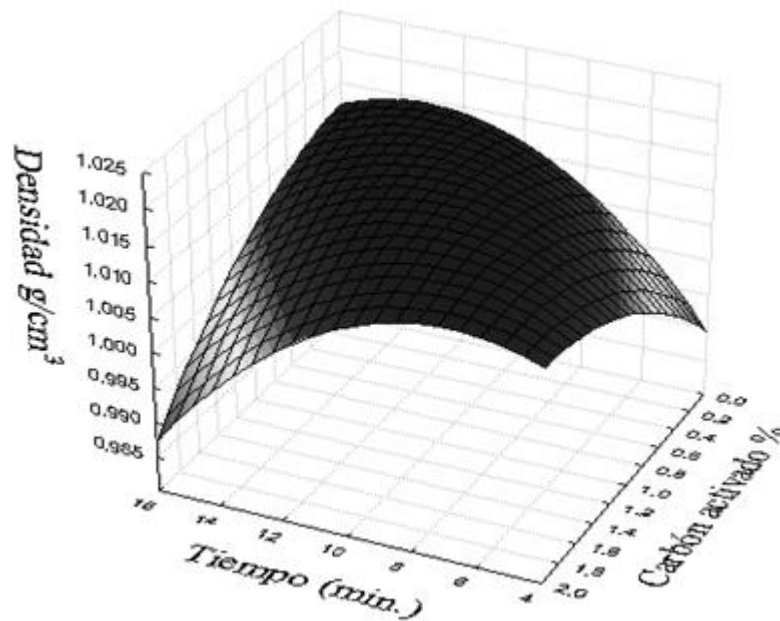


Figura 2. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de carbón activado sobre la densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) del concentrado clarificado de estevia.

Por el análisis de superficie de respuesta generado por el modelo (Figura 3) se puede observar que los valores de densidad más altos se obtuvieron bajo las condiciones del punto central para las variables independientes tiempo de adsorción (min) y porcentaje de celite, que son, 10 minutos y 0.5% respectivamente. Esto significa que se encontraron las condiciones de operación más apropiadas para tiempo de adsorción y porcentaje de celite en el módulo de adsorción, esto ayudara a reducir los costes finales de procesamiento ya que un menor número de pruebas son necesarias para obtener densidades idóneas (Rodrigues y Iemma 2015). Nótese la similitud de los valores obtenidos con la densidad del agua ( $1 \text{ g}/\text{cm}^3$ ). Estos resultados son deseables pues se sabe que el principal mercado para los edulcorantes de estevia son las bebidas no alcohólicas aromatizadas (DOUE 2011) cuyo principal ingrediente es el agua (Moreiras *et al.* 2016), por lo tanto, es plausible afirmar que usar este concentrado como edulcorante no interfiere con el perfil tecnológico de una bebida comercial de esta categoría en cuanto al perfil reológico concierne.

En la Figura 3 cabe destacar que de necesitarse disminuir la densidad del edulcorante final, le resulta más barato al ingeniero aumentar el tiempo de adsorción y no el porcentaje de

celite, pues, aunque la magnitud de sus coeficientes de regresión denota harta similitud en disminuir la densidad del edulcorante, es la variable tiempo de adsorción preponderante en este sentido.

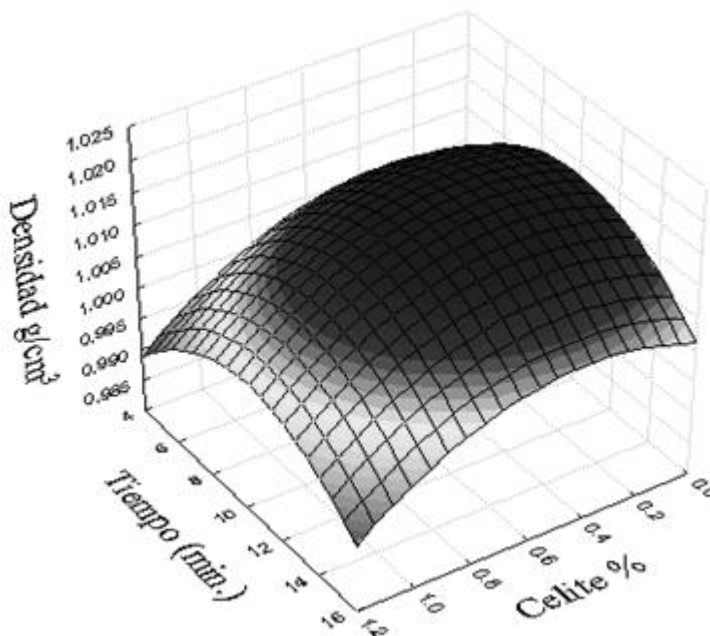


Figura 3. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de celite sobre la densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) del concentrado clarificado de estevia.

**Análisis de acidez.** Todas las variables independientes afectaron significativamente el valor de acidez (pH) del concentrado (Cuadro 11). Todas presentan coeficientes de regresión positivos, es decir, el aumento de estas variables aumenta el valor de acidez del concentrado.

El  $R^2$  de la variable acidez del concentrado indica que un 88% de las observaciones fueron predichas o ajustadas por el modelo, y solo 12% no se logran explicar mediante el análisis (Cuadro 11). Esto implica que las respuestas dentro de la región experimental delimitada son predictivas considerando solo el coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

Cuadro 11. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y R<sup>2</sup> de un modelo de regresión polinomial, aplicado al pH del concentrado clarificado de estevia.

Variable	Coefficiente	P
Intercepto	3.81E + 00	1.56E - 10Φ
X <sub>1</sub> (L)	7.67E - 02	6.13E - 03Φ
X <sub>1</sub> (Q)	3.20E - 02	9.90E - 02Φ
X <sub>2</sub> (L)	4.66E - 02	2.72E - 02Φ
X <sub>2</sub> (Q)	5.75E - 02	1.53E - 02Φ
X <sub>3</sub> (L)	6.68E - 02	7.34E - 03Φ
X <sub>3</sub> (Q)	-4.86E - 03	7.61E - 01
X <sub>1</sub> ×X <sub>2</sub>	-2.92E - 02	1.44E - 01
X <sub>1</sub> ×X <sub>3</sub>	-2.75E - 02	2.29E - 01
X <sub>2</sub> ×X <sub>3</sub>	3.00E - 02	1.95E - 01
<b>Falta de ajuste</b>	4.20E - 01	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.88	
<b>F. Calculado</b>	10.1710	
<b>F. Tabular</b>	2.31	

X<sub>1</sub> = celite (%); X<sub>2</sub> = tiempo de adsorción (min), X<sub>3</sub> = carbón activado (%).

L = Efecto lineal; Q = Efecto cuadrático.

Φ Significativo (P < 0.10).

La falta de ajuste no fue significativa por lo que el modelo se perfila para ser predictivo (Rodrigues y Iemma 2015). La expresión matemática que representa la acidez (pH) incluyó las variables independientes significativas para predecir las tendencias o comportamientos de las variables respuesta o dependientes (Ecuación 12).

$$\text{Acidez (pH)} = 3.813152 + 0.076652X_1 - 0.076652X_1^2 + 0.046640X_2 + 0.057484X_2^2 + 0.066795X_3 \quad [12]$$

La prueba F (P < 0.10) resulto en un F calculado mayor al tabular. Este último parámetro nos permite delimitar el modelo como predictivo y valida el uso de gráficas. En base al modelo (Ecuación 12) se crearon gráficos de superficie de respuesta (Figura 4, 5 y 6) donde se muestra el comportamiento de las variables independientes significativas. Nótese la falta de significancia en las interacciones entre variables (Cuadro 11), esto indica que el nivel de una variable (sea X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, o X<sub>3</sub>) no afecta el nivel de la otra y sus efectos en el pH son independientes.

Las figuras 4, 5 y 6 muestran que todos los valores de pH bajo las condiciones estudiadas se mantuvieron en un rango de entre 3.6 hasta 4.1. Estos valores son deseables pues se mantienen dentro de los límites de pH encontrados en el edulcorante comercial Santiveri®. El pH de este edulcorante comercial se analizó en fase uno siendo de 3.2 y posteriormente se evaluó otro de distinto lote en fase dos con un valor de acidez de 4.13. Desde este punto de vista el concentrado clarificado por adsorción se perfila como comercialmente viable. Más adelante, la asociación dental americana (ADA) menciona que un 93% de las bebidas no alcohólicas aromatizadas en el mercado estadounidense tienen un pH menor a 4 (Reddy

*et al.* 2016), similar a los obtenidos en este estudio. Nótese que esta categoría de bebidas supone el mercado más importante para los edulcorantes de estevia (DOUE 2011). Esto permite afirmar que el concentrado clarificado no entorpecerá el perfil tecnológico de estas bebidas. De acuerdo a López (2017), quien evaluó 341 productos endulzados en el mercado hondureño, hasta un 60% de estos son de procedencia estadounidense; este patrón contextualiza mejor este argumento.

Estas bebidas no alcohólicas aromatizadas se endulzan principalmente con azúcares extrínsecos de la leche como fructosa, sacarosa y glucosa. Dichos azúcares tienen un alto poder cariogénico debido al perfil de sus carbohidratos. Estos se depositan en los surcos de los dientes, funcionando como sustrato para el desarrollo de bacterias degradativas de la masa dental principalmente de las especies estreptococos y lactobacilos (Mishra y Mishra 2011). Estas lesiones orales tienen una fuerte correlación con enfermedades como diabetes (Malvania *et al.* 2016). Con edulcorantes a base de esteviósidos se logra una ventaja al desarrollar estas bebidas, pues estudios *in vitro* han demostrado su propiedad antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus*; esta propiedad se debe a la disminución en la incidencia de polímeros solubles bacterianos (Cortés *et al.* 2016).

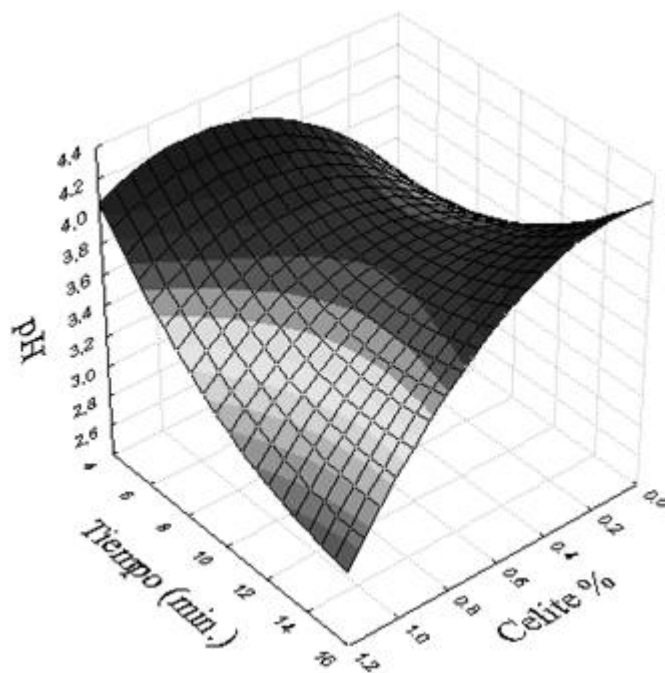


Figura 4. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de celite sobre el valor de acidez (pH) del concentrado clarificado de estevia.

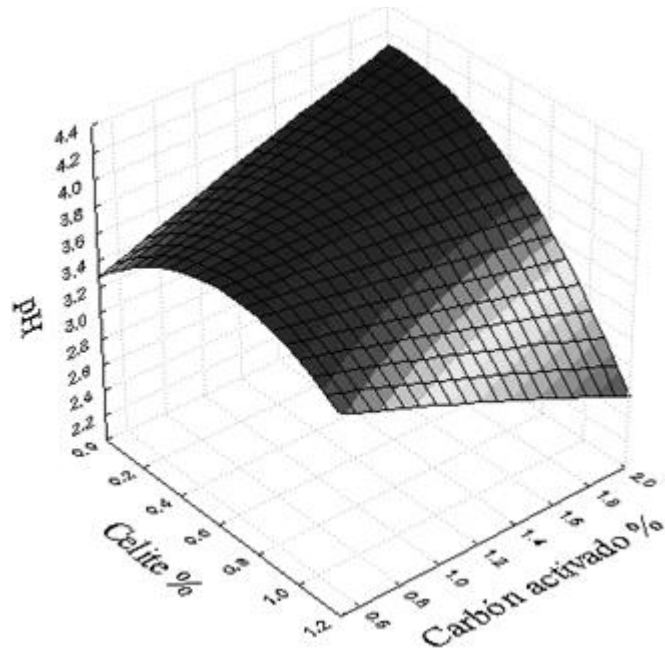


Figura 5. Efecto del porcentaje de celite y porcentaje de carbón activado sobre el valor de acidez (pH) del concentrado clarificado de estevia.

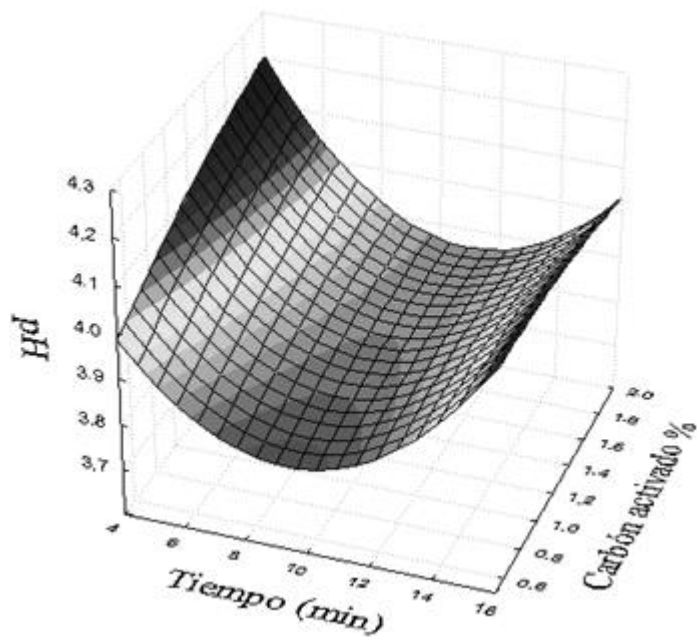


Figura 6. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de carbón activado sobre el valor de acidez (pH) del concentrado clarificado de estevia.

**Atributo L\*.** Ninguna de las variables estudiadas presento significancia ( $P > 0.10$ ) (Cuadro 12), no obstante, se muestra interacción entre el porcentaje de celite y tiempo de adsorción, lo que significa que el nivel de una variable fue afectado dependiendo del nivel de la otra. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) demuestra que un 55% de las observaciones fueron ajustadas por el modelo, y 45% no se logran explicar mediante el análisis (Cuadro 12). Esto implica que las respuestas dentro de la región experimental delimitada son de carácter tendencioso ya que se tiene un  $R^2$  menor a 70%.

Cuadro 12. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y  $R^2$  de un modelo de regresión polinomial, aplicado al atributo de color L\* del concentrado clarificado de estevia.

<b>Variable</b>	<b>Coficiente</b>	<b>P</b>
Intercepto	5.27E + 01	1.61E - 06 $\Phi$
X <sub>1</sub> (L)	2.17E + 00	2.03E - 01
X <sub>1</sub> (Q)	-1.09E + 00	4.67E - 01
X <sub>2</sub> (L)	-2.21E - 01	8.74E - 01
X <sub>2</sub> (Q)	-5.90E - 01	6.91E - 01
X <sub>3</sub> (L)	-1.91E + 00	2.17E - 01
X <sub>3</sub> (Q)	2.96E - 01	8.33E - 01
X <sub>1</sub> ×X <sub>2</sub>	3.50E + 00	6.49E - 02 $\Phi$
X <sub>1</sub> ×X <sub>3</sub>	-5.78E - 01	7.57E - 01
X <sub>2</sub> ×X <sub>3</sub>	3.16E + 00	1.33E - 01
<b>Falta de ajuste</b>	4.97E - 01	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.55	
<b>F. Calculado</b>	5.4468	
<b>F. Tabular</b>	3.01	

X<sub>1</sub> = celite (%); X<sub>2</sub> = tiempo de adsorción (min), X<sub>3</sub> = carbón activado (%).

L = Efecto lineal; Q = Efecto cuadrático.

$\Phi$  Significativo ( $P < 0.10$ ).

El modelo se estima tendencioso a pesar de encontrar una falta de ajuste no significativa (Cuadro 12) (Rodrigues y Iemma 2015). La expresión matemática que representa el atributo L\* se expresa mediante la ecuación 13 basado en los resultados significativos del Cuadro 13.

$$\text{Atributo L}^* = 52.65652 + 3.49654X_1 \times X_2 \quad [13]$$

La prueba de significancia ( $P < 0.10$ ) resulto en un F calculado mayor al tabular. Este último parámetro nos permite validar el uso de gráficas. En base al modelo (Ecuación 13) se creó un gráfico de superficie de respuesta (Figura 7).

El gráfico de superficie de respuesta de la Figura 7 para luminosidad (L\*) describe aumento en la claridad del concentrado basado en el aumento del tiempo y porcentaje de celite en conjunto. Los valores más altos de luminosidad se obtienen en los puntos axiales (+ $\alpha$ ) del

estudio 15.05 minutos de tiempo de adsorción y 1% de celite. Esta claridad, guarda una fuerte correlación con el índice de blancura de los productos y el acercamiento a un blanco ideal (Hirschler 2012). Aumentarla se considera altamente deseable en el edulcorante comercial, dado que se necesita que este no interfiera con el color de una bebida o un alimento en específico donde se emplee.

Debido al esquema tendencioso de este modelo debemos de ser conservadores al comparar nuestros resultados con los demás estudios. Tomando en cuenta esta premisa, es válido decir que los valores obtenidos se encuentran arriba de 50, dichos valores son hasta 50% más altos que los reportados por Gasmalla *et al.* (2015) quienes usando diferentes poderes y tiempos de sonicación reportan valores de  $L^*$  de 26 como promedio sin pasar nunca de 27 en algún tratamiento.

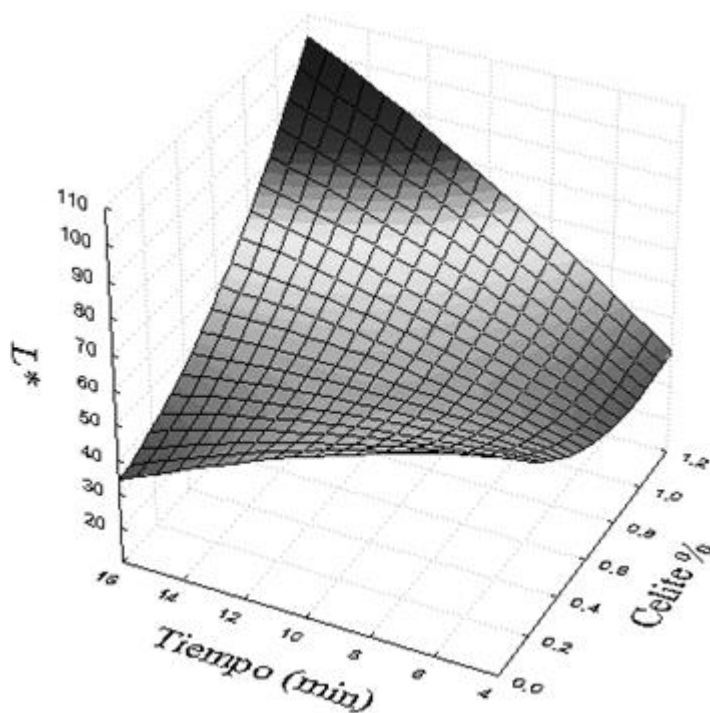


Figura 7. Efecto del porcentaje de celite y tiempo de adsorción en minutos sobre el atributo de color  $L^*$  en el concentrado clarificado de estevia.

El efecto sinérgico entre estas dos variables ( $X_1$ ,  $X_2$ ) para aumentar la claridad del concentrado, curiosamente se explica integrando a la variable ( $X_3$ ) en la línea de análisis. Y es que la tasa de desorción de impurezas que el carbón activado pueda experimentar a medida que aumenta el tiempo de contacto adsorbato-adsorbente (debido al debilitamiento progresivo de los puentes iónicos que unen las impurezas a la superficie del carbón) puede ser disminuida por las arcillas presentes en el celite (sílices amorfas principalmente cristobalitas) capaces de depositarse en la red porosa del carbón, formando nuevos sitios de interacción y ensanchando los ya existentes micro y meso poros para aumentar la capacidad



de retención del carbón (Marrakchi *et al.* 2017). Es por eso que a mayor cantidad de celite más se puede extender el tiempo de adsorción para obtener resultados deseables.

**Atributo a\***. Este valor expresa la escala de rojo/verde, en cuanto más bajo es el valor mayor es la pérdida del indeseado color rojo. Los coeficientes de regresión obtenidos (Cuadro 13) indican que las variables independientes que afectan a la respuesta analizada son el porcentaje de celite (linear) y el porcentaje de carbón activado (cuadrático); un aumento en cualquiera de los dos disminuiría los valores de a\*, siendo el carbón activado, en su expresión cuadrática, el que más afectaría el valor a\*. Esta premisa resulta interesante al ingeniero que trata de reducir costos, pues, si se tratase exclusivamente de reducir el atributo a\*, sabrá que es preferible aumentar una unidad de carbón activado en relación a celite por el defecto cuadrático del primero.

Más adelante el R<sup>2</sup> del atributo a\* denota un apego de los datos al modelo del 77% y un valor de F calculado apenas mayor que el F tabular, esto, más una falta de ajuste no significativa valida al modelo como predictivo.

Cuadro 13. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y R<sup>2</sup> de un modelo de regresión polinomial, aplicado al atributo de color a\* del concentrado clarificado de estevia.

<b>Variable</b>	<b>Coficiente</b>	<b>P</b>
Intercepto	6.35E + 00	9.80E - 06Φ
X <sub>1</sub> (L)	-7.47E - 01	3.39E - 02Φ
X <sub>1</sub> (Q)	-1.04E - 01	6.84E - 01
X <sub>2</sub> (L)	4.34E - 01	1.19E - 01
X <sub>2</sub> (Q)	-1.37E - 01	5.97E - 01
X <sub>3</sub> (L)	-4.26E - 01	1.29E - 01
X <sub>3</sub> (Q)	-4.85E - 01	9.03E - 02Φ
X <sub>1</sub> ×X <sub>2</sub>	-7.88E - 01	2.81E - 02Φ
X <sub>1</sub> ×X <sub>3</sub>	9.00E - 02	7.81E - 01
X <sub>2</sub> ×X <sub>3</sub>	-6.78E - 01	7.80E - 02Φ
<b>Falta de ajuste</b>	6.32E - 01	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.77	
<b>F. Calculado</b>	6.3043	
<b>F. Tabular</b>	2.36	

X<sub>1</sub> = celite (%); X<sub>2</sub> = tiempo de adsorción (min), X<sub>3</sub> = carbón activado (%).

L = Efecto linear; Q = Efecto cuadrático.

Φ Significativo (P < 0.10).

La expresión matemática que representa el atributo de color a\* incluye las variables independientes significativas que predicen el efecto de a\*, declarándose a través de la ecuación 14.

$$\text{Atributo } a^* = 6.350986 - 0.746628X_1 - 0.484747X_2^2 - 0.788372X_1 \times X_2 - 0.677500X_2 \times X_3$$

[14]

En base al modelo de la ecuación 14 se crearon dos gráficos de superficie de respuesta para las interacciones significativas de porcentaje de celite por minutos de tiempo (Figura 8) y minutos de tiempo por porcentaje de carbón activado (Figura 9).

A pesar de que bajo las condiciones establecidas todos los valores de  $a^*$  (al ser positivos) se clasificaron como rojos (Figura 8 y 9), el método de adsorción redujo la incidencia de este color en el concentrado clarificado comparándolo con el CRE intacto. Este efecto es deseable por dos razones: (1) acerca los valores de  $a^*$  del concentrado clarificado (3-7) a los del edulcorante comercial blanqueado (-1.64) y (2) la tendencia de disminuir los valores de  $a^*$  es indirectamente proporcional al efecto que toma este valor (aumentar) cuando hojas de estevia cruda se secan por distintos métodos (Lemus *et al.* 2016). Todos estos métodos de secado oscurecen el color de las hojas. Por lo tanto, es admisible decir que el efecto del atributo de color  $a^*$  clarificó el extracto.

La figura 8 muestra como los valores más deseables, los que disminuyen el valor de  $a^*$ , se consiguen cuando la concentración de celite y el tiempo son máximos: 1% y 15.05 minutos respectivamente. Al igual que el valor  $L^*$ , este es otro punto óptimo que se encuentra en los puntos axiales ( $+\alpha$ ). Así mismo, cuando el tiempo de adsorción es máximo y el porcentaje de celite es nulo, se describen los valores más altos de  $a^*$ , por lo tanto, el celite si tiene un rol importante en la adsorción de impurezas.

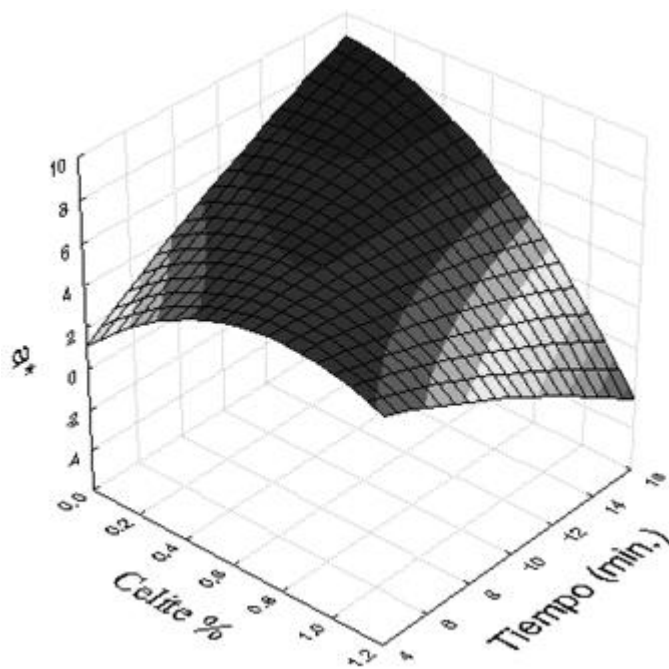


Figura 8. Efecto del porcentaje de celite y minutos de tiempo de adsorción sobre el atributo de color  $a^*$  en el concentrado clarificado de estevia.

El proceso de adsorción de pigmentos por el celite y sus arcillas consiste en dos periodos distintivos. Un período inicial de adsorción acelerada (10 minutos aproximadamente), donde la superficie de las arcillas retiene beta carotenos y clorofilas por interacción química primordialmente, y un segundo periodo de adsorción más lento y gradual, donde la retención es de carácter físico y se da debido a la difusión inter partícula de las impurezas que se unen a los poros de las arcillas a medida que se encuentran en el medio acuoso. Por lo tanto, la máxima sorción de pigmentos se consigue después de pasada la hora de adsorción (Wu y Li 2009). Esto explica porque se necesita de más tiempo de adsorción para lograr valores de  $a^*$  deseables.

Nótese el efecto lineal que experimenta la variable tiempo cuando la concentración de carbón activado es mínima (0.5%) (Figura 9), aumentando la cantidad de carbón activado y el tiempo se disminuyen los valores de  $a^*$ . Estos resultados contradicen a Cortés *et al.* (2016) quienes cuantificando clorofilas, encuentran que a una concentración similar a la del punto axial negativo de nuestro estudio (0.5%), la sorción de clorofilas por carbón activado es máxima y cuando este aumenta la concentración de carbón activado, el porcentaje de clorofilas retenidas disminuye. Esto se debe a que no cuantificaron los demás pigmentos presentes en su extracto y la cantidad de clorofilas en sus niveles más primitivos de degradación eran mayores en su extracto pues no acidifican el medio. Por lo tanto, el carbón activado, cuya afinidad principal entre pigmentos, son las clorofilas íntegras (Ribeiro *et al.* 2001), adsorbió rápidamente estas en su extracto.

La figura 9 señala que se optimizan los valores de  $a^*$  (disminución) cuando se opera en los valores axiales positivos (15.05 minutos y 1.84% de carbón activado). El valor de tiempo en este caso se necesita más alto. Otra vez se encuentran contradicciones con Cortés *et al.* (2016) quienes indican que la desorción de clorofilas por carbón activado empieza a los 10 minutos. Esta aparente disparidad sucede debido a que no utilizan el carbón activado en conjunto con alguna tierra adsorbente como en el caso de este estudio es celite, que se sabe aumenta la capacidad del carbón activado de retener impurezas (Marrakchi *et al.* 2017). Así mismo, utiliza carbón activado granular, con menor porosidad y menor afinidad a clorofilas, carotenoides y otros pigmentos fenólicos que el carbón activado en polvo usado en este estudio (Ribeiro *et al.* 2001).

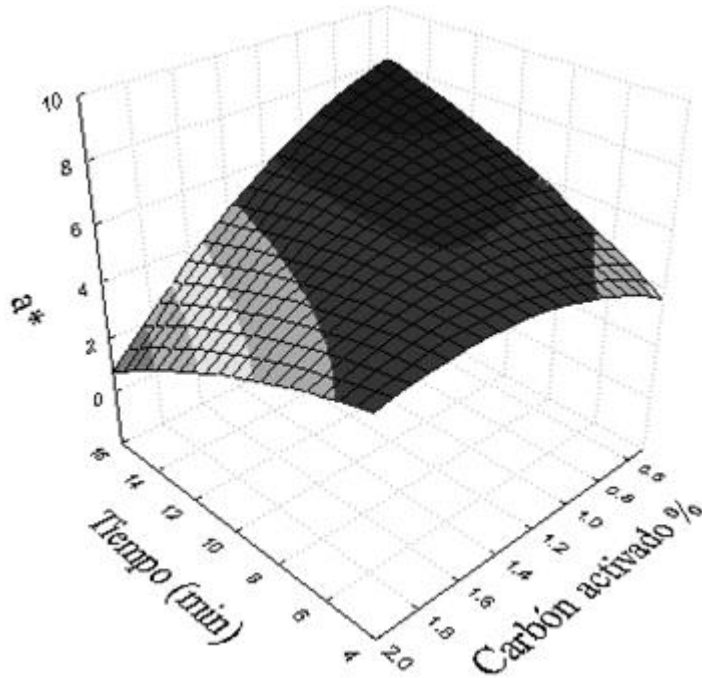


Figura 9. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de carbón activado sobre el atributo de color  $a^*$  en el concentrado clarificado de estevia.

**Atributo  $b^*$ .** Este atributo expresa la escala amarillo/azul. Donde los valores positivos expresan amarillo y negativos, azul. Se desea evitar los valores de  $b^*$  negativos, por lo tanto, valores positivos son el objetivo. No obstante, teniendo en cuenta el valor  $b^*$  del edulcorante comercial blanqueado (1.45) se prefiere valores positivos bajos.

La variable lineal porcentaje de carbón activado ( $X_3$ ) fue la única que demostró coeficiente de regresión significativo (Cuadro 14). El  $R^2$  es mayor a 70%, este indica que 76% de las observaciones se ajustan al modelo y 24% no pueden ser explicadas por este. Así mismo, la falta de ajuste no es significativa por lo tanto el modelo se perfila a ser de carácter predictivo.

Cuadro 14. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y R<sup>2</sup> de un modelo de regresión polinomial, aplicado al atributo de color b\* del concentrado clarificado de estevia.

Variable	Coefficiente	P
Intercepto	4.85E + 01	7.86E - 08Φ
X <sub>1</sub> (L)	-5.88E - 01	4.66E - 01
X <sub>1</sub> (Q)	-1.01E + 00	2.09E - 01
X <sub>2</sub> (L)	7.53E - 01	3.10E - 01
X <sub>2</sub> (Q)	-6.89E - 01	3.72E - 01
X <sub>3</sub> (L)	-2.71E + 00	1.03E - 02Φ
X <sub>3</sub> (Q)	-7.88E - 01	2.91E - 01
X <sub>1</sub> ×X <sub>2</sub>	1.68E - 01	8.31E - 01
X <sub>1</sub> ×X <sub>3</sub>	5.00E - 03	9.96E - 01
X <sub>2</sub> ×X <sub>3</sub>	3.38E - 01	7.19E - 01
<b>Falta de ajuste</b>		7.73E - 01
<b>R<sup>2</sup></b>		0.76
<b>F. Calculado</b>		10.5601
<b>F. Tabular</b>		2.64

X<sub>1</sub> = celite (%); X<sub>2</sub> = tiempo de adsorción (min), X<sub>3</sub> = carbón activado (%).

L = Efecto lineal; Q = Efecto cuadrático.

Φ Significativo (P < 0.10).

La expresión matemática es un modelo lineal y se expresa a través de la ecuación 15.

$$\text{Atributo } b^* = 48.45424 - 2.70944X_3 \quad [15]$$

La prueba de significancia describe un valor de F calculado mayor al tabular. Esto supone el último argumento para designar el modelo como predictivo y otorga validez para generar gráficas. No obstante, la ausencia de otra variable independiente significativa limita el uso de graficas tridimensionales pues no existe otro punto de comparación significativo, es por esta razón que se diseña una gráfica bidimensional que denota la influencia del porcentaje de carbón activado en la escala cromática b\*.

La Figura 10 denota la influencia de la variable (X<sub>3</sub>) (L) en los valores del atributo de color b\*. Los valores desplegados en esta grafica son todos positivos, esto indica que el concentrado clarificado se encuentra dentro del espectro amarillo y no azul. No obstante, tomando como referencia el valor de cromaticidad b\* del edulcorante comercial blanqueado (1.45), es deseable que estos valores no sean tan altos y más bien tiendan a cero. En este sentido, el comportamiento del carbón activado (Figura 10) sugiere que se deben aumentar los niveles de carbón activado para reducir el valor del atributo de color b\*. Otros estudios han utilizado porcentajes de carbón activado mucho mayores: Rajab *et al.* (2009) utilizan porcentajes de hasta 10% de carbón activado mientras que Ghandi *et al.* (2016) reportan extensiones de porcentaje de carbón activado de hasta el 20%. En este estudio, no se extendió la cantidad de carbón activado utilizado, puesto que, a porcentajes mayores a los axiales positivos (1.84%) se entorpecía la turbulencia que la plancha de agitación podía generar. Este fenómeno de pérdida de velocidad de agitación es completamente indeseable

en adsorciones en lote, pues disminuye la movilidad de las partículas del adsorbato disminuyendo la capacidad de remoción de impurezas del adsorbente (Garba *et al.* 2016).

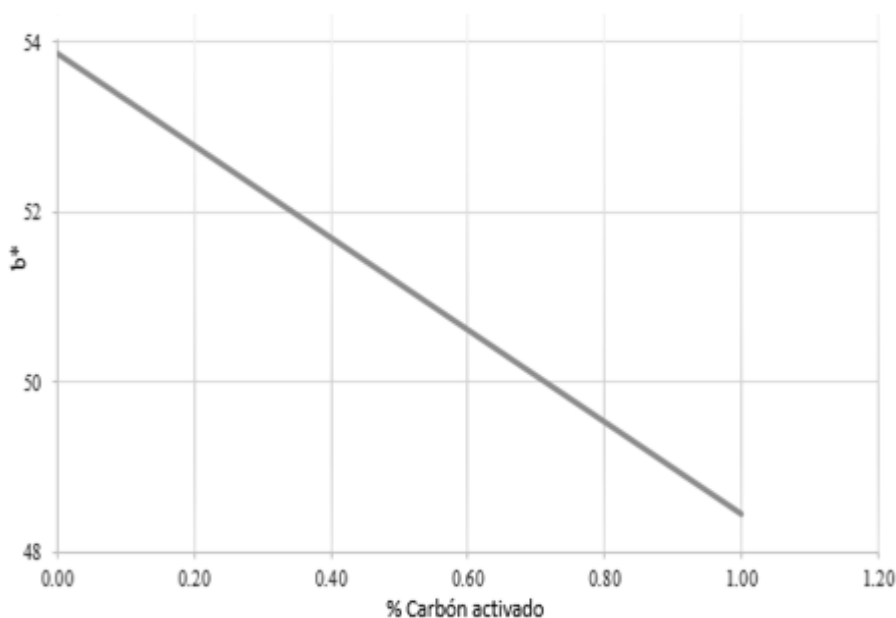


Figura 10. Efecto de la variable independiente carbón activado en el atributo  $b^*$  del concentrado clarificado de estevia.

**Índice de blancura (IB).** Este índice es un importante parámetro de calidad en industrias textiles y de papel y más recientemente es usado en la alimentaria y de pigmentos. “Una superficie blanca ideal debe tener un índice de blancura igual a 100” (Montoya *et al.* 2012).

La variable lineal de porcentaje de celite fue significativa  $P < 0.10$  (Cuadro 15), demostrando un aumento en el porcentaje de IB en base al incremento del celite en el módulo de adsorción. Así mismo, hay significancia en las interacciones entre porcentaje de celite y tiempo ( $X_1 \times X_2$ ) y en tiempo sobre porcentaje de carbón activado.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) demuestra que 64% de las observaciones logran ser explicadas mediante el modelo y 46% no se explican; a pesar de una falta de ajuste no significativa y un F calculado mayor al tabular se define al modelo como tendencioso.

Cuadro 15. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y R<sup>2</sup> de un modelo de regresión polinomial, aplicado al índice de blancura (IB) del concentrado clarificado de estevia.

<b>Variable</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>P</b>
Intercepto	3.18E + 01	8.21E - 07Φ
X <sub>1</sub> (L)	2.08E + 00	4.52E - 02Φ
X <sub>1</sub> (Q)	-4.21E - 02	9.56E - 01
X <sub>2</sub> (L)	-6.90E - 01	3.70E - 01
X <sub>2</sub> (Q)	3.65E - 02	9.62E - 01
X <sub>3</sub> (L)	5.29E - 01	4.91E - 01
X <sub>3</sub> (Q)	7.79E - 01	3.18E - 01
X <sub>1</sub> ×X <sub>2</sub>	2.56E + 00	2.20E - 02Φ
X <sub>1</sub> ×X <sub>3</sub>	-4.93E - 01	6.19E - 01
X <sub>2</sub> ×X <sub>3</sub>	2.09E + 00	7.44E - 02Φ
<b>Falta de ajuste</b>	3.92E - 01	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.64	
<b>F. Calculado</b>	10.3729	
<b>F. Tabular</b>	2.46	

X<sub>1</sub> = celite (%); X<sub>2</sub> = tiempo de adsorción (min.), X<sub>3</sub> = carbón activado (%).

L = Efecto lineal; Q = Efecto cuadrático.

Φ Significativo (P < 0.10).

La expresión matemática es un modelo determinado entre el índice de blancura y las variables independientes (y sus interacciones) significativas; se expresa de acuerdo a la ecuación 16.

$$\begin{aligned} \text{Índice de blancura (IB)} = & 31.79776 + 2.07742X_1 + 2.56484X_1 \times X_2 \\ & + 2.09235X_2 \times X_3 \quad [16] \end{aligned}$$

La prueba de significancia  $P > 0.10$  entrega un valor de F calculado mayor al F tabular. Este resultado otorga validez para desarrollar gráficos de superficies de respuesta donde se ignoran los efectos de las variables independientes que no fueron significativas.

La figura 11 demuestra la interacción entre el porcentaje de celite y el tiempo en minutos. Nótese que a mayor nivel de tiempo y mayor nivel de celite (+α) se logran niveles más altos de IB. Esto indica que se deben aumentar los puntos centrales del estudio para observar el efecto de esta interacción a niveles mayores donde el modelo tiende a aumentar el IB. La razón en la necesidad del aumento de ambas variables para mejorar el IB es explicada por González *et al.* (2005) quienes indican que, en comparación a la adsorción rápida de pigmentos fotosintéticos, las tierras diatomeas continúan adsorbiendo compuestos secundarios de la oxidación más allá de los 20 minutos. Estos productos oxidados son el resultado de la degradación de compuestos orgánicos tanto por la cocción inicial del extracto como por la interacción de los heteroátomos del carbón activado con el concentrado que puede llegar a formar grupos hidroxilos de carácter fenólico (Ortega *et al.* 2013).

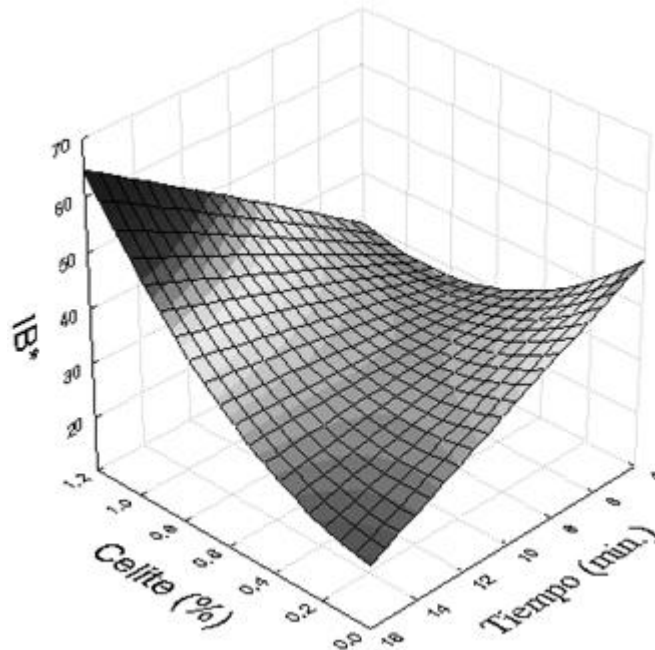


Figura 11. Efecto del porcentaje de celite y minutos de tiempo de adsorción sobre el índice de blancura (IB) del concentrado clarificado de estevia.

\* Escala adimensional.

La necesidad de dislocar los puntos axiales del estudio queda en manifiesto en la figura 12, donde a mayor nivel de tiempo de adsorción (15.05 minutos) y mayor porcentaje de carbón activado (1.84%) se consiguen los valores óptimos de IB. Dentro de los límites del estudio la gráfica demuestra que se obtuvieron valores de IB entre 28 y 35, esto indica que el perfil de color se encuentra dentro del blanco-amarillento. Esto hace sentido con los resultados obtenidos anteriormente por los valores  $b^*$  positivos que indican una alta incidencia del color amarillo en el concentrado clarificado. Así mismo, el IB expresado por el edulcorante comercial blanqueado Santiveri® de 81.52 (Cuadro 8) cae en esta categoría de perfil de blancura blanco-amarillento ya que aquellos valores que rebasen el blanco ideal de 100, serán clasificados como blanco-azulados (Montoya *et al.* 2012).

El remanente de impurezas en el concentrado clarificado es evidente si se comparan los valores de IB reflejados en la figura 12 (28-35) obtenidos en el estudio, con el IB de un edulcorante totalmente blanqueado (81.52). Esta premisa sirve para justificar la necesidad de aumentar tanto la cantidad de carbón activado como el tiempo, ya que Ma *et al.* (2013) y posteriormente Saeed *et al.* (2014) adsorbiendo fenoles y tintes orgánicos en extractos acuosos, indican que la cantidad de carbón activado en polvo a usarse depende de la concentración inicial de impurezas, y, evidenciándose un remanente significativo de estas en nuestro concentrado clarificado se puede afirmar que se debió usar más porcentaje de carbón activado. Más adelante, en cuanto al tiempo, queda en evidencia que no sirve de nada aumentar la cantidad de carbón activado si no se aumenta el tiempo (Figura 12). Esto es corroborado por Saeed *et al.* (2014) quienes encuentran picos de sorción máximos hasta pasados los 50 minutos de tiempo de contacto adsorbato con adsorbente.



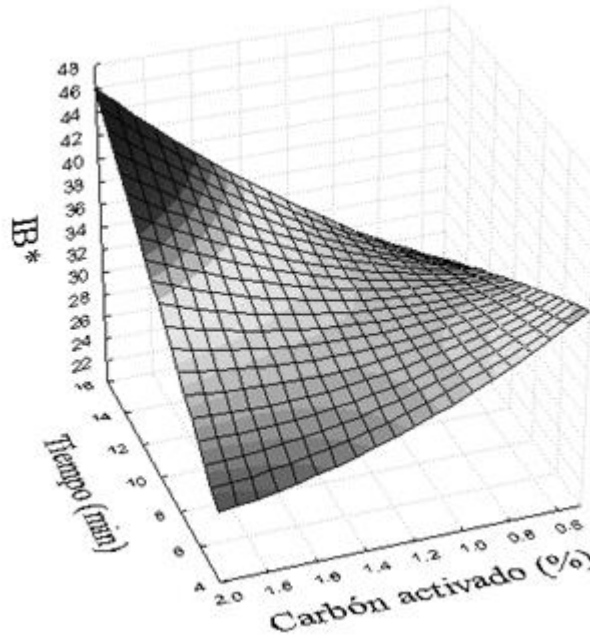


Figura 12. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de carbón activado sobre el índice de blancura (IB) del concentrado clarificado de estevia.  
\* Escala adimensional.

**Índice de empardeamiento (IE).** El índice de empardeamiento indica la pureza del color café en un producto y es ampliamente usado en la industria para inferir sobre los cambios en una matriz alimenticia que se somete a empardeamiento tanto enzimático como no enzimático (Gasmalla *et al.* 2015). Más adelante, el comportamiento común de este índice es una alta correlación con los atributos colorimétricos  $L^*$  y  $b^*$ , sin embargo, esta tendencia no es exacta en todos los estudios de caso que utilizan el índice y es recomendable establecer estadígrafos de correlación con los atributos colorimétricos básicos ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) para determinar la verdadera significancia de este índice en el contexto que se utilice (Hirschler 2012).

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) del atributo  $a^*$  denota un apego de los datos al modelo del 71% y un valor de F calculado apenas mayor que el F tabular, esto, más una falta de ajuste no significativa valida al modelo como predictivo (Cuadro 16).

Cuadro 16. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y R<sup>2</sup> de un modelo de regresión polinomial, aplicado al índice de empareamiento (IE) del concentrado clarificado de estevia.

<b>Variable</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>P</b>
Intercepto	1.86E + 02	1.12E - 05Φ
X <sub>1</sub> (L)	-2.40E + 01	2.73E - 02Φ
X <sub>1</sub> (Q)	1.59E + 00	8.35E - 01
X <sub>2</sub> (L)	1.08E + 01	1.83E - 01
X <sub>2</sub> (Q)	-1.28E + 00	8.68E - 01
X <sub>3</sub> (L)	-6.82E + 00	3.79E - 01
X <sub>3</sub> (Q)	-6.07E + 00	4.24E - 01
X <sub>1</sub> ×X <sub>2</sub>	-2.83E + 01	1.47E - 02Φ
X <sub>1</sub> ×X <sub>3</sub>	8.69E + 00	3.90E - 01
X <sub>2</sub> ×X <sub>3</sub>	-2.12E + 01	7.02E - 02Φ
<b>Falta de ajuste</b>	4.40E - 01	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.71	
<b>F. Calculado</b>	12.8175	
<b>F. Tabular</b>	2.46	

X<sub>1</sub> = celite (%); X<sub>2</sub>=tiempo de adsorción (min), X<sub>3</sub>= carbón activado (%).

L = Efecto lineal; Q = Efecto cuadrático.

Φ Significativo (P < 0.10).

La expresión matemática es un modelo determinado entre el índice de empareamiento y las variables independientes (y sus interacciones) significativas; se expresa de acuerdo a la ecuación 17.

$$\begin{aligned} \text{Índice de empareamiento (IE)} = & 186.2085 - 23.9684X_1 - 28.3478X_1 \times X_2 \\ & -21.1923X_2 \times X_3 \quad [17] \end{aligned}$$

La prueba de significancia  $P > 0.10$  entrega un valor de F calculado mayor al F tabular. Este resultado otorga validez para desarrollar gráficos de superficies de respuesta donde se ignoran los efectos de las variables independientes que no fueron significativas.

Las figuras 13 y 14 demuestran un patrón recurrente en este estudio. Demuestran que los valores más deseables de IE se consiguen cuando se trabaja en los puntos axiales positivos del estudio (1.84% de carbón activado, 1% de celite y 15.05 minutos de tiempo).

Los resultados obtenidos de IE para la fase tres son más altos que los del concentrado rico en esteviósidos intacto a pesar de que si evaluamos cualitativamente a ambos, consideraríamos sin espacio de duda, que las muestras obtenidas en fase tres son mucho más claras que el CRE. Esto se atribuye a la alta correlación del IE con los atributos L\* y b\* que son significativamente más altos para las muestras de fase tres. Esto significa que probablemente para esta fase sería de mayor provecho evaluar otro índice de comportamiento del color como índice de amarillamiento (Hirschler 2012).

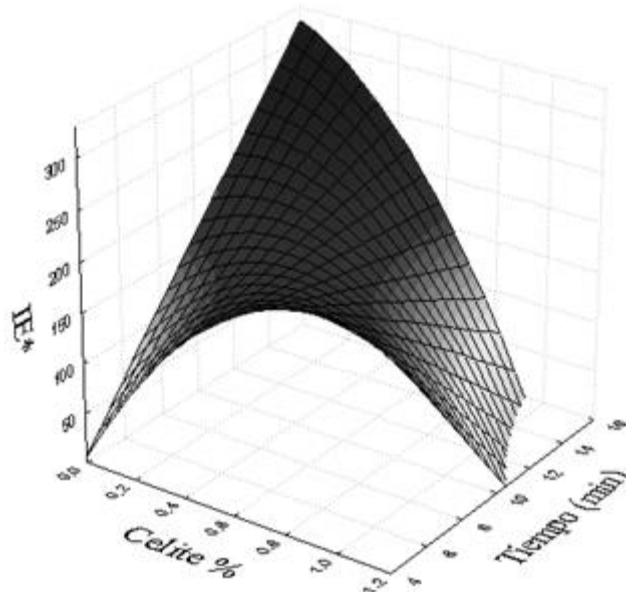


Figura 13. Efecto del porcentaje de celite y tiempo de adsorción en minutos sobre el índice de empardeamiento (IE) del concentrado clarificado de estevia.  
\* Escala adimensional.

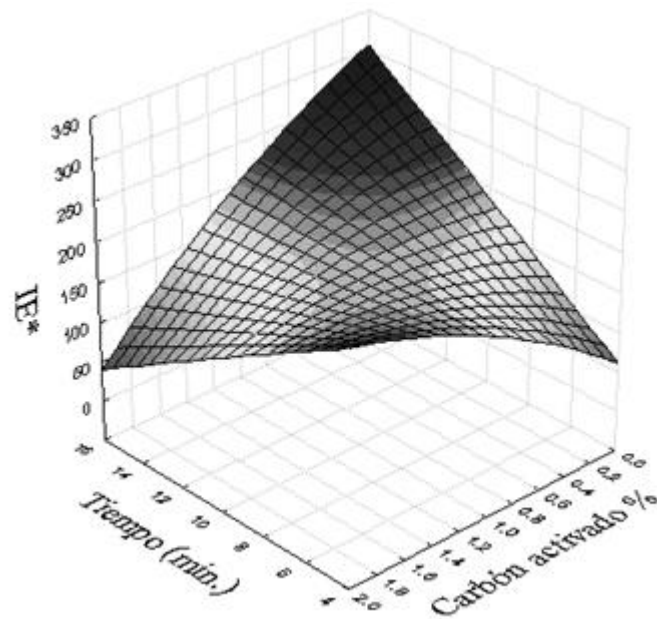


Figura 14. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de carbón activado sobre el índice de empardeamiento (IE) del concentrado clarificado de estevia.  
\* Escala adimensional.

**Eficiencia en decoloración (ED).** Este valor deriva de un análisis de absorbancia. Significa el porcentaje de disminución en la absorbancia de una solución, estrictamente a 420 nanómetros. Fuh y Chiang (1990) determinaron que esta longitud de onda es la absorbida

por la mayoría de los pigmentos que resultan luego de un proceso de purificación con membranas. Otros autores denominan a este fenómeno como porcentaje de clarificación o eficiencia de despigmentación (Reis *et al.* 2008, Fernandes *et al.* 2001). Se desean porcentajes de eficiencia en decoloración altos, que puedan acercarse o alcanzar el 100%.

La variable tiempo, en su expresión linear, denota un coeficiente de regresión significativo con una influencia positiva sobre la variable respuesta (Cuadro 17). Esto indica que el incremento de una unidad de tiempo aumentará igualmente una unidad en el porcentaje de eficiencia en decoloración. Más adelante encontramos significancia en la interacción del porcentaje de celite con el tiempo; la presencia de una de estas afecta el comportamiento de la otra.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) demuestra que un 63% de las observaciones fueron ajustadas por el modelo, y 37% no se logran explicar mediante el análisis (Cuadro 17). Esto implica que las respuestas dentro de la región experimental delimitada son de carácter tendencioso ya que se tiene un  $R^2$  menor a 70%.

La falta de ajuste no es significativa y el F calculado es mayor al tabular (Cuadro 17). A pesar de que estos parámetros clasifican para denominar al modelo como predictivo, el precedente de un  $R^2$  menor a 70% lo encasilla como tendencioso. La expresión matemática que determina el porcentaje de ED surge de acuerdo a la ecuación 18.

$$\text{Eficiencia en decoloración (\%)} = 87.57901 + 1.25151X_2 + 1.39995X_1 \times X_2 \quad [18]$$

Cuadro 17. Coeficientes de regresión, probabilidades (P) y valores F y  $R^2$  de un modelo de regresión polinomial, aplicado a la eficiencia en decoloración (ED) del concentrado clarificado de estevia.

<b>Variable</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>P</b>
Intercepto	8.76E + 01	2.49E - 09Φ
X <sub>1</sub> (L)	-9.68E - 01	2.10E - 01
X <sub>1</sub> (Q)	-6.07E - 01	3.81E - 01
X <sub>2</sub> (L)	1.25E + 00	9.29E - 02Φ
X <sub>2</sub> (Q)	-5.57E - 01	4.21E - 01
X <sub>3</sub> (L)	5.23E - 01	4.33E - 01
X <sub>3</sub> (Q)	-2.62E - 01	6.83E - 01
X <sub>1</sub> ×X <sub>2</sub>	1.40E + 00	9.25E - 02Φ
X <sub>1</sub> ×X <sub>3</sub>	4.38E - 01	6.09E - 01
X <sub>2</sub> ×X <sub>3</sub>	-4.58E - 01	5.92E - 01
<b>Falta de ajuste</b>	3.79E - 01	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.63	
<b>F. Calculado</b>	4.3110	
<b>F. Tabular</b>	2.64	

X<sub>1</sub> = celite (%); X<sub>2</sub> = tiempo de adsorción (min), X<sub>3</sub> = carbón activado (%).

L = Efecto linear; Q = Efecto cuadrático.

Φ Significativo (P < 0.10).

La prueba de significancia al 10% (F calculado mayor al tabular) admite el uso de gráficos, generándose uno para la interacción significativa entre las variables porcentaje de celite y tiempo en minutos.

La figura 15 muestra cómo se aumenta el porcentaje de ED cuando el porcentual de celite y el tiempo se encuentran en los puntos axiales positivos: 1% y 15.05 min respectivamente. Esto ocurre pues las arcillas del celite no logran capturar completamente los pigmentos presentes en el concentrado dado que el tiempo de contacto solo les permite completar su faceta de sorción química y la faceta física, que implica más tiempo de contacto, no se lleva a cabalidad por los límites del experimento (Marrakchi *et al.* 2017). No obstante, la gráfica deja ver que los valores obtenidos del porcentaje de ED rondan entre el 77 hasta el 89% lo que supone un incremento de hasta el 12% de los valores obtenidos por el experimento de la acidificación en fase uno. Esto certifica que la adsorción puede remover aún más los pigmentos indeseables del concentrado que la acidificación por sí sola.

Este resultado final (77-89%) de eficiencia en decoloración es muy similar al obtenido por Oliveira *et al.* (2015) quienes usando floculantes naturales de quitosano logran valores de entre 68 a 94% de eficiencia en decoloración. A pesar de aparentar ser más eficiente que las tierras adsorbentes en remover impurezas, el quitosano también retuvo hasta un 59% de los esteviósidos presentes en su extracto, esta pérdida de esteviósidos jamás es tan alta en la literatura que utiliza tierras adsorbentes para remover impurezas de extractos de estevia siendo la máxima de 3.82% reportada por Cortes *et al.* (2016).

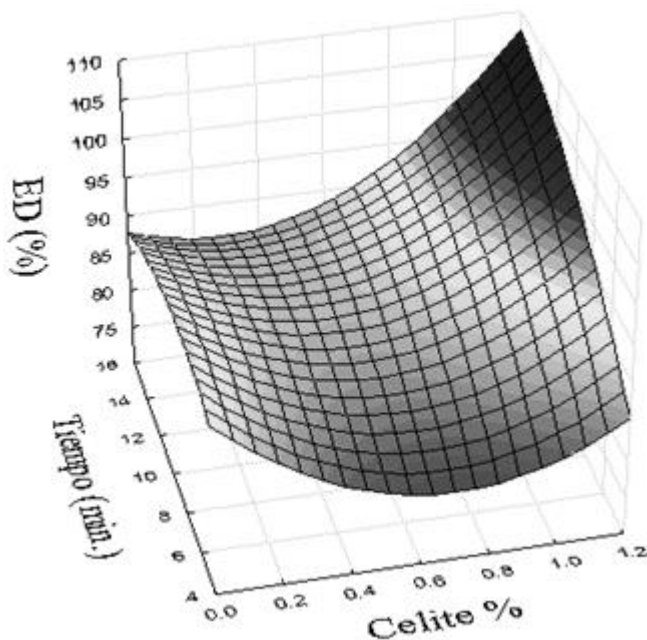


Figura 15. Efecto del tiempo de adsorción en minutos y porcentaje de celite sobre el porcentaje de eficiencia en decoloración (ED) del concentrado clarificado de estevia.

**Función de utilidad.** Se muestran los valores óptimos de las variables independientes sobre las diferentes respuestas (variables dependientes). Esto bajo restricciones de maximización en los parámetros de escala amarillo/azul (atributo b\*), índice de blancura (IB) y porcentaje de eficiencia en decoloración (ED), y una minimización de los parámetros de escala rojo/verde (atributo a\*) e índice de emparpeamiento (IE).

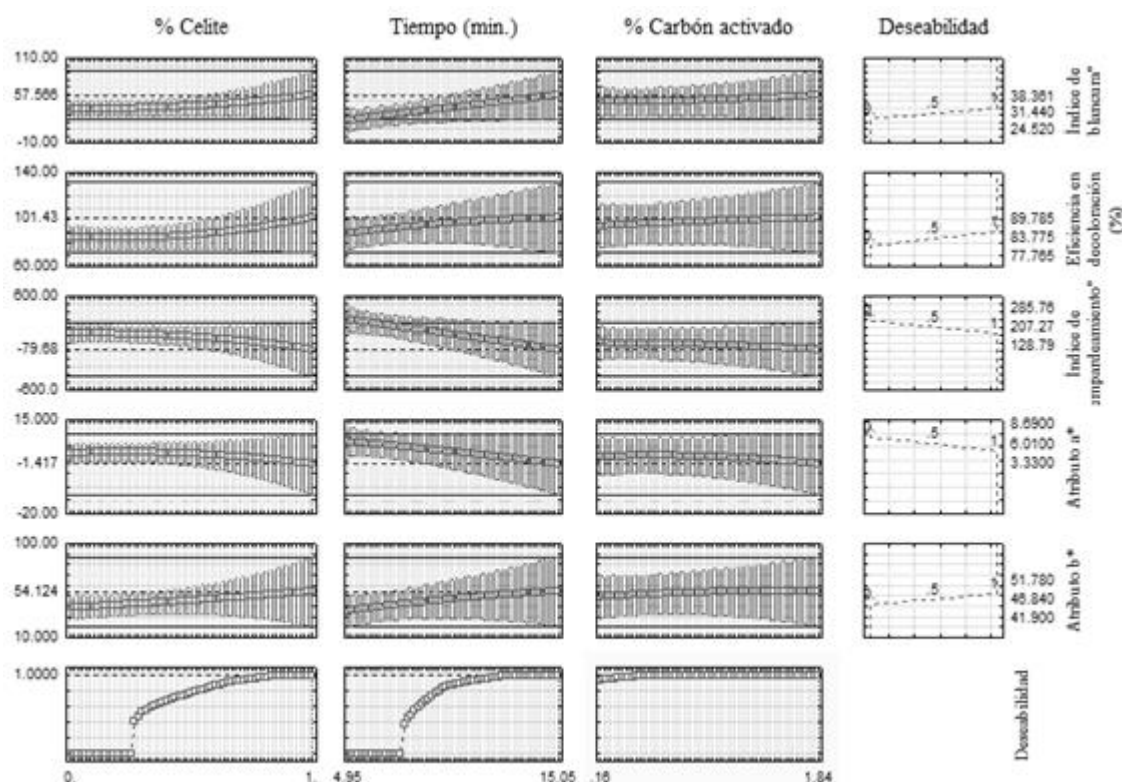


Figura 16. Función de utilidad para las variables independientes sobre los atributos y características colorimétricas más eficiencia en decoloración de un concentrado clarificado de estevia.

<sup>o</sup>: Escala adimensional.

Todos los valores óptimos de las variables independientes fueron arrastrados hacia los puntos axiales del estudio. Esto sugiere que se realice una dislocación del punto central en dichas variables con el propósito de investigar su interacción a niveles más altos, donde es plausible afirmar que se maximizará el blanqueamiento del concentrado (Figura 16).

#### Fase 4. Comparación del concentrado clarificado bajo condiciones óptimas versus edulcorante comercial blanqueado Santiveri®, CRE intacto y tratamientos del punto central.

El cuadro 18 demuestra cómo, significativamente, el concentrado óptimo es más claro, menos rojo, menos pardo y más blanco que las medias de las muestras obtenidas bajo el punto central. También el óptimo mostro la eficiencia en decoloración más cercana al

edulcorante comercial blanqueado. Esto muestra la eficacia del método de superficie de respuesta para predecir el efecto de las variables independientes implicadas (Rodríguez y Lemma 2015).

Cuadro 18. Comparación de medias para análisis colorimétrico (atributos y características) y de absorbancia entre los productos finales y materia prima.

Producto	L*	a*	b*	H°	IE <sup>φ</sup>	IB <sup>φ</sup>	ED (%)
CRE	6.45 <sup>d</sup>	1.38 <sup>c</sup>	4.54 <sup>c</sup>	73 <sup>c</sup>	125.90 <sup>b</sup>	6.33 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
Punto Central	51.41 <sup>c</sup>	6.37 <sup>a</sup>	47.90 <sup>a</sup>	82 <sup>b</sup>	190.04 <sup>a</sup>	31.37 <sup>c</sup>	87.06 <sup>c</sup>
Óptimo	55.65 <sup>b</sup>	3.29 <sup>b</sup>	41.87 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	125.74 <sup>b</sup>	38.92 <sup>b</sup>	90.18 <sup>b</sup>
Stevia Santiveri <sup>®</sup>	81.65 <sup>a</sup>	-1.64 <sup>d</sup>	1.44 <sup>d</sup>	139 <sup>a</sup>	0.29 <sup>c</sup>	81.51 <sup>a</sup>	99.48 <sup>a</sup>
CV (%)	4.26	16.79	5.31	2.76	13.90	3.30	1.59

<sup>a-d</sup> Las medias con diferente letra minúscula en la misma columna, indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

H°: Ángulo de matiz.

<sup>φ</sup> Escala adimensional.

IE: Índice de empardeamiento; IB: Índice de blancura.

ED: Porcentaje de eficiencia en decoloración.

CRE: Concentrado rico en esteviósidos intacto.

CV: Porcentaje de coeficiente de variación.

El cuadro 19 demuestra como el método de absorbancia tiene muy poca incidencia en la densidad del extracto vegetal. Estas densidades no varían tanto por la filtración final del concentrado adsorbido que retiene las partículas remanentes de carbón activado y diatomita que puedan tener una influencia significativa en la densidad final.

Cuadro 19. Comparación de medias de densidad y pH entre los productos finales y materia prima.

Producto	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	pH
CRE	1.0088 <sup>b</sup>	5.90 <sup>a</sup>
Punto Central	1.0155 <sup>b</sup>	3.85 <sup>c</sup>
Óptimo	1.0142 <sup>b</sup>	3.84 <sup>c</sup>
Stevia Santiveri <sup>®</sup>	1.0323 <sup>a</sup>	4.13 <sup>b</sup>
CV (%)	0.64	0.51

<sup>a-c</sup> Las medias con diferente letra minúscula en la misma columna, indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

CRE: Concentrado rico en esteviósidos intacto.

CV: Porcentaje de coeficiente de variación.

## 4. CONCLUSIONES

- Se diseñó un sistema de blanqueamiento empleando ácido cítrico, carbón activado y una tierra diatomea todos con aprobación de “generalmente reconocido como seguro” lo que mantiene el perfil natural deseado por Everest Foods.
- El punto óptimo para maximizar el blanqueamiento del extracto acuoso de estevia fue de carbón activado a 1.84%, tiempo de adsorción de 15.05 minutos y Celite 545® a 1%.
- El concentrado blanqueado bajo las condiciones óptimas fue más claro, menos rojo, menos café, y más blanco que el CRE intacto. Además, tuvo una eficiencia en decoloración significativamente superior a las muestras del punto central del diseño siendo el producto que más se acercó al edulcorante comercial blanqueado Santiveri®.



## 5. RECOMENDACIONES

- Dislocar los puntos centrales de las variables porcentaje de carbón activado, porcentaje de Celite 545® y tiempo de adsorción (min), para encontrar valores óptimas que maximicen el blanqueamiento del extracto acuoso de estevia.
- Diseñar un módulo de adsorción con mayor capacidad de generar turbulencia a través de agitadores verticales de alta velocidad propulsados por motores.
- Someter el concentrado clarificado obtenido en este estudio a spray-drying para eliminar agua, aumentar la concentración de esteviósidos y luego diluirlos en agua destilada con el propósito de clarificar aún más y obtener el perfil de dulzor deseable.

## 6. LITERATURA CITADA

Abelyan V, Markosyan A, Abelyan L, inventores. 2010. High rebaudioside D and applications. Malasia. Patente EP 2708548 A3.

Anton DS, Martin KC, Han MH, Coulon S, William BA, Cefalu MD, Geiselman P, Williamson DA. 2010. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *J. Appet.* 55(1):37-43. eng. doi: 10.1016/j.appet.2010.03.009.

AOAC 962.13. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International. Maryland (Estados Unidos)

AOAC 981.12. 1982. Official Methods of Analysis. 18th ed. AOAC International .Virginia (Estados Unidos).

Artero JA. 2015. Elaboracion de jugo funcional de guayaba (*Psidium guajava L.*) a partir de mermas y coproductos de la producción de guayaba en El Salvador [Tesis]. Honduras: Zamorano. 35 p. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4539/1/AGI-2015-007.pdf>.

Barros CM, Lessa RQ, Grechi MP, Mouco TL, Souza MD, Wiernsperger N, Bouskela E. 2007. Substitution of drinking water by fructose solution induces hyperinsulinemia and hyperglycemia in hamsters. *J. Clin. Sao Pablo.* 62(3):327-34. eng. doi: 10.1590/S1807-59322007000300019.

Castellar G, Angulo E, Zambrano A, Charris D. 2013. Equilibrio de adsorción del colorante azul de metileno sobre carbón activado. *Rev. U.D.C.A. Act. & Div. Cient;* [consultado 2017 ago 6]. 16(1):263–271. Esp. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/revudca/v16n1/v16n1a30.pdf>.

Chakraborty S. 2017. Membrane based steviol glycoside purification technology. [internet]. Himachal (India); [actualizado 2017 oct 16; consultado 2017 oct 16]. Disponible en: <https://www.steviaschantanu.com/stevia-membrane-based-extraction>.

Chariguamán JA. 2015. Caracterización de bioplástico de almidón elaborado por el método de casting reforzado con albedo de maracuyá (*Pasiflora edulis* spp.) [Tesis]. Honduras: Zamorano. 60 p. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4560/1/AGI-2015-014.pdf>.

Cortés G, Ramírez D, Bobadilla CQ, Cortés AM, Ramírez MA, Chávez RM, Morales R. 2016. Remoción de clorofilas presentes en extractos de stevia (*Stevia rebaudiana* b.) por adsorción con carbón activado y precipitación con cal grado alimenticio. Acta Univ. 27(1):67-75. esp. doi: 10.15174/au.2017.1209.

Daciw GM. 2005. *Stevia rebaudiana bertonii*: kaá-heé. In: Rafael Centeno ed. Universidad Nacional de Quilmes, Vol 1: Programa de Becas para Jóvenes Destacado del Polimodal. Buenos Aires (Argentina): Serie Digital. p.52-64.

de la Rosa LA, Alvarez E, González GA. 2010. Fruit and vegetable phytochemical: chemistry, nutritional value and stability. 1ra ed. Iowa (Estados Unidos): John Wiley & Sons. 380 p.

Ding H, Tian H, Lian Y, Niu Z. 2013. Study on bleaching effect of activated carbon on stevia solution [internet] Provincia de Hadan (China): Engineering Research Center of Natural Pigment; [consultado 2017 feb 25]. [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-ZSTJ20130402htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZSTJ20130402htm).

DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea). 2011. Reglamento (UE) n° 1131 [internet]. Bruselas (Bélgica): Comisión Europea (CE); [consultado 2017 sep 22]. <https://www.boe.es/doue/2011/295/L00205-00211.pdf>.

Fennema O, Damodaran S, Parkin K. 2007. Food chemistry. 4ta ed. Florida (Estados Unidos): Taylor & Francis Groups. 1160 p.

Fernandes LM, Pereira NC, Mendes ES, Motta Lima OC, Costa SC. 2001. Clarificacao do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* (bert.) utilizando o cacto, *cereus peruvianus* [internet]. Paraná (BRA): Universidade Estadual de Maringá; [consultado 2017 mar 10] Disponible en: <https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=http://ojs.ue.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/viewFile/2766/1829>.

Fuh WS, Chiang BH. 1990. Purification of steviosides by membrane and ion exchange processes. J. Food Sci. 55(5):1454-57. eng. doi: 10.1111/j.1365-2621.1990.tb03956.x.

Garba ZN, Bello I, Galadima A, Lawal AY. 2016. Optimization of adsorbition conditions using central composite design for the removal of copper (II) and lead (II) by deffated papaya seed. Karbala Int. J. Mod. Sci. 2(1):20-28. eng. doi: 10.1016/j.kijoms.2015.12.002.

Gasmalla MAA, Yang R, Hua X. 2015. Extraction of rebaudioside-A by sonication from *Stevia rebaudiana* leaf and decolorization of the extract by polymers. J. Food Sci. Technol. 52(9):5946-5953. eng. doi: 10.1007/s13197-015-1717-3.

Ghandi P, Baxi I, Parag P, inventores. 2016. Process for extraction and debitterizing sweet compounds from stevia plants. Estados Unidos. Patente US 2016/0015066 A1.

Giraldo CE, Marín LD, Habeych DI. 2005. Obtención de edulcorantes de *Stevia rebaudiana*. CENIC Cie. Biol; [consultado 2017 feb 06]. 36(1):8p. esp. Disponible en: <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-2005-4-CB-078.pdf>.

González LA, Noriega JA, Ortega J, Gámez N, Medina LA. 2005. Cinética de adsorción de pigmentos, peróxidos y tocoferoles durante el proceso de blanqueo del aceite de soja. Rev. Grasas y Aceites; [consultado 2017 oct 10]. 56(4):324-327. esp. <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/viewFile/100/100>.

Guerrero S, Alzamora S, Gerschenson L. 1996. Optimization of a combined factors technology for preserving banana purée to minimize colour changes using the response surface methodology. J. Food Eng. 28(1):307-322. eng. doi: 10.1016/0260-8774(95)00036-4.

Hirschler R. 2012. Whiteness, yellowness and browning in food colorimetry. In: Caivano JL, Buera MP, editores. Color in food: technological and psychophysical aspects. Florida (Estados Unidos): CRC Press Taylor & Francis Group. p. 93-102.

Janson JC. 2011. Protein purification: principles, high resolution methods, and application. 3ra ed. New Jersey (Estados Unidos): John Wiley & Sons; [consultado 2017 oct 30]. doi: 10.1002/9780470939932.

Jeppesen PB, Gregersen S, Alstrup KK, Hermansen K. 2002. Stevioside induces antihyperglycemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: studies in the diabetic goto-kakizaki (gk) rats. J. Phytomed. 9(1):9-14. eng. doi: 10.1078/0944-7113-00081.

Jingang S, Wang H, Mingming D, inventores. 2012. Stevia sweetener with a surfactant. Estados Unidos. Patente WO 2012104726 A2.

Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sanchez-Lozada LG. 2010. Potential role of sugar (fructose) in epidemic hypertension, obesity and metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. Am. J. Clin. Nutr; [consultado 2017 feb 14]. 86(4):899-906. eng. Disponible en: <http://ajcn.nutrition.org/content/86/4/899.long>.

Koca N, Karadeniz F, Burdurlu HS. 2007. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. J. Food Chem. 100(2):609-615. eng. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.079.

Le KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, Boesch C, Tappy L. 2009. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. Am. J. Clin. Nutr. 89(6):1760-5. eng. doi: 10.3945/ajcn.2008.27336.

Lemus RA, Vega A, Rojas P, Kong AH. 2016. Assessment of quality attributes and steviosides of *stevia rebaudiana* leaves subject to different drying methods. J. Food Nut. Res. 4(11):720-729. eng. doi: 10.12691/jfmr-4-11-4.

López MN. 2017. Evaluación de productos con contenido de edulcorantes artificiales y naturales [reporte]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-San Antonio de Oriente. 15 p.

Ludwing DS, Peterson KE, Gortmaker SL. 2001. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. Lancet. 357(9255):505-08. eng. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04041-1.

Ma Y, Gao N, Chu W, Li C. 2013. Removal of phenol by powdered activated carbon adsorption. Front. Environ. Sci. 7(2):158-165. eng. doi: 10.1007/s11783-012-0479-7.

Makapugay HC, Nanayakkara NPD, Kinghorn AD. 1984. Improved high-performance liquid chromatographic separation of the *Stevia rebaudiana* sweet diterpene glycosides using linear gradient elution. J. Chrom. 283(16):390-395. eng. doi: 10.1016/S0021-9673(00)96278-2.

Malvania EA, Sheth SA, Sharma AS, Mansuri S, Shaikh F, Sahani S. 2016. Dental caries prevalence among type II diabetic and nondiabetic adults attending a hospital. J. Int. Soc. Prev. Community Dent. 6(3):232-236. eng. doi: 10.4103/2231-0762.197202.

Mangos TJ, Berger RG. 1997. Determination of major chlorophyll degradation products [internet]. Berlín (Alemania): Springer-Berlag Berlin Heidelberg; [consultado 2017 mar 06]. Disponible en: <http://documentslide.com/documents/determination-of-major-chlorophyll-degradation-products.html>.

Marrakchi F, Bouaziz M, Hameed BH. 2017. Activated carbon-clay composite as an effective adsorbent from the spent bleaching sorbent of olive pomace oil: process optimization and adsorption of acid blue 29 and methylene blue. Chem. Eng. Res. Des. 8762(17):30580-4. eng. doi: 10.1016/j.cherd.2017.10.015.

Mishra MB, Mishra S. 2011. Sugar-sweetened beverages: general and oral health hazards in children and adolescents. Int. J. Clin. Pediatr. Dent. 4(2):119-123. eng. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1094.

Monte ML, Monte M, Pohndorf RS, Crexi VT, Pinto LA. 2015. Bleaching with blends of bleaching earth and activated carbon reduces color and oxidation products of carp oil. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 116(1):1-8. eng. doi: 10.1002/ejlt.201400223.

Montoya J, Giraldo GA, Aguirre JC. 2012. Determinación del índice de blancura en harina de trigo comercial. Rev. Vitae; [consultado 2017 oct 8]. 19(1):415-416. esp. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914130>.

- Moreiras GV, Iglesias MS, Samaniego ML. 2016. Composition and nutrient information of non-alcoholic beverages in the Spanish market: an update. *J. Nutri.* 8(10):618. eng. doi: 10.3390/nu8100618.
- Oliveira SP, Mahl CR, Simoes MR, Silva CF. 2012. Chitosan as flocculant agent for clarification of stevia extract. *SciELO Bra: Polím.* 22(4):401-06. eng. doi: 10.1590/S0104-14282012005000066.
- O'keefe JH, Bell DS. 2007. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am. J. Cardiol.* 100(5):899-904. eng. doi: 10.1016/j.amjcard.2007.03.107.
- Ortega GC, Cardozo BM, Guerrero JF, Taboada JE. 2013. Adsorción por lote y en una columna de lecho fijo del colorante b39 sobre carbón activado granular. *Rev. Prospect;* [consultado 2017 jul 28]. 11(1):66-75. esp. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/4962/496250735008.pdf>.
- Puri M, Sharma D, Barrow CJ, Tiwary AK. 2012. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *J. Food Chem.* 132(1):1113–1120. eng. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.063.
- Rajab R, Mohankumar C, Murugan K, Harish M, Mohanan PV. 2009. Purification and toxicity studies of stevioside from *Stevia rebaudiana*. *Toxi. Internat;* [consultado 2017 feb 05]. 16(1):49-54. eng. Disponible en: <http://www.toxicologyinternational.com/article.asp?issn=09716580;year=2009;volume=16;issue=1;spage=49;epage=54;aulast=Rajab>.
- Ramakrishnan SK, Usha A, Muthukumaran G, inventors. 2010. Process for preparing sweetner from *Stevia rebaudiana*. India. Patente WO 20002100 A3.
- Rao AB, Reddy GR, Ernala P, Sridhar S, Ravikumar YVL. 2012. An improvised process of isolation, purification of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves and its biological activity. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47(12):2554-60. eng. doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03134.x.
- Rao AB, Prasad E, Roopa G, Sridhar S, Lakshmi YV. 2012. Simple extraction and membrane purification process in isolation of steviosides with improved organoleptic activity. *Adv. Biosci. Biotech.* 3(4):327-335. eng. doi: 10.4236/abb.2012.34048.
- Reddy A, Norris DF, Momeni SS, Waldo B, Ruby JD. 2016. The pH of beverages in the United States. *J. Am. Dent. Asso.* 147(4):255-263. eng. doi: 10.1016/j.adaj.2015.10.019.
- Reis MHM, Da Silva FV, Andrade CMG, Rezende SL, Wolf MR, Bergamasco R. 2009. Clarification and purification of aqueous stevia extract using membrane separation process. *J. Food Proc.* 32(3):338-354. eng. doi: 10.1111/j.1745-4530.2007.00219.x.

Ribeiro MH, Lourenço PA, Monteiro JP, Ferreira-Dias S. 2001. Kinetics of selective adsorption of impurities from a crude vegetable oil in hexane to activated earths and carbons. *Eur. Food Res. Technol.* 213(1):132-138. eng. doi: 10.1007/s002170100347.

Richman AS, Gijzen M, Starratt AN, Yang Z, Brandle JE. 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *Plant J.* 19(4):411-421. eng. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00531.x.

Rodrigues MI, Iemma AF. 2015. Experimental design and process optimization. 1ra ed. Florida (Estados Unidos): CRC Press Taylor & Francis Group. 336 p.

Rosabal JM, Puyans LG. 2006. Hidrodinámica y separaciones mecánicas. 3ra ed. Ciudad de México (México): Instituto Politécnico Nacional. 325 p.

Saeed K, Ishaq M, Shoukat A, Ahmad I, Rahman A. 2014. Adsorption of alizarin red dye from aqueous solution on an activated charcoal. *Int. J. Sci. Inv. Today*; [consultado 2017 oct 25]. 3(6):705-718. eng. [http://www.ijst.com/admin/ijstiles/ADSORPTION%20OF%20ALIZARIN%20RED%20DYE%20FROM%20AQUEOUS%20SOLUTION%20ON%20AN%20ACTIVATED%20CHARCOAL\\_IJSIT\\_3.6.16.pdf](http://www.ijst.com/admin/ijstiles/ADSORPTION%20OF%20ALIZARIN%20RED%20DYE%20FROM%20AQUEOUS%20SOLUTION%20ON%20AN%20ACTIVATED%20CHARCOAL_IJSIT_3.6.16.pdf).

Schwartz SJ, Von Elbe JH. 1983. Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables. *J. Food Sci.* 48(4):1303-1306. eng. doi: 10.1111/j.1365-2621.1983.tb09216.x.

Schwarz JM, Stanhope KL, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokoza S, Nakajima K, Nakano T, Beysen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ. 2009. Consuming fructose-sweetened, not glucose sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J. Clin. Invest.* 119(5):1322-34. eng. doi: 10.1172/JCI37385.

Sevak NP, Doshi HV, Shah DD, Bhatt MB, inventores. 2014. Extraction method for organic certifiable steviosides from organic stevia leaves. India. Patente WO 2014097319 A1.

Tsai WT, Lai CW, Hsien KJ. 2006. Characterization and adsorption properties of diatomaceous earth modified by hydrofluoric acid etching. *J. Coll. Interf. Sci.* 297(1):749-754. eng. doi: 10.1016/j.jcis.2005.10.058.

U.S. Food and Drug Administration. 2010. High purity rebaudioside A (95%-98%): Food usage conditions for general recognition of safety [internet]. Maryland (EUA): Food and Drug Administration; [consultado 2017 feb 06]. Disponible en: <https://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm269490.pdf>.

Weemaes C, Ooms V, Indrawati, Ludikhuyze L, Van den Broeck I, Van Loey A, Hendrickx M. 1999. Pressure-temperature degradation of green color in broccoli juice. *J. Food Sci.* 64(3):504-508. eng. doi: 10.1111/j.1365-2621.1999.tb15072.x.

Wu Z, Li C. 2009. Kinetics and thermodynamics of  $\beta$ -carotene and chlorophyll adsorption onto acid-activated bentonite from xinjiang in xylene solution. J. Haz. Mat. 171(1):582-587. eng. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.06.047.

Yang R, Musa A, Hua X, Zhang W, Gasmalla MAA. 2014. Physico-chemical assessment and rebaudioside a productively of natural sweeteners (*Stevia rebaudiana*). J. Food Nut. Res. 2(5):209-214. eng. doi: 10.12691/jfnr-2-5-1.



## 7. ANEXO

### Anexo 1. Fundamentación teórica de la extracción.

Esta operación unitaria involucra filtrados con membranas especiales que separan partículas acorde a su peso molecular. Ultra filtrado (UF) puede atrapar partículas tan pequeñas como 0.01  $\mu\text{m}$  y nano filtrado (NF) hasta 0.001  $\mu\text{m}$ . Corte de peso molecular (CPM) es un método de caracterización que describe la distribución de poros y capacidad de retención de las ultra y nano membranas. Se define como el menor de los pesos moleculares (Dalton) a partir del cual más del 90% del soluto es retenido. Membranas de 1,000 a 100,000 Da de CPM son consideradas ultra y de 100 a 1,000, nano. En cuanto a su configuración geométrica estas pueden ser: enrolladas en espiral, tubulares, fibra hueca y de plancha o marco, cada una implica una operación especial. Se recomienda tanto en UF como en NF utilizar fibra hueca o enrollado en espiral, estas permiten lavado *in situ* y retro lavado. Everest Foods utiliza configuración de enrollado en espiral en sus dos membranas (Chakraborty 2017).

Es considerable el diferencial de presión necesario para empujar el fluido a través de las membranas. El NF requiere de mayor presión transmembrana para operar. En el caso de Everest Foods ambas se operan bajo el método de flujo tangencial o cruzado, donde existe un afluente (alimentación) y dos efluentes (permeado y rechazo). Este método es idóneo para filtrar extractos con alto contenido de material filtrable, además, el flujo constante conseguido previene el ensuciamiento superficial de la membrana y permiten reducir el número de limpiezas (Chakraborty 2017).

La coloración verde opaca obtenida es inevitable y se debe al traslape del peso molecular de los esteviósidos con múltiples compuestos como pesticidas, herbicidas, azúcares, endotoxinas/pirógenos y taninos hidrolizables (Tabla 1).

Tabla 1. Traslape de los pesos moleculares en Dalton (Da), entre compuestos atrapados en el concentrado de la nano filtración.

Compuesto glúcido	Peso molecular (Da)		Compuesto Fotosintético
Rebaudiósido D	1129	907	Clorofila B
Rebaudiósido E	967	894	Clorofila A
Rebaudiósido A	967	596	Antoxantina
Rebaudiósido C	951	588	Xantofila
Esteviósido	805	569	Zeaxantina
Rebaudiósido B	805	538	Beta caroteno
Esteviol	626	300	Antocianina

Fuente: (Chakraborty 2017).

Las razones de la poca eficiencia final fueron: (1) la relación inversa entre rendimiento y calidad inherente a las membranas: cuando las presiones transmembrana se aumentan para incrementar el flujo de salida del compuesto meta, la selectividad de la membrana disminuye atrapando menos material deseable. Esta premisa, en el proceso de Everest Foods, es más evidente en la UF donde obtener mayor obtención del permeado claro implica perder más esteviósidos en el rechazo. (2) La bomba de alimentación de membranas tanto en la extracción uno y dos presentó un caudal de fuga menor pero constante a través del largo proceso de filtrado.

Existieron ligeras variaciones poco significativas entre la extracción de la fase uno con respecto a la dos. El cambio más importante se trata del uso de hojas pulverizadas en la extracción de la fase dos, pues según Sevak *et al.* (2014) el diámetro idóneo cuando se trabaja con membranas es de al menos 20 mm ya que partículas más finas reducen el flujo transmembrana al bloquear más rápidamente el sitio activo de filtrado.