



Original

Artículo español

## Extracción de glucósidos edulcorantes de *Stevia rebaudiana bertonii* por métodos de fluidos supercríticos.

### Extraction of *Stevia rebaudiana bertonii* sweetener glycosides by supercritical fluid methods.

Juan José Hinojosa-González<sup>1,2</sup>, Ana Tun-Navarrete<sup>2</sup>, Alvaro Canul-López<sup>2</sup>, Claudia Ruiz-Mercado<sup>2</sup>, José Antonio Rocha-Uribe<sup>2</sup>, David Betancur-Ancona<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México

<sup>2</sup> Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Colonia Chuburná de Hidalgo Inn, 97203 Mérida, Yucatán, México.

#### Resumen

**Objetivo.** Evaluar el método de extracción con dióxido de carbono supercrítico con y sin la adición de cosolvente al sistema (mezcla agua:etanol); para la obtención de los glicósidos mayoritarios a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

**Métodos.** Para la extracción supercrítica se utilizó un equipo modelo SFT-150 SFE/SFR con CO<sub>2</sub> como fluido. Las variables estudiadas fueron la temperatura, presión, el tiempo de extracción y la presencia o ausencia del cosolvente (mezcla agua-etanol en una concentración 70:30 v/v), incorporado en diferentes proporciones para determinar el efecto sobre el rendimiento. La cantidad de glucósidos edulcorantes se analizaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

**Resultados.** La presión fue el factor que favoreció la extracción, la cual fue selectiva en la obtención del Rebaudiósido A con rendimientos no mayores que 2%. La inclusión del cosolvente consiguió un aumento en el rendimiento hasta valores de 2.9 %.

**Conclusión.** El CO<sub>2</sub> supercrítico de manera individual y mezclado con etanol-agua como cosolvente no fue eficiente para extraer los esteviosidos edulcorantes de *Stevia rebaudiana*.

#### Palabras clave

*Stevia*; Fluido supercrítico; Cosolvente; Glucósidos; Edulcorantes

#### Abstract

**Aim.** The aim was to evaluate the supercritical carbon dioxide extraction method with and without the addition of co-solvent to the system (mixture water: ethanol) to obtain the glycosides from leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni.

**Methods.** A SFT-150 SFE / SFR model with CO<sub>2</sub> as a fluid was used for the supercritical extraction. The variables studied were temperature, pressure, extraction time and the presence or absence of the co-solvent (water-ethanol mixture in a concentration of 70:30 v/v), incorporated in different proportions to determine the effect on yield. The amount of glycoside sweeteners was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

**Results.** The pressure was the factor that favored the extraction, which was selective in obtaining Rebaudioside A with yields no greater than 2%. The inclusion of the co-solvent achieved an increase in yield to values of 2.9%

**Conclusion.** Supercritical CO<sub>2</sub> individually and mixed with ethanol-water as a co-solvent was not efficient to extract *Stevia rebaudiana* stevioside sweeteners

#### KEYWORDS

*Stevia*; Supercritical Fluid; Co-solvent; Glycosides; Sweeteners

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [bancona@correo.uady.mx](mailto:bancona@correo.uady.mx) (David Abram Betancur-Ancona).

Recibido el 20 de febrero de 2017; aceptado el 2 de marzo de 2017.



Los artículos publicados en esta revista se distribuyen con la licencia:  
Articles published in this journal are licensed with a:  
Creative Commons Attribution 4.0.  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>  
La revista no cobra tasas por el envío de trabajos,  
ni tampoco cuotas por la publicación de sus artículos.

## Aportación a la literatura científica.

En México, los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportan cifras crecientes de sobrepeso y obesidad en la población tanto infantil como adulta. La elevada ingesta de calorías en la dieta junto con un estilo de vida sedentario, son los principales factores. Así se puede mencionar como una alternativa el uso de la *Stevia rebaudiana*, con un reciente auge de producción en varios estados de México y que posee un poder edulcorante 300 veces más dulce que la sacarosa, sin aportar calorías. Sus principios activos son los esteviósidos y los rebaudiósidos, que son los glucósidos responsables del sabor dulce de la planta, encontrándose en mayor cantidad el esteviósido y rebaudiósido A. En la actualidad, debido al incremento en el consumo de alimentos que sean benéficos a la salud de los consumidores, denominados como “alimentos funcionales”, se han desarrollado investigaciones para obtener de una forma segura, rápida y de bajo costo, las sustancias y los componentes bioactivos que los contengan. En general la extracción de dichos compuestos se realiza a través de solventes orgánicos, que no resultan muy efectivos por ser poco selectivos y laboriosos, tóxicos e inflamables. Una alternativa son los fluidos supercrítico (FSC), definido como cualquier fluido que se encuentra a presiones y temperaturas superiores por encima de sus valores críticos. Esta técnica ha demostrado su eficacia en infinidad de aplicaciones, sin embargo, la respuesta no fue satisfactoria para la extracción de los glucósidos edulcorantes de *Stevia rebaudiana*, obteniéndose rendimientos muy bajos.

## Introducción

La *Stevia rebaudiana* es una planta originaria de Paraguay, con reciente auge de producción en México, que posee un poder edulcorante no calórico 300 veces más dulce que la sacarosa. Los glicósidos responsables del dulzor de la planta fueron descubiertos en 1931 y actualmente extractos conteniéndolos son utilizados como aditivos alimentarios y edulcorantes no calóricos por Japón y Brasil. Además, es una planta que posee diversos componentes nutraceuticos y a la que se le ha atribuido un potencial antidiabético<sup>1</sup>. Los compuestos responsables del dulzor de la *Stevia rebaudiana* son los glucósidos de esteviol de tipo diterpenoide, aislados e identificados como esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F y dulcósido. Éstos compuestos se encuentran en las hojas de la planta en porcentajes variables en función de la especie, las condiciones de crecimiento y las técnicas agronómicas, llegando a alcanzar hasta el 15% de su composición<sup>2</sup>.

Estos glucósidos son considerados como dietéticos porque su estructura no es metabolizada por el organismo humano. Asimismo presentan características de estabilidad al calor (198-200°C), al pH, no se fermentan, son antiplacas y anticaries, por lo que son muy recomendables para diabéticos<sup>3</sup>. En varios estudios se ha reportado el efecto antihiper glucemiante de *S. rebaudiana* y del esteviósido, tanto en modelos animales como en humanos, así como el efecto hipogluce miente. Los esteviósidos reducen el exceso de glucosa en la sangre y tienden a potenciar la secreción de insulina en pacientes con esta enfermedad, pudiendo ser considerada como aditivo para el mejoramiento de la regulación de la diabetes<sup>4</sup>.

Los compuestos dulces de la estevia son usados en Japón, China y Brasil y su mercado se está extendiendo a Europa, Canadá y América Latina debido a las ventajas que ofrecen sobre edulcorantes químicos como el aspartame, acesulfame k, ciclamato, y sobre la sacarosa, por el aporte de calorías. En EE.UU., el rebaudiósido A y glucósidos de esteviol altamente purificados recibieron el estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro) en 2008 y 2009, respectivamente, y están siendo utilizados como aditivos alimentarios. El Comité Mixto (FAO/OMS) de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció en 2008 elevar la IDA (ingesta diaria admisible) para los glucósidos de esteviol expresadas como esteviol 2-4 mg / kg de peso corporal<sup>5,6</sup>.

Muchos de los procesos de extracción de los glucósidos de *Stevia rebaudiana* se llevan a cabo en Japón y hay muchas patentes que los describen. Las diferentes extracciones se pueden categorizar en aquellas basadas en solventes, adsorción cromatográfica, intercambio iónico, precipitación selectiva, procesos de membrana, y fluidos supercríticos<sup>7</sup>. Los beneficios de aplicar la tecnología de FSC en la industria de alimentos son varios, siendo la mas relevante la respuesta a las demandas de producir sin dañar el medio ambiente, ya que en general los solventes utilizados no son contaminantes. La industria química requiere solventes “verdes” para su desarrollo sostenible; los problemas de residuos en los productos finales, los riesgos para el personal de planta y de laboratorios de los compuestos orgánicos volátiles y su descarga a la atmósfera son problemas que preocupan a la sociedad y son cuidadosamente controlados por los gobiernos y los organismos internacionales<sup>8</sup>. El objetivo del trabajo fue determinar las condiciones más adecuadas para la extracción de edulcorantes no calóricos (glucósidos de esteviol) presentes en hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni aplicando técnicas de extracción con fluido supercrítico, en presencia y ausencia de un cosolvente.

## Métodos

### Obtención de la materia prima y molienda.

Se utilizaron hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, variedad Morita II las cuales fueron proporcionadas por el Campo Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el municipio de Mocochoá, Yucatán, México. Las hojas *S. rebaudiana* obtenidas de la variedad fueron secadas a la sombra y pulverizadas en molino dentado Thomas Wiley Model 4 (Thomas Scientific, NJ, E.E.U.U), hasta obtener una harina que se pasó por malla 60 (1 mm) y protegidas de la luz para su uso posterior.

## Extracción de los principales glucósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

La extracción con fluido supercrítico se realizó utilizando un equipo de extracción modelo SFT-150 SFE/SFR System. El diseño modular del SFT-150 hace que sea fácil y rentable para modificar la configuración básica adaptándolo para satisfacer nuevas o cambiantes necesidades de aplicación. El SFT-150 tiene varios mecanismos de control integrado que permite al usuario realizar una amplia variedad de tareas. Estos incluyen la posibilidad de ajustar parámetros como temperatura y presión. Tiene un recipiente de acero inoxidable capaz de contener fluidos supercríticos a presiones de hasta 10.000 psi. (68,9 MPa). El SFT-150 incorpora una bomba de alto rendimiento accionada por aire, lo cual puede producir rápidamente altas presiones necesarias para el trabajo con fluidos supercríticos, además tiene ciertos bloqueos para proporcionar las precauciones de seguridad, evitando el exceso de temperatura o condiciones de presión excesiva. Posee una válvula restrictiva que proporciona un control preciso sobre los flujos, El flujo puede variar de 1 a 330 ml/min (1 a 310 gramos/min) de CO<sub>2</sub> líquido en condiciones normales de funcionamiento. Aunque que el dióxido de carbono es el más comúnmente utilizado, el SFT-150 permite al usuario la flexibilidad para trabajar con una gran variedad de fluidos supercríticos.

El diseño experimental se basó en la metodología de superficie de respuesta, la cual consiste en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés está influenciada por otras. Las variables de interés fueron la temperatura, presión, el tiempo de extracción, la presencia o ausencia, de un cosolvente (mezcla agua-etanol en una concentración 70:30 v/v), este último con variaciones de volumen incorporado para observar el efecto que genera sobre el rendimiento, definido como los g de extracto por cada 100g de stevia; y por último, el uso de diferentes cantidades de estevia para conocer el efecto de la masa de muestra en la obtención de glucósidos.

En un primer ensayo experimental, se utilizó un diseño factorial 2<sup>3</sup> con 5 puntos centrales lo cual dio como resultado trece corridas, esto con el fin de conocer los factores que afectaron el rendimiento, además de identificar la cantidad de glucósidos extraídos sin el uso de un cosolvente. Los factores y niveles evaluados fueron: presión (200-400 bar), tiempo de extracción (30-60 min) y temperatura (40-90 °C). Una vez obtenidos los resultados del diseño anterior se observaron los factores que afectaron el rendimiento de extracción, y con base en esto, se planteó un nuevo diseño factorial 2<sup>2</sup> con 4 tratamientos centrales teniendo como factores y niveles: la presión (200-400 bar) y la adición del cosolvente (10-20%). El diseño con 4 puntos centrales dió como resultado un total de ocho corridas experimentales. En todos los casos el tamaño de muestra fue de 25 g de *Stevia* molida.

## Cuantificación por HPLC de los glucósidos edulcorantes

Se analizaron los extractos obtenidos de *S. rebaudiana* Bertoni variedad Morita II por fluidos supercríticos para cuantificar los glucósidos derivados de esteviol. La cuantificación se realizó de acuerdo a la metodología recomendada por JECFA<sup>6</sup> y validada por Aranda-González *et al.*,<sup>9</sup>. Se elaboró una curva patrón para cada glucósido con 5 concentraciones (10, 20, 30, 40, 50 µg/mL) del estándar rebaudiósido A (Sigma 01432), (20, 40, 60, 80, 100 µg/mL) (Sigma 01432) y (20, 40, 60, 80, 100 µg/mL) del estándar esteviósido (Sigma S3572), los cuales se suspendieron en agua grado HPLC, filtraron con membrana de 0.45 µm y se congelaron a -20 °C hasta su uso. Las condiciones cromatográficas fueron las que se describen a continuación: se utilizó un equipo Agilent serie 100 con una columna Luna 5µ C18 100A (Phenomenex) de 250 mm de longitud, diámetro interno de 4.6 mm y tamaño de partícula de 5µm, la fase móvil fue una mezcla 32:68 (v/v) de acetonitrilo y solución amortiguadora de sodio fosfato 10 mmol/L (pH 2.6), con un flujo isocrático de 1 mL/min y detector UV a 210 nm. Los resultados cromatográficos se analizaron con el programa Clarity versión 2.7.3.498 (2000-2009). Cada muestra se analizó por triplicado y se determinó la concentración a través de la ecuación de la recta de regresión lineal construida con los estándares.

## Análisis estadístico

Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza multifactorial y análisis de regresión para determinar las condiciones en las cuales se obtuvo la mayor cantidad de glucósidos de la *Stevia rebaudiana*, y los factores que influyen en la obtención de estos edulcorantes de acuerdo a los métodos sugeridos por Montgomery<sup>10</sup> y con la ayuda del paquete estadístico Statgraphics plus 5.1.

## Resultados

### Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico

En la Tabla I se muestran las condiciones de cada uno de los tratamientos a los cuales se sometió las hojas molidas de *Stevia rebaudiana* B. en el reactor de fluido supercrítico. Se obtuvieron rendimientos de extracción comprendidos entre valores de 0.14 a 1.91%.

**Tabla I.** Rendimiento de extracción de glucósidos por el método de fluido supercrítico (FSC) sin cosolvente

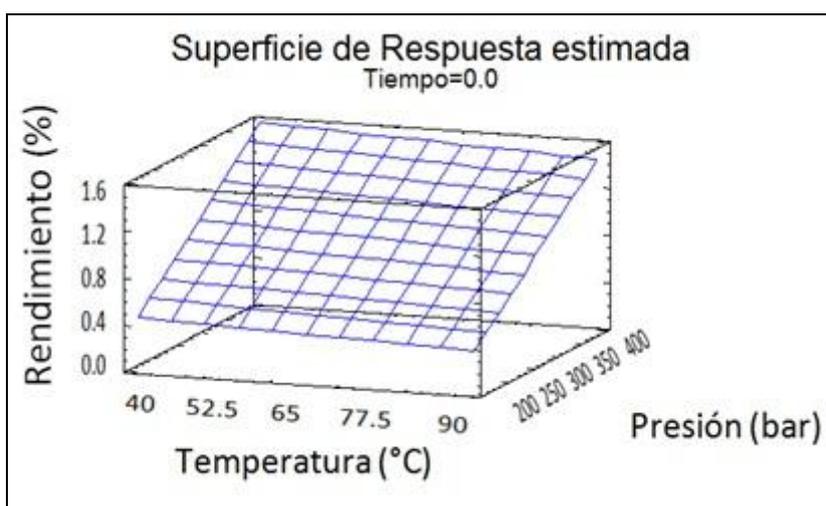
Tratamiento	Presión (bar)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Rendimiento %
1	200	30	40	0.38
2	200	60	40	0.48
3	400	30	40	1.91
4	400	60	40	0.70
5	200	30	90	0.41
6	200	60	90	0.14
7	400	30	90	1.13
8	400	60	90	1.88
9	300	45	65	0.80
10	300	45	65	0.84
11	300	45	65	0.79
12	300	45	65	0.81
13	300	45	65	0.81

El análisis de varianza de los datos indicó que el factor presión presentó efectos significativos para el rendimiento de la extracción ya que tuvo un valor de probabilidad (P) inferior a 0.05. El test de falta de ajuste indicó que el modelo propuesto es adecuado para los datos observados al 95.0% de nivel de confianza. De esta manera la ecuación de la regresión que se ajusta a los datos experimentales es:

$$\text{Rendimiento} = 0.966327 - 0.0506625 * \text{Temperatura} + 0.552063 * \text{Presión} + 0.0382875 * \text{Tiempo} - 0.0078625 * \text{Temperatura} * \text{Presión} + 0.226362 * \text{Temperatura} * \text{Tiempo} + 0.115737 * \text{Presión} * \text{Tiempo} + 0.318163 * \text{Temperatura} * \text{Presión} * \text{Tiempo}$$

El estadístico R<sup>2</sup> indicó que el modelo ajustado explica el 96.88% de los datos de rendimiento obtenidos.

La figura 1 representa la superficie de respuesta completa para los dos factores determinantes en el rendimiento de extracción de los glucósidos de *Stevia rebaudiana* B., Temperatura (°C), Presión (bar).



**Figura I.** Superficie de respuesta estimada para un determinado tiempo (t). Se visualiza la importancia de la presión para el incremento significativo en el rendimiento de extracción.

El rendimiento de extracción global no fue favorable con esta metodología, ya que no superó el 2% para ningún tratamiento del diseño experimental, siendo el valor mínimo esperado de 19% según Aranda-González *et al.*,<sup>11</sup>. Una hipótesis de la posible causa del bajo aprovechamiento es que durante la extracción la presión del sistema no es constante, como se mencionó anteriormente, el equipo SFT-150 funciona a través de un control manual de presión, el cual debe manipularse durante toda la operación para que ésta no salga del intervalo establecido. Por otro lado se cree

que el solvente no fue afín al soluto, de tal manera que no hubo un arrastre importante de glucósidos, es decir, como el CO<sub>2</sub> es no polar, y los glucósidos de esteviol (grupos glucosídicos) son polares, el proceso de extracción no presentó ninguna selectividad específica independientemente de la presión, es por este motivo que se propone un método que incorpora un cosolvente polar al sistema para evaluar si éste tiene algún efecto sobre el rendimiento.

### Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico y adición de cosolvente

En la tabla II se muestran las condiciones y los resultados para la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico y la adición de cosolvente, es posible observar que se obtuvieron rendimientos comprendidos entre valores de 0.38 a 2.89 %.

**Tabla II.** Tratamientos y resultados de la extracción por el método de fluido supercrítico (CO<sub>2</sub> supercrítico) y cosolvente (agua:etanol 70:30 v/v).

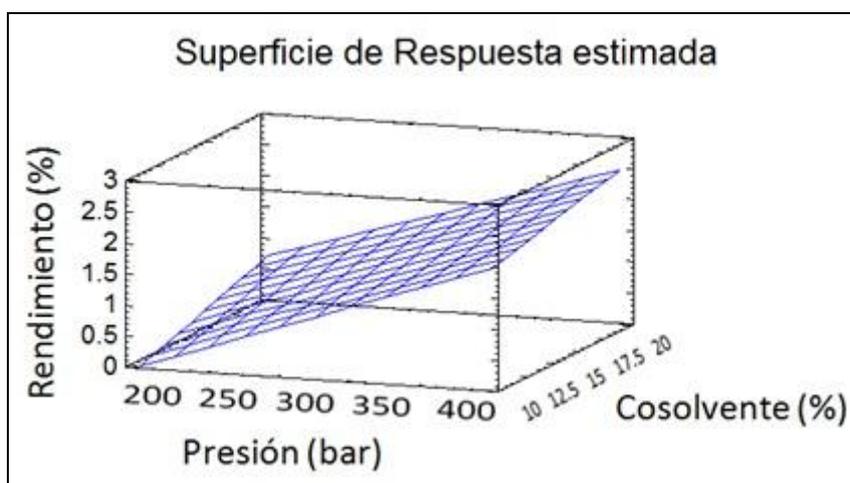
Tratamiento	Presión (bar)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Cosolvente (%)	Rendimiento %
1	200	45	75	10	0,38
2	200	45	75	20	1,12
3	400	45	75	10	2,32
4	400	45	75	20	2,89
5	300	45	75	15	0,76
6	300	45	75	15	0,88
7	300	45	75	15	0,68
8	300	45	75	15	0,77

Al comparar los porcentajes de rendimiento de extracción en presencia y ausencia de un cosolvente se aprecia un incremento debido al aumento en la polaridad de la fase extractante.

El análisis de varianza de los datos reveló que el factor presión nuevamente presenta efectos significativos sobre el rendimiento de la extracción, no así el caso del factor cosolvente que resultó no tener efecto estadísticamente sobre el rendimiento. La ecuación de la regresión que representa los datos de este diseño es:

$$\text{Rendimiento} = 1.3 + 0.9275 \cdot \text{Presión} + 0.3275 \cdot \text{Cosolvente} - 0.0425 \cdot \text{Presión} \cdot \text{Cosolvente}$$

El estadístico R<sup>2</sup> indica que el modelo propuesto explica el 71.55 % de los datos de rendimiento obtenidos. La figura 2 representa la superficie de respuesta completa para los dos factores determinantes en el rendimiento de extracción de los glucósidos de *Stevia rebaudiana* B., Presión (bar) y concentración de cosolvente añadido (%), es decir la representación gráfica del ajuste.



**Figura II.** Superficie de respuesta estimada para un determinado tiempo (t). Se observa el efecto de la presión sobre el rendimiento de extracción.

Los valores del rendimiento no incrementaron de manera importante, ya que sólo se consiguió un aumento de 1% para el valor máximo obtenido, además se encontró según el análisis estadístico, que la influencia de la adición de un cosolvente al sistema no fue significativa ( $\alpha=0.05$ ), sin embargo al considerar la relación entre el cosolvente y la presión, se consiguieron rendimientos más altos con relaciones de cosolvente altas (20%) y presiones altas (400 bar). Esto se puede explicar debido a que los cosolventes polares inducen cambios en la estructura de la matriz celular vía

intra-cristalina y por hinchazón osmótica, se rompen los enlaces de analito-matriz al competir con las interacciones polares entre la matriz y los compuestos que se extraen. Por tal motivo se propone una metodología con un ambiente de extracción completamente polar y manteniendo la presión en niveles altos ya que como se observó anteriormente, parece tener un efecto significativo en la obtención de glucósidos <sup>12</sup>.

## Cuantificación por el método de HPLC de los glucósidos presentes en los extractos

En análisis de los cromatogramas para los extractos obtenidos por fluidos supercríticos evidenció la presencia de rebaudiósido A, sin embargo, para el esteviósido no se observó ningún pico cromatográfico, es decir no se encontraba en una concentración detectable para esta metodología, como resultado de una pobre extracción. Para corroborar esto, se procedió a fortificar las muestras con un estándar de la curva patrón (esteviósido 500µg/mL), esto con el fin de conocer si se encontraba en cantidades importantes el glucósido, es decir, al haber un incremento en la señal correspondiente al estándar se podría determinar por diferencia la concentración de esteviósido en la muestra, sin embargo la respuesta no fue satisfactoria, de tal manera que se procedió a calcular solo la cantidad de rebaudiósido A en los extractos obtenidos ya que este glucósido si mostraba una señal cuantificable por este método. Por lo anterior se procedió a cuantificar así el rebaudiósido A en las muestras de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico con y sin cosolvente.

La figura III muestra los resultados para la cantidad de rebaudiósido A que se pueden extraer por cada 100g de hoja molida en las condiciones propuestas por el diseño experimental FSC sin cosolvente. En el gráfico se distingue que el tratamiento con el mejor aprovechamiento fue el que tiene las condiciones más drásticas del diseño, es decir: Temperatura: 90°C, Presión: 400 bar, y tiempo: 60 min, con una cantidad promedio de 5525±307 µg reb A/ 100 g de hoja, sin embargo en el estudio reportado Aranda-González *et al.*, <sup>2</sup> se determinó una cantidad de 15.15 ± 0.2 g rebaudiósido A/100 g de hoja seca, lo cual pone de manifiesto que el rendimiento está muy por debajo del esperado.

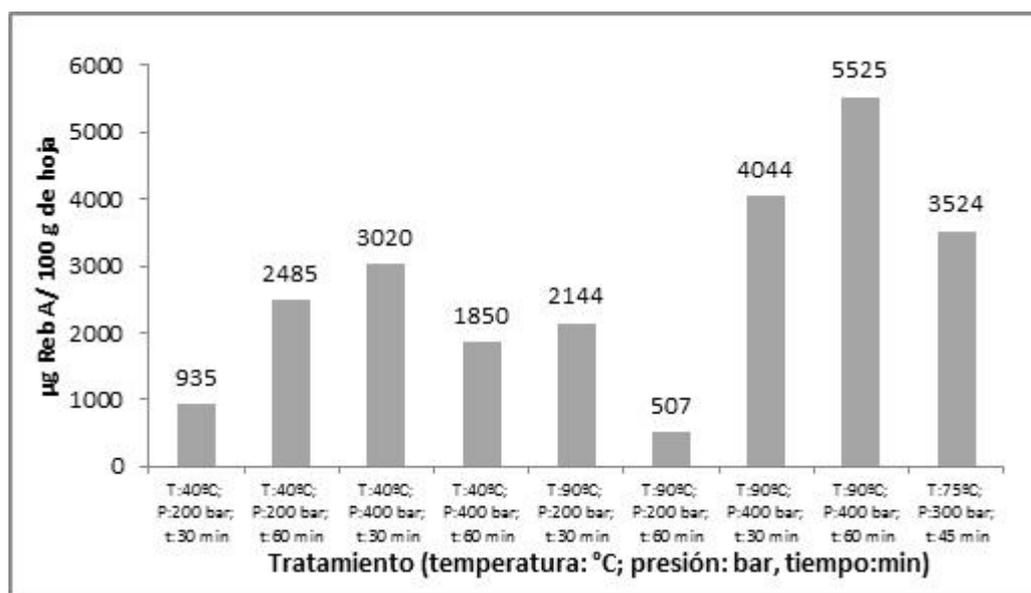


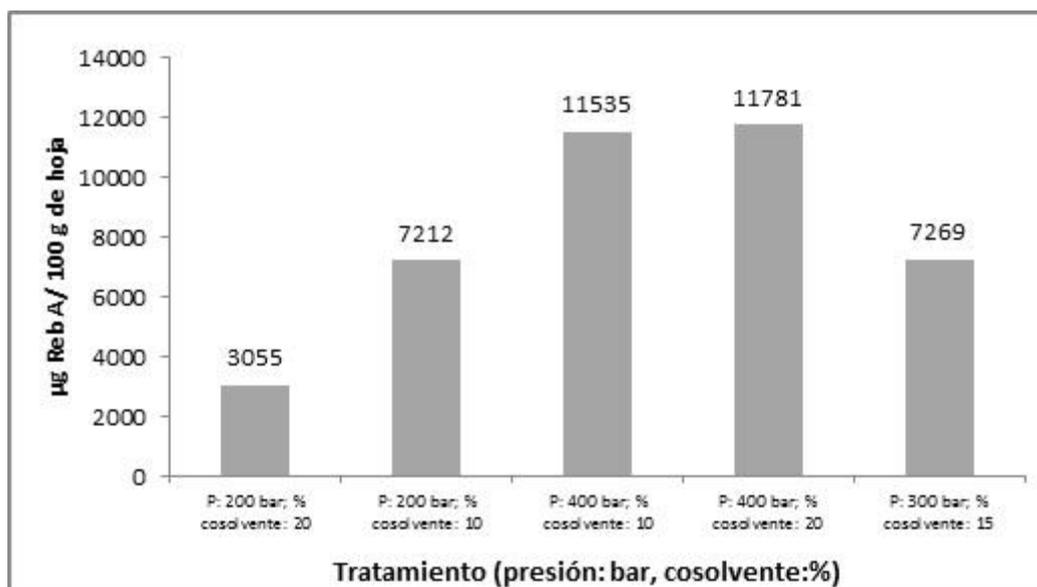
Figura III. Cantidad de rebaudiósido A extraído con FSC por cada 100g de hoja. El resultado de los puntos centrales se presenta como el promedio de las repeticiones.

En la figura IV se presenta un análisis gráfico de los distintos tratamientos y la cantidad del glucósido rebaudiósido A para este diseño, que se pueden extraer por cada 100g de hoja de *Stevia rebaudiana* en las condiciones propuestas por el diseño experimental FSC-cosolvente.

## Discusión

Se obtuvieron rendimientos de extracción comprendidos entre valores de 0.14 a 1.91% para la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, mientras que para la metodología CO<sub>2</sub> supercrítico con la adición de un cosolvente fue de 0.38 a 2.89 %, siendo estos porcentajes de rendimiento de extracción muy bajos para los contenidos de los glucósidos reportados en las hojas de *Stevia rebaudiana*.

La metodología de superficie de respuesta permitió identificar si los factores de cada diseño (presión, temperatura, % cosolvente y relación estevia:agua) tenían un efecto significativo en el rendimiento de extracción. Los análisis de varianza indicaron que para el diseño FSC sin cosolvente, el factor presión presentó efectos significativos ( $\alpha=0.05$ ) sobre el rendimiento. El test de falta de ajuste mostró que el diseño describe de manera lineal a los datos experimentales, de tal manera que la ecuación de la regresión de los datos es de primer orden. Al construir la superficie con la regresión de los datos se tiene que el trayecto para la respuesta estimada cambia rápidamente con un cambio en la presión del sistema. Esto evidencia que a valores más altos se consigue un mejor rendimiento.



**Figura IV.** Cantidad de rebaudiósido A extraído por cada 100g de hoja con FSC y la adición de un cosolvente. El resultado de los puntos centrales se presenta como el promedio de las 4 repeticiones.

Consecuentemente se propuso el diseño FSC-cosolvente al cual se incorporó una mezcla de agua:etanol (70:30 v/v) y se mantuvo la variación en la presión, el análisis de varianza demostró que la presión en el sistema de extracción tiene un efecto significativo para el rendimiento en la condiciones propuestas ( $\alpha=0.05$ ). Se construyó la superficie con la ecuación de regresión de los datos experimentales, la cual, según el test de falta de ajuste es de primer orden, esto indica que se producen cambios importantes en la medida que se incrementa la presión, mientras que un cambio en la concentración de cosolvente no afectó de manera relevante al porcentaje de extracción. Lo anterior se puede explicar en términos de polaridad ya que como el  $\text{CO}_2$  es un compuesto no polar, en el proceso de extracción no presentó ninguna selectividad específica independientemente de la presión, mientras que la adición de la mezcla de agua-etanol como una cosolvente polar debería mejorar la solubilidad de los glucósidos y en consecuencia su extracción.

Al considerar la relación entre el cosolvente y la presión, se consiguieron rendimientos de extracción más altos con relaciones de cosolvente de 20% y presiones altas (400 bar). Lo anterior se debe a que los cosolventes polares inducen cambios en la estructura de la matriz celular vía intra-cristalina y por hinchazón osmótica, se rompen los enlaces de analito-matriz al competir con las interacciones polares entre la matriz y los compuestos que se extraen<sup>12</sup>.

En un estudio realizado para la extracción con fluido supercrítico y análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de los esteviósidos<sup>13</sup>, se encontró que el aumento de la temperatura y la presión no tuvieron un efecto importante para la eficiencia de extracción mediante FSC para el esteviósido, mientras que en el estudio de extracción con  $\text{CO}_2$  supercrítico<sup>14</sup>, los efectos de la temperatura y el cosolvente fueron significativos para el rendimiento, cabe contrastar que para las dos metodologías de extracción con fluidos supercríticos propuestas en este trabajo (FSC y FSC-cosolvente), el factor presión fue el que manifestó tener efectos significativos en términos de rendimiento.

De acuerdo con los resultados del análisis de HPLC de los extractos de *S. rebaudiana* B. variedad Morita II cultivada en Yucatán, en la metodología FSC se determinó una cantidad de  $5.52 \pm 0.31$  mg Reb A/100 g de hoja, para el diseño FSC-cosolvente se tiene la cantidad máxima extraída de  $11.78 \pm 0.20$  mg Reb A/100 g de hoja. Siendo estos últimos, los valores más altos encontrados en los diseños evaluados.

Según Erkucuk *et al.*,<sup>14</sup> los rendimientos más altos obtenidos son 4110 mg esteviósido/g de hoja y 1880 mg rebaudiósido A/g de hoja bajo las condiciones 250 bar, 80°C, usando 20% de cosolvente (etanol-agua (70:30 v/v)), mientras que para el diseño FSC-cosolvente (agua:etanol 70:30 v/v) la cantidad máxima extraída fue de  $11.780 \pm 0.199$  mg reb A/100 g de hoja, por lo que se observa una diferencia importante, es decir se obtuvo 100 veces menos del glucósido rebaudiósido A en la metodología propuesta en este estudio.

Liu *et al.*,<sup>15</sup> estudiaron la extracción con fluidos supercríticos de *S. rebaudiana* utilizando metanol como cosolvente e informaron de una alta eficiencia de extracción. Aunque el metanol es de los cosolventes más usados, se evitó en este estudio, ya que no es un solvente GRAS (generalmente considerado como seguro). En lugar de metanol se utilizó una mezcla agua:etanol (70:30) como cosolvente con el fin de aumentar la polaridad en el sistema.

El propósito de la utilización de un cosolvente para la metodología FSC-cosolvente fue incrementar el rendimiento de extracción de compuestos polares, como lo son los glucósidos de esteviol. El uso del cosolvente redujo la absorción de solutos polares en la superficie de las matrices polares con lo que podría mejorar la hinchazón de la matriz para acelerar la difusión de los analitos fuera del sistema, sin embargo, la respuesta no mejoró significativamente, es decir, los rendimientos y cantidad de glucósidos obtenidos no fue la esperada<sup>16</sup>. Pol *et al.*,<sup>17</sup> compararon dos solventes (agua y etanol) para la extracción a altas presiones, los resultados de los métodos fueron, el extracto acuoso contenía 41.96 mg esteviósido/g hoja de estevia y 22.53 mg rebaudiósido A/g hoja de estevia, mientras que los valores de estos glucósidos fueron 33.76mg/g y 14.84 mg/g respectivamente para los extractos en etanol.

## Conclusiones

La utilización de fluidos supercríticos como una estrategia experimental para la extracción de glucósidos edulcorantes de *Stevia rebaudiana* planteaba la posibilidad de realizar procesos más eficientes, con menor número de experimentos y que brindaran mayor información acerca del comportamiento del sistema, así como una reducción el impacto ambiental por el uso de menos solventes, y una optimización de la técnica de extracción de los glucósidos de esteviol. Sin embargo, a pesar de los beneficios de la metodología FSC, como el de ofrecer productos libres de solventes, en contraste con los generados por métodos convencionales, en este trabajo se encontró un menor aprovechamiento en la extracción de glucósidos de esteviol en las condiciones propuestas por el diseño experimental utilizando CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico con y sin la adición de un cosolvente.

## Fuentes de apoyo

Fundación Educación Superior-Empresa (FESE-México).

## Conflicto de Interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## Referencias

1. Madan S, Ahmad S, Singh G, Kohli, K, Kumar Y, Singh R, Garg M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – A review”. Indian J. Nat. Prod. Res. 2010; 1 (3): 267-286.
2. Aranda-González I, Barbosa-Martín E, Toraya-Avilés R, Segura-Campos M, Moguel-Ordoñez Y, Betancur-Ancona D. Evaluación de la inocuidad de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivada en el sureste de México como edulcorante de alimentos. Nut. Hosp. 2014; 30 (3): 594-601
3. Wöelwer-Rieck U. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: A review. J. Agric. Food Chem. 2012; 60: 886-895
4. Kujur RS, Singh V, Ram M, Yadava HN, Singh KK, Kumari S, et al. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. Pharmacognosy Res. 2010; 2(4): 258-63.
5. Woelwer-Rieck U, Lankes C, Wawrzun A, Wüst M. Improved HPLC method for evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. Eur. Food Res. Technol. 2010; 231: 581-8.
6. JECFA. Compendium of food additive specifications. FAO, JECFA, Monographs. ISSN 1817-7077, 2010; 10, 17-23.
7. Goyal SK, Samsher, Goyal RK. *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: A review. Int. J. Food Sci. Nut. 2010; 61 (1): 1-10
8. Velasco R. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. Inf. Tecnol. 2007; 18(1): 53-65.
9. Aranda-González I, Moguel-Ordoñez Y, Betancur-Ancona D. Validation of HPLC-UV method for determination of minor glycosides contained in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. Biomed Chrom. 2015; 29: 733-738
10. Montgomery DC. Diseño y análisis de experimentos. México. 2ª ed. Editorial Limusa Wiley. 2004
11. Aranda-González I, Moguel-Ordoñez Y, Betancur-Ancona D. Determination of rebaudioside A and stevioside in leaves of *S. rebaudiana* Bertoni grown in México by a validated HPLC method. Am. J. Anal. Chem. 2015; 6: 878-885.
12. Bjorklund E, Jaremo M, Mathiasson L, Jonsson JA, Karlsson L. Illustration of important mechanisms controlling mass transfer in supercritical fluid extraction, Analy. Chim. Acta. 1998; 368: 117–128.
13. Hae Choi Y, Kim I, Yoon K.D., S.J. Lee, C.Y. Kim, K.P. Yoo, Y. Hee Choi, J. Kim. Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from *Stevia rebaudiana* leaves. Chromatographia, 2002; 55: 617–620.
14. Erkucuk A, Akgun IH, Yesil-Celiktas O. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. The J. Supercrit. Fluids. 2009; 51: 29–35.
15. Liu J, Ong CP, Li SFY. Subcritical fluid extraction of stevia sweeteners from *Stevia rebaudiana*, J. Chrom. Sci. 1997; 35: 446–450.
16. Langenfield JL, Hawthorne SB, Miller DJ, Pawliszyn J. Role of modifiers for analytical-scale supercritical fluid extraction of environmental samples. Anal. Chem. 1994; 66: 909-16
17. Pol J, Ostra EV, Karasek P, Roth M, Benesova K, Kotlarikova P, Caslausky J. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water, Anal Bioanal Chem. 2007; 388:1847–1857.