

## **Nuevo procedimiento de clarificación de extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Estevia) ricos en esteviolglicósidos**

New process for the clarification of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Stevia) extracts rich in steviol glycosides

Aurora Terylene Pérez Martínez<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5813-3111>

Carol Cristina Carvajal Ortíz<sup>1</sup> <https://orcid.org/000-0003-2324-8087>

Janet Quiñones Galvez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2229-0745>

Alen Nils Baeza Forte<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2262-9435>

Ariel Martínez García<sup>3,4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2742-2321>

Oscar Vitalio Concepción Laffitte<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2572-9445>

<sup>1</sup>Universidad Máximo Gómez Báez. Centro de Bioplantas. Ciego de Ávila, Cuba.

<sup>2</sup>Centro Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) Laboratorio Proteómica. La Habana, Cuba

<sup>3</sup>Universidad de La Habana. Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales. La Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones en Plantas Proteicas y Productos Bionaturales. Complejo Barlovento, La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [terylene@gmail.com](mailto:terylene@gmail.com), [aperez@bioplantacuba.cu](mailto:aperez@bioplantacuba.cu)

### **RESUMEN**

**Introducción:** *Stevia rebaudiana* Bertoni se destaca por poseer compuestos edulcorantes de bajo valor calórico llamados esteviolglicósidos que pueden sustituir al azúcar con un poder endulzante 300-450 veces superior y con

múltiples potencialidades terapéuticas. Se han desarrollado de diferentes procedimientos para mejorar la calidad de sus extractos, aumentar el poder competitivo y la factibilidad económica de los procesos industriales, quedando aún mucho por hacer en este sentido.

**Objetivo:** Determinar el efecto del carbón activado y semillas de *Moringa oleífera* Lam sobre la clarificación de extractos acuosos de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II.

**Métodos:** Los extractos acuosos se obtuvieron a partir de hojas de *Stevia rebaudiana*, con tamaño de partícula 0,7  $\mu\text{m}$ , relación masa/volumen 1:10 y maceración con agitación a 25 °C durante 3 h. Se evaluaron dos agentes clarificantes: carbón activado y semillas de *Moringa oleífera*. En los diferentes tratamientos de clarificación se evaluó la absorbancia de los extractos a 650 y 210 nm, así como la concentración de esteviósidos, rebaudiósido A y totales.

**Resultados:** Las semillas desnudas, desengrasadas y trituradas (37.5 mg.ml<sup>-1</sup>) en el tercer ciclo de clarificación resultaron el agente clarificante más efectivo, mostrando menor contaminación tanto por turbidez como por compuestos coloreados sin afectar el contenido de esteviolglicósidos del extracto.

**Conclusiones:** El uso del método de clarificación seleccionado (semillas de *Moringa oleífera*), constituye un método efectivo para la clarificación de extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* con calidad aceptable para la preparación de siropes de uso industrial.

**Palabras clave:** estevia; esteviolglicósidos; rebaudiósido; clarificación; moringa.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Stevia rebaudiana* Bertoni stands out for having low-calorie sweetening compounds called steviol glycosides that can replace sugar with a 300-450 times higher sweetening power and with multiple therapeutic potentials. Different procedures have been developed to improve the quality of its extracts, increase the competitive power and economic feasibility of industrial processes, and there is still much to be done in this regard.

**Objective:** To determine the effect of activated charcoal and seeds of *Moringa oleifera* Lam on the clarification of aqueous extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II leaves.

**Methods:** Aqueous extracts were obtained from *Stevia rebaudiana* leaves, with particle size 0.7  $\mu\text{m}$ , mass/volume ratio 1:10 and maceration with agitation at 25 °C for 3 h. Two clarifying agents were evaluated: activated charcoal and *Moringa oleifera* seeds. The absorbance of the extracts at 650 and 210 nm was evaluated, as well as the concentration of steviosides, rebaudioside A and totals.

**Results:** Naked, degreased and crushed seeds (37.5 mg.ml<sup>-1</sup>) in the third clarification cycle were the most effective clarifying agent, showing less contamination by both turbidity and colored compounds without affecting the steviol glycoside content of the extract.

**Conclusions:** The use of the selected clarification method (*Moringa oleifera* seeds) is an effective method for the clarification of aqueous *Stevia Rebaudiana* extracts with acceptable quality for the preparation of syrups for industrial use.

**Keywords:** stevia; steviol glycosides; rebaudioside; clarification; moringa.

Recibido:24/12/2022

Aceptado: 05/07/2023

## Introducción

En la actualidad existen varias especies vegetales que despiertan la atención de diferentes sectores de la sociedad por sus múltiples beneficios alimenticios, medicinales, industriales y ambientales, *Stevia rebaudiana* Bertoni (*S. rebaudiana*) es una de ellas.<sup>(1)</sup>

*Stevia rebaudiana* es una planta herbácea y arbustiva perteneciente a la familia Asteraceae, nativa de Paraguay, y se destaca por poseer compuestos edulcorantes (esteviolglicósidos) de bajo valor calórico que pueden sustituir al azúcar;<sup>(2)</sup> al contar entre sus principales componentes endulzantes, al esteviósido, rebaudiósido A, B, C, D, E, F, M y dulcósido A.<sup>(3)</sup> De ellos el de mayor presencia en las hojas es el esteviósido (4-13 % de la masa seca total), con un sabor amargo permanente y un poder endulzante 150-300 veces mayor al de la sacarosa; seguido en segundo lugar por el rebaudiósido A, por su abundancia (2-4 % de la masa seca total) y el de mayor interés debido a su sabor de mejor calidad, no mostrar retrogusto amargo y ser el más estable, con un poder endulzante 250 - 450 veces mayor al de la sacarosa, mientras que el rebaudiósido C (1-2 % de la masa seca total), cuenta con poder endulzante de 50 - 120 veces mayor al de la sacarosa. Por otra parte, el dulcósido A (0,4 - 0,7 % de la masa seca total) tiene igual poder endulzante que el rebaudiósido C.<sup>(3,4,5)</sup>

Los esteviolglicósidos son compuestos de bajo valor calórico, no genotóxicos, no cancerígenos, no mutagénicos y potentes antihiperoglucemiantes que reducen el nivel de azúcar en la dieta sin crear reacciones alérgicas, estimulan la secreción de insulina por el páncreas en el tratamiento de la diabetes y de otros disturbios del metabolismo de los carbohidratos.<sup>(2,6,7)</sup> Además, en la actualidad se ha demostrado que los constituyentes de *Stevia rebaudiana* tienen propiedades antiamnesia, antitumoral, antihipertensiva, antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antihiperoglucemiante,

hepatoprotectiva, nefroprotectiva, antiprotozoaria, antihemolítica, antiinflamatoria e inmunomoduladora.<sup>(3,8)</sup>

Las potencialidades terapéuticas y para la industria alimenticia de la *Stevia rebaudiana* han generado la necesidad de establecer métodos de extracción y purificación de sus constituyentes. Para la extracción, los métodos convencionales involucran el uso, a diferentes temperaturas, de: agua, metanol, etanol, cloroformo, sorbitol, glicerina, propilenglicol y diferentes mezclas; y los modernos utilizan líquidos presurizados, fluidos supercríticos, lixiviación, asistida por microondas, ultrasonido y *soxhlet*,<sup>(9,10,11)</sup> en el que la mayoría de los solventes son tóxicos y en muchas ocasiones costosos, lo que representa un riesgo potencial en el proceso.<sup>(12)</sup> Sin embargo, el agua se encuentra entre los solventes más utilizados para la extracción, debido a que el rebaudiósido A es más soluble en agua que el esteviósido, lo que unido a su no toxicidad, sencillez, reproducibilidad y menor gasto económico que representa su uso hacen que la extracción con agua, resulte una alternativa más viable.<sup>(9,13)</sup>

La principal desventaja en el uso de extractos ricos en esteviolglicósidos es su sabor amargo asociado a otros que se describen como herbal, metálico o similar al regaliz<sup>(5,14)</sup> los cuales se deben a la presencia, de otros compuestos como clorofilas A, B, C, terpenos, taninos y otros compuestos fenólicos que ocasionan, la coloración oscura de extractos y cristales.<sup>(5,15,16)</sup>

Para hacer más atractivo el uso de los glucósidos de la *Stevia rebaudiana* y lograr su comercialización es necesario implementar un método para la remoción o disminución de los compuestos que afectan tanto el sabor como el color y que son liberados durante el proceso de extracción; con esta finalidad se utilizan diversas técnicas como: precipitación selectiva, gel de plásmido, intercambio iónico, precipitación con hidróxido de calcio-dióxido de carbono, cromatográficos, ultrafiltración y adsorción. Dentro de las técnicas mencionadas, una de las más utilizadas es la adsorción por carbón

activado, en virtud de la simplicidad del diseño, la facilidad de la operación e insensibilidad a las sustancias tóxicas.<sup>(5,9,10,11,14,16).</sup>

Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado que las semillas de *Moringa oleífera* Lam se consideran entre los coagulantes naturales más utilizados, considerando además que poseen propiedades floculantes y adsorbentes, son de fácil adquisición, bajo costo y baja toxicidad.<sup>(17,18)</sup> Estas semillas están catalogadas como el mejor coagulante para aguas turbias, al reducir la contaminación por sustancias tóxicas y remover colorantes sintéticos en el agua residual de procesos industriales.<sup>(18,19,20).</sup>

Hasta la actualidad se han desarrollado diferentes procedimientos para mejorar la calidad de los extractos de steviolglicósidos de *Stevia rebaudiana* con el fin de aumentar el poder competitivo y la factibilidad económica de los procesos industriales. Sin embargo, la mayoría son muy costosos y complejos; y es por ello que el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del carbón activado y las semillas de *Moringa oleífera* Lam sobre la clarificación de extractos acuosos de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II.

## Métodos

Como material vegetal se utilizaron hojas de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni var. Morita II (Asteraceae), depositado en el herbario Julián Acuña de la Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte, Cuba, con número de voucher CB-0020, provenientes de plantas de 90 días de cultivo en los canteros del área de aclimatización del Centro Bioplasmas.

Las plantas se cultivaron en un sustrato de suelo rojo y humus de lombriz (1:1, v:v), con iluminación de luz solar directa y un flujo de fotones fotosintético (FFF) de  $800 \pm 50 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  medidos a las 12:00 PM. El fotoperiodo se correspondió con el ciclo natural de los días y las noches de

16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se utilizó riego por aspersion una vez al día. La humedad relativa fue de  $40 \pm 5$  %.

Las hojas se secaron a 70 °C en estufa modelo HS62A hasta obtener la masa seca constante. Posteriormente, las hojas secas se molieron con molino modelo Mikro-Feinmuhle-Culatti (MFC) con tamaño de partícula de 0.7  $\mu\text{m}$ . Para la obtención del extracto crudo se mantuvo la proporción masa seca de polvo de hojas (g): volumen de agua (ml) 1:10 (m: v). La extracción acuosa se realizó a 25 °C, durante 3 h y en agitación con impelente.

Las determinaciones de absorbancia de diterpenos totales se realizaron con espectrofotómetro Rayleigh UV-2601, a 210 nm para diterpenos totales y a 650 nm para los pigmentos. Las muestras se analizaron con tres lecturas de absorbancia por cada réplica.

Para determinar la concentración de esteviolglucósidos en los extractos se realizó el análisis de las muestras en un sistema cromatográfico Shimatzu HPLC-UV. Para las lecturas se empleó una columna Amino (NH<sub>2</sub>). Como fase móvil se utilizó una mezcla de Metanol: Agua (70:30), pH = 2.8. Con un flujo de 0,85 ml·min<sup>-1</sup>. El volumen de inyección fue de 5  $\mu\text{L}$  y los análisis se realizaron a 210 nm.

Para determinar las concentraciones de esteviolglucósidos (mg.ml<sup>-1</sup>) en las muestras se realizó una curva de calibración de una mezcla estándar de esteviolglucósidos (esteviósido + rebaudiósido A).

### **Clarificación de extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* con carbón activado**

Se evaluó el efecto clarificante del carbón activado, por la adsorción de los compuestos que aportan color a los extractos de *Stevia rebaudiana*, ricos en esteviolglucósidos. El proceso de adsorción (ciclos de clarificación con carbón activado) de los compuestos contaminantes de las muestras se

agruparon en cuatro tratamientos: sin clarificar, un ciclo, dos ciclos y tres ciclos.

Se realizaron tres réplicas por tratamiento.

Para la clarificación se tomaron alícuotas del extracto crudo acuoso obtenido y se clarificaron con carbón activado a 20 mg.ml<sup>-1</sup> (2 %).<sup>(21)</sup> Luego de agregar el agente clarificante, se agitaron por 20 min en agitador vortex modelo IKA GENIUS3 y se centrifugaron a 21891 x g durante 20 min en centrífuga modelo Heal Force.

Se determinó la absorbancia (210 y 650 nm) y la concentración (HPLC-UV) de esteviolglucósidos de los extractos correspondientes a todos los tratamientos.

## **Clarificación de extractos acuosos de *Stevia. rebaudiana* con semillas de *Moringa oleífera***

### **Clarificación con diferentes partes de las semillas**

El efecto de las diferentes partes de las semillas de *Moringa oleífera* Lam. (*M. oleífera*) en la clarificación de extractos ricos en esteviolglucósidos de *Stevia. rebaudiana* se evaluó al tomar alícuotas del extracto acuoso obtenido y clarificarlos en cuatro tratamientos: sin clarificar, semillas completas trituradas, cáscaras de semillas trituradas y semillas sin cáscaras desengrasadas y trituradas.

Se realizaron tres réplicas por tratamiento y un ciclo de clarificación en cada caso.

Para el proceso de clarificación se utilizaron 37,5 mg / ml de extracto acuoso (3,75 %). Inicialmente la mezcla se agitó vigorosamente por 2 min y luego lentamente por 15 min en agitador magnético. Se filtró por gasa para eliminar el residuo sólido grueso. Luego se centrifugó a 21891 x g durante 20 min en centrífuga modelo Heal Force. Se determinó la absorbancia (210 y 650 nm) y



la concentración (HPLC-UV) de esteviolglucósidos de los extractos correspondientes a todos los tratamientos.

### **Ciclos de clarificación con semillas de *M. oleífera***

Se realizó la evaluación del efecto clarificante de las semillas de *Moringa oleífera* en extractos ricos en esteviolglucósidos de *Stevia rebaudiana*.

El proceso (ciclos de clarificación con semillas de *Moringa oleífera*) se agrupó en cuatro tratamientos: sin clarificar, un ciclo, dos ciclos y tres ciclos.

Se realizaron tres réplicas por tratamiento y para la clarificación se utilizaron 37,5 mg de semilla/ ml de extracto acuoso (3.75 %).

Se tomaron alícuotas del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* y se añadió semilla desengrasada y triturada de *Moringa oleífera*. Inicialmente la mezcla se agitó vigorosamente por 2 min y luego lentamente por 15 min en agitador magnético. Se filtró por gasa para eliminar el residuo sólido grueso. Se estableció un control de extracto sin clarificar. Se utilizaron tres réplicas para cada uno. Se determinó la absorbancia (210 y 650 nm) y la concentración (HPLC-UV) de esteviolglucósidos de los extractos correspondientes a todos los tratamientos.

### **Relación masa de semillas y volumen de extracto**

Se diseñó con el objetivo de evaluar el efecto de la relación entre la masa de semillas desnudas, desengrasadas y trituradas de *Moringa oleífera* y para 1 ml de extracto, en la clarificación de extractos acuosos de *Stevia rebaudiana*.

Se tomaron alícuotas del extracto acuoso obtenido y se clarificaron con cuatro tratamientos: 0,0 mg (0 %), 37.5 mg (3,75 %), 62.5 mg (6,25 %) y 87.5 mg (8,75 %) por ml de extracto crudo.

Se utilizaron tres réplicas por tratamiento y tres ciclos de clarificación en cada caso.

La mezcla se agitó vigorosamente por 2 min y luego lentamente por 15 min en agitador magnético. Se filtró por gasa para eliminar el residuo sólido. Luego se centrifugó a 21 891 xg durante 20 min en centrífuga modelo Heal Force. Se determinó la absorbancia (210 y 650 nm) y la concentración (HPLC-UV) de esteviolglucósidos de los extractos correspondientes a todos los tratamientos.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20 para Windows, SPSS Inc. El ajuste a la distribución normal de los datos y la homogeneidad de las varianzas de cada tratamiento se comprobaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene. Se realizaron pruebas paramétricas ANOVA de un factor y Tukey para comparar las diferencias ( $p \leq 0,05$ ) entre las muestras ( $n = 3$ ).

## Resultados

### Clarificación de extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* con carbón activado

En la tabla 1 se muestran los resultados de la clarificación del extracto acuoso con carbón activado a 20 mg.ml<sup>-1</sup>.

Como se puede apreciar la presencia de pigmentos (absorbancia a 650 nm) disminuyó a medida que aumentaron los ciclos de adsorción con carbón activado, con el menor valor después del tercero y una disminución de 45 (ciclo 1), 48 (ciclo 2) y 58 % (ciclo 3) con respecto al control.

La absorbancia 210 nm, asociada al contenido de diterpenos totales, tuvo un comportamiento similar a los pigmentos, alcanzando su menor cifra al realizar tres lavados por carbón activado.

**Tabla 1-** Clarificación de extractos acuosos crudos de *S. rebaudiana* con carbón activado

Ciclos de clarificación (Carbón activado)	Absorbancia (650 nm)	Absorbancia (210 nm)	Esteviósidos (mg·ml <sup>-1</sup> )	Rebaudiósido A (mg·ml <sup>-1</sup> )	Total (mg·ml <sup>-1</sup> )
0	1,454 c	0,510 a	1,13	7,88	9,01
1	0,849 b	0,416 ab	0,51	6,36	6,87
2	0,710 ab	0,441 ab	0,75	4,42	5,17
3	0,653 a	0,309 b	0,00	3,87	3,87

Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor y Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$ ).

Los análisis por HPLC-UV corroboraron el comportamiento observado en los análisis espectrofotométricos al no detectarse la presencia de esteviósidos y disminuir la concentración de rebaudiósido A y la total con el incremento de los ciclos de clarificación.

## Clarificación de extractos acuosos de *S. rebaudiana* con semillas de *M. oleífera*

### *Clarificación con diferentes partes de las semillas*

Los resultados de la clarificación del extracto acuoso con diferentes partes de las semillas de *Moringa oleífera* se muestran en la tabla 2, donde se aprecia que la presencia de pigmentos (absorbancia a 650 nm) fue menor cuando la clarificación se realizó con polvo de semillas de *Moringa oleífera* sin cáscara desengrasadas, lográndose una disminución con respecto al control de 68 %.

Para las cáscaras de semillas y las semillas completas no se logró disminución de pigmentos, mostrando una absorbancia a 650 nm similar al control.

**Tabla 2** - Clarificación de extractos de *Stevia rebaudiana* con diferentes partes de semillas de *Moringa oleífera*.

Clarificación ( <i>Moringa oleífera</i> )	Absorbancia (650 nm)	Absorbancia (210 nm)	Esteviósidos (mg·ml <sup>-1</sup> )	Rebaudiósido A (mg·ml <sup>-1</sup> )	Total (mg·ml <sup>-1</sup> )
Sin clarificar (control)	1,454 b	0,510 a	1,13 a	7,88 a	9,01 a
Semillas completas trituradas	1,471 b	0,564 a	1,09 a	7,56 a	8,65 a
Cáscaras de semillas trituradas	1,482 b	0,534 a	1,05 a	7,62 a	8,67 a
Semillas sin cáscaras desengrasadas y trituradas	0,902 a	0,555 a	1,11 a	7,07 a	8,18 a

Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor y Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$ ).

La absorbancia 210 nm, asociada al contenido de diterpenos totales se mantuvo constante e independiente de la parte de la semilla con la que se realizó la clarificación.

Los análisis por HPLC-UV corroboraron el comportamiento observado en los análisis espectrofotométricos al no existir diferencias en la concentración de esteviósidos, rebaudiósido A y la total con respecto al resto de los tratamientos.

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó la clarificación con semillas desnudas, desengrasadas y trituradas para continuar la experimentación.

### Ciclos de clarificación con semillas de *Moringa oleífera*

La tabla 3 muestra los resultados de clarificación del extracto acuoso con semillas de *Moringa oleífera* desnudas, desengrasadas y trituradas.

Como se puede apreciar la presencia de pigmentos (absorbancia a 650 nm) disminuyó a medida que aumentó el número de ciclos de clarificación.

El menor valor de absorbancia 650 nm se obtuvo cuando el extracto se clarificó tres veces. La disminución de los pigmentos varió desde 38 % para el ciclo uno, 52 para ciclo dos y 64 % para el ciclo tres.

**Tabla 3** - Clarificación de extractos de *S. rebaudiana* con semillas sin cáscara desengrasadas y trituradas de *Moringa oleífera*.

Ciclos de clarificación ( <i>Moringa. oleífera</i> )	Absorbancia (650 nm)	Absorbancia (210 nm)	Esteviósidos (mg·ml <sup>-1</sup> )	Rebaudiósido A (mg·ml <sup>-1</sup> )	Total (mg·ml <sup>-1</sup> )
0	1,454 d	0,510 a	1,13 a	7,88 a	9,01 a
1	0,902 c	0,564 a	1,61 a	7,45 a	9,06 a
2	0,702 b	0,523 a	1,72 a	7,37 a	9,09 a
3	0,521 a	0,501 a	1,75 a	8,05 a	9,80 a

Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor y Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$ ).

Por su parte, la absorbancia a 210 nm, asociada al contenido de diterpenos totales, se mantuvo constante independientemente de los ciclos de clarificación, resultado que se corroboró en los análisis de HPLC-UV para esteviósidos, rebaudiósido A y concentración total.

En este experimento se demostró la eficiencia del incremento de los ciclos de clarificación con el uso de las semillas desnudas, desengrasadas y trituradas de *Moringa oleífera*.

### Relación masa de semillas y volumen de extracto

La tabla 4 muestra la clarificación de extracto acuoso crudo de *Stevia rebaudiana* con diferentes relaciones de masa de semilla desnuda, desengrasada y triturada de *Moringa oleífera* y el volumen de extracto, expresados en forma de concentración (mg·mL<sup>-1</sup>).

La presencia de pigmentos (absorbancia a 650 nm) disminuyó a medida que aumentó la concentración del agente clarificante, llegando hasta obtenerse

un 90 % para la mayor masa de semillas y con altos valores para el resto de las masas evaluadas (62 y 69 %).

**Tabla 4** - Clarificación de extractos de *Stevia rebaudiana* con diferentes concentraciones de semillas desengrasadas y trituradas de *Moringa oleífera*.

Clarificación con <i>Moringa oleífera</i> . Dosis (mg·mL <sup>-1</sup> )	Absorbancia (650 nm)	Absorbancia (210 nm)	Esteviósidos (mg·mL <sup>-1</sup> )	Rebaudiósido A (mg·mL <sup>-1</sup> )	Total (mg·mL <sup>-1</sup> )
00,0	1,454 c	0,510 a	1,13 a	7,88 a	9,01 a
37,5	0,521 b	0,513 a	1,11 a	7,57 a	8,68 a
62,5	0,450 b	0,490 a	1,07 a	8,40 a	9,47 a
87,5	0,150 a	0,318 b	0,04 b	2,23 b	2,27 b

Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor y Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$ ).

Al analizar la absorbancia a 210 nm, asociada al contenido de diterpenos totales, no se mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de 37.5 y 62.5 mg·mL<sup>-1</sup> con el tratamiento control sin clarificar.

Sin embargo, la mayor concentración evaluada (87.5 mg·mL<sup>-1</sup>) afectó este indicador.

Un comportamiento similar se encontró en los análisis de HPLC-UV, tanto para esteviósidos, como para el rebaudiósido A y la concentración total.

Teniendo en cuenta los resultados se seleccionó como la mejor concentración 37,5 mg de semillas desnudas, desengrasadas y trituradas por mL de extracto acuoso crudo de *Stevia. rebaudiana* Bertoni.

La figura 1 muestra la comparación de los procesos de clarificación (tres ciclos) con carbón activado (20 mg.ml<sup>-1</sup>) y con semillas desnudas, desengrasadas y trituradas (37.5 mg.ml<sup>-1</sup>)



**Fig. -1** - Clarificación de extracto acuoso crudo de *S. rebaudiana*. A) Sin clarificar. B) Ciclos de clarificación con carbón activado. C) Ciclos de clarificación con semilla desnuda, desengrasada y triturada de *M. oleifera*.

Como se puede observar, durante los ciclos 1 y 2 no se observaron diferencias cualitativas entre la acción de ambos agentes clarificantes.

Sin embargo, se logra un mejor resultado con el uso semillas desnudas, desengrasadas y trituradas (37,5 mg.ml<sup>-1</sup>) en el tercer ciclo de clarificación (fig. 1C-3) con respecto al carbón activado (fig. 1 B-3), lográndose un extracto con menor contaminación tanto por turbidez como por compuestos coloreados (fig. 1C-3) y sin afectar el contenido de estevioglucósidos del extracto (tabla 4).

## Discusión

El carbón activado se utiliza comúnmente para remover compuestos orgánicos y metales pesados en industrias y tiene mayor afinidad para clorofilas, feofitinas, carotenoides, compuestos fenólicos (hidroperóxidos), productos de oxidación y ácidos grasos libres.<sup>(5, 22)</sup>

La clarificación con carbón activado 2 % favoreció el proceso de clarificación de los extractos al adsorber las clorofilas durante los tres ciclos de 20 min y por tanto disminuir la absorbancia a 650 nm. Sin embargo, se afectó también la concentración tanto de esteviósidos como de rebaudiósido A, lo cual fue incrementándose proporcionalmente con los ciclos de clarificación y como consecuencia disminuye la capacidad edulcorante del extracto (tabla 1).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por *Ríos Cortes* y otros,<sup>(5)</sup> en cuanto a la adsorción de glucósidos con el uso de carbón activado, lo cual es un aspecto negativo en el caso de los extractos de *Stevia rebaudiana*.

Por otra parte, se plantea que a partir de los 10 min existe un proceso de desorción de las clorofilas, las cuales comienzan a liberarse nuevamente al medio,<sup>(5)</sup> y difiere de los resultados alcanzados.

Con el uso combinado de carbón activado a 1,84 % y Celite 545® a 1 %, durante 15,05 min se logró el blanqueamiento del extracto acuoso de estevia,<sup>(23)</sup> y podría ser parte de evaluaciones futuras.

Las semillas de moringa se han evaluado como un coagulante/floculante en varios procesos de purificación de agua, tanto para eliminar turbidez como colorantes contaminantes, demostrándose su eficiencia y factibilidad por ser una alternativa correcta ambientalmente.<sup>(17,20,22,24,25)</sup>

Las semillas desnudas, desengrasadas y trituradas (tabla 2) mostraron los mejores valores al lograr la mayor disminución de la absorbancia a 650 nm (pigmentos) sin afectar la concentración de esteviolglicósidos (210 nm). Un comportamiento similar se observa al aumentar los ciclos de clarificación (tabla 3), lográndose una disminución de pigmentos proporcionalmente con la cantidad de ciclos de clarificación. Se logró un rango de despigmentación de 38 a 68 % en comparación con el control.

Con harina de semillas desnudas sin desengrasar (0,2 mg/ml), y el uso de un tiempo de 120 min para el proceso coagulación-floculación-sedimentación se logró eliminar entre el 92 y 99 % de la turbidez del agua del río Sama, incrementando el poder floculante con el aumento del grado de turbidez del agua.<sup>(20)</sup>

Por otra parte, con dosis de 0,75-0,85 mg/ml de semillas moringa se redujo al 64 % la turbidez del agua de la ciénaga de Malambo-Atlántico en un tiempo total de 36 min.<sup>(18)</sup> Sin embargo, con una mayor dosis de semillas (37,5 mg) y un tiempo de 37 min se lograron alcanzar porcentajes de despigmentación,



que variaron de 38-68 % al evaluar diferentes partes de la semilla de *Moringa oleífera* como agente clarificante (tabla 2), de 38-62 % con el uso de diferentes ciclos de clarificación (tabla 3) y de 62- 90 % al evaluar diferentes relaciones de masa de semillas desnudas, desengrasadas y trituradas de *Moringa oleífera*: extracto crudo de *Stevia rebaudiana*.

Durante la comparación del efecto coagulante de tres tipos de semillas se encontró que el porcentaje de reducción de la turbidez de aguas residuales sintéticas fue del 98,2 % con semillas de *Moringa oleífera*, con semillas de *Phaseolus vulgaris* del 96 % y con semilla de *Strychnos. potatorum* fue del 86 %.<sup>(25)</sup> Esta actividad coagulante/floculante de las semillas de *Moringa oleífera* se asocia con el alto contenido proteico de los cotiledones, siendo los compuestos mayoritarios en la pasta desengrasada (448,16 mg de proteína/g de semilla).<sup>(17,22)</sup>

En estas semillas existe una proteína catiónica mayoritaria (globulina I), capaz de coagular el material presente en el agua turbia.<sup>(17,18)</sup> Con el uso de semillas desengrasadas a concentraciones de 50 mg/ml y las proteínas albúminas y globulina I a 0,013 mg/ml (aisladas por fraccionamiento de las semillas) se alcanzaron remociones del color y la turbidez superiores al 90 %. Por el contrario, las prolaminas, glutelina, globulina II, la fracción proteica insoluble, las semillas a 10 mg/ml no poseen actividad coagulante.<sup>(17)</sup>

En los resultados expuestos se logra el mejor uso con las semillas desnudas, desengrasadas y trituradas en el tercer ciclo de clarificación con respecto al carbón activado, lográndose un extracto con menor contaminación tanto por turbidez como por compuestos coloreados (fig. 1) y sin afectar el contenido de esteviolglicósidos del extracto.

Los resultados de esta investigación coinciden con los de *Reck* y otros,<sup>(19)</sup> cuando comparan el uso del carbón activado con el de semillas desnudas y molidas de *Moringa oleífera* (4 mg/ ml) para descontaminar agua quitando tartrazina (colorante contaminante del proceso industrial del café).

Las semillas de *Moringa oleífera* mostraron mayor actividad coagulante en comparación con el carbón activado, siendo capaces de remover más del 95 % del colorante puro. Estas semillas remueven entre el 20 - 100 % de los nitratos y nitritos, siendo una alternativa viable y efectiva para disminuir la contaminación generada en estas industrias para la remoción de colorantes de aguas contaminadas.

Por otra parte, el uso de estas semillas como coagulante de origen natural puede ser factible, además de su actividad, por su alto rendimiento de producción. Dado que un árbol es capaz de producir 2000 semillas por año, con posibilidades de incrementar de 5 a 10 veces esa cantidad al ser cultivado. Además, se ha demostrado que la planta y sus semillas tienen una baja toxicidad.<sup>(18)</sup>

Concluyéndose que el uso del método de clarificación por coagulación/floculación con semillas trituradas de *Moringa oleífera*, sin cáscara y desengrasadas, constituye un método efectivo para la clarificación de extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* con una calidad aceptable para la preparación de siropes de uso industrial.

### **Agradecimientos**

Este trabajo forma parte del Proyecto Nacional P131LH001.05: "Obtención de edulcorante natural, de bajo contenido energético, para la producción de alimentos a partir de extractos crudos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni". Se agradece la colaboración del Programa Nacional de Alimento Humano por su financiación y supervisión y, la colaboración de MSc. Maribel Rivas Paneca y del técnico Danilo Pina Morgado, por sus contribuciones en la colecta, preparación del material vegetal utilizado y obtención de extractos.

## Referencias bibliográficas

1. Oviedo-Pereira D, Alvarenga S, Lozano SE, Sepúlveda G, Rodríguez-Monroy M. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un cultivo promisorio para México. *BioTecnología* 2015;19(2):14-27.
2. Basharat S, Ziyang H, Gong MLvX, Ahmed A, Hussain MI, Li J et al. A review on current conventional and biotechnical approaches to enhance biosynthesis of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Chin. J. Chem. Eng.* 2021;30:92-104. DOI: [/10.1016/j.cjche.2020.10.018](https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.10.018).
3. Singh DP, Kumari M, Prakash HG, Rao GP, Solomon S. Phytochemical and pharmacological importance of stevia: A calorie-free natural sweetener. *Sugar Tech* 2019;21(2):227-34. DOI: [/10.1007/s12355-019-00704-1](https://doi.org/10.1007/s12355-019-00704-1)
4. Bugliani M, Tavarini S, Grano F, Tondi S, Lacerenza S, Giusti L et al. Protective effects of *Stevia rebaudiana* extracts on beta cells in lipotoxic conditions. *Acta Diabetol.* 2022;59(1):113-26. DOI: [/10.1007/s00592-021-01793-9](https://doi.org/10.1007/s00592-021-01793-9)
5. Ríos Cortés G, Ramírez Aguilar D, Bobadilla Reyes CQ, Ríos Cortés AM, Ramírez Bello MA, Sales Chávez RM et al. Remoción de clorofilas presentes en extractos de *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) por adsorción con carbón activado y precipitación con cal grado alimenticio. *Acta Univ.* 2017;27(1):67-75 DOI: [/10.15174/au.2017.1209](https://doi.org/10.15174/au.2017.1209)
6. Adesh AB, Gopalakrishna B, Kusum SA, Tiwari OP. An overview on *Stevia*: A natural calorie free sweetener. *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* 2012;1(3):362-8.
7. Anker CCB, Rafiq S, Jeppesen PB. Effect of steviol glycosides on human health with emphasis on type 2 diabetic biomarkers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients* 2019;11:1-21. DOI: [/10.3390/nu11091965](https://doi.org/10.3390/nu11091965).
8. Joseph D, George J. Remedial Potentials of Sweet Leaf A Review on *Stevia rebaudiana*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2019;54:91-5.

9. Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chem. 2012;132:131-5. DOI: [/10.1016/j.foodchem.2011.11.140](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.140)
10. Mlambo R, Wang J, Chen Ch. *Stevia rebaudiana*, a Versatile Food Ingredient: The Chemical Composition and Medicinal Properties. J. Nanomater. 2022;1-12. DOI: [/10.1155/2022/3573005](https://doi.org/10.1155/2022/3573005)
11. Puri M, Sharma D, Barrow CL, Tiwary AK. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. Food Chem. 2012;132(3):1113-20. DOI: [/10.1016/j.foodchem.2011.11.063](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.063)
12. Gasmalla MA, Yang R, Musa A, Hua X, Ye F. Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia (Stevia rebaudiana bertoni)* leaves. Arab. J. Chem. 2017;10(5):726-31. DOI: [/10.1016/j.arabjc.2014.06.012](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.06.012)
13. Abou-Arab EA, Abou-Arab AA, Abu-Salem FM. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. Afr. J. Food Sci. 2010;4(5):269-81.
14. Kaplan B, Turgut K. Improvement of rebaudioside A diterpene glycoside content in *Stevia rebaudiana* Bertoni using clone selection. Turk. J. Agric. For. 2019;43(2):232-40. DOI: [/10.3906/tar-1803-37](https://doi.org/10.3906/tar-1803-37)
15. Rodríguez González H, Acosta de la Luz LL, Hechevarría Sosa I, Rivera Amita MM, Rodríguez Ferradá CA, Sánchez Govín E *et al.* Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni en Cuba. RCPM. 2007;12(4):1-5.
16. Díaz-Montes E, Gutiérrez-Macías P, Orozco-Álvarez C, Castro-Muñoz R. Fractionation of *Stevia rebaudiana* aqueous extracts via two-step ultrafiltration process: Towards rebaudioside A extraction. Food Bioprod. Process. 2020; 123:111-22. DOI: [/10.1016/j.fbp.2020.06.010](https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.06.010)

17. Baptista ATA, Silva MO, Guttierres Gomes R, Bergamasco R, Vieira MF, Vieira AMS. Protein fractionation of seeds of *Moringa oleifera* Lam and its application in superficial water treatment. SEPPUR. 2017;180: 114-24. DOI: [10.1016/j.seppur.2017.02.040](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.02.040)
18. Meza-Leones M, Riaños-Donado K, Mercado-Martínez I, Olivero-Verbel R, Jurado-Eraso M. Evaluación del poder coagulante del sulfato de aluminio y las semillas de *Moringa oleifera* en el proceso de clarificación del agua de la ciénaga de Malambo-Atlántico. Rev. UIS Ing. 2018;17(2):95-104. DOI: [/10.18273/revuin.v17n2-2018009](https://doi.org/10.18273/revuin.v17n2-2018009)
19. Reck IM, Paixão RM, Bergamasco R, Vieira MF, Salcedo Vieira AM. Removal of tartrazine from aqueous solutions using adsorbents based on activated carbon and *Moringa oleifera* seeds. JCLP. 2018;171:85-97. DOI: [/10.1016/j.jclepro.2017.09.237](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.237)
20. Castillo Cohaila MA, Avendano Caceres EO. Efecto de las semillas de moringa (*Moringa oleifera* lam.) en las condiciones para la clarificación del agua del río sama. Rev. Soc. Quím. 2020;86 (1):47-57 DOI: [/10.37761/rsqp.v86i1.272](https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i1.272)
21. González M, Daquinta M, Pina D, Portal N, Mosqueda O, Andújar I *et al.* Efecto de la poda en la producción de biomasa y contenido de estevioglicósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II. Biot. Veg. 2019;19 (3):155-164.
22. Ribeiro MH, Lourenço PA, Monteiro JP, Ferreira-Dias S. Kinetics of selective adsorption of impurities from a crude vegetable oil in hexane to activated earths and carbons. Eur. Food Res. Technol. 2001;213 (1):132-38. DOI: [/10.1007/s002170100347](https://doi.org/10.1007/s002170100347).
23. Arguello-Valle F. Optimización del blanqueamiento de un extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* B. con carbón activado y Celite 545. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 2017.[acceso 09/07/2022] Disponible

en: <https://bdigital.zamorano.edu/items/b9750989-18cf-4436-981e-5aca57fabaed>

24. Pérez-Ángel R, Pérez-Tamayo NM, Castro-Martínez C, Contreras-Andrade I. Rendimientos y composición química de biomasa, semilla y aceite de ecotipos de *Moringa oleifera* Lamarck introducidos en Sinaloa, México. Agro Productividad 2020;13(7):21-28. DOI: [/10.32854/agrop.vi.1643](https://doi.org/10.32854/agrop.vi.1643)

25. Muthuraman G, Sasikala S. Removal of turbidity from drinking water using natural coagulants. J. Ind. Eng. Chem.2014;20 (4):1727-1731.DOI: [/10.1016/j.jiec.2013.08.023](https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.08.023)

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

### **Contribuciones de los autores**

*Conceptualización:* Aurora Pérez Martínez.

*Investigación:* Aurora Terylene Pérez Martínez, Carol Carvajal Ortiz, Iván Andújar Martínez, Lianny Pérez Gómez, Janet Quiñones Gálvez, Alen Nils Baeza Forte, Ariel Martínez García y Oscar Vitalio Concepción Lafitte.

*Metodología:* Aurora Terylene Pérez Martínez.

*Administración del proyecto:* Oscar Concepción Lafitte.

*Redacción del borrador original:* Iván Andújar Martínez, Aurora Terylene Pérez Martínez y Janet Quiñones Gálvez.

*Redacción, revisión y edición:* Aurora Terylene Pérez Martínez y Janet Quiñones Gálvez.

### **Financiación**

Programa Nacional de Alimento Humano.