

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“Análisis de efectos en la cristalización del Glucósido de Esteviol (Rebaudiósido A) para la maximización del tamaño D (2,1) y masa formada como sustituto edulcorante de la sacarosa”.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:
I.Q. Lorena Stephanie Galicia Contreras

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Eusebio Bolaños Reynoso

CODIRECTOR DE TESIS:
Dr. Galo Rafael Urrea García





"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

FECHA: 15/11/2017
DEPENDENCIA: POSGRADO
ASUNTO: Autorización de Impresión
OPCIÓN: I

C. LORENA STEPHANIE GALICIA CONTRERAS
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:
CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"ANALISIS DE EFECTOS EN LA CRISTALIZACION DEL GLUCOSIDO DE ESTEVIOL (REBAUDIOSIDO A) PARA LA MAXIMIZACION DEL TAMAÑO D (2,1) Y MASA FORMADA COMO SUSTITUTO EDULCORANTE DE LA SACAROSA".

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE


RUBEN POSADA GOMEZ

JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO

C.A. TITULACIÓN



SECRETARIA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO
TECNOLÓGICO
DE ORIZABA

ggc





"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

FECHA : 08/11/2017

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. RUBEN POSADA GOMEZ
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACION.
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

LORENA STEPHANIE GALICIA CONTRERAS

la cual lleva el título de:

"ANALISIS DE EFECTOS EN LA CRISTALIZACION DEL GLUCOSIDO DE ESTEVIOL (REBAUDIOSIDO A) PARA LA MAXIMIZACION DEL TAMAÑO D (2,1) Y MASA FORMADA COMO SUSTITUTO EDULCORANTE DE LA SACAROSA".

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : DR. EUSEBIO BOLAÑOS REYNOSO

SECRETARIO : DR. GALO RAFAEL URREA GARCIA

VOCAL : DRA. LETICIA LOPEZ ZAMORA

VOCAL SUP. : M.C. MARIA ELENA GARCIA REYES

FIRMA

FIRMA

FIRMA

FIRMA

EGRESADO(A) DE LA MAESTRIA EN **CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA**

OPCION: I **Tesis**



AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Eusebio Bolaños Reynoso por el asesoramiento, apoyo en revisiones y consejos para el desarrollo de este trabajo.

A mi co-asesor el Dr. Galo Rafael Urrea García por la amabilidad y tiempo brindado para la revisión de este trabajo, seguimiento de mi formación académica como tutor, además de haberme transmitido parte de sus conocimientos siendo un gran ejemplo como profesor .

A la Dra. Leticia López Zamora por el apoyo y disponibilidad para las revisiones y observaciones realizadas para complementar el trabajo.

A la M.C.I.Q. María Elena García Reyes por el apoyo en las revisiones y observaciones realizadas para complementar el trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional otorgada con el número de registro 710116, durante mi permanencia en la Maestría en Ciencias en Ingeniería Química.

Al Tecnológico Nacional de México (TecNM) por haber otorgado el financiamiento Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica 2017, que contribuyó a la realización de ésta tesis con el proyecto 6139.17-P con nombre “Estudio para la maximización del tamaño y masa de cristal (D(2,1) y MCF) en la cristalización del Glucósido de Esteviol (Rebaudiósido A) como sustituto edulcorante del azúcar comercial”.

DEDICATORIAS

A DIOS

Agradezco desde lo más profundo de mi corazón a Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome la fortaleza y esperanza necesarias en los momentos de oscuridad donde creí desfallecer. Tú sabes todo el esfuerzo y dificultades vividos, por eso humildemente te dedico primero mi trabajo. GRACIAS.

A MI MAMÁ MAU

Este triunfo también es suyo porque me dio la confianza de creer en mí pese a las adversidades e inculcó valores que jamás olvidaré. Aunque ya no estés físicamente, siempre has estado en mi corazón y mente. Con mucho cariño te dedico todo mi esfuerzo y trabajo. TE AMO.

A MIS HERMANOS

Lizeth Nayeli, Alexandra e Irving David gracias por estar conmigo, apoyarme y animarme siempre dándome palabras de aliento. Su ejemplo como estudiantes me ha llevado hasta donde estoy ahora, superándonos y siendo un orgullo para nuestra madre. LOS QUIERO MUCHO.

A MI MADRE

Porque siempre ha sido un ejemplo a seguir al ser una mujer fuerte y trabajadora que me ha enseñado que no hay que rendirse ante las dificultades sin luchar. Gracias por la paciencia, por esas noches que me acompañaste y por haber velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Con mucho cariño te dedico todo mi esfuerzo y trabajo. TE AMO.

A ADÁN

Esta tesis está dedicada especialmente a ti. Agradezco sinceramente que has apoyado y motivado mi formación académica, creyendo en mí cuando por momentos ni yo misma lo hice, sin dudar de mis habilidades y enseñándome que todo es posible si hay un trabajo y esfuerzo de por medio. Cuando el cansancio y desánimo me vencía, pensando en dejar todo, fuiste la persona que me animó a continuar permaneciendo a mi lado y apoyándome en todos los sentidos siendo mi compañero inseparable de cada jornada. Fuiste la pieza clave para el cumplimiento del proyecto siendo además de mi pareja sentimental, mi amigo, confidente, colega y asesor por lo que le agradezco a Dios el haberme guiado hacia ti. TE QUIERO MUCHÍSIMO MI TITO HERNÁNDEZ.

A MIS AMIGOS

Marleny, viejita, gracias por ser una mejor amiga que siempre se preocupó por mí, sin recibir nada a cambio me escuchaste, orientaste y ayudaste personal y académicamente. Nunca olvidaré esos días de mucho estudio, tareas y pláticas sin fin.

Saúl, mi gran amigo, te agradezco por los consejos y apoyo brindados a lo largo de nuestro recorrido, por ser el chef y cuidador del equipo, por esas peleas que después de hacernos enojar, nos hacían reír y llorar.

Gracias a ambos por todas esas noches de desvelo y angustia, por las tardes de estudio y consejos personales, por las risas, diversión, lágrimas y tristezas que compartí con ustedes y por abrirme las puertas de su hogar. Fueron mis cómplices en ésta aventura, no bastando estar juntos en licenciatura, permanecimos unidos en ésta etapa que hoy culmina y a su vez me permitió conocerlos mejor, reafirmando su gran y leal amistad. LOS QUIERO MUCHÍSIMO.

Rosita agradezco tu preocupación como mejor amiga al estar constantemente pendiente de mi desarrollo académico, eres un gran ejemplo a seguir como profesionista y persona al ser una mujer de calidad. TE QUIERO MUCHO.

A MI SOBRINA Y CUÑADO

Mi bebé Emma has sido un regalo y alegría para la familia donde tu risa e inocencia me dieron esperanza en culminar mis estudios al obligarme a ser un ejemplo a seguir para ti. TE QUIERO.

Gracias Oscar por los ánimos brindados y abrirme las puertas de tu casa en momentos complicados.

A MI PAPA

A pesar de no haber convivido tanto estos años, te agradezco por haber creído en mí y darme tu apoyo económico. TE QUIERO.

A MIS AMIGOS DE LABORATORIO

Aldo, Jose Humberto, Magdalena y Fortino les agradezco por compartir momentos de risa y apoyo en nuestros trabajos, no olvidaré el compañerismo y complicidad surgido durante mi estancia en el laboratorio.

*A TODOS ELLOS DEDICO LA
OBTENCIÓN DE ÉSTE GRADO, QUE SIN
SU APOYO, NO HUBIESE PODIDO SER*

Ésta tesis se desarrolló en el Instituto Tecnológico de Orizaba durante el periodo Agosto 2015 – Diciembre 2017. Las presentaciones en congresos y publicaciones que se obtuvieron se enlistan a continuación.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- 2017 Ponencia Caracterización de la curva de solubilidad y la primera zona metaestable del Rebaudiósido A (Glucósido de esteviol). Presentación en el Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Tabasco 2017. Villahermosa, Tabasco, México. 29-31 marzo 2017.
- 2017 Ponencia Diseño, construcción e instrumentación de un cristizador por lotes con adquisición de datos en LabVIEW. Presentación en el Congreso Internacional Multidisciplinario (CIM) Veracruz 2017. Veracruz, Veracruz, México. 23-25 agosto 2017.

PUBLICACIONES

- 2017 Dr. Eusebio Bolaños Reynoso, Ing. Lorena Stephanie Galicia Contreras, Dr. Galo Rafael Urrea García y Cleever José Soriano Cruz. Caracterización de la curva de solubilidad y la primera zona metaestable del Rebaudiósido A (Glucósido de esteviol). *Memorias Congreso Internacional de Investigación Academia Journals*. ISSN 1946-5351. 9 (3): 390-394.
- 2017 Dr. Eusebio Bolaños Reynoso, Ing. Lorena Stephanie Galicia Contreras, Dr. Galo Rafael Urrea García y Cleever José Soriano Cruz. Caracterización de la curva de solubilidad y la primera zona metaestable del Rebaudiósido A (Glucósido de esteviol). *Libro electrónico Aplicación del Saber: Casos y Experiencias*. ISBN 978-1-939982-28-5. Vol. 3: 390-394.

RESUMEN

Análisis de efectos en la cristalización del Glucósido de Esteviol (Rebaudiósido A) para la maximización del tamaño D (2,1) y masa formada como sustituto edulcorante de la sacarosa

Realizado por: Ing. Lorena Stephanie Galicia Contreras

Dirigido por: Dr. Eusebio Bolaños Reynoso

Dr. Galo Rafael Urrea García

El objetivo de este trabajo fue el de establecer las condiciones para la cristalización por enfriamiento de Rebaudiósido A (Reb A) para el incremento del tamaño de cristal D(2,1), D(3,2) y masa formada, como un edulcorante sustituto de la sacarosa. Se caracterizó la curva de solubilidad y línea intermedia del soluto en agua obteniendo un rango de temperatura de cristalización de 60 a 10 °C. La amplitud de la primera zona metaestable limitó el crecimiento de los cristales ($D(2,1)=37 \mu\text{m}$). Se realizaron pruebas con diferentes solventes seleccionando el alcohol etílico debido a que el Reb A fue parcialmente soluble en éste, utilizándolo en mezcla con agua (%v/v) para aumentar la solubilidad. Se probaron diferentes porcentajes de la mezcla alcohol etílico/agua obteniendo mayor grado de concentración de saturación en las mezclas 60-40% con 53 °Brix y 70-30% con 50 °Brix, estableciendo ésta mezcla como solvente para la cristalización. Para este proceso se diseñó y construyó un cristalizador por lotes de 1 L con una doble pared (1.45 cm) instrumentado para la adquisición de variables críticas (temperatura y agitación) a través de un sistema SCADA mediante una interfaz gráfica en LabVIEW. Se planteó un diseño de experimentos factorial 2^2 con réplica, evaluando el efecto la proporción de los solventes y la agitación sobre el tamaño de partícula (D(2,1), D(3,2)) y la masa de cristal formado (MCF). Los resultados mostraron que la proporción en la mezcla de solventes fue significativa contrario a la agitación y la interacción de los factores. Los mejores valores se obtuvieron en la mezcla 60-40% a 50 rpm con $D(2,1)= 95 \mu\text{m}$, $D(3,2)= 51 \mu\text{m}^2$ y $MCF= 111.65 \text{ g}$. En comparación con la sacarosa el tamaño de cristal del Reb A cristalino fue en promedio 40% menor para la D(2,1) y 62% para la D(3,2) sin embargo, comparado con el Reb A original se obtuvo un aumento en el tamaño de partícula del 85%. Las pruebas hedónicas, mostraron que se obtuvo un producto neutro (no gusta ni disgusta) y potencialmente aceptable.

ABSTRACT

Analysis of effects on the crystallization of the Steviol glucoside (Rebaudioside A) for the maximization of size D (2,1) and mass formed as sucrose sweetener substitute

Maded by: Eng. Lorena Stephanie Galicia Contreras

Directed by: Dr. Eusebio Bolaños Reynoso

Dr. Galo Rafael Urrea García

The objective of this work was to establish the conditions for the crystallization by cooling Rebaudioside A (Reb A) to increase the crystal size D(2,1), D(3,2) and formed mass, as a sweetener substitute for sucrose. The solubility and intermediate line curve of the solute in water was characterized by obtaining a crystallization temperature range of 60 to 10°C. The amplitude of the first metastable zone limited the growth of the crystals (D(2.1)=37 microns). Tests with different solvents were carried out by selecting the ethyl alcohol because Reb A was partially soluble in it, using it in mixture with water (%v/v) to increase the solubility. Different percentages of the ethyl alcohol/water mixture were tested obtaining higher degrees of saturation concentration in the 60-40% mixtures with 53 ° Brix and 70-30% with 50 °Brix, establishing this mixture as a solvent for crystallization. For this process a crystallizer was designed and built in 1L batches with a double wall (1.45 cm) instrumented for the acquisition of critical variables (temperature and agitation) through a SCADA system through a graphical interface in LabVIEW. A replicate factorial 2² design was proposed, the effect of the proportion of solvents and agitation on particle size (D(2,1), D(3,2)) and the formed crystal mass (MCF)). The results showed that the proportion in the solvent mixture was significant contrary to the agitation and interaction of the factors. The best values were obtained in the 60-40% mixture at 50 rpm with D2.1)= 95 µm, D(3.2)= 51 µm² and MCF= 111.65 g. Compared to sucrose, the crystal size of crystalline Reb A was on average 40% lower for D(2.1) and 62% for D(3.2). However, compared to the original Reb A, obtained an increase in particle size of 85%. The hedonic tests showed that a neutral (not like or dislike) and potentially acceptable product was obtained.

ÍNDICE

	Página
Resumen	
Abstract	
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
Nomenclatura	xi
Introducción	1
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
1.1 Antecedentes científicos	4
1.2 Avances	5
1.3 Edulcorantes	6
1.3.1 Definición	6
1.3.2 Tipos de edulcorantes	6
1.3.3 Importancia	7
1.4 Estevia	8
1.4.1 Origen y descripción	8
1.4.2 Glucósidos de esteviol	11
1.4.3 Características del Rebaudiósido A	13
1.4.4 Efectos en la salud	16
1.5 Cristalización	17
1.5.1 Generalidades	17
1.5.2 Saturación y sobresaturación	18
1.5.2.1 Curva de solubilidad	19
1.5.3 Tipos de cristalización	21
1.5.3.1 Modo de operación	21
1.5.3.2 Generación de la sobresaturación	22
1.5.4 Factores influyentes en el proceso de cristalización	23
1.6 Sistema SCADA	23

1.6.1	Arquitectura de un sistema SCADA	26
1.7	Instrumentación virtual	27
1.7.1	Adquisición de datos	29
1.7.2	Acondicionamiento de señales	30
1.7.3	LabVIEW	30
1.7.3.1	Elementos y características del software	31
1.8	Diseño de experimentos	33
1.8.1	Diseño factorial 2 ²	33

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Materiales	36
2.1.1	Rebaudiósido A	36
2.1.2	Baño de recirculación programable	36
2.1.3	Microscopio electrónico	37
2.1.4	Bomba peristáltica	37
2.1.5	Densímetro digital	38
2.1.6	Refractómetro automático	38
2.1.7	Espectrofotómetro colorimétrico	39
2.1.8	Tarjeta de adquisición y acondicionamiento de señales	39
2.1.9	Otros materiales	39
2.2	Métodos	40
2.2.1	Obtención de la curva de solubilidad	40
2.2.2	Determinación del rango de temperatura de cristalización	41
2.2.3	Obtención de la primera zona metaestable	41
2.2.4	Ajuste de modelos polinomiales en MATLAB	43
2.2.5	Implementación de un sistema de cristalización por lotes	43
2.2.5.1	Diseño del sistema	43
2.2.5.1.1	Diseño del cristalizador por lotes	43
2.2.5.1.1.1	Cálculo del espesor de la doble pared del cristalizador	44
2.2.5.1.2	Diseño de agitador y abrazadera de anillo	47
2.2.5.1.3	Diseño de la estructura de soporte	48

2.2.5.2 Construcción del sistema de cristalización	49
2.2.5.3 Instrumentación del cristizador por lotes	49
2.2.5.4 Desarrollo del sistema SCADA	51
2.2.5.4.1 Sistema embebido para un cristizador por lotes	51
2.2.5.4.2 Desarrollo del panel físico y virtual	53
2.2.6 Prueba de solventes	54
2.2.7 Cristalización de Rebaudiósido A	55
2.2.7.1 Diseño experimental	55
2.2.7.2 Procedimiento y especificaciones de cristalización	57
2.2.7.2.1 Determinación de tamaño promedio de cristal	58
2.2.7.2.2 Determinación de masa de cristal formada	58
2.2.8 Análisis de parámetros físicos y organolépticos	59
2.2.8.1 Determinación de color	59
2.2.8.2 Determinación de características organolépticas	60
2.2.8.3 Comparación de productos	61

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Puntos experimentales de solubilidad	63
3.2 Rango de cristalización	65
3.3 Puntos experimentales del límite de la primera zona metaestable	65
3.4 Ajustes polinomiales de la curva de saturación y límite de la primera zona metaestable	67
3.4.1 Modelos matemáticos para la densidad	67
3.4.2 Modelos matemáticos para el índice de refracción	68
3.5 Montaje del sistema de cristalización por lotes	69
3.6 Implementación del sistema SCADA en una interfaz gráfica	69
3.7 Selección del solvente	72
3.7.1 Mezclas alcohol etílico/agua	73
3.8 Tamaño medio y masa de cristal	75
3.9 Análisis estadístico del diseño experimental	77
3.10 Análisis de la comparación de productos	80
3.10.1 Longitud y área	80

3.10.2 Color y blancura	81
3.10.3 Propiedades organolépticas	81
Conclusiones y recomendaciones	85
Referencias bibliográficas	89
Anexos	
Anexo A Resultados del diseño y construcción del sistema de cristalización	98
Anexo B Código de Arduino	100
Anexo C Resultados de las pruebas hedónicas	104
Anexo C.1 Formato de la prueba aplicada	104
Anexo C.2 Puntaje asignado por panelistas	105
Anexo D Resultados de saturación y zona de crecimiento	107
Anexo D.1 Puntos experimentales de solubilidad	107
Anexo D.2 Puntos críticos del límite de la primera zona metaestable	107

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Planta estevia: a) arbusto y hojas y b) flores	10
1.2	Estructura química del Rebaudiósido A	14
1.3	Zonas de concentración	20
1.4	Estructura básica de un sistema de supervisión y mando	27
1.5	Sistema de adquisición de datos basado en una computadora	29
2.1	Sistema para la determinación de la zona de concentración	42
2.2	Dimensionamiento del cristalizador por lotes	44
2.3	Diseño de agitador: a) paletas planas, b) propelas y c) flecha	48
2.4	Dimensionamiento de la abrazadera: a) vista frontal y b) vista superior	48
2.5	Dimensionamiento y distribución de la estructura de soporte: a) vista frontal, b) lateral isométrica y c) superior	49
2.6	Descripción del cristalizador por lotes: a) Boca roscada central GL 32, b) bocas roscadas laterales GL 18, c) tapadera con labio inferior esmerilado, d) cuerpo principal interior con labio superior esmerilado, e) chaqueta para el control de temperatura, f) entrada de agua g) salida de agua, h) abrazadera de anillo y i) empaque superficial	50
2.7	Sensores digitales Ds18b20	50
2.8	Mecanismo de agitación: a) motor, b) poleas, c) banda transmisora, d) seguro de flecha, e) chumacera, f) balero, g) flecha y h) cabezal	51
2.9	Etapas del sistema embebido	52
2.10	Diseño de la placa de potencia: a) circuitería y b) PCB	52
2.11	Diseño de panel de control físico: a) circuitería y b) PCB	53
3.1	Puntos experimentales de solubilidad (densidad)	64
3.2	Puntos experimentales de solubilidad (índice de refracción)	64
3.3	Rango de temperatura para la cristalización del Rebaudiósido A	65

3.4	Límite de la primera zona metaestable (densidad)	66
3.5	Límite de la primera zona metaestable (índice de refracción)	67
3.6	Diagrama de la primera zona metaestable (temperatura vs. densidad)	68
3.7	Diagrama de la primera zona metaestable (temperatura vs. índice de refracción)	69
3.8	Montaje del sistema de cristalización por lotes	70
3.9	Pestaña de configuración	71
3.10	Pestaña de agitación y almacenamiento de datos	71
3.11	Pestaña de temperatura interior	72
3.12	Pestaña de proceso	72
3.13	Muestras de Reb A en diferente solventes	73
3.14	Proporciones de etanol-agua seleccionadas	75
3.15	Morfología de cristales de Reb A en solución acuosa	75
3.16	Micrografías de Reb A cristalizado en solución etanol/agua a 50 rpm	76
3.17	Muestras de MCF	76
3.18	Gráfica de efectos para la D(2,1)	78
3.19	Gráfica de efectos para la D(3,2)	78
3.20	Gráfica de efectos para la MCF	79
3.21	Muestras a evaluación para panel no entrenado	82
A.1	Cristalizador por lotes de vidrio de borosilicato	98
A.2	Agitadores de acero inoxidable tipo propela y paleta plana	98
A.3	Abrazadera de acero inoxidable tipo anillo	99
A.4	Fuente conmutada	99
A.5	Panel de control físico	99
C.1	Boleta de prueba hedónica aplicada	104

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Taxonomía de la estevia	9
1.2	Propiedades físicas y sensoriales de glucósidos de esteviol	12
1.3	Especificaciones para la Rebiana (JECFA, 2007)	15
2.1	Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del Rebaudiósido A	36
2.2	Cálculo de volúmenes y masas	46
2.3	Comparación de entalpías	47
2.4	Diseño factorial 2 ² para la cristalización de Rebaudiósido A	55
3.1	Puntos de solubilidad promediados para densidad e índice de refracción	63
3.2	Puntos críticos promediados para densidad e índice de refracción	66
3.3	Concentración de Rebaudiósido A en diferentes solventes	73
3.4	Concentración de Reb A en 100 mL de solvente	74
3.5	Resultados del diseño factorial 2 ² para la cristalización de Reb A	77
3.6	Análisis de varianza para la D(2,1)	77
3.7	Análisis de varianza para la D(3,2)	78
3.8	Análisis de varianza para la MCF	79
3.9	Tamaños promedio de cristal	80
3.10	Promedio de parámetros de color (escala Hunter)	81
3.11	Análisis de varianza para el olor	82
3.12	Comparación de medias para el olor	82
3.13	Análisis de varianza para el color	83
3.14	Comparación de medias para el color	83
3.15	Análisis de varianza para el sabor	83
3.16	Comparación de medias para el sabor	84
3.17	Análisis de varianza para la apariencia	84
3.18	Comparación de medias para la apariencia	84

C.2.1	Resultados de la calificación para el olor y color	105
C.2.2	Resultados de la calificación para el sabor y apariencia	106
D.1	Datos de solubilidad de Reb A-Agua	107
D.2.1	Puntos experimentales a TS de 10 °C	107
D.2.2	Puntos experimentales a TS de 20 °C	108
D.2.3	Puntos experimentales a TS de 30 °C	108
D.2.4	Puntos experimentales a TS de 40 °C	108
D.2.5	Puntos experimentales a TS de 50 °C	108
D.2.6	Puntos experimentales a TS de 60 °C	109

NOMENCLATURA

Letras latinas mayúsculas

Símbolo	Definición	Unidades
ARC	Azúcar refinada de caña	----
DTC	Distribución del tamaño de cristal	μm
D(2,1)	Diámetro de tamaño de cristal promedio en longitud	μm
D(3,2)	Diámetro de tamaño de cristal promedio en longitud	μm
GL	Grados de libertad	----
GPIB	General-purpose instrumentation bus	----
H ₀	Hipótesis nula	----
H ₁	Hipótesis alterna	----
IDA	Ingesta diaria aceptada	mg/kg de peso corporal/día
IHM	Interfaz hombre Máquina	----
IR	Índice de refracción	----
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	----
LabVIEW	Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench	----
LED	Light-emitting diode (Diodo emisor de luz)	----
MATLAB	Matrix Laboratory	----
MCF	Masa de cristal formada	g
OAA	Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación	----
OMS	Organización Mundial de la Salud	----
PWM	Pulse-width modulation (Modulación por ancho de pulsos)	----
RBC	Rebaudiósido A cristalizado	----
RMP	Rebaudiósido A como materia prima	----
SCADA	Supervisory control and data acquisition (Control con supervisión y adquisición de datos)	----
SGs	Glucósidos de esteviol	----

VI Instrumento virtual ----

Letras latinas mayúsculas

Símbolo	Definición	Unidades
pH	Potencial de hidrógeno	----

Letras griegas minúsculas

Símbolo	Definición	Unidades
μ	Efecto medio general	----
τ_i	Efecto del i-ésimo nivel del factor A	----
β_j	Efecto del j-ésimo nivel del factor B	----
ξ_{ijk}	Error aleatorio	----

INTRODUCCIÓN

El consumo de edulcorantes es parte fundamental de la dieta humana ya que se ingieren de manera directa o indirecta, es decir, a través de bebidas, dulces u otros alimentos, donde cabe destacar que la sacarosa (azúcar de caña) es la fuente principal de endulzante natural al ser atractiva y económica pero tiene la desventaja que al ingerirse en grandes cantidades ocasiona diversos problemas a la salud. México no es la excepción ante tal problemática, por lo que el migrar en su dieta tradicional de azúcar de caña hacia otros edulcorantes, ya sea naturales o artificiales que eviten y/o disminuyan problemas de salud serios como la obesidad y la diabetes, se ha convertido en un asunto de vital importancia pero de proceso lento debido a la dificultad de disponibilidad que ocasiona su costo elevado.

Ante tal situación se requiere de estudios acerca de nuevos edulcorantes preferentemente de origen natural que satisfagan las necesidades de los consumidores, tal es el caso de los glucósidos de esteviol provenientes de las hojas de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni, los cuales aún no han sido explotados adecuadamente, destacando entre ellos al Rebaudiósido A, que según Baines *et al.*, (2012) es uno de los glucósidos que se encuentra en mayor proporción en la planta, tiene un poder endulzante 300 veces mayor que el azúcar comercial, contiene cero calorías, de sabor agradable y que se puede obtener con pureza superior al 97% y es el que está aprobado por el Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la OAA/OMS (JECFA por sus siglas en inglés) como un edulcorante de consumo seguro.

En la actualidad la purificación del glucósido de esteviol (Rebaudiósido A) se efectúa de manera artesanal, obteniéndose un producto de tamaño pequeño ($D_{prom(2,1)} = 37 \mu m$) que dificulta su comercialización y consumo debido al costo elevado de su producción, por lo que es necesario considerar una técnica de purificación que haga factible su producción a nivel industrial logrando así un producto competitivo en el mercado actual. Una de las técnicas comúnmente empleadas en la industria es la cristalización, que se define como un proceso de

separación térmico para concentrar sustancias en un estado puro a partir de soluciones y tiene por objetivo obtener un producto que tenga una distribución del tamaño de cristal (DTC) específica y de alta pureza.

Por lo mencionado anteriormente se tiene como objetivo general analizar los efectos de las condiciones de operación para la cristalización por lotes del Glucósido de Esteviol (Rebaudiósido A), para incrementar el tamaño de cristal y masa formada como sustituto edulcorante de la sacarosa, propiciando así su producción industrial, comercialización y competencia ante otros edulcorantes y favoreciendo el decremento del consumo de azúcar de caña.

Para cumplir dicho objetivo se establecieron cuatro objetivos específicos: primero se caracterizó la curva de saturación y límite de la primera zona metaestable por medio del diagrama temperatura/concentración para identificar condiciones de operación de la cristalización del Rebaudiósido A-Agua proveniente de soluciones; segundo se implementó un sistema de cristalización por enfriamiento a través del diseño, construcción e instrumentación de un cristizador por lotes escala laboratorio y se desarrolló un sistema SCADA en LabVIEW 2016 para el monitoreo y control de temperatura y velocidad de agitación durante las pruebas experimentales; tercero se identificó estadísticamente el efecto de la proporción de alcohol etílico-agua como solvente y velocidad de agitación mediante un diseño experimental aplicado a la cristalización del Reb A-Alcohol etílico/agua para incrementar el tamaño de cristal $D(2,1)$ - $D(3,2)$ y masa formada del producto; y cuarto se comparó el producto cristalizado con la materia prima (Reb A) y sacarosa (azúcar refinada), mediante un análisis del tamaño de cristal, color y aceptación del cliente para cuantificar las diferencias y posibles mejoras del producto cristalizado.

Ésta investigación se justifica por las características benéficas del Reb A (glucósido más apreciado y aceptado debido a su alto grado de dulzor, sabor agradable y aprobado por la JECFA), que lo convierten en una alternativa endulzante de origen natural (estevia) para la elaboración de productos bajos en calorías, sin efectos colaterales a la salud y que satisfagan las necesidades del consumidor.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Antecedentes científicos

Antonio-Acatzihua (2011), evaluó experimentalmente la curva de saturación y las zonas de concentración para mieles industriales de azúcar de caña y las implemento en un cristalizador por lotes al vacío a través de instrumentación virtual.

Díaz-Nicolás (2011), caracterizó las propiedades fisicoquímicas de mieles industriales (azúcar de caña) y efectuó un estudio comparativo del tamaño y masa de cristal formado proveniente del proceso de cristalización industrial (área de crudo y refinado - primera etapa) y de una planta piloto con el fin de determinar parámetros de escalamiento.

Rabesiaka *et al.*, (2011), determinaron las curvas de saturación y sobresaturación del monohidrocloreuro de lisina por un método automático basado en la turbidez del medio de cristalización. Además se obtuvo que al ser considerable la variación de solubilidad vinculada a la temperatura, la operación de cristalización debe llevarse a cabo por enfriamiento.

Frawley *et al.*, (2012), estudiaron el efecto de la agitación sobre la nucleación y la sobresaturación observando que para velocidades de agitación elevadas existe una mayor área de cristal para la deposición de soluto lo que promueve el crecimiento acelerado del cristal.

Sander y Prlic (2012), observaron que las condiciones del proceso de obtención del pentaeritritol mediante cristalización en lotes por enfriamiento, influyen en la distribución de tamaño de cristal. Determinaron que un perfil óptimo de enfriamiento, menor tiempo de retención, mayor velocidad de mezclado y menor área superficial de la semilla mejoran la DTC.

1.2 Avances

Vanneste *et al.*, (2011), evaluaron el rendimiento de un proceso de tres etapas con membranas comerciales, así como con membranas de polietersulfona (PES) hechas a medida para la purificación de los edulcorantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Obtuvieron que éste procedimiento no aumenta la pureza de los edulcorantes de estevia al requisito del 95% propuesto por la JECFA, por lo que dicho proceso debe ser visto como un pretratamiento útil para otras etapas de purificación como la cristalización.

Li *et al.*, (2012), estudiaron sistemáticamente la separación y purificación de Rebaudiósido A (RA) de extractos crudos de *Stevia rebaudiana* Bertoni por resina de adsorción macroporosa (MAR) de lecho mixto. Basándose en el experimento de cinética/termodinámica del lecho mixto, encontraron los mejores datos experimentales ajustados en el modelo de pseudo-segundo orden y la difusión intra-partículas fue la etapa limitante de la velocidad.

Gasmalla *et al.*, (2014), estudiaron los efectos de las condiciones de ultrasonido sobre la eficacia de la extracción y el rendimiento total de Rebaudiósido A. Demostraron que en comparación con los métodos clásicos como la maceración y extracción de calor, la utilización de extracción asistida por ultrasonido es un medio mucho más simple y más eficaz para obtener de manera eficiente las especies de plantas extractivas.

Bathinapatla *et al.*, (2016), desarrollaron un novedoso biosensor electroquímico modificado con nanocompuesto de citocromo c para la determinación electroquímica de Rebaudiósido A en diferentes muestras de alimentos. Demostraron el uso de nuevos materiales de electrodo en la aplicación del biosensor electroquímico en la industria alimentaria.

Chranioti *et al.*, (2016), encapsularon los glucósidos de esteviol (SGs) por secado por aspersión, liofilización y secado en horno de vacío con el fin de minimizar el

sabor amargo de los SGs, así como para mejorar sus propiedades. El secado por aspersión de productos SGs presenta las mejores características fisicoquímicas y organolépticas.

Rumelhard *et al.*, (2016), estudiaron y evaluaron la seguridad del Rebaudiósido A, producido fermentativamente por *Yarrowia lipolytica* codificando la vía metabólica de *Stevia rebaudiana* (Reb A fermentativo). A partir del estudio de toxicidad, los Niveles de Efectos Adversos No Observados (NOAEL) podrían ser derivados de por lo menos 2000 mg/kg de peso corporal/día o al menos 660 mg de esteviol equivalentes/kg de peso corporal/día, lo cual fue la dosis más alta probada. Los resultados de los estudios de toxicidad apoyaron la seguridad del Reb A fermentativo producido a partir de *Y. lipolytica*.

1.3 Edulcorantes

1.3.1 Definición

Como edulcorante se conoce a la sustancia que proporciona a un alimento un gusto dulce. Dicho de otro modo los edulcorantes son un grupo de aditivos alimentarios utilizados para dar un sabor dulce a los alimentos sin azúcar añadido, con un contenido reducido de azúcar o para el consumo individual (Heising y KÜchler, 2012). Los edulcorantes tienen la ventaja de ser alimentos baratos que varias veces duplican la dulzura en comparación con edulcorante natural más común (sacarosa), además presentan otros beneficios como la disminución del poder energético contenido, mejoras en la salud tales como la disminución a padecer diabetes mellitus y regulación de la insulina en la hiperglucemia así como protección dental (Khalaf *et al.*, 2014).

1.3.2 Tipos de edulcorantes

Los edulcorantes se pueden clasificar con respecto a su origen en naturales y artificiales. Los primeros también son denominados nutritivos y tienen la característica de proporcionar energía en forma de calorías. Los segundos son

también llamados no nutritivos y presentan la cualidad de tener ningún aporte energético (Secretaría de Economía, 2012).

Los edulcorantes naturales son obtenidos a partir de plantas o frutas, proveen sabor dulce y volumen cuando son agregados a los alimentos, además conservan y contribuyen a la frescura y calidad del producto. Proporcionan 4 cal/g y algunos tiene la cualidad de tener un aporte energético bajo. Entre los más destacados se encuentra la sacarosa, la fructuosa, la miel de abeja, el jarabe de maíz, los azúcares alcoholes (sorbitol, xilitol, manitol), la dextrosa, la maltosa, el esteviol, entre otros más (Secretaría de Economía, 2012).

Los edulcorantes artificiales o sintéticos son compuestos elaborados por el ser humano, cuyo beneficio radica en que son mucho más dulces que la sacarosa y su contenido de energía fisiológica es nulo o despreciable por lo que al agregarlos a una gran variedad de productos o alimentos, se disminuye de forma importante su contenido de calorías, sin perder el sabor dulce. Los más importantes y ampliamente utilizados son el aspartamo, la sacarina, el acesulfame K, la sucralosa, el ciclamato de sodio y en menor rango el alitamo, el glucin, el neotamo, etcétera (Heising y KÜchler, 2012).

1.3.3 Importancia

En la actualidad el consumo de productos bajos en calorías tiene la misma importancia como la tiene el consumo de un alimento común, estos tipos de alimentos se consumen cada vez más ya sea por seguir una dieta baja en calorías que no incluyan edulcorantes artificiales, por problemas de salud serios como la diabetes y enfermedades que tengan que se relacionen con el exceso de azúcar o por solo tener la posibilidad de ingerir calorías de forma inteligente y placentera sin remordimientos posteriores (Galvis-López, 2009).

En México, por ejemplo, existen dos problemas de salud pública que conducen a millones a limitar su consumo de azúcar: la obesidad y la diabetes. El 11% de la

población nacional padece diabetes mellitus (la primera causa de muerte en este país), esto es, alrededor de 5.5 millones de individuos; en tanto que la obesidad afecta a cerca de 54 millones. Es decir, más de 50 millones de mexicanos tienen que cuidar sus niveles de glucosa en la sangre y/o de ingesta de calorías (Fitch y Keim, 2012). Por este hecho la importancia y popularidad en el uso de edulcorantes bajos en calorías se incrementa día con día y se refleja en un sinnúmero de productos entre los que se pueden encontrar refrescos, yogures, dulces, aguas de sabor, cereales, gomas de mascar, edulcorantes de mesa e incluso en suplementos nutricionales y laxantes.

Los edulcorantes bajos en calorías tienen la superioridad de brindar una gran satisfacción a las personas preocupadas por su peso y el consumo de calorías diarias, ya que se pueden consumir estos alimentos sin provocar una cantidad de calorías extra, es decir, ayudan a mantener el peso como parte de un modo de vida saludable y en forma (Fitch y Keim, 2012; Galvis-López, 2009).

1.4 Estevia

1.4.1 Origen y descripción

Las hojas de sabor dulce de la planta sudamericana estevia fueron utilizadas durante siglos por la población nativa de Paraguay y Brasil para endulzar y aumentar la palatabilidad de las preparaciones de té de hierbas de sabor amargo (Well *et al.*, 2013). La estevia o “hierba dulce” debe su nombre al botánico y médico español Pedro Jaime Esteve que investigó por primera vez la estevia que se utiliza como edulcorante natural.

El naturalista suizo Moisés Santiago Bertoni fue el primero en describir la especie científicamente en el Alto Paraná. Posteriormente, el químico paraguayo Ovidio Rebaudi publicó en 1900 el primer análisis químico que se había hecho de ella. En ese análisis, Rebaudi descubrió un glucósido edulcorante capaz de endulzar 200 veces más que el azúcar refinado, pero sin los efectos tan contraproducentes que éste produce en el organismo humano. Tras los primeros estudios sobre sus

principios y características químicas, el científico consiguió aislar los dos principios activos, conocidos como el "Esteviósido" y el "Rebaudiósido" (Misra *et al.*, 2011).

La estevia, de nombre científico *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta herbácea de la familia de los crisantemos; en la Tabla 1.1 se puede observar su taxonomía. Es nativa del noreste paraguayo en la región de la Cordillera de Amambay, donde aún se encuentra en estado silvestre. Su cultivo se ha extendido hasta el noreste y noroeste argentinos, Francia, España, Colombia, Bolivia, Perú, Chile, México, Estados Unidos, Canadá y donde actualmente los principales productores son: Japón, China Taiwán, Tailandia, Corea, el sur de Brasil, Malasia y Paraguay (Esmat *et al.*, 2010; Well *et al.*, 2013).

Tabla 1.1 Taxonomía de la estevia

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Género	Stevia
Especie	<i>S. Rebaudiana</i> Bertoni

Los arbustos de esta especie son perennes y alcanzan los 0.9 m de altura. Sus hojas, lanceoladas o elípticas y dentadas, son alternas, simples, de color verde oscuro brillante y superficie rugosa, a veces algo vellosas, de hasta 5 cm de largo por 2 cm de ancho. Sus tallos, pubescentes y rectos, sólo se ramifican después del primer ciclo vegetativo, con tendencia a inclinarse (ver Figura 1.1a). Las raíces son mayormente superficiales, aunque una sección engrosada se hunde a mayor profundidad; fibrosas, filiformes y perennes, son la única parte de la planta en la que no se presentan los glucósidos. Son plantas dioicas que a comienzos de

primavera presentan flores pequeñas, tubulares y de color blanco, sin fragancia perceptible, en panículas corimboides formadas por pequeños capítulos axilares (ver Figura 1.1b) y tardan más de un mes en producir todas las flores (Lewis, 1992).



Figura 1.1 Planta estevia: a) arbusto y hojas y b) flores

En estado silvestre crece en terrenos arenosos, poco fértiles y de buen drenaje; es ligeramente acidófila. Requiere días largos, y mucho sol. Para efectos agrícolas se prefiere emplear esquejes, suelo de textura ligera e irrigar con frecuencia durante el período seco. La cosecha se realiza justo antes de la floración, para mantener la máxima concentración posible de edulcorante en las hojas. Se resalta que en el 2014 el cultivo de la estevia en Paraguay alcanzó una superficie sembrada de 2,300 hectáreas que produjeron 3,680 toneladas según estimaciones de la Dirección Nacional de Censos y Estadísticas del Ministerio de Agricultura y Ganadería (Brandle *et al.*, 1998; Acosta, 2015).

La planta de estevia es una buena fuente de carbohidratos (61.93% peso seco), proteínas (11.41% peso seco), fibra cruda (15.52% peso seco) y minerales (K, 21.15; Ca, 17.7; Na, 14.93 y Mg, 3.26 mg/100 g de peso seco y Cu, 0.73; Mn, 2.89; Fe, 5.89 y Zn, 1.26 mg/100 g de peso seco). De igual manera aminoácidos esenciales se encuentran en cantidades superiores a los recomendados por la OAA (FAO por sus siglas en inglés) y la OMS para los adultos. Específicamente las hojas de la planta contienen de 10 a 20% de glucósidos de esteviol (Esmat *et al.*, 2010).

1.4.2 Glucósidos de esteviol

El interés de los consumidores por los aditivos procedentes de fuentes naturales aumentó de forma constante a lo largo de los años, y por lo tanto también el de la industria alimentaria. El 2 de diciembre de 2011, la Unión Europea publicó una regulación permitiendo la venta y uso de los glucósidos de esteviol, que se extraen de las hojas de estevia, como nuevos edulcorantes de origen natural. Durante el transcurso de su aprobación se generó interés en el mercado, lo que ofreció un gran número de usos potenciales para estos glucósidos, por ejemplo en bebidas aromatizadas, helados, productos que contienen cacao o chocolate y cereales para el desayuno (Heising y KÜchle, 2012).

Los glucósidos son sustancias no reductoras que se sintetizan (a través de hidrólisis ácida o enzimática) cuando un azúcar o glúcido (generalmente monosacáridos) se une, mediante su carbono anomérico reductor a un grupo alcohol propio o de otro compuesto que puede o no ser un azúcar. Por un lado cuando el OH pertenece a un monosacárido se producen oligosacáridos que reciben el nombre genérico de O-glucósidos por estar enlazados mediante un átomo de oxígeno; a esta unión se le llama enlace glucosídico. Ahora bien existen otras muchas sustancias que son resultado del enlace de un azúcar reductor con una molécula que no tiene carácter de carbohidrato y que recibe el nombre genérico de aglucona. El azúcar y la aglucona tienen la capacidad de enlazarse mediante átomos de oxígeno, de nitrógeno o de azufre, por lo que se les designa, respectivamente, O-glucósidos, N-glucósidos o S-glucósidos y desempeñan un papel muy importante: muchos de ellos son pigmentos, algunos confieren las características de sabor a distintos alimentos, otros son tóxicos, se emplean como medicamentos y varios más tienen funciones biológicas hormonales (Badui, 2013).

Específicamente los glucósidos de esteviol son el principio dulce de la estevia y componen aproximadamente el 10%-20% del peso seco total. Dentro de las últimas décadas, varios glucósidos se aislaron con éxito a partir de hojas de estevia, típicamente, sobre una base de peso en seco, los cuatro glucósidos principales

encontrados son Dulcósido A (0.3%), Rebaudiósido C (0.6%), Rebaudiósido A (3.8%), Esteviósido (9.1%) y en cantidades traza Rebaudiósidos B y D-F, Rubusósido y Biósido de esteviol (Purkayastha y Markosyan, 2012; Well *et al.*, 2013). De entre los glucósidos de esteviol, sólo el Esteviósido y el Rebaudiósido A están disponibles a escala comercial, además de que sólo de éstos dos se han estudiado bien las propiedades físicas y sensoriales. La Tabla 1.2 presenta algunas propiedades de diferentes glucósidos de esteviol.

Tabla 1.2. Propiedades físicas y sensoriales de glucósidos de esteviol

Nombre	Fórmula	Temperatura de fusión (°C)	Peso molecular	Solubilidad en agua (%)	Dulzor relativo	Calidad del sabor
Esteviósido	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	196-198	804.88	0.13	210	Amargo
Rebaudiósido A	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	242-244	967.01	0.80	200 - 400	Ligeramente amargo
Rebaudiósido B	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	193-195	804.88	0.10	150	Amargo
Rebaudiósido C	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	215-217	951.01	0.21	30	Amargo
Rebaudiósido D	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	248-249	1129.15	1.00	220	Como la sacarosa
Rebaudiósido E	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	205-207	967.01	1.70	170	Como la sacarosa
Rebaudiósido F	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	No definido	936.99	No definido	No definido	No definido
Dulcósido A	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	193-195	788.87	0.58	30	Muy amargo
Biósido de esteviol	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	188-192	642.73	0.03	90	Desagradable
Rubusósido	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	No definido	642.73	No definido	110	Muy amargo

Los glucósidos de esteviol tienen cero calorías y se pueden utilizar donde quiera que se utilice el azúcar. Son ideales en las dietas para diabéticos y bajas en calorías. Además poseen propiedades funcionales y sensoriales superiores a los de muchos otros edulcorantes de alta intensidad (JECFA, 2007; Purkayastha y Markosyan, 2012).

Según la literatura la producción de un extracto de estevia incluye la extracción de material vegetal con agua, mezcla de agua con un disolvente orgánico tal como el metanol y etanol o con un fluido supercrítico, la precipitación de las sustancias de alto peso molecular, desionización y decoloración, la purificación en adsorbentes poliméricos con macroporos específicos, la concentración y el secado. El extracto de estevia se seca mediante secado por pulverización y/o la tecnología de secado a vacío para evaporar la humedad y el procesamiento de los disolventes del extracto. El polvo resultante contiene partículas muy finas con un contenido de humedad muy bajo y baja densidad aparente, lo que lo hace muy polvoriento de manejar durante el procesamiento de aplicaciones de alimentos (Purkayastha y Markosyan, 2012).

Un esquema general de un proceso moderno para la obtención de los glucósidos comprende lo siguiente: se realiza una extracción primaria que consiste en remojar las hojas secas en el agua, el cual es proceso de suficiente para disolver los glucósidos de esteviol. El exceso de material vegetal es separado por filtración y se añaden floculantes tales como sales de calcio para precipitar las proteínas solubles u otros componentes de la planta. La solución clarificada se pasa a través de resinas de adsorción donde otros materiales son arrastrados fuera y se concentran los glucósidos de esteviol, que posteriormente se eluyen o enjuagan mediante alcohol de la resina. Después de la concentración, el eluido que comprende los glucósidos, es secado por aspersion para producir un extracto crudo. La composición de dicho extracto varía, pero bien podría comprender 50% de Esteviósido, 25% de Rebaudiósido A y aproximadamente el 10% de otros glucósidos, siendo el resto componentes de la planta sin caracterizar (Jackson *et al.*, 2006; Prakash *et al.*, 2007a; Baines *et al.*, 2012).

1.4.3 Características del Rebaudiósido A

El Rebaudiósido A que a alta pureza es también conocido como Rebiana, es un edulcorante natural no calórico y uno de los principales componentes dulces de la estevia. Es uno de los glucósidos de esteviol más apreciado ya que se considera

que tiene atributos sensoriales más favorables de los cuatro principales glucósidos por lo que es funcional en una amplia gama de bebidas y alimentos y muy adecuado para la mezcla con otros edulcorantes no calóricos o de carbohidratos al grado de ser comercializado conjuntamente por Cargill, Incorporated y The Coca-Cola Company, para dicho uso (Kinghorn *et al.*, 2001; Prakash *et al.*, 2008).

En la Figura 1.2 se puede apreciar la estructura molecular del Rebaudiósido A, la cual es estable bajo condiciones secas y en los sistemas de alimentación acuosos, su estabilidad es notablemente mejor que la del aspartamo o neotamo (Vanneste *et al.*, 2011).

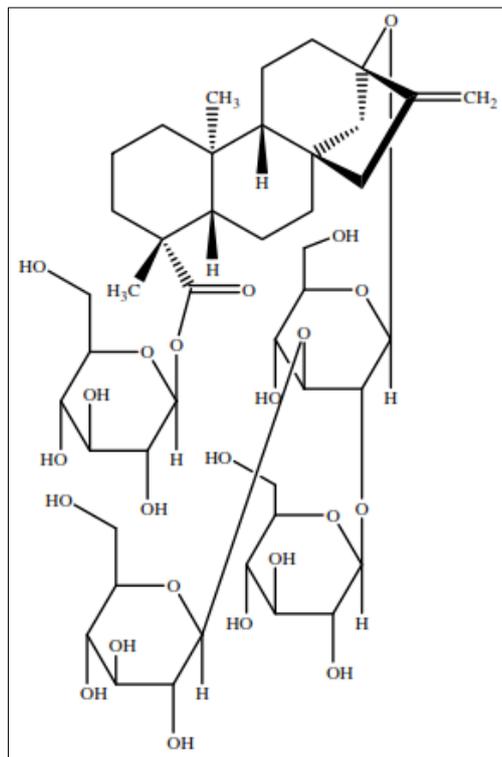


Figura 1.2 Estructura química del Rebaudiósido A

La Rebiana se obtiene en dos etapas a partir de las hojas de estevia. En primer lugar, los glucósidos de esteviol se extraen de las hojas con agua y el extracto se seca. En la segunda etapa, al extracto puro se le da una mayor purificación por disolución en alcohol acuoso a partir del cual, en condiciones apropiadas, cristaliza selectivamente a alta pureza (97% Rebaudiósido A con 3% de otros glucósidos y

otros materiales). Cabe destacar que a este enfoque general del proceso, se le han descrito distintas variaciones como la que a continuación se menciona. La obtención del extracto crudo se da como la mencionada en el subtema 1.4.2, después para la purificación final, que es el último paso, el eluido seco se vuelve a disolver en un alcohol reducido (ya sea puro o una solución alcohólica acuosa) y es cristalizado. Tradicionalmente se ha utilizado metanol, pero el etanol tiene la ventaja de aumentar selectivamente el contenido de Rebaudiósido A. Por último, el producto cristalizado se filtra y se seca (Abelyan *et al.*, 2006; Magomet *et al.*, 2007; Prakash *et al.*, 2007a).

Como un polvo seco, la Rebiana es estable durante al menos dos años a temperatura ambiente y en condiciones de humedad controlada. En solución, es más estable entre los valores de pH 4-8 y notablemente menos estable por debajo de pH 2. Como era de esperar, la estabilidad disminuye con el aumento de la temperatura (Prakash *et al.*, 2007b). Para que el Rebaudiósido A pueda considerarse como Rebiana, éste debe cumplir ampliamente con las especificaciones de la JECFA, de las cuales algunas de ellas se muestran en la Tabla 1.3 (JECFA, 2007).

Tabla 1.3 Especificaciones para la Rebiana (JECFA, 2007)

Parámetro	Especificación
Composición	97% Rebaudiósido A
Apariencia	Polvo blanco a blanquecino
Olor	No hay mal olor
Sabor	Dulce
Fórmula empírica	$C_{44}H_{70}O_{23}$
Peso molecular	967.01 g/mol
Solubilidad	Soluble en agua (1 g soluble en 100 mL de agua en 5 min)
pH	Entre 4.5 y 7.0 (1 g en 100 mL de agua)
Otros glucósidos de esteviol relacionados	No más que 3% p/p
Pérdida por secado	No más que 6% a 105 °C, 3 h
Residuo en ignición	No más que 0.2% p/p
Rotación específica (0.5% agua)	-29° a 31° calculado sobre base anhidra

El Rebaudiósido A ha sido aprobado para su uso como edulcorante en una serie de países, incluyendo Japón, China y Brasil. Sus propiedades únicas proporcionarán a la tecnología de los alimentos con otra herramienta para producir alimentos y bebidas innovadoras de gran sabor y sin las calorías del azúcar con el fin de satisfacer la demanda de los consumidores (Baines *et al.*, 2012).

En conclusión, el Rebaudiósido A proporciona numerosos beneficios como edulcorante, es (Prakash *et al.*, 2008):

- 200-300 veces más potente que el azúcar
- Natural
- No calórico
- Poseedor de un limpio sabor dulce, sin significantes características de sabor indeseables
- Estable en una amplia variedad de alimentos y bebidas diarias
- Es compatible con sabores que contiene aldehídos

1.4.4 Efectos en la salud

Algunos de los efectos benéficos de la estevia es que no afecta los niveles de azúcar sanguíneo, por el contrario, estudios han demostrado sus propiedades hipoglucémicas y su uso para mejorar la tolerancia a la glucosa, es por eso que es recomendado para los pacientes diabéticos. También posee actividad antibiótica, especialmente contra las bacterias *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Corynebacterium difteriae* y de igual forma contra el hongo *Cándida albicans* (EFSA, 2010). La JECFA estableció una IDA (Ingesta Diaria Aceptada) para los glucósidos de esteviol (expresados como equivalentes de esteviol) de 4 mg/kg de peso corporal/día, que es proporcional a una IDA para el Rebaudiósido A de 12.15 mg/kg de peso corporal/día. También, los resultados de las pruebas toxicológicas indicaron que los glucósidos de esteviol no son genotóxicos, cancerígenos, ni está asociado a ninguna toxicidad reproductiva/desarrollo (Baines *et al.*, 2012; Well *et al.*, 2013).

Las dosis únicas de 1000 mg de glucósidos de esteviol/persona/día (97% Rebaudiósido A) no afectó a la homeostasis de la glucosa y tampoco la presión arterial en individuos con tolerancia normal a la glucosa o diabetes mellitus tipo 2. Tras su metabolismo en seres humanos, el Rebaudiósido A se convierte principalmente a su aglicona de esteviol y a ácido glucurónico de esteviol, generalmente conocido como glucurónido de esteviol (Wheeler *et al.*, 2008; EFSA, 2010).

Los glucósidos de esteviol están autorizados para su uso en alimentos y bebidas en Corea del Sur, Japón, Argentina, Paraguay y Brasil. Otros países que permiten el uso de glucósidos de esteviol son China, Rusia, Indonesia, México (desde 2005), Senegal (desde 2006), Tailandia e Israel (EFSA, 2010).

1.5 Cristalización

1.5.1 Generalidades

La cristalización es uno de los procesos de separación más complejos debido a los numerosos procesos simultáneos (transferencia de masa, calor y momento, cambio de fase, disolución, aglomeración, rotura). Ésta operación unitaria consiste en purificar químicos orgánicos e inorgánicos mediante la separación sólido-líquido, en donde un componente de una solución sobresaturada es transferido a una fase sólida en forma de cristales que precipitan, obteniéndose la presencia de una fase continua y una fase dispersa que a su vez dan lugar a la presencia de fenómenos fisicoquímicos como la nucleación, crecimiento, atrición y muerte de los cristales (Velázquez *et al.*, 2010; Sander y Prlic, 2012). La fuerza impulsora de la cristalización es la sobresaturación relativa que se define como la diferencia entre la concentración de la solución y la concentración de saturación (Nagy *et al.*, 2008; Vetter *et al.*, 2014).

Por lo anterior la cristalización es uno de los métodos más eficientes para la separación y purificación en muchos ámbitos, como son la industria química, farmacéutica, fertilizante y de alimentos, teniendo como objetivo a nivel industrial

que el producto tenga una forma, tamaño y pureza específica, en lugar de un producto aleatorio (Akrap *et al.*, 2010; Sangwal, 2010; Gherras y Fevotte, 2012). La calidad del producto que se obtiene depende del buen conocimiento y control de los factores que influyen en la formación de los cristales tales como la nucleación, el crecimiento del cristal, la sobresaturación, el grado de mezclado, las temperaturas y presiones de operación (Akrap *et al.*, 2010).

Una ventaja de emplear la cristalización como un medio de separación es el ahorro energético, la forma purificada (purezas superiores al 99%) y apariencia atractiva que tiene el producto sólido, el cual, puede obtenerse a partir de soluciones relativamente impuras en una etapa simple de procesamiento a temperaturas bajas y a una escala que varía desde unos cuantos gramos hasta miles de toneladas, además de su fácil transporte (Perry *et al.*, 2010; Pollak, 2011).

1.5.2 Saturación y sobresaturación

Primero la solución se encuentra en un estado de insaturación (mayor cantidad de disolvente), después se alcanza la saturación, es decir, la solución ha alcanzado la solubilidad límite a una determinada condición de temperatura, de esta manera, si se mantienen constantes las condiciones externas (temperatura, presión y concentración) de las dos fases involucradas: líquida y sólida, coexistirán indefinidamente alcanzado un estado de equilibrio estable (Kadam *et al.*, 2012).

Bajo ciertas condiciones, una solución puede contener más soluto disuelto que el definido por la condición de saturación (solución sobresaturada). Para que cualquier proceso de cristalización tenga lugar se requiere que la solución saturada posea un estado de sobresaturación, siendo ésta utilizada como potencial impulsor de la concentración para que suceda la nucleación y/o el crecimiento del cristal de forma que no tendrá lugar la ocurrencia de ninguno de los dos fenómenos anteriores en una solución saturada o insaturada. Ahora bien la principal fuerza impulsora se define como la diferencia en el potencial químico de la sustancia de cristalización en los estados sólido y disuelto (Kadam *et al.*, 2012; Beckmann, 2013).

En la práctica comercial es conveniente que, para que los cristales se formen en el licor, exista una sobresaturación considerable. La sobresaturación en el licor disminuye en la proporción en que los cristales se forman y crecen. Para conservarla es necesario entonces mantener la evaporación del agua y el aprovisionamiento del material por concentrar. El grado de sobresaturación es determinado por los flujos de materiales y energías, así como también por las cinéticas de cristalización (nucleación y crecimiento). El control de la sobresaturación, es la herramienta más poderosa para controlar y optimizar la cristalización (Wu *et al.*, 2012).

Para generar la sobresaturación de la solución y permitir la nucleación y crecimiento de los cristales dentro del proceso se pueden utilizar tres métodos distintos (Wu *et al.*, 2012):

- a) Disminución de la temperatura o enfriamiento
- b) Evaporación
- c) Influencia de un tercer componente en dos fases involucradas: líquida y sólida, coexistirán indefinidamente alcanzado un estado de equilibrio

1.5.2.1 Curva de solubilidad

La curva que describe la dependencia de la solubilidad límite del soluto en el solvente con la temperatura se conoce como curva de solubilidad y a partir de esta es posible determinar la concentración del soluto en el solvente cuando se alcance el equilibrio. En otras palabras dicha curva describe el balance entre el soluto y el solvente, además de que representa las condiciones bajo la cuales los cristales del soluto y la solución coexisten en un equilibrio termodinámico (Kadam *et al.*, 2012).

La curva de solubilidad para un sistema dado es definible, reproducible y representa el punto de saturación máximo que el sistema puede tolerar, además de ser una herramienta esencial en el estudio de la cristalización ya que la forma de la curva define el modo de cristalización y las condiciones de sobresaturación, que es la fuerza motriz de la cristalización (Rabesiaka *et al.*, 2011; Beckmann, 2013).

En estas curvas se reconocen las diferentes regiones o estados de saturación del sistema. Si se ubica la temperatura en el eje de las abscisas, cualquier combinación de temperatura-concentración que se ubique por debajo de la línea de saturación, es indicativo de que la solución se encuentra insaturada, mientras que hacia arriba la solución se encuentra sobresaturada (Nagy, 2009). La sobresaturación varía dependiendo de las diferentes zonas de concentración (intermedia, metaestable y lábil) que pueden ocurrir durante el enfriamiento de una solución (Figura 1.3). Estas zonas están limitadas por el equilibrio y las líneas de nucleación (Ni y Liao, 2010).

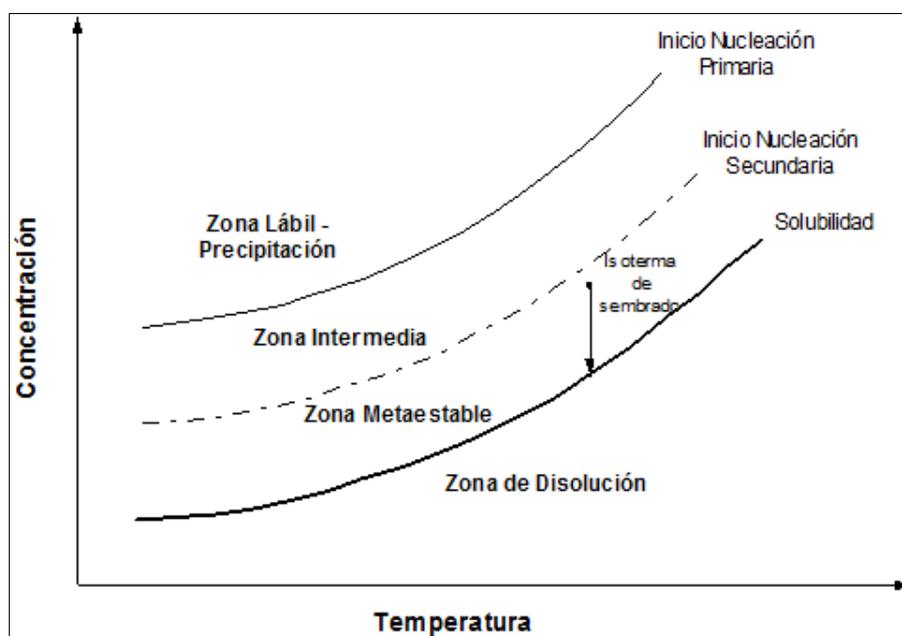


Figura 1.3 Zonas de concentración

A continuación se describen cada una de las zonas de concentración anteriormente referidas (Beckmann, 2013):

- Zona de disolución. No existe formación ni crecimiento de cristales.
- Zona metaestable. Próxima a la saturación; aquí los cristales existentes crecen, pero no se pueden formar nuevos.
- Zona intermedia. Se pueden formar nuevos cristales, pero sólo en presencia de los existentes.
- Zona lábil. Es una región inestable en la que se pueden formar nuevos cristales aún en ausencia de los mismos (nucleación espontánea).

1.5.3 Tipos de cristalización

En términos generales los tipos de cristalización pueden clasificarse dependiendo del enfoque, como por ejemplo: por el modo de operación (alimentación continua o por lotes); por el tipo de generación de la sobresaturación (por enfriamiento, evaporación, desplazamiento salino, reacción química) y por las propiedades de las fases involucradas (cristalización de soluciones y a partir de una masa fundida). A continuación se presentan de forma más detallada los dos primeros enfoques.

1.5.3.1 Modo de operación

La cristalización se puede clasificar de acuerdo a su operación en continua y por lotes. La primera ha sido ampliamente estudiada debido a que se utiliza en operaciones a gran escala. La atracción particular de la cristalización continua es su flexibilidad incorporada para el control de la temperatura, sobresaturación, nucleación, crecimiento del cristal y todos los otros parámetros que influyen en la DTC. Sin embargo, los sistemas continuos de cristalización no descargan su producto bajo condiciones cercanas al equilibrio ya que a menudo se autosemillan indeseablemente después de un cierto tiempo de funcionamiento, lo que requiere apagado y lavado frecuente (Capper y Rudolph, 2010; Acevedo y Nagy, 2014).

Por otra parte, la cristalización por lotes (batch) es uno de los procesos más ampliamente usados para la separación y purificación en la producción de finos y químicos especiales, alimentos y productos farmacéuticos o cuando son requeridos pequeños volúmenes de producto con ciertas propiedades específicas (elevada viscosidad, toxicidad, peligro) o requisitos (estándares de higiene) (Hojjati *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012). En este modo de operación la primera etapa es obtener la sobresaturación, posterior a esto, la formación de núcleos ocurre y finalmente el subsecuente crecimiento de esos núcleos para generar cristales de mayor tamaño (Nagy *et al.*, 2008), destacando que el producto es retirado del cristizador sólo al final de la corrida. Los cristizadores por lotes también son más baratos y más fáciles de desarrollar que los continuos (Acevedo y Nagy, 2014).

Una clara ventaja de la cristalización por lotes es que es capaz de hacer productos con una DTC más estrecha que los cristalizadores continuos debido a la ausencia de la distribución del tiempo de residencia asociado con la eliminación del producto. Sin embargo, los procesos de cristalización por lotes son difíciles de controlar como por ejemplo la calidad del producto, que está determinada en gran medida por la fase inicial del lote en el que se forma la población inicial de las partículas en el cristalizador o añadido en ella (Capper y Rudolph, 2010).

1.5.3.2 Generación de la sobresaturación

El proceso de cristalización por enfriamiento es la técnica común más empleada para generar la sobresaturación porque su operación y control es simple, además se usa cuando la solubilidad de la sustancia a ser cristalizada aumenta considerablemente con la temperatura. Para este método la solución saturada es alimentada dentro del cristalizador y enfriada (la temperatura inicial es reducida gradualmente hacia una temperatura final) ya sea a través de una chaqueta externa o un refrigerador en el interior del cristalizador.

Como la velocidad de nucleación y crecimiento depende de la sobresaturación la cual es función de la temperatura, el control de los productos cristalinos es usualmente llevado a cabo mediante la manipulación de la temperatura de la solución mediante la aplicación de diversas rutas programadas o perfiles de enfriamiento calculados usualmente mediante optimización, que aumenten la calidad o maximicen la cantidad de producto al final del proceso (Saengchan *et al.*, 2011; Beckmann, 2013).

Al final del proceso de enfriamiento, el producto cristalino puede tener una superficie grande, pero todavía crece muy lentamente debido a las bajas sobresaturaciones. Cuando el contenido del cristalizador se mezcla bien y se retira el calor de manera uniforme con respecto al espacio, existe aproximadamente la misma sobresaturación óptima y distribución del tamaño de cristal en todo el cristalizador (Aguilar y Román, 2006; Beckmann, 2013).

La cristalización evaporativa es útil cuando la solubilidad aumenta ligeramente, permanece casi constante o disminuye con la temperatura. La solución insaturada se introduce en el cristalizador y se calienta hasta el punto de ebullición de la solución de manera que el disolvente se evapora. Debido a que el punto de ebullición de la solución es una función de la presión, la ebullición se lleva a cabo en la superficie del líquido, lo que conduce a altos niveles de sobresaturación. A una velocidad constante de evaporación, la sobresaturación en el comienzo de la operación es desfavorablemente alta y es baja hacia el final (Beckmann, 2013).

Finalmente, en la cristalización a vacío, la solución es evaporada y enfriada simultáneamente por disminución de la presión y temperatura. El vacío es frecuentemente creado y mantenido por compresores de chorro de vapor en un máximo de seis pasos (Saengchan *et al.*, 2011).

1.5.4 Factores influyentes en el proceso de cristalización

Algunos de los principales parámetros que afectan o definen la manera como se lleva a cabo el proceso de cristalización son: sobresaturación, temperatura, tasa de enfriamiento presión y agitación que tenga el sistema y los cuales deben ser monitoreados y controlados durante el proceso, ya que de estos dependerá el tamaño del cristal obtenido (Alvarado-Sánchez, 2009).

El estudio de tales variables resulta de gran importancia para obtener una DTC específica óptima, considerando las necesidades del proceso y la sustancia de trabajo que permita una reducción en los costos de operación y minimice el tiempo de proceso empleado para de esta manera obtener un producto competitivo y de calidad en el mercado (Díaz-Nicolás, 2011).

1.6 Sistema SCADA

Para poder supervisar todas las variables influyentes en el proceso de cristalización es necesario además de instrumentar físicamente, monitorear y controlar dichas

variables a través de interfaces basadas en sistemas de envío y recepción de información como lo son los de tipo SCADA. Se da el nombre de SCADA (Supervisory Control And Data Acquisition o Control con Supervisión y Adquisición de Datos) a cualquier software que permita el acceso a datos remotos de un proceso (dispositivos de campo) y permita, utilizando las herramientas de comunicación necesarias en cada caso, el control del mismo desde la pantalla de una computadora. Cabe aclarar que no se trata de un sistema de control, sino de una utilidad software de monitorización o supervisión, que realiza la tarea de interfase entre los niveles de control y los de gestión, a un nivel superior (Rodríguez, 2007; Lajara y Pelegrí, 2012).

En otras palabras un SCADA abarca la recolección de la información y la transferencia de datos al sitio central, llevando a cabo el análisis y el control necesario, para luego mostrar la información sobre una serie de pantallas de operador y de esta manera permitir la interacción, cuando las acciones de control requeridas se transportan de nuevo al proceso (Molina y Jiménez, 2010).

Un paquete SCADA debe estar en disposición de ofrecer las siguientes prestaciones: posibilidad de crear paneles de alarma, generación de históricos de señal de planta, ejecución de programas que modifican la ley de control y posibilidad de programación numérica. De igual manera, los requisitos para que su instalación sea perfectamente aprovechada son los siguientes (Rodríguez, 2007):

- Funcionalidad completa de manejo y visualización en sistema operativo Windows sobre cualquier computadora estándar.
- Arquitectura abierta que permita combinaciones con aplicaciones estándar y usuario, que permitan a los integradores crear soluciones de mando y supervisión optimizadas.
- Sencillez de instalación, sin exigencias de hardware elevadas, fáciles de utilizar y con interfaces amigables con el usuario.
- Permitir la integración con las herramientas ofimáticas y de producción.
- Fácilmente configurable y escalable, debe ser capaz de crecer o adaptarse según las necesidades cambiantes de la empresa.

- Ser independiente del sector y la tecnología.
- Funciones de mando y supervisión integradas.
- Comunicaciones flexibles para poder comunicarse con total facilidad y de forma transparente al usuario con el equipo de planta y con el resto de la empresa (redes locales y de gestión).

El paquete SCADA, en su vertiente de herramienta de interfase hombre-máquina, comprende toda una serie de funciones y utilidades encaminadas a establecer una comunicación lo más clara posible entre el proceso y el operador. Entre las prestaciones de una herramienta de este tipo destacan (Pérez, 2015):

- La monitorización. Representación de datos en tiempo real a los operadores de planta. Se leen los datos de los autómatas (temperaturas, velocidades, detectores, etcétera).
- La supervisión. Supervisión, mando y adquisición de datos de un proceso y herramientas de gestión para la toma de decisiones (mantenimiento predictivo, por ejemplo). Tienen además la capacidad de ejecutar programas que puedan supervisar y modificar el control establecido y, bajo ciertas condiciones, anular o modificar tareas asociadas a los autómatas. Evita una continua supervisión humana.
- La adquisición de datos de los procesos en observación.
- La visualización de los estados de las señales del sistema (alarmas y eventos). Reconocimiento de eventos excepcionales acaecidos en la planta y su inmediata puesta en conocimiento a los operarios para efectuar las acciones correctoras pertinentes. Además, los paneles de alarma pueden exigir alguna acción de reconocimiento por parte del operario, de forma que queden registradas las incidencias.
- El mando. Posibilidad de que los operadores puedan cambiar consignas u otros datos claves del proceso directamente desde el ordenador (marcha, paro, modificación de parámetro, etcétera).
- Grabación de acciones o recetas. En algunos procesos se utilizan combinaciones de variables que son siempre las mismas. Un sistema de

recetas permite configurar toda una planta de producción ejecutando un solo comando.

- Garantizar la seguridad de los datos.
- Tanto el envío como la recepción de datos deben de estar suficientemente protegidos de influencias no deseadas, intencionadas o no (fallos en la programación, intrusos, situaciones inesperadas, etcétera).
- Garantizar la seguridad en los accesos. Restringiendo zonas de programa comprometidas a usuarios no autorizados, registrando todos los accesos y acciones llevadas a cabo por cualquier operador.

1.6.1 Arquitectura de un sistema SCADA

Las primeras incursiones en el campo de la automatización localizaban todo el control en la computadora y tendían progresivamente a la distribución del control en planta. De esta manera, el sistema queda dividido en tres bloques principales:

1. Software de adquisición de datos y control (Scada)
2. Sistemas de adquisición y mando (sensores y actuadores)
3. Sistema de interconexión (comunicaciones)

El usuario, mediante herramientas de visualización y control, tiene acceso al sistema de control de proceso, generalmente una computadora donde reside la aplicación de control y supervisión (se trata de un sistema servidor). La comunicación entre estos dos sistemas se suele realizar a través de redes de comunicaciones corporativas como Ethernet (Rodríguez, 2007; Pérez, 2015).

Ahora bien en la Figura 1.4 se observa que el sistema de proceso capta el estado del sistema a través de los elementos sensores e informa al usuario a través de las herramientas IHM. Basándose en los comandos ejecutados por el usuario, el sistema de proceso inicia las acciones pertinentes para mantener el control del Sistema a través de los elementos actuadores.

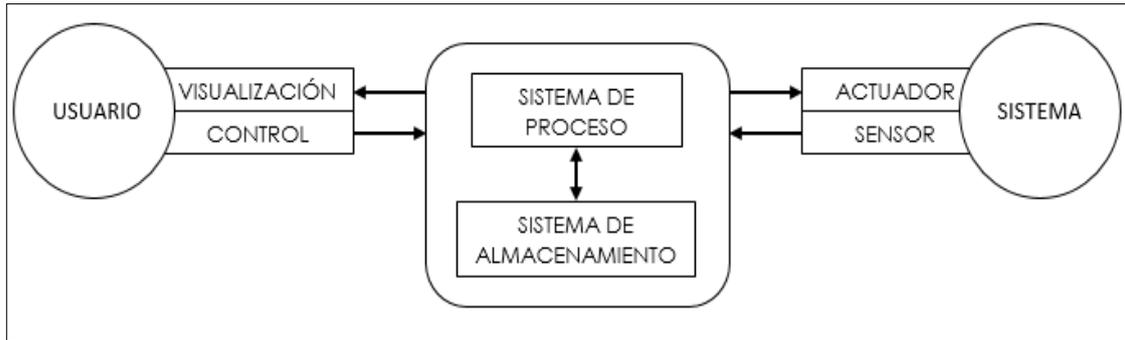


Figura 1.4 Estructura básica de un sistema de supervisión y mando

La transmisión de los datos entre el sistema de proceso y los elementos de campo (sensores y actuadores) se lleva a cabo mediante los denominados buses de campo. La tendencia actual es englobar los sistemas de comunicación en una base común. Toda la información generada durante la ejecución de las tareas de supervisión y control se almacena para disponer de los datos a posteriori.

La estructura funcional de un sistema de visualización y adquisición de datos obedece generalmente a la estructura Maestro-Esclavo. La estación central (el maestro) se comunica con el resto de estaciones (esclavos) requiriendo de éstas una serie de acciones o datos (Rodríguez, 2007; Pérez, 2015).

1.7 Instrumentación virtual

Todo sistema de instrumentación consta de unos instrumentos, un sistema de interconexión de estos instrumentos y un controlador inteligente que gestiona el funcionamiento de todo el sistema y da las órdenes para que una medida se realice correctamente. El concepto de instrumentación virtual nace a partir del uso de la computadora personal, como forma de reemplazar equipos físicos por software, permite a los usuarios interactuar con la computadora como si estuviesen utilizando un instrumento real. El usuario manipula un instrumento que no es real, se ejecuta en una computadora, tiene sus características definidas por software pero realiza las mismas funciones que un equipo real. La idea es sustituir y ampliar elementos hardware por otros software, para ello se emplea un procesador que ejecute un programa específico, este programa se comunica con los dispositivos para

configurarlos y leer sus medidas. La gran capacidad de almacenamiento de las computadoras, rápido acceso a la información y toma de decisión, brinda la posibilidad de emular una gran cantidad de dispositivos de medición y operar varios instrumentos al mismo tiempo (Álvarez *et al.*, 2009).

La instrumentación virtual implica adquisición de señales, el procesamiento, análisis, almacenamiento, distribución y despliegue de los datos e información relacionados con la medición de una o varias señales, interfaz hombre-máquina, visualización, monitoreo y supervisión remota del proceso, la comunicación con otros equipos, etcétera. Un instrumento virtual puede mostrar en pantalla dos tipos de elementos gráficos:

- Elementos Indicadores:
Son elementos de salida que permiten mostrar información al usuario, por ejemplo, el valor de una medida. Algunos ejemplos de indicadores son: gráficas, indicadores de aguja, LED, etcétera.
- Elementos de Control:
Los cuales aceptan la entrada del usuario, permitiendo gobernar el comportamiento del programa y/o del sistema. Algunos ejemplos de controles son: interruptores, pulsadores, cajas de entrada de texto, etcétera.

Algunas ventajas de la instrumentación virtual frente a la instrumentación convencional son (Sumathi y Surekha, 2007):

- La interfaz y el instrumento es definido por el usuario
- Funcionalidad ilimitada, orientado a aplicaciones, conectividad amplia
- El software es la clave del sistema
- Bajo costo/función, variedad de funciones
- Es reusable y se puede aplicar tantas veces se requiera
- Rápida incorporación de nuevas tecnologías.
- Intercambio de información con otras aplicaciones de Windows, Linux, u otro sistema operativo.
- Múltiples capturas desde un solo punto, y posibilidad de envió a múltiples puntos locales o remotos.

1.7.1 Adquisición de datos

La Figura 1.5 muestra un sistema de adquisición de datos que consiste en captar una señal física y llevarla a una computadora, es decir, tomar un conjunto de variables mensurables en forma física y convertirlas en tensiones eléctricas, de tal manera que se puedan utilizar o puedan ser leídas en la computadora. Cabe destacar que las señales pueden ser originadas a partir de la medición directa de cantidades eléctricas (voltajes de corriente directa y alterna, frecuencia o resistencia) o a partir de transductores (termopares o sensores de presión). De la misma manera que se toma una señal eléctrica y se transforma en una digital dentro del ordenador, se puede tomar una señal digital o binaria y convertirla en una eléctrica, de esta manera la computadora puede enviar señales hacia dispositivos actuadores. La señal física pasa por una serie de etapas para poder ser leída por la computadora (Tarot-Gálvez, 2004; Mendiburu, 2010):



Figura 1.5 Sistema de adquisición de datos basado en una computadora

1. Etapa de transductores: los transductores son dispositivos que convierten una señal física (como por ejemplo presión, temperatura, luz, etcétera) en señales eléctricas de voltaje o corriente.
2. Etapa de transmisión: Permite enviar las señales de salida de una etapa hacia otra situada en una localización remota. Para distancias no excesivas, es común emplear un bucle de corriente 4-20 mA para la transmisión de las señales.
3. Etapa de acondicionamiento: contiene circuitos electrónicos encargados de transformar las señales de sensado en nuevas variables eléctricas, de forma que sean más fáciles de tratar por el resto de etapas del sistema. Implica filtrado de ruido, escalonamiento, ajuste al rango del convertidor A/D, etc.

4. Etapa de adquisición: efectúa la transformación de la información analógica a un formato digital, lo que hace posible un posterior procesamiento y almacenamiento mediante el uso de una computadora.
5. Etapa de procesamiento: tiene lugar dentro de la computadora, consiste en la realización de operaciones sobre la información digital obtenida: decisiones para el control de un sistema, detección de situaciones de alarma, corrección de medidas, almacenamiento y reportes de información, etc.

1.7.2 Acondicionamiento de señales

Por lo general las señales eléctricas de campo vienen contaminadas de ruido, armónicos, caídas de voltaje o corriente, y otros fenómenos que distorsionan la señal. El acondicionamiento de señal es opcional, porque dependiendo de cada señal y/o aplicación, se puede o no requerir amplificación, atenuación, filtraje, aislamiento, etc. de cada señal. Si la señal está en el rango de los ± 5 V dc y no se requiere de aislamiento o filtraje, la misma puede ser conectada directamente a la tarjeta de adquisición de datos.

En esta etapa de acondicionamiento es posible encontrar otras subetapas como amplificación, aislamiento, multiplexado, filtrado, excitación y linealización, aunque no todas están siempre presentes (Mendiburu, 2010; Lajara y Pelegrí, 2012).

1.7.3 LabVIEW

LabVIEW (*Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*) de la compañía *National Instruments* (NI) es una herramienta de programación gráfica usada principalmente para tareas como: adquisición de datos, control de instrumentos, automatización industrial y diseño de control. LabVIEW permite diseñar interfaces de usuario mediante una consola interactiva basada en software ya que es un sistema de programación de propósito general con librerías y funciones para diversas tareas. En particular incluye librerías para: adquisición, análisis, presentación y almacenamiento de datos, GPIB y control serial de instrumentos.

Posee un entorno de programación destinado al desarrollo de aplicaciones, similar a los sistemas de desarrollo comerciales que utilizan el lenguaje C o Basic. Sin embargo, se diferencia de dichos programas en un importante aspecto: los citados lenguajes de programación se basan en líneas de texto para crear el código fuente del programa, mientras que LabVIEW, emplea la programación gráfica o lenguaje G para crear programas basados en diagramas de bloques (Pineda, 2011).

Una de sus principales aplicaciones es en sistemas de medición, como monitoreo de procesos y aplicaciones de control, un ejemplo de esto pueden ser sistemas de monitoreo en transportación, laboratorios para clases en universidades o procesos de control industrial. Es muy utilizado en procesamiento digital de señales, procesamiento en tiempo real, para aplicaciones biomédicas, manipulación de imágenes y audio, automatización, diseño de filtros digitales, generación de señales, entre otras (Mendiburu, 2010).

1.7.3.1 Elementos y características del software

LabVIEW produce instrumentos virtuales (VIs), que contienen diferentes elementos de los cuales los dos primeros son las partes principales (Mendiburu, 2010; Pineda, 2011; LabVIEW™, 2013):

1. Panel frontal

Es la pantalla donde se hace una representación gráfica de los elementos físicos reales, es decir, es la interface que el usuario está viendo, fundamentalmente combinando elementos indicadores y de control:

- Los controles simulan los dispositivos de entrada de un instrumento y proporcionan los datos al diagrama de bloques del VI.
- Los indicadores simulan los dispositivos de salida de un instrumento y muestran los datos adquiridos o generados por el diagrama de bloques.

2. Diagrama de Bloques (Funciones)

Esta ventana contiene el diagrama de bloques del algoritmo que se está programando, es decir es código fuente gráfico de LabVIEW. El diagrama de bloques es una solución ilustrada a un problema de programación y se construye uniendo (cableando) objetos que reciben o envían datos, realizan una función específica y controlan el flujo de la ejecución del programa.

3. Iconos y Conectores

Son usados para crear nuevos iconos personalizados, en realidad un icono representa un subprograma en el diagrama de bloques del programa principal. Los conectores son líneas (cables).

4. Funcionabilidad

Existen funciones prediseñadas para adquisición de datos e imágenes, de comunicaciones, de procesamiento digital de señales, de funciones matemáticas simples, hasta funciones que utilizan otros programas como MATLAB o HiQ para resolver problemas, otras más complejas como "nodos de formula" que se utilizan para la resolución de ecuaciones editando directamente estas como en lenguajes de programación tradicionales y definiendo las entradas y las salidas.

5. Flujo de Datos

Otra característica se encuentra en el flujo de datos, que muestra la ejecución secuencial del programa, es decir, una tarea no se inicia hasta no tener información en todas sus variables de entrada o que las tareas predecesoras hayan terminado de ejecutarse.

6. Estructuras y Subdiagramas

Las estructuras se comportan como cualquier otro nodo en el diagrama de bloques, ejecutando automáticamente lo que está programado en su interior una vez que tiene disponibles los datos de entrada, y una vez ejecutadas las instrucciones requeridas, suministran los correspondientes valores a los cables unidos a sus salidas. Un subdiagrama es una colección de nodos, cables y terminales situados

en el interior del rectángulo que constituye la estructura. Los subdiagramas se construyen del mismo modo que el resto del programa, cada estructura ejecuta su subdiagrama de acuerdo con las reglas específicas que rigen su comportamiento, ejemplos de ellas son: case structure, sequence structure, for loop, while loop y formula node (Mendiburu, 2010; Pineda, 2011).

1.8 Diseño de experimentos

El diseño experimental es una herramienta de importancia fundamental en el ámbito de la ingeniería para mejorar el desempeño de un proceso de manufactura. También tiene múltiples aplicaciones en el desarrollo de procesos nuevos y mejoramiento de procesos. Un experimento diseñado puede definirse como una prueba o serie de pruebas en las que se hacen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema para observar e identificar las razones de los cambios que pudieran observarse en la respuesta de salida (Montgomery, 2013).

1.8.1 Diseño factorial 2^2

Los diseños factoriales son ampliamente utilizados en experimentos en los que intervienen varios factores para estudiar el efecto conjunto de éstos sobre una respuesta. Por diseño factorial se entiende aquel en el que se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada réplica del experimento y los factores están cruzados en este tipo de diseño. El diseño factorial 2^2 cuenta con dos factores A y B representados por el exponente, cada uno con dos niveles (alto y bajo), es decir un total de cuatro combinaciones. El orden estándar de las combinaciones de tratamientos es (1), a, b y ab. En este diseño factorial no hay datos suficientes para estimar los residuos, por lo que no es posible hacer contrastes así como se estiman cuatro parámetros con cuatro datos por tanto, no hay grados de libertad para los residuos. El modelo estadístico lineal de efectos de un diseño factorial es:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad \begin{cases} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, b \\ k = 1, 2, \dots, n \end{cases} \quad (1.1)$$

Donde μ es el efecto medio general, τ_i es el efecto del i -ésimo nivel del factor A de los renglones, β_j es el efecto del j -ésimo nivel del factor B de las columnas, $(\tau\beta)_{ij}$ es el efecto de la interacción entre τ_i y β_j , y ϵ_{ijk} es el componente del error aleatorio que considera la replicación k -ésima. Inicialmente se supone que ambos factores son fijos y que los efectos de tratamiento se definen como desviaciones de la media general (Montgomery, 2013).

En el diseño factorial de dos factores, los factores (o tratamientos) de los renglones y las columnas, A y B, son de igual interés. Específicamente, el interés se encuentra en probar hipótesis acerca de la igualdad de los efectos de los tratamientos de los renglones:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0 \quad (1.2)$$

$$H_1: \text{al menos una } \tau_i \neq 0 \quad (1.3)$$

Y de la igualdad de los efectos de los tratamientos de las columnas:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_b = 0 \quad (1.4)$$

$$H_1: \text{al menos una } \beta_j \neq 0 \quad (1.5)$$

También existe interés en determinar si los tratamientos de los renglones y las columnas interactúan:

$$H_0: (\tau\beta)_{ij} = 0 \quad \text{para todas las } i, j \quad (1.6)$$

$$H_1: \text{al menos una } (\tau\beta)_{ij} \neq 0 \quad (1.7)$$

Los efectos de los factores A y B, pueden tener una contribución positiva o negativa, esto depende si existen diferencias significativas entre los niveles y si se busca incrementar la variable de respuesta (rendimiento, producción, resistencia, etc.) o disminuir la misma (tiempo, costo, etc.). El modelo de efectos fijos se utiliza cuando el experimentador propone los niveles de los factores, en esta situación se prueban hipótesis acerca de los tratamientos, y las conclusiones se aplican únicamente a los niveles de los factores considerados en el análisis. Las conclusiones no pueden extenderse a tratamientos similares que no fueron considerados explícitamente. (Montgomery, 2013).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Rebaudiósido A

Polvo cristalino color blanco con 95% de pureza (marca Stevia Bonda), no presenta olor desagradable, fácilmente soluble en agua, de sabor dulce característico de los glucósidos extraídos de las hojas de estevia. Se emplea como endulzante en productos de panadería, lácteos, bebidas, repostería, confitería, etcétera. Tiene un contenido energético de 0 kcal, proteínas, grasas, fibra dietética, colesterol y sodio de 0 g por un tamaño de porción de 1 g. En la Tabla 2.1 se presentan las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas.

Tabla 2.1 Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del Rebaudiósido A

Propiedades fisicoquímicas	
Humedad	≤ 5 %
Punto de fusión	198 – 202 °C
Densidad	300 – 350 kg/L
Solubilidad	0.01 g/mL
Cenizas	≤ 1 %
pH (1% en solución)	Entre 4.5 y 7
Metales pesados	≤ 1 mg/kg
Plomo residual	≤ 1 mg/kg
Arsénico residual	≤ 1 mg/kg
Propiedades microbiológicas	
Coliformes totales	≤ 10 ufc/g
Hongos y levaduras	≤ 10 ufc/g
<i>E. Coli</i>	Ausente
<i>Salmonella</i> en 25 g	Ausente

2.1.2 Baño de recirculación programable

El baño de recirculación programable con calefacción y refrigeración de líquidos en el tanque (termostático) modelo F34-MD de la marca Julabo se caracteriza por ser

de funcionamiento silencioso, cuenta con un control activo de refrigeración (ACC) donde el compresor de refrigeración se activa para todo el rango de temperaturas, parrilla de ventilación extraíble para una conveniente limpieza y mantener el rendimiento de refrigeración, desconexión automática en caso de perturbación y es controlado con la computadora a través de un puerto de comunicación en línea RS-232C. El rango de temperatura de trabajo es de -30 a 150 °C con una estabilidad de temperatura de ± 0.01 °C, el medio refrigerante es el R134a, tiene un flujo de la bomba 15 L/min y un volumen utilizable del baño de 14 a 20 L.

2.1.3 Microscopio electrónico

El microscopio óptico profesional Primo Star iLED modelo 37081 de la marca Carl Zeiss tiene un diseño compacto. Cuenta con un módulo de iluminación de lámpara halógena, iluminación LED, indicadores de la intensidad luminosa en azul, platina de desplazamientos en cruz 75x30 para el manejo desde la derecha/izquierda con sujetaobjetos, cuatro objetivos de un alto poder resolutivo con óptica corregida a infinito del tipo "Plan-ACHROMAT" con aumentos de 4x, 10x, 40x 100x/Oil (aplicaciones con aceite de inmersión) para campo claro, oscuro y contraste de fases en luz transmitida.

Está provisto con una cámara digital de microscopio modelo AxioCam ERc-5s de marca Zeiss que tiene un sensor Micron MT9P031 de 5 Mp tipo CMOS, conectividad USB y HDMI, sensibilidad espectral entre 400 y 700 nm y utiliza el programa AxionVision que es el software estándar disponible para la adquisición, análisis, procesamiento y archivo de imágenes.

2.1.4 Bomba peristáltica

La bomba peristáltica modelo MasterFlex L/S 7024-20 de la marca Cole Palmer, además de ser económica tiene accionamientos analógicos fáciles de usar ofreciendo una velocidad y control preciso, cuenta con un motor reversible, un tubo

de purga para antes y después del bombeo, bombea el fluido en cualquier dirección, indicador de encendido y velocidad de flujo mínima de 10 y máxima de 1300.

2.1.5 Densímetro digital

El densímetro digital modelo DMA-4500 es un medidor de concentración de alta precisión de la marca Anton Paar, puede realizar mediciones de densidad, densidad relativa, gravedad específica y °Brix entre otros, tanto para líquidos y gases. Basa su medición en el método de oscilación armónica de tubo en "U" y cuenta con un termómetro de platino (Pt 100) montado en el interior de la celda de medición.

El rango de medición para la densidad va de 0 a 3 g/cm y para la temperatura de 0 a 90 °C, tiene una alimentación de muestra en la celda de 1 mL de solución, un error de medición en la temperatura de 0.1 °C y en la densidad de 1×10^{-5} g/cm³, con tiempo de medición por muestreo usualmente de 5 minutos. Este equipo consta del panel de funciones, la pantalla de impresión de datos y la ventanilla para la celda de medición donde se observa la introducción de la muestra en el tubo.

2.1.6 Refractómetro automático

El refractómetro automático de ángulo crítico modelo ATR-BR de la marca SCHMIDT HAENSCH mide el índice de refracción (IR) de medios líquidos independientemente de la opacidad, viscosidad y color. El instrumento consiste en un cabezal de medición colocado en la parte superior y una interfaz de usuario en la superficie frontal, en la configuración estándar muestra los resultados de índice de refracción, porcentaje de sustancia seca (°Brix y %glucosa) y temperatura.

El volumen de muestra es de 0.5 mL, con rango de medición del IR de 1.3320 a 1.5320 con una exactitud de 0.0001, el rango de medición de los brix y glucosa va de 0 a 95% con una exactitud de 0.05 % y con una temperatura operacional de 10 a 40 °C, tiene un prisma de cristal de zafiro sintético resistente a los arañazos, el compartimiento de la muestra es de acero inoxidable y su recubrimiento de vitron.

2.1.7 Espectrofotómetro colorimétrico

El espectrofotómetro colorimétrico de haz doble modelo miniscan Xplus de la marca HunterLab mide el color de sustancias sólidas, está formado por un conjunto de diodos de 256 elementos y rejilla holográfica cóncava de alta resolución con componente especular difuso/8°, rango espectral de 400 nm a 700 nm, resolución espectral menor a 3 nm, rango fotométrico del 0 al 150 %, lámpara de xenón pulsada como fuente de luz, tiempo de medición de 2 s con intervalo mínimo entre mediciones de 3 s, observadores de 2° y 10° triestímulo, escalas de color CIE L*a*b*, Hunter Lab, CIE L*C*h, CIE Yxy y CIE XYZ, escalas de diferencia de color $\Delta L^*a^*b^*$, ΔLab , ΔL^*C^*H , ΔYxy y ΔXYZ , índices de diferencia de color ΔE^* , ΔE , ΔC^* , ΔC y ΔE_{cmc} y cuenta con asignación estándar de instrumentos de acuerdo con el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST).

2.1.8 Tarjeta de adquisición y acondicionamiento de señales

La tarjeta de adquisición, acondicionamiento y procesamiento de señales modelo Nano de la marca Arduino es una placa con un microcontrolador ATmega328, funciona con un cable USB Mini-B que permite programar el microcontrolador desde cualquier computadora y hacer pruebas de comunicación con el chip. Este tipo de tarjeta es ampliamente utilizada para proyectos electrónicos de adquisición y generación de señales y automatización de procesos. Cuenta con un diseño electrónico internacionalmente aprobado y de libre distribución. Se alimenta con una fuente externa no regulada de 6-20 V o con una fuente externa regulada de 5V, tiene 14 puertos digitales de entrada/salida, 8 puertos análogos, memoria de 16 KB, 1 KB de SRAM y 512 bytes de EPROM, corriente máxima por cada PIN de E/S de 40 mA y frecuencia de reloj de 16 MHz.

2.1.9 Otros materiales

La balanza analítica modelo Explorer EP-64 de la marca OHAUS, tiene un alcance en peso de 210 g, zona de tarado, tiempo de estabilización de 4 s, plato de 9 cm

de diámetro, intervalo operativo de temperatura de 10 a 40 °C y diferentes modos de pesada (g, mg, oz, g, entre otros).

El sensor electrónico Ds18B20 adquiere las señales de manera digital mediante el protocolo “OneWire” (conexión mediante un sólo cable de datos). Cuenta con un encapsulado metálico y recubrimiento de plástico reforzado que le permite ser sumergido en líquidos a altas temperaturas. Abarca rango de temperatura de -55 a 125 °C con precisión de ± 0.5 °C en un intervalo de -10 a 85 °C, resolución de 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 °C, tiempo de lectura de 93.75, 187.5, 375, 750 ms y voltaje de alimentación de 3.3 – 5.5 V. Es empleado para sistemas de control termostático, sistemas industriales, termómetros y sistemas térmicos sensitivos.

La agitación se realizó mediante un motorreductor de corriente directa (CD) marca pololu de 12 V con corriente máxima consumida de 5000 mA, consiste en un cilindro de 68 mm de longitud por 37 mm de diámetro, peso de 230 g y diámetro del eje de 6 mm, tiene un motor con escobillas con relación de transmisión del engranaje de 19:1 (reducción metálica) integrado con un codificador de cuadratura incremental de dos canales basado en medición CPR (cuenta por revolución) que indica posición y dirección del giro además de la velocidad de movimiento a través de un sensor magnético, provee 64 pulsos por vuelta en el eje del motor y equivale a 1,200 pulsos por vueltas en la salida de la caja de reducción, tiene un rango de operación de 0 a 500 rpm y un torque máximo de 10 kg · cm.

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención de la curva de solubilidad

Se midió una alícuota de 20 mL de agua tridestilada y se depositó en un tubo de ensaye con tapa roscada, después se pesó una cantidad inicial de 0.1 g del soluto Rebaudiósido A al 95 % de pureza y se agregó a la muestra de agua, después a través de agitación manual se realizó el mezclado del soluto en el agua con el fin de favorecer la disolución de éste en el medio acuoso, en seguida la muestra se introdujo en un baño de recirculación con una temperatura por encima de la

temperatura de saturación (+10 °C) a la que se estaba realizando el experimento con el fin de asegurar que el soluto se disolviera completamente en el agua.

Se observó que la muestra no tuviera precipitado alguno (solución transparente), para asegurar que el soluto se encontraba totalmente disuelto en el agua fue necesario tomar una alícuota de 1 mL y se analizó en el microscopio en un portaobjetos con el objetivo 10x, se disminuyó la temperatura de forma gradual en un rango de 10 °C hasta la temperatura de saturación deseada. Una vez que la muestra se estabilizó a la temperatura de saturación, se midió la densidad y el índice de refracción en el equipo DMA-4500 y ATR-BR, respectivamente.

Este procedimiento se repitió hasta la aparición de un precipitado que ya no pudo disolverse (solución sobresaturada) a la temperatura de saturación especificada, lo que indicó que se encontró el punto de saturación (concentración a una determinada temperatura).

2.2.2 Determinación del rango de temperatura de cristalización

El rango de temperatura para la cristalización de Rebaudiósido A, se obtuvo del análisis de los resultados obtenidos en la sección 2.2.1, donde se seleccionó el intervalo de 60 a 10°C ya que incluye la sección de curva con mayor pendiente, es decir, donde la solubilidad de la solución cambió considerablemente con respecto a la temperatura.

2.2.3 Obtención de la primera zona metaestable

Para la determinación de los puntos experimentales del límite de la primera zona metaestable fue necesario realizar un montaje (Figura 2.1) que incluyó un recipiente adaptado con aislante para recircular agua proveniente del baño termostático a través de bombas peristálticas y manguera aislada, un matraz Erlenmeyer de 100 mL como reactor y la agitación del sistema mediante una bala y parrilla electromagnética.



Figura 2.1 Sistema para la determinación de la zona de concentración

Para cada temperatura de saturación el matraz fue cargado con 75 mL de una solución saturada de Rebaudiósido A y agua tridestilada, realizando las corridas experimentales para las seis temperaturas de saturación (10 - 60°C). La disolución del soluto se logró mediante recirculación de agua de calentamiento en el recipiente, con una temperatura de 10 °C superior respecto a la temperatura de saturación de la solución, hasta obtener una disolución completa, verificándose a través del microscopio para observar que no existieran partículas suspendidas en el seno de la solución. Posteriormente, se aplicó un enfriamiento tipo rampa hasta que está alcanzara su respectiva temperatura de saturación.

Cuando la solución dentro del matraz se disolvió completamente y llegó a la temperatura de saturación, con una densidad igual o ligeramente menor a la de saturación dio inicio la corrida experimental, donde la solución fue enfriada lentamente en intervalos de 1 °C y en cada estado estacionario de temperatura con una manguera de silicón, se tomó una muestra para medir la densidad y realizar la captura de las imágenes. Los muestreos finalizaron cuando el primer núcleo visible apareció.

Para medir densidad se tomó una muestra de 4 mL de solución (fase continua + núcleos) la cual se filtró con papel azucarero estándar (50 μm) introduciéndose 2 mL en el densímetro. Para el índice de refracción se tomó una muestra de 6 gotas

de solución filtrada y se introdujo en el refractómetro. Para la obtención de las micrografías se tomaron 2 mL de solución sin filtrar y se adquirieron imágenes de los núcleos existentes en el microscopio con el software AxioVision Rel. 4.8.2.

La identificación del límite de la primera zona metaestable se obtuvo detectando en las micrografías el primer núcleo visible, proporcionando la temperatura, densidad e índice de refracción en donde se ubica el límite de la zona de crecimiento.

2.2.4 Ajuste de modelos polinomiales en MATLAB

Los modelos polinomiales para la curva de saturación y la primera zona de concentración (crecimiento) determinadas experimentalmente se obtuvieron empleando el asistente de ajuste de curvas de MATLAB R2017a. El modelo polinomial que ajusta de mejor forma a los datos experimentales se determinó mediante la selección del índice de correlación (R^2) más cercano a la unidad.

2.2.5 Implementación de un sistema de cristalización por lotes

La implementación del sistema de cristalización se llevó a cabo en tres etapas: (I) diseño y construcción de un cristalizador y componentes, (II) instrumentación para medir variables de importancia en el proceso y (III) servicios auxiliares y montaje.

2.2.5.1 Diseños del sistema

2.2.5.1.1 Diseño del cristalizador por lotes

Se diseñó un cristalizador por lotes de acuerdo con los requerimientos para el proceso de cristalización del Rebaudiósido A considerando el volumen efectivo (1000 mL), de trabajo requerido de 80% (800 mL) y la capacidad de enfriamiento y/o calentamiento, la cual fue calculada mediante la comparación de entalpías de soluciones acuosas y azucaradas. El equipo se conforma de dos cilindros concéntricos de vidrio, en el primero ocurre la cristalización, el segundo funge como doble pared para la circulación de agua mediante dos entradas, una colocada en la

parte inferior y otra en la parte superior con el fin de distribuir homogéneamente el agua evitando pérdidas considerables de calor que afecten bruscamente la temperatura interna del reactor. Para el sellado se tiene una tapa con tres bocas, sujeta al cuerpo del equipo mediante una abrazadera tipo anillo con muesca de acero inoxidable con un empaque que evita el contacto superficial vidrio-metal. La Figura 2.2 muestra el dimensionamiento del cuerpo principal, tapa y distribución de las bocas en una vista frontal y superior.

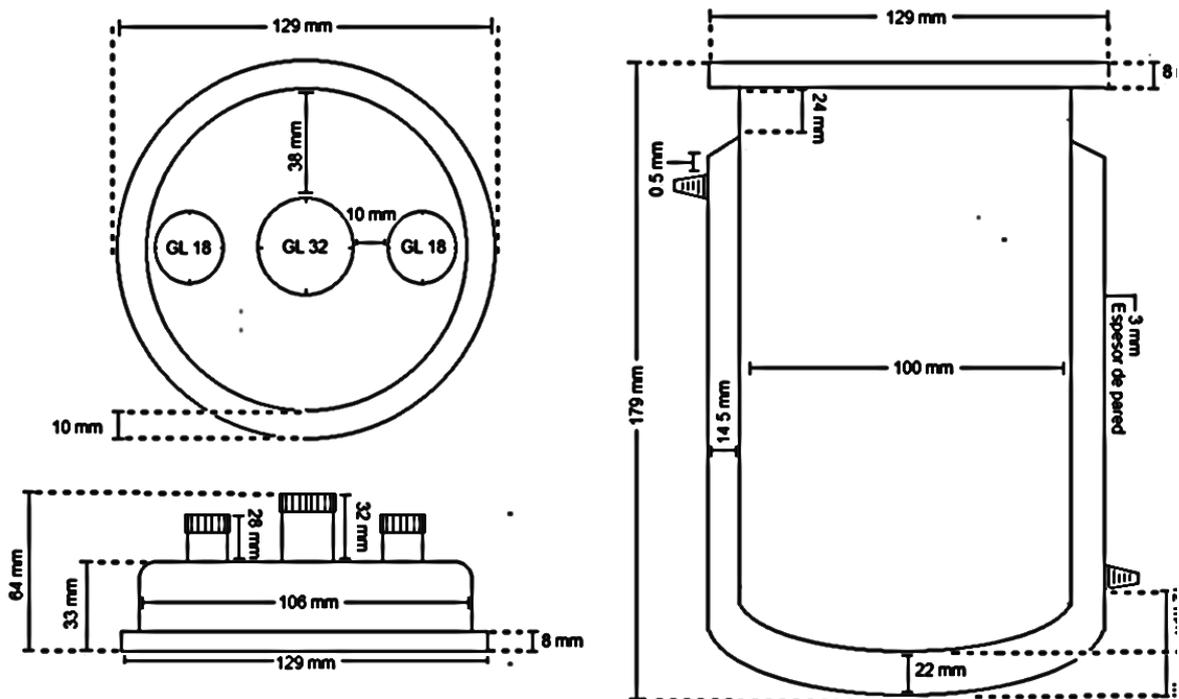


Figura 2.2 Dimensionamiento del cristizador por lotes

2.2.5.1.1.1 Cálculo del espesor de la doble pared del cristizador

En la determinación del espesor de la doble pared del cristizador se consideró la entalpía como referencia para conocer el calor que puede absorber y/o retirar el cilindro interno y externo teniendo en cuenta que tipo de líquido/solución va a contener cada cilindro para así determinar la diferencia de calor desprendido o absorbido que existe entre ellos y compensarla con el diámetro del cilindro externo, el cual determina directamente el espesor de la doble pared. Para calcular tal espesor se consideró que la resistencia de transferencia de calor está en función

de una alta viscosidad empleándose la ecuación 2.1 (cambio de entalpía), que representa el calor que debe ser removido para enfriar o agregado para calentar soluciones azucaradas dado que son más viscosas que soluciones de Rebaudiósido A, además de que el cristalizador se utilizará para múltiples soluciones. Dónde ΔH es el cambio de entalpía en cal, m es la diferencia de masa en g, C_p es el calor específico en cal/g °C y ΔT es la diferencia de temperatura inicial y final en °C.

$$\Delta H = mC_p\Delta T \quad (2.1)$$

Para calcular la masa es necesario conocer la densidad de la solución azucarada a la temperatura superior e inferior de trabajo (70 - 40 °C) y el volumen de trabajo del primer cilindro (interior del reactor), así como la densidad del agua de enfriamiento a la misma temperatura de trabajo y el volumen de trabajo del segundo cilindro (interior de la doble pared), por lo que se considera la ecuación 2.2. Dónde m es la masa del fluido en g, ρ es la densidad del fluido en g/cm³ y V es el volumen de trabajo en cm³.

$$m = \rho V \quad (2.2)$$

El volumen efectivo de ambos cilindros está en función de sus diámetros y a su vez el volumen de trabajo del cilindro interior se obtiene considerando solo el 80 % de la capacidad total o efectiva. En la Tabla 2.2 se muestran los cálculos para la determinación de los volúmenes efectivos y de trabajo que posteriormente se utilizan para calcular las masas correspondientes para cada cilindro y temperatura. En lo que respecta a la densidad (a temperatura superior e inferior) y calores específicos, se utilizaron los de la solución saturada de azúcar y agua (ver Tabla 2.2). Retomando la ecuación 2.1, se sustituyó cada variable para obtener la entalpía de las soluciones en su respectivo cilindro, es importante mencionar que la variable masa se consideró como una diferencia ya que se trataba de dos temperaturas.

Tabla 2.2 Cálculo de volúmenes y masas

	Solución saturada de azúcar (cilindro interno)	Agua (cilindro exterior)
Volumen (cm³)	$V_{ef} = \pi \cdot \frac{D^2}{4} \cdot h$ $V_{ef} = \pi \cdot \frac{(10 \text{ cm})^2}{4} \cdot 12.73 \text{ cm}$ $V_{ef.ss} = 999.81 \cong 1000 \text{ cm}^3$ $V_{trabajo} = 0.8 \cdot V_{ef}$ $V_{trabajo} = 0.8 \cdot 1000 \text{ cm}^3$ $V_{trabajo} = 800 \text{ cm}^3$	$V_{ef} = \left(\pi \cdot \frac{D^2}{4} \cdot h \right) - V_{ef.ss}$ $V_{ef} = \left(\pi \cdot \frac{(12.9 \text{ cm})^2}{4} \cdot 14 \text{ cm} \right) - 1000 \text{ cm}^3$ $V_{ef.a} = 829.77 \text{ cm}^3$
Temperatura	Masa (g)	
40 °C	$C_{p_{sol.sat.}} = 0.3 \text{ cal/g } ^\circ\text{C}$ $\rho = 1.3348 \text{ g/cm}^3$ $m = \left(1.3348 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right) \cdot 800 \text{ cm}^3$ $m_1 = 1067.84 \text{ g}$	$C_{p_{agua}} = 1 \text{ cal/g } ^\circ\text{C}$ $\rho = 0.9922 \text{ g/cm}^3$ $m = \left(0.9922 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right) \cdot 829.77 \text{ cm}^3$ $m_1 = 823.3 \text{ g}$
70 °C	$\rho = 1.3587 \text{ g/cm}^3$ $m = \left(1.3587 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right) \cdot 800 \text{ cm}^3$ $m_2 = 1086.96 \text{ g}$	$\rho = 0.9776 \text{ g/cm}^3$ $m = \left(0.9776 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right) \cdot 829.77 \text{ cm}^3$ $m_2 = 811.18 \text{ g}$

El espesor de pared necesario se obtuvo hasta alcanzar una diferencia significativa llegando al doble de la entalpía del agua en el cilindro exterior que la entalpía de la solución saturada en el cilindro interior (ver Tabla 2.3), con el fin de asegurar que el volumen de agua es suficiente para retirar el calor desprendido por la solución saturada de azúcar. La metodología descrita se basó en los fundamentos teóricos de calor de Çengel y Ghajar (2011).

Tabla 2.3 Comparación de entalpías

	Solución saturada de azúcar (cilindro interno)	Agua (cilindro exterior)
Entalpía (cal)	$m = m_2 - m_1 $	$m = m_2 - m_1 $
	$m = 1086.96 - 1067.84 g$	$m = 811.18 - 823.3 g$
	$m = 19.12 g$	$m = 12.12 g$
	$\Delta H = mC_p\Delta T$	$\Delta H = mC_p\Delta T$
	$\Delta H = (19.12 g) \left(0.3 \frac{cal}{g \text{ } ^\circ C}\right) (30 \text{ } ^\circ C)$	$\Delta H = (13.81 g) \left(1 \frac{cal}{g \text{ } ^\circ C}\right) (30 \text{ } ^\circ C)$
	$\Delta H = 172.08 cal$	$\Delta H = 363.6 cal$

Una vez conocido el procedimiento para la obtención de las entalpías, éstas se fueron modificando a través de los diámetros del cilindro externo e interno y su altura. La ecuación 2.3 muestra cómo se obtuvo el espesor, donde cabe mencionar que al tratarse de una configuración circular, se dividió entre 2.

$$\text{Espesor doble pared} = \frac{\phi_{cil.ext} - \phi_{cil.int}}{2} = \frac{12.9 - 10}{2} = 1.45 \text{ cm} \quad (2.3)$$

2.2.5.1.2 Diseño del agitador y abrazadera de anillo

En la Figura 2.3 se muestra el dimensionamiento de los agitadores y la flecha, el primero incluye cuatro álabes de configuración tipo paleta plana para homogeneizar la parte superior de la solución y el segundo tres álabes de configuración tipo propela debido a que esa configuración proporciona un mejor mezclado y suspensión de los cristales, ambos con una flecha de 10 mm de diámetro acondicionada en la punta inferior a 6 mm para la entrada de los cabezales.

En la Figura 2.4 se muestra el esquema de la abrazadera tipo anillo con vista frontal y superior que fue acoplada para la sujeción de la tapa al cuerpo del cristizador, la cual se sostiene del cuello del cuerpo principal al labio superior de la tapa a través de cuatro pestañas que brindan un efecto “mordaza” en conjunto con el empaque.

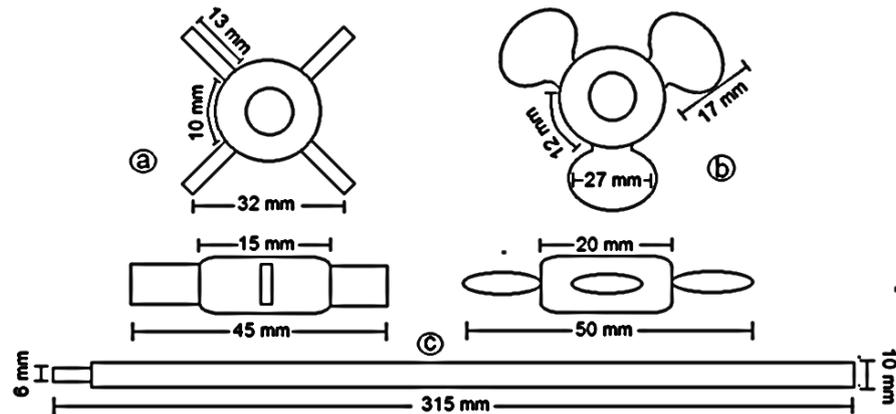


Figura 2.3 Diseño de agitador: a) paletas planas, b) propelas y c) flecha

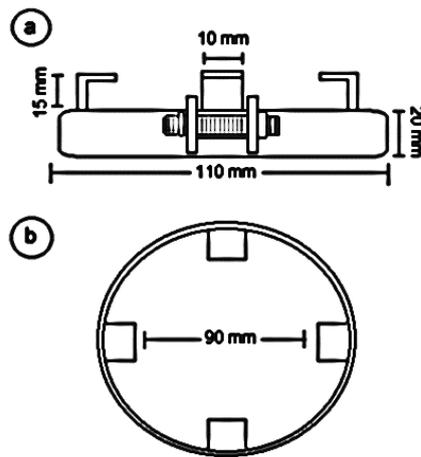


Figura 2.4 Dimensionamiento de la abrazadera: a) vista frontal y b) vista superior

2.2.5.1.3 Diseño de la estructura de soporte

La Figura 2.5 muestra una vista frontal, lateral isométrica y superior del diseño de la estructura, donde se planteó una base principal de estilo rectangular para lograr mayor soporte, cuadratura y estabilidad, ésta incluyó tres partes: la primera fue la base para sostener el baño de recirculación que consistió en unos travesaños ubicados en la parte inferior de la estructura; la segunda fue el asiento que sostiene la mitad del cristalizador en conjunto con dos tubos que fijan la parte superior del mismo mediante el cuello, ambas piezas ubicadas en la parte media-alta; y finalmente la tercera donde se hizo una reducción de la estructura principal para fijar el motor, mecanismo de agitación y agitador ubicada en la parte superior.

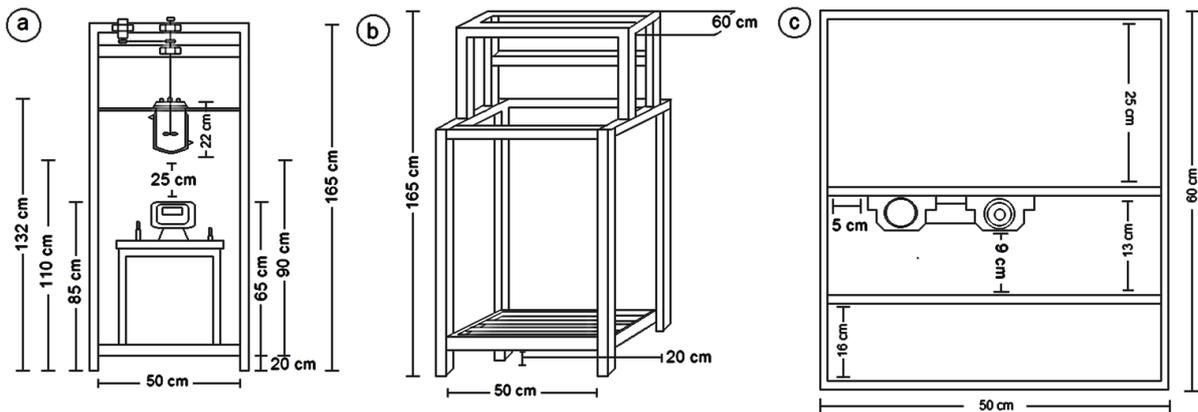


Figura 2.5 Dimensionamiento y distribución de la estructura de soporte: a) vista frontal, b) lateral isométrica y c) superior

2.2.5.2 Construcción del sistema de cristalización

El resultado de la construcción del cristizador por lotes y sus componentes se muestra en la Figura 2.6 donde el reactor fue construido en vidrio de borosilicato tipo pyrex resistente al ataque químico y a cambios de temperatura bruscos, la abrazadera de anillo fue de acero inoxidable 304, el empaque central fue de nitrilo blanco 60, ambos accesorios tienen clasificación de grado alimenticio. Las dos boquillas laterales GL 18 contienen capuchones con silicón, una contiene el sensor de temperatura y la otra un puerto de muestreo, la boquilla central GL 32 con capuchón es la entrada del agitador de acero inoxidable 304 de tipo propela/paleta al cuerpo interior del reactor. Todas las piezas (de vidrio, acero y electrónicas) se montaron en la estructura de aluminio descrita en la sección anterior (Anexo A).

2.2.5.3 Instrumentación del cristizador por lotes

En un sistema de cristalización por lotes, dos de las variables críticas en el proceso son la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y la agitación (rpm), es por esto que se requirió instrumentar dichas variables para tener una lectura precisa de los datos y proporcionar el mezclado necesario al proceso.

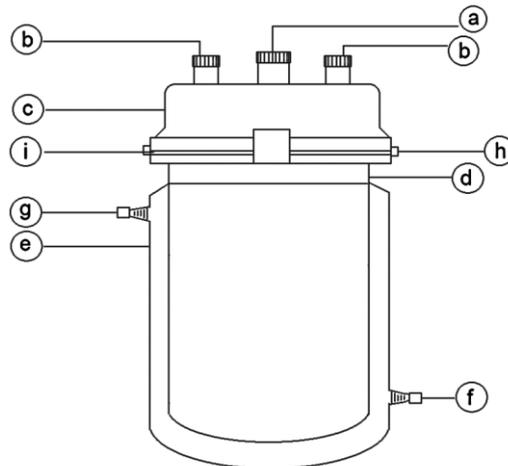


Figura 2.6 Descripción del cristizador por lotes: a) Boca roscada central GL 32, b) bocas roscadas laterales GL 18, c) tapadera con labio inferior esmerilado, d) cuerpo principal interior con labio superior esmerilado, e) chaqueta para el control de temperatura, f) entrada de agua g) salida de agua, h) abrazadera de anillo y i) empaque superficial

Para la medición de temperatura se utilizaron sensores digitales Ds18b20 (ver Figura 2.7) y para la medición de la velocidad de agitación se desarrolló un mecanismo de agitación integrado por chumaceras, baleros, poleas 1:1.5, banda transmisora, agitador de propela y paletas planas y motorreductor CD con reducción metálica de 19:1 integrado con codificador de cuadratura incremental (indica posición, dirección y velocidad de movimiento a través de sensor magnético) con un rango de operación de 0 - 500 rpm de la marca pololu (ver Figura 2.8).

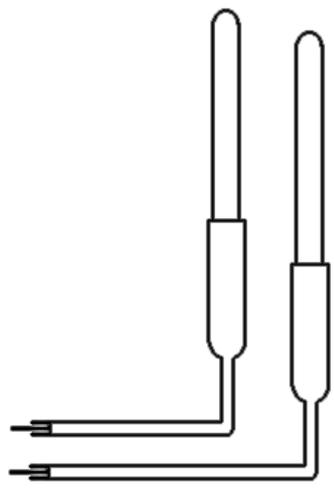


Figura 2.7 Sensores digitales Ds18b20

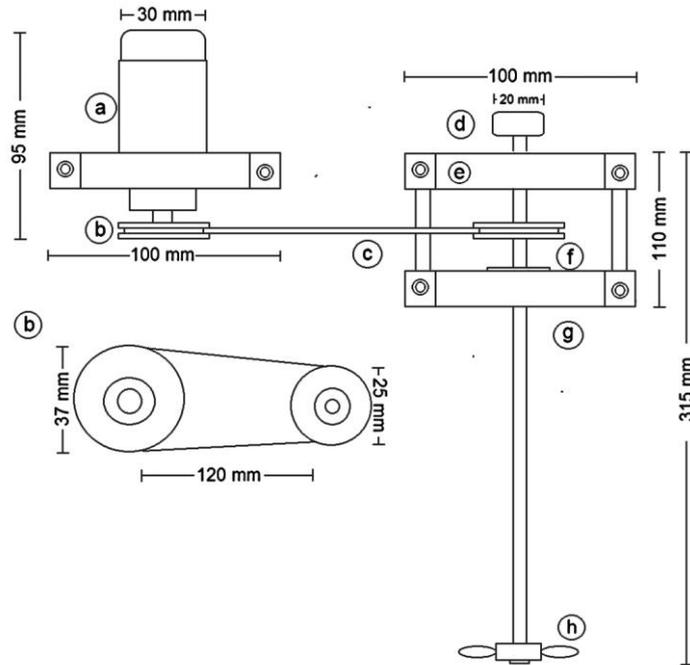


Figura 2.8 Mecanismo de agitación: a) motor, b) poleas, c) banda transmisora, d) seguro de flecha, e) chumacera, f) balero, g) flecha y h) cabezal

2.2.5.4 Desarrollo de sistema SCADA

2.2.5.4.1 Sistema embebido para un cristalizador por lotes

Se implementó un sistema embebido, es decir, un sistema electrónico diseñado para realizar pocas funciones en tiempo real enfocado a un cristalizador por lotes. En la Figura 2.9 se muestran las etapas que conforman dicho sistema y las partes generales por las que están conformadas.

En la etapa de potencia se produce la alimentación del sistema a través de una fuente conmutada de topología “flyback” con una salida a 12 V; la etapa de adquisición de señales consiste en la medición de las variables mediante sensores digitales para la temperatura y codificador con sensor magnético; posteriormente en la etapa de procesamiento de señales la información recopilada en forma de datos es sometida a análisis en una tarjeta de acondicionamiento de datos Arduino Nano que procesa la información recibida a través de un microcontrolador ATmega328 logrando así enviar señales de control, las cuales llevan a la etapa de salida o de elementos controlados, donde dichas señales de tipo PWM (modulación

de ancho de pulsos) son recibidas por un transductor L298n (alimentado por la fuente conmutada) que las convierte a señales eléctricas y las envía al motorreductor para regular la velocidad.

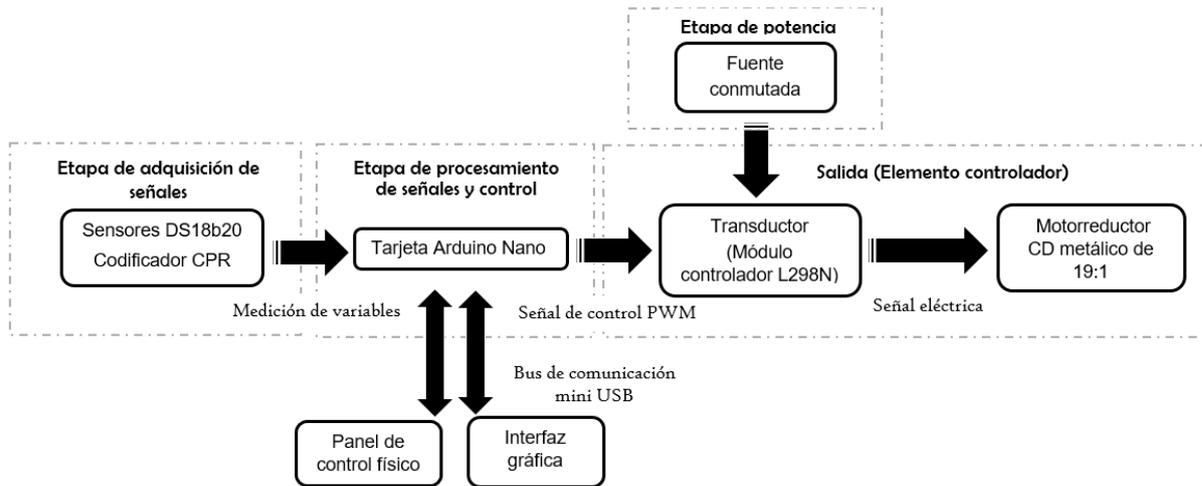


Figura 2.9 Etapas del sistema embebido

Las señales adquiridas fueron de la temperatura interior del cristizador y del agua de recirculación de la chaqueta, así como para la velocidad de agitación. En la Figura 2.10 se muestra el diseño de la PCB (placa de circuito impreso) y la circuitería en 2D que conforma la etapa de potencia, encajonada en acrílico.

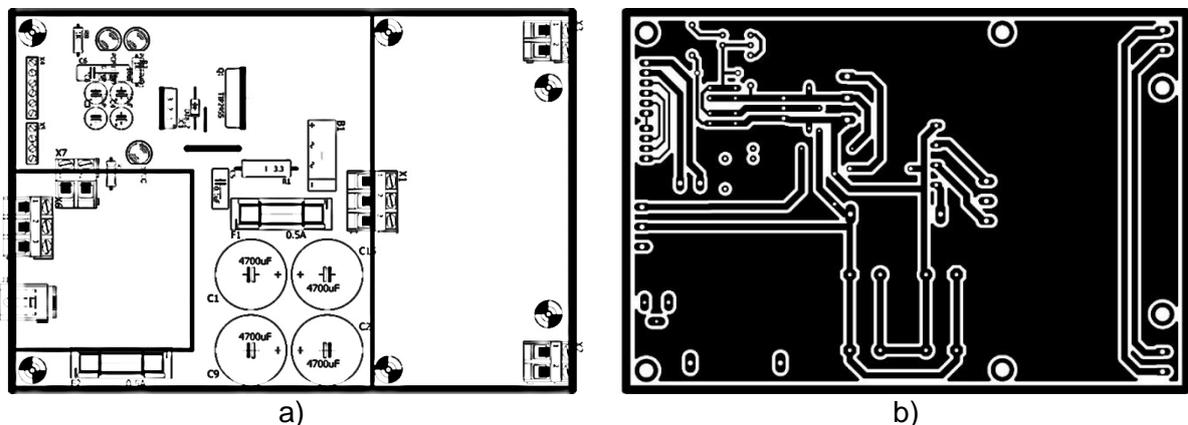


Figura 2.10 Diseño de la placa de potencia: a) circuitería y b) PCB

La programación del código de adquisición y procesamiento de señales fue desarrollada en el software Arduino Genuino versión 1.6.9, donde fue necesario

importar cinco librerías para el reconocimiento y correcto funcionamiento de las piezas electrónicas: “LiquidCrystal” para el control del panel LCD (pantalla de cristal líquido), “DallasTemperature” y “One-Wire” para el uso de los sensores Ds18b20 y envío/recepción de datos por un único cable, respectivamente; “RTCLib” para controlar los tiempos del reloj de computadora (circuito integrado que mantiene la hora actual) y “SD” para leer/escribir en tarjetas micro SD. Debido a la cantidad de líneas programadas, el código se muestra en el Anexo B.

2.2.5.4.2 Desarrollo de panel de control físico y virtual

La Figura 2.11 esquematiza el diseño de la PCB y circuitería en 2D del panel físico construido para el monitoreo de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y control de la velocidad de agitación (rpm), que al igual que la placa de potencia fue encajonada en acrílico transparente para evitar interferencias electromagnéticas y brindar mayor protección durante las corridas experimentales. Ésta consta principalmente de la tarjeta Arduino Nano, pantalla LCD 20x4 para la visualización de datos, potenciómetro para la manipulación y control de la agitación en un rango de 0 a 500 rpm, módulo SD para el almacenamiento de datos e interruptores para modo manual y paro de emergencia.

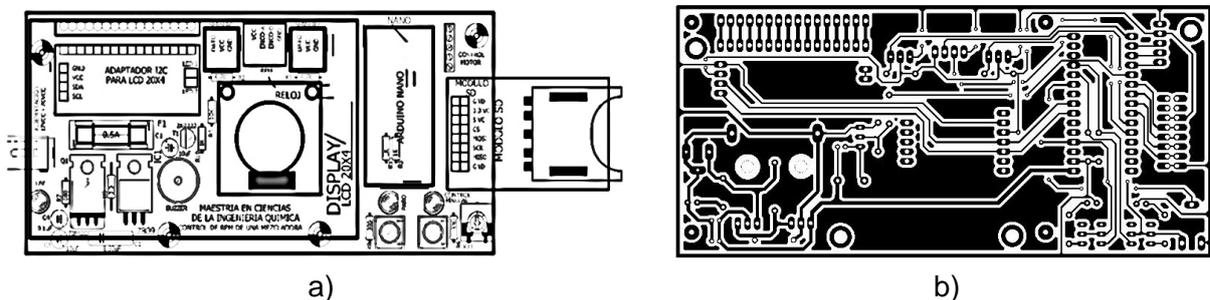


Figura 2.11 Diseño de panel de control físico: a) circuitería y b) PCB

El panel de control virtual se implementó en LabVIEW 2016 mediante la sincronización de las señales transmitidas por la tarjeta Nano a través del desarrollo de una interfaz gráfica para el monitoreo del proceso de cristalización del Reb A programando instrumentos virtuales (VI's). Dicha sincronización se realizó por medio de la herramienta de lazo denominada VISA la cual se basa en la recepción

y envío de datos vía mini USB. Dentro de las herramientas que se utilizaron para el diseño de la interfaz de los dos lazos fueron "Double precision (DBL)", "Boolean (True/False)", "While Data directly to chart" y "String to number function".

2.2.6 Prueba de solventes

Debido que al cristalizar las soluciones acuosas de Rebaudósido A no hubo un crecimiento significativo de los cristales ($D(2,1) = 37 \mu\text{m}$) atribuido a la poca cantidad de soluto necesario para saturar el agua (de 0.2 a 0.85 g en un intervalo de 10 a 60 °C), fue necesario realizar una prueba que incluyó seis solventes (la mayoría alcoholes) para determinar la solubilidad y compatibilidad del soluto en el solvente encontrando condiciones que favorecieran la cristalización, esto en base a lo reportado por Alves *et al.*, (2007) donde menciona que la glucosa mostró una solubilidad considerablemente alta en agua, por lo que estudiar mezclas que contengan dos o más solventes es viable para el proceso de cristalización. En este caso se buscó un solvente que permitiera aumentar la solubilidad del Reb A a temperaturas menores de 60 °C.

Para la prueba de solventes se midieron 10 ml de seis solventes (alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropílico, alcohol isoamílico, cloroformo y etanol) y se depositaron en tubos de ensaye, después se pesó y agregó Reb A a cada muestra, agitándose a temperatura ambiente hasta llegar a un punto de saturación en cada una, después se determinó que solvente contenía la mayor cantidad de soluto disuelto mediante los °Brix, dado que la concentración es un factor crucial en el proceso de cristalización.

Una vez seleccionado el solvente, que para este caso fue alcohol etílico, se probaron diferentes mezclas de alcohol acuoso variando %v/v para mantener y aprovechar los beneficios que brinda emplear agua. Para establecer los porcentajes a probar de la mezcla de solventes se realizó una asimilación del glucósido de esteviol con la glucosa debido a que el Rebaudósido A está formado principalmente de moléculas de glucosa por lo que se consideraron mezclas alcohol etílico/agua

de 50-50%, 60-40%, 70-30% y 80-20% según lo reportado para glucosa por Alves *et al.* (2007). Para este trabajo las mezclas seleccionadas fueron en base a la mayor concentración obtenida (°Brix).

Para determinar la cantidad de Reb A necesaria para saturar las mezclas de etanol acuoso se prepararon muestras de 100 mL de solución (base porcentual) a las cuales se les agregó soluto en cantidades dosificadas a una temperatura de 60 °C hasta alcanzar soluciones saturadas sin precipitados (soluciones claras) y se le determinó el grado de concentración en °Brix, densidad e IR, seleccionando las mezclas que presentaron mayores valores de concentración, con el fin de favorecer la cristalización.

2.2.7 Cristalización de Rebaudiósido A

2.2.7.1 Diseño experimental

En la Tabla 2.4 se ilustra el diseño experimental tipo factorial 2² para conocer el efecto de los factores elegidos en dos parámetros de cristalización. Los experimentos se realizaron aleatoriamente y por duplicado con lo que se obtuvo un total de 8 corridas (4 para cada réplica). Las variables de respuesta fueron tres cuantitativas: el tamaño de cristal D(2,1) y D(3,2), reportado en micras y la masa de cristal formado (MCF), en g recuperados (en 350 mL de solución).

Tabla 2.4 Diseño factorial 2² para la cristalización de Rebaudiósido A

Combinación de tratamientos	Factor			Réplica	
	A	B	AB	I	II
(1)	-	-	+	8	6
a	+	-	-	5	1
b	-	+	-	7	4
ab	+	+	+	3	2

Se consideraron dos factores: la proporción en la mezcla de solventes %v/v (factor A) con dos niveles, 60% alcohol etílico - 40% agua (bajo) y 70% alcohol etílico –

30% agua (alto), siendo seleccionadas de la Sección 2.2.6 al ser las que dieron el grado de concentración más alto (°Brix); y la velocidad de agitación (factor B) con dos niveles 50 rpm (bajo) y 100 rpm (alto), establecidos por que son relativamente bajos dado proporcionan un mayor crecimiento del cristal según Scheel y Fukuda (2003).

Prueba de hipótesis:

- Efecto del tratamiento τ_i del factor A (velocidad de agitación):

Hipótesis nula: La velocidad de agitación no modifica la D(2,1), D(3,2) y la MCF.

$$H_0: 50 \text{ rpm} = 100 \text{ rpm} = 0 \quad (2.4)$$

Hipótesis alterna: La velocidad de agitación modifica la D(2,1), D(3,2) y la MCF.

$$H_1: \text{al menos una } \tau_i \neq 0 \quad (2.5)$$

- Efecto del tratamiento β_j del factor B (%v/v del solvente):

Hipótesis nula: El efecto del porcentaje v/v de la mezcla de solventes es igual sobre la D(2,1), D(3,2) y la MCF.

$$H_0: 60 - 40\% = 70 - 30\% = 0 \quad (2.6)$$

Hipótesis alterna: El efecto del porcentaje v/v de la mezcla de solventes es diferente sobre la D(2,1), D(3,2) y la MCF.

$$H_1: \text{al menos una } \beta_j \neq 0 \quad (2.7)$$

- Efecto de la interacción de tratamientos $(\tau\beta)_{ij}$ de los factores A y B:

Hipótesis nula: La interacción de los dos factores es igual sobre la D(2,1), D(3,2) y la MCF.

$$\begin{aligned} H_0: 50 \text{ rpm y } 60 - 40\% &= 100 \text{ rpm y } 60 - 40\% = 50 \text{ rpm y } 70 - 30\% \\ &= 100 \text{ rpm y } 70 - 30\% \end{aligned} \quad (2.8)$$

Hipótesis alterna: La interacción de los dos factores es diferente sobre la D(2,1), D(3,2) y la MCF.

$$H_1: \text{al menos una } (\tau\beta)_{ij} \neq 0 \quad (2.9)$$

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los datos experimentales obtenidos usando el programa NCSS para determinar el efecto del %v/v de la mezcla de solventes, velocidad de agitación y su interacción sobre la D(2,1), D(3,2) y la MCF.

2.2.7.2 Procedimiento y especificaciones de cristalización

Previamente el baño termostático se ajustó a 10 °C, continuando con la preparación de la solución concentrada donde se utilizó como materia prima Rebaudiósido A con pureza del 95 %. Se preparó una solución saturada de Reb A midiendo con probeta 350 mL de la mezcla alcohol etílico/agua (60-40 % y 70-30 % v/v) y se pesaron en balanza analítica 192.5 y 157.5 g de soluto, respectivamente, después se depositaron en un matraz erlenmeyer sometido a calentamiento directo a 60 °C (límite superior del rango de temperatura para cristalización) para disolver totalmente el soluto y evaporar parte del solvente estableciendo una solución concentrada (saturada y viscosa) de 55 °Brix para ambas mezclas de solventes. Las cantidades utilizadas del glucósido se obtuvieron de la prueba de solventes, además se realizaron muestreos para supervisar el IR y % sólidos disueltos (°Brix) asegurando así la concentración inicial encontrada en la Sección 2.2.6, también se tomaron micrografías para verificar la disolución de todas las partículas de Reb A.

Procediendo con la cristalización, se cargó la solución en el cristalizador y se sometió a un enfriamiento natural de 60 a 10 °C mediante la recirculación del agua fría en la doble pared, dando inicio la corrida experimental. El tiempo en que la solución concentrada se enfrió a 10 °C fue de 40 min, dando 20 min más para su estabilización por lo que el tiempo de lote se fijó a 60 min. Se probaron velocidades de agitación de 50 y 100 rpm que en cada experimento permanecieron constantes.

Se tomó una muestra de 3 mL al inicio y final de la corrida para la medición de °Brix y captura de micrografías, y sólo al final para la masa de cristal.

Para la cristalización no se consideró el sembrado de cristales en la solución debido a que no sería posible analizar el efecto de la nucleación espontánea y crecimiento (con las condiciones del diseño factorial) sobre la forma y tamaño del cristal, buscando conocer el comportamiento fenomenológico de la población de cristales dispersa en la fase continua compuesta por los dos solventes (Bolaños, 2000).

2.2.7.2.1 Determinación de tamaño promedio de cristal

Para cuantificar el tamaño promedio de cristal (D(2,1) y D(3,2)) se tomaron micrografías de los cristales situados en el seno de la solución y se analizaron mediante la técnica de medición de cristales descrita por Bolaños *et al.*, (2008) que se basa en la conversión de pixeles a micras de los cristales. Cabe destacar que se hizo una modificación a dicha técnica por Ramos y Valdés (2016) que consistió en la calibración y actualización del factor de conversión del objetivo 10x (1 pixel = 0.432364615).

2.2.7.2.2 Determinación de masa de cristal formada

La medición de la masa de cristal formada se basó en la técnica de peso seco. Para cada cristalización se recolectaron 20 mL de solución cristalizada (licor madre + cristales) en tubos que previamente se pesaron vacíos en una balanza analítica y se introdujeron a una centrífuga por 5 min a 3000 rpm, este procedimiento se repitió de dos a tres veces por muestra con el fin de separar la mayor cantidad de solvente. Posteriormente las muestras centrifugadas se sometieron a calentamiento en una estufa a 80 °C por 6 h para evaporar el solvente residual y obtener una muestra seca (cristales secos). Durante el secado fue necesario mover cada hora la muestra en los tubos, favoreciendo el contacto de aire caliente con la muestra húmeda y evitando que los cristales se apelmacen.

2.2.8 Análisis de parámetros físicos y organolépticos

En esta etapa se caracterizaron: el mejor producto cristalizado de Rebaudiósido A obtenido en el diseño de experimentos, la sacarosa y la materia prima utilizada originalmente, para determinar dos tipos de parámetros, los de tipo físico: tamaño de cristal D(2,1), D(3,2) y color; y los de tipo organolépticos que incluyen: olor, sabor, color y apariencia. La técnica empleada para la determinación del tamaño se mencionó en la Sección 2.2.7.2.1, el resto se describen a continuación.

2.2.8.1 Determinación de color

Se utilizó un espectrofotómetro colorimétrico el cual mide el color utilizando la escala Hunter L, a, b, basada en la teoría del color contrario en un espacio rectangular tridimensional la cual asume que el espectro visible se percibe como pares de opuestos (HunterLab, 2012):

- Eje L: Luz contra oscuridad, donde 0 es negro, 100 es blanco y 50 es gris
- Eje a: rojo contra verde, donde un valor positivo indica rojo, negativo indica verde y 0 neutral.
- Eje b: amarillo contra azul, donde un valor positivo indica amarillo, negativo indica azul y 0 neutral.

Para describir completamente el color de un objeto se requieren tres valores (ΔL , Δa y Δb) que indican la diferencia de L, a y b entre un estándar y una muestra:

- Si ΔL es: positivo, la muestra es más clara que el estándar; si es negativo, es más oscura que el estándar.
- Si Δa es: positivo, la muestra es más roja (o menos verde) que el estándar; si es negativo es más verde (o menos roja).
- Si Δb es: positivo la muestra es más amarilla (o menos azul) que el estándar; si es negativo es más azul (o menos amarilla).

La diferencia de color (ΔE) es un valor único que tiene en cuenta el grado de diferencias entre ΔL , Δa y Δb de la muestra y el estándar pero no la dirección. Para la evaluación del color, se introdujo 1 g de cada muestra sólida en el depósito de medición; se compararon con un estándar (placa blanca) previamente caracterizada dado que todas las muestras tienen tendencia a la blancura. El equipo establece los valores L, a y b y calcula automáticamente ΔE de cada muestra medida respecto al estándar, cuantificando la desviación en el color y se calculó ΔL conociendo así la jerarquía de blancura de las muestras. El equipo realizó la medición por triplicado y generó un promedio de los datos.

2.2.8.2 Determinación de características organolépticas

Se efectuó un análisis sensorial a un panel no entrenado de 20 personas donde se evaluaron cuatro atributos de los dos edulcorantes: olor, sabor, color y apariencia, con el objetivo de conocer las preferencias y recomendaciones de los consumidores en propiedades tangibles y bien definidas del producto, para así potenciar su desarrollo o mejora orientada a la comunidad científica del área de alimentos y/o directivos de empresas. Específicamente se utilizó un análisis sensorial de tipo hedónico (de 9 puntos) donde se logró medir de manera precisa las respuestas del consumidor minimizando los potenciales efectos de desviación que la identidad del edulcorante pudo ejercer sobre su juicio. Cabe destacar que ésta prueba es recomendada para la mayoría de proyectos de investigación estándar, donde el objetivo es simplemente determinar si existen diferencias entre los productos en la aceptación del consumidor (Ramírez, 2012).

Las muestras se presentaron en cucharas idénticas y codificadas con cuatro caracteres, tres letras y un número, exponiéndose ordenadamente para cada panelista; la presentación fue de manera simultánea debido a que fue más fácil de administrar y permitió a los panelistas volver a evaluar las muestras y hacer comparaciones entre ellas. Para la evaluación del atributo de apariencia, se mostraron portaobjetos con la muestra correspondiente brindando una mejor vista y manipulación de los productos expuestos. En el Anexo C.1 se presenta la boleta

para la prueba hedónica donde se observa opciones (nueve categorías relacionadas con cierto puntaje) utilizadas para evaluar los cuatro atributos sensoriales de los edulcorantes.

2.2.8.3 Comparación de productos

La comparación del tamaño de cristal D(2,1) y D(3,2) se realizó determinando la diferencia de tamaños entre la materia prima y el Reb A cristalizado, y el de azúcar de caña con este mismo producto. En lo que respecta a la diferencia de color se efectuó una comparación de las muestras con un estándar, evaluando la desviación del color y blancura.

Los datos organolépticos del Reb A cristalizado, azúcar refinada de caña y Reb A original, se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA (nivel de confiabilidad $\alpha = 0.05$) para determinar diferencias significativas en el promedio de los valores de las muestras posteriormente se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey-Kramer para conocer la aceptabilidad general de los productos en base a los cuatro atributos (Montgomery, 2013).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Puntos experimentales de solubilidad

La Tabla 3.1 muestra los resultados promedio de las dos réplicas de densidad e índice de refracción, obtenidos de las corridas experimentales por cada temperatura de saturación propuesta. Los valores de las réplicas se encuentran en el Anexo D.1. La prueba consistió en disolver cierta cantidad de soluto en el solvente hasta alcanzar el equilibrio o solubilidad límite.

Tabla 3.1 Puntos de solubilidad promediados para densidad e índice de refracción

Temperatura (°C)	Densidad (g/cm ³)	Índice de refracción (-)
5	1.00223	1.3337
10	1.0019	1.3336
20	1.00106	1.334
30	1.0005	1.3351
40	0.99837	1.3355
50	0.99572	1.3364
60	0.99498	1.3387

La Figura 3.1 presenta los valores promedio graficados de la densidad donde es posible apreciar que disminuye conforme aumenta la temperatura dado que el Reb A es un soluto de alto peso molecular requiriéndose cantidades pequeñas del mismo para saturar el agua tridestilada, dando como resultado que la densidad de la solución Rebaudiósido A-Agua no tuviera variación significativa respecto a la densidad del agua que disminuye a temperaturas elevadas. Se tuvo especial cuidado en disolver completamente el soluto y filtrar las muestras antes de realizar las mediciones.

La Figura 3.2 muestra que el índice de refracción aumentó conforme la temperatura se elevó dado que, al agregar más soluto a un solvente se generan mayor número de partículas aunado a un incremento de temperatura, por consiguiente la concentración tiende a aumentar. La variación del índice de refracción respecto a

la temperatura es pequeña (± 0.001) indicando que la concentración no varía de manera significativa en el rango de temperatura de trabajo, es decir, el Reb A es parcialmente soluble en agua de 10 a 60 °C. A temperaturas mayores es altamente soluble lo que dificulta su cristalización por la elevada sobresaturación.

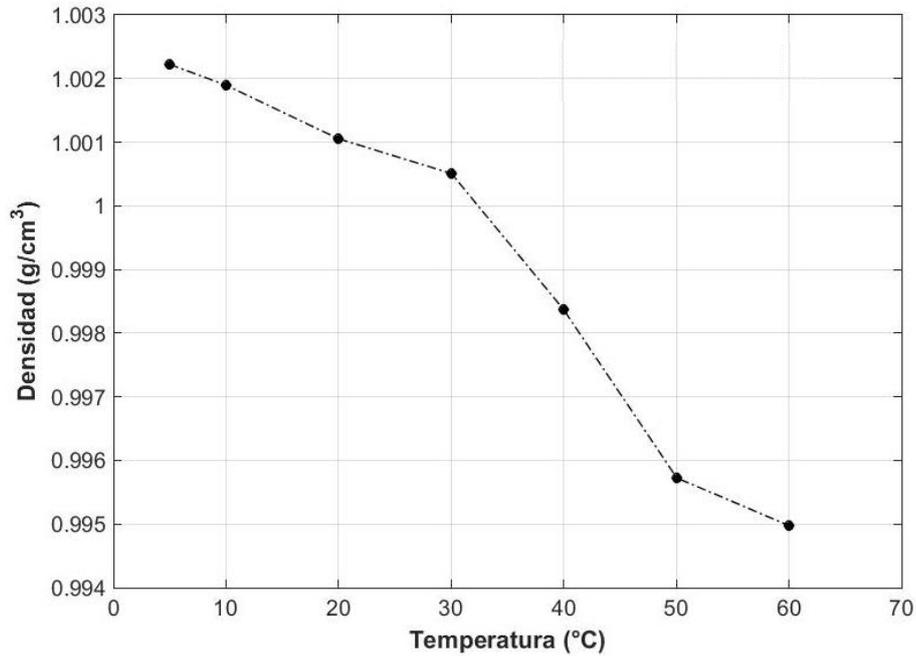


Figura 3.1 Puntos experimentales de solubilidad (densidad)

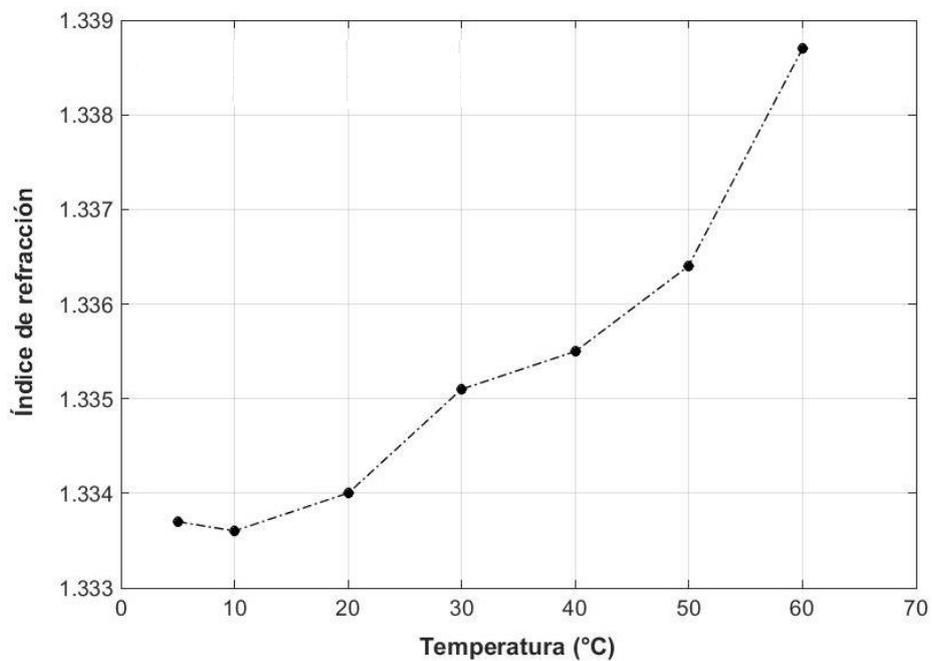


Figura 3.2 Puntos experimentales de solubilidad (índice de refracción)

3.2 Rango de cristalización

Para determinar el rango de temperatura para la cristalización de soluciones acuosas de Reb A, se graficaron los promedios de la densidad (ver Figura 3.3) con el fin de identificar la sección de curva con la pendiente más pronunciada, es decir, los extremos de la curva donde no hubo un cambio significativo de la concentración respecto a la temperatura. El rango obtenido fue de 10 a 60 °C, proporcionando así un intervalo de trabajo de -50 °C para la cristalización por enfriamiento.

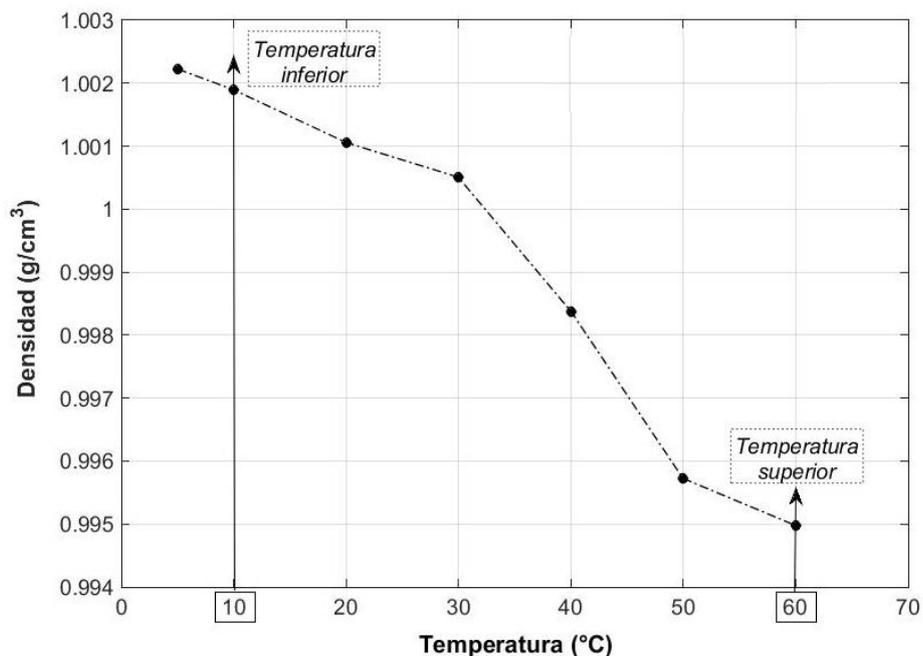


Figura 3.3 Rango de temperatura para la cristalización del Rebaudiósido A

3.3 Puntos experimentales del límite de la primera zona metaestable

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados promedio de las dos réplicas de los puntos críticos de la primera zona para densidad e índice de refracción, obtenidos de las corridas experimentales para cada temperatura de saturación del rango de cristalización encontrado previamente. Los valores de las réplicas se encuentran en el Anexo D.2. La prueba consistió en enfriar la solución hasta la aparición del primer núcleo visible.

Tabla 3.2 Puntos críticos promediados para densidad e índice de refracción

Temperatura (°C)	Densidad (g/cm ³)	Índice de refracción (-)
7	1.00324	1.3349
16	1.00295	1.3358
26	1.00265	1.3364
37	1.00059	1.3369
47	0.99805	1.3378
57	0.99697	1.3404

Las Figuras 3.4 y 3.5 presentan los valores promedio graficados de cada temperatura de saturación establecida por el rango de cristalización y sometida a enfriamiento, donde es posible apreciar que en ambas variables fue necesario disminuir la temperatura entre - 4 y - 5 °C para llegar al punto crítico de la zona de crecimiento, es decir, el punto donde a determinada temperatura y concentración comenzó la aparición de núcleos.

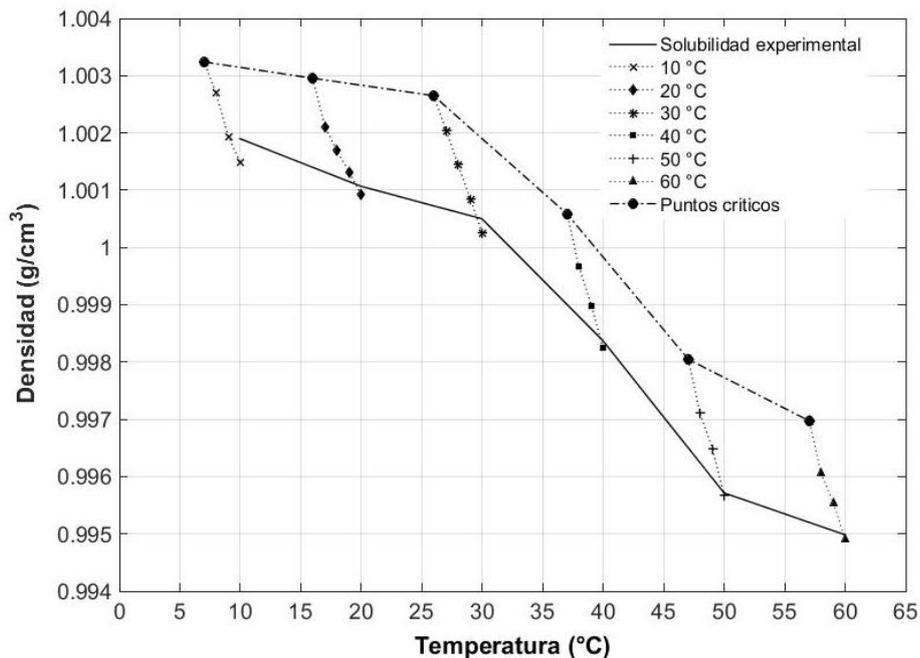


Figura 3.4 Límite de la primera zona metaestable (densidad)

Es posible observar que el límite de la primera zona tuvo un comportamiento similar al de la curva de saturación en la densidad e índice de refracción. De igual forma en los dos gráficos la amplitud de la zona de crecimiento resultó ser estrecha, es

decir, ésta limitó el crecimiento de los cristales, debido a que la cinética de nucleación se produjo súbitamente obteniendo que dichos núcleos fueran de tamaño pequeño $D(2,1) = 37 \mu\text{m}$ en soluciones acuosas de Reb A.

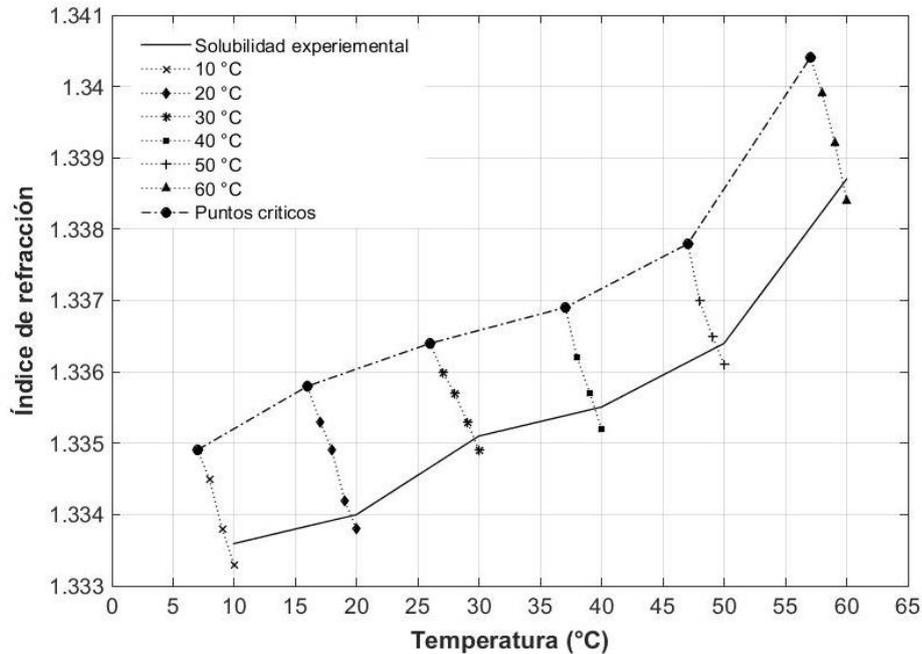


Figura 3.5 Límite de la primera zona metaestable (índice de refracción)

3.4 Ajustes polinomiales de la curva de saturación y límite de la primera zona metaestable

Se presentan los modelos matemáticos polinomiales para la curva de saturación y el límite de la zona de crecimiento de la mezcla Rebaudiósido A-Agua, los cuales se ajustaron a los datos experimentales de concentración (densidad e índice de refracción) resultaron de tercer orden con un índice de correlación satisfactorio cercano a la unidad debido a la ligera diferencia en los valores de densidad (± 0.008) e índice de refracción (± 0.006) de la solución saturada y la solución nucleada.

3.4.1 Modelos matemáticos para la densidad

Las ecs. 3.1 y 3.2 muestran los modelos resultantes, donde se tiene a la densidad como variable dependiente y a la temperatura como variable independiente.

- Densidad de saturación con $R^2= 0.9842$:

$$\rho_{\text{saturación}} = 1.046 \times 10^{-7} \cdot T^3 - 1.239 \times 10^{-5} \cdot T^2 + 2.792 \times 10^{-4} \cdot T + 1 \quad (3.1)$$

- Densidad intermedia con $R^2= 0.9876$:

$$\rho_{\text{intermedia}} = 9.809 \times 10^{-8} \cdot T^3 - 1.163 \times 10^{-5} \cdot T^2 + 2.569 \times 10^{-4} \cdot T + 1.002 \quad (3.2)$$

La Figura 3.6 representa el diagrama de temperatura contra concentración en términos de densidad que simboliza la primera zona metaestable o de crecimiento, la cual está delimitada por la línea de saturación y la línea intermedia.

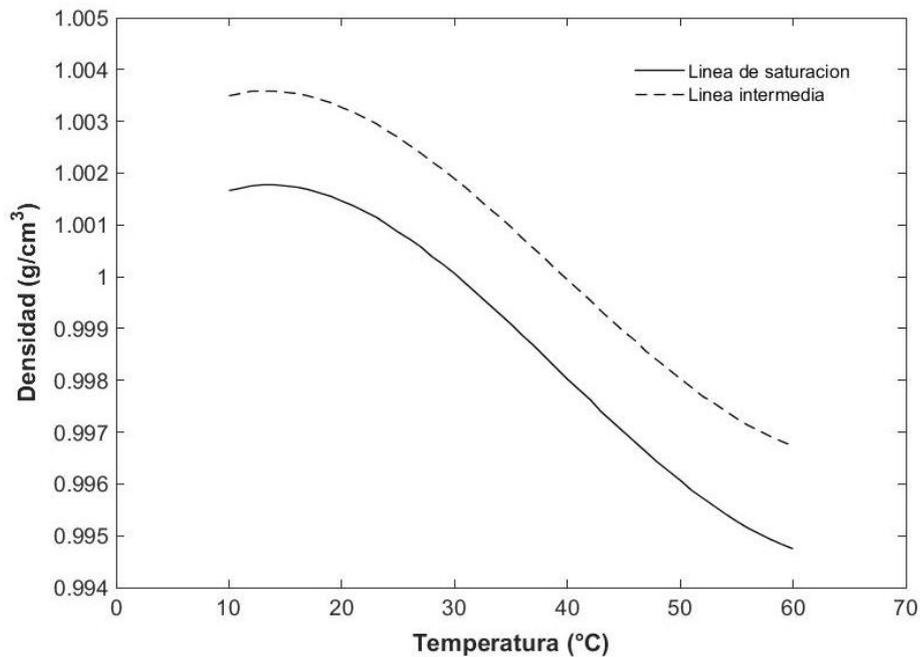


Figura 3.6 Diagrama de la primera zona metaestable (temperatura vs. densidad)

3.4.2 Modelos matemáticos para el índice de refracción

Las ecs. 3.3 y 3.4 muestran los modelos resultantes, donde se tiene al índice de refracción como variable dependiente y a la temperatura como variable independiente. La Figura 3.7 representa el diagrama de temperatura contra concentración en términos de índice de refracción que simboliza la primera zona metaestable o de crecimiento, la cual está delimitada por la curva de saturación y la línea intermedia.

- Índice de refracción con $R^2= 0.987$:

$$IR_{saturación} = 6.574 \times 10^{-8} \cdot T^3 - 5.349 \times 10^{-6} \cdot T^2 + 1.942 \times 10^{-4} \cdot T + 1.332 \quad (3.3)$$

- Índice de refracción con $R^2= 0.9982$:

$$IR_{intermedia} = 1.127 \times 10^{-7} \cdot T^3 - 9.125 \times 10^{-6} \cdot T^2 + 2.775 \times 10^{-4} \cdot T + 1.333 \quad (3.4)$$

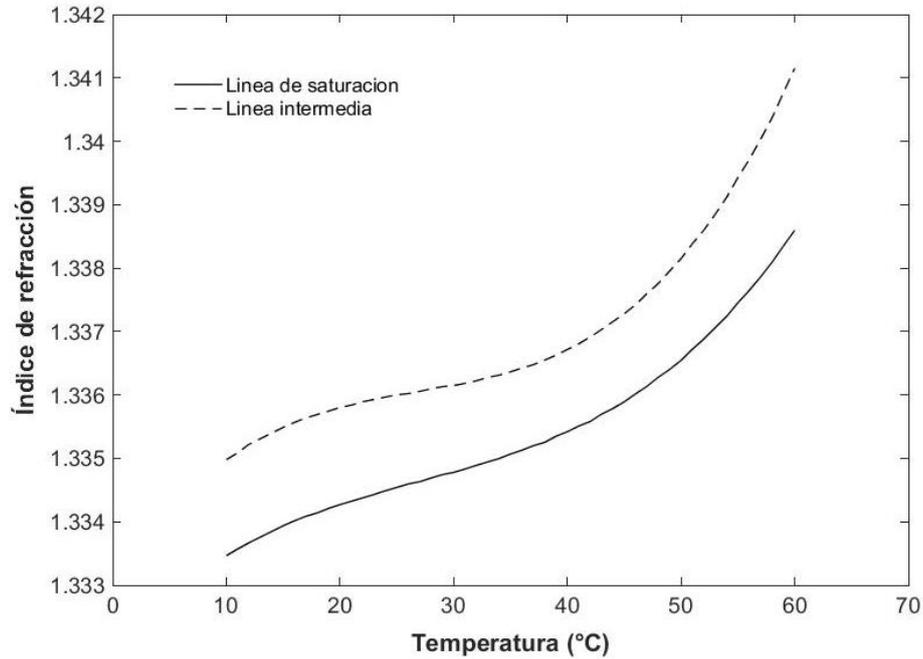


Figura 3.7 Diagrama de la primera zona metaestable (temperatura vs. índice de refracción)

3.5 Montaje del sistema de cristalización por lotes

Se montaron y acoplaron los componentes: baño termostático, panel de control de temperatura y agitación, fuente, motor, sensores de temperatura, agitador y cristizador por lotes, en una estructura de aluminio para integrar el sistema de cristalización (ver Figura 3.8).

3.6 Implementación del sistema SCADA en una interfaz gráfica

Se diseñó una interfaz gráfica para el panel de control del proceso de cristalización en LabVIEW 2016, donde se incluyó una instrumentación virtual para el monitoreo

de la temperatura y control de la velocidad de agitación. La interfaz está formada por dos partes: panel frontal y diagrama de bloques.



Figura 3.8 Montaje del sistema de cristalización por lotes

El panel frontal cuenta con seis pestañas, la primera contiene un recuadro donde se selecciona el puerto "COM" donde se conecta el cable mini usb de la tarjeta arduino, el tipo de muestra a procesar y la velocidad de agitación inicial (ver Figura 3.9); la segunda muestra una perilla virtual que representa el punto de ajuste de la velocidad de agitación en rpm, una gráfica que indica la velocidad medida por el

sensor del motor (codificador), un botón de paro de emergencia del motor, un botón de paro de la interfaz virtual y un botón para iniciar la captura de los datos adquiridos en tiempo real importados a una hoja de cálculo en Excel para su almacenamiento (ver Figura 3.10), la tercera, cuarta y quinta pestaña presentan las gráficas para la visualización en tiempo real de la temperatura interior del cristalizador, la temperatura del agua que fluye en la doble pared proveniente del baño termostático y la diferencia de ambas temperaturas, respectivamente (ver Figura 3.11) y finalmente la pestaña seis tiene el cristalizador esquemático (3D) junto con indicadores de las variables en cuestión (ver Figura 3.12).

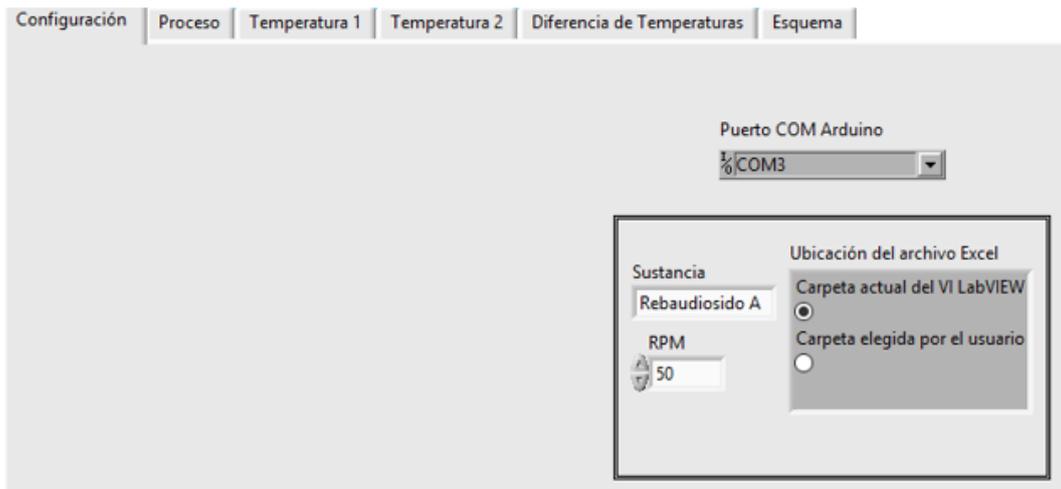


Figura 3.9 Pestaña de configuración

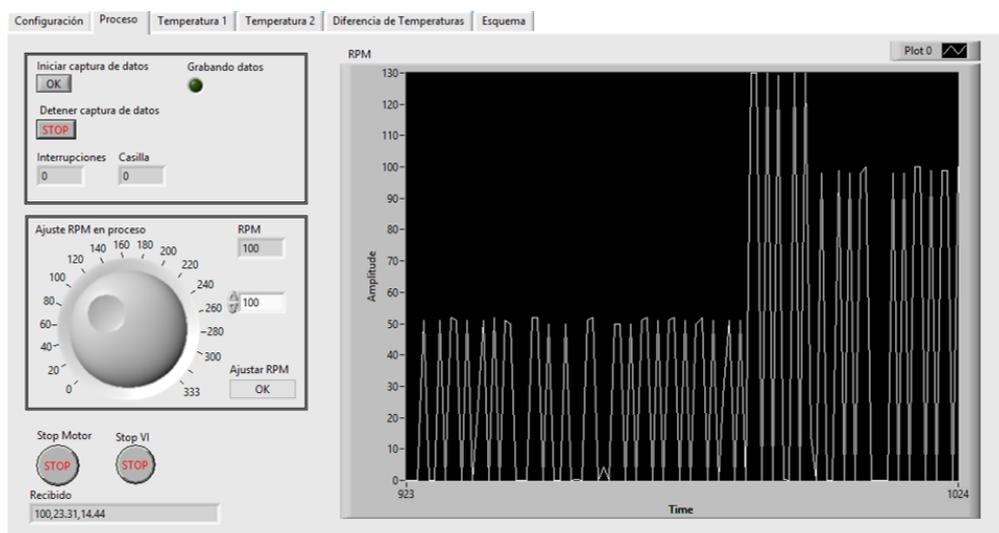


Figura 3.10 Pestaña de agitación y almacenamiento de datos

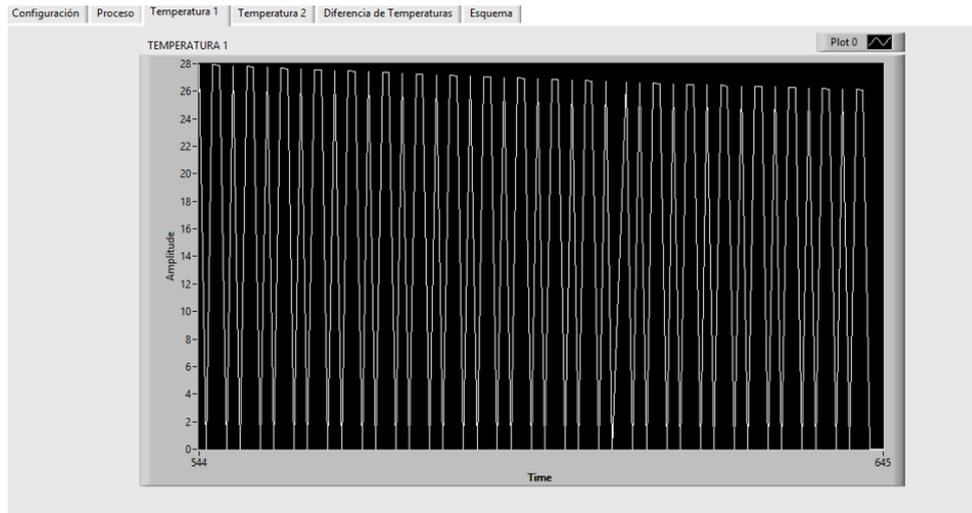


Figura 3.11 Pestaña de temperatura interior



Figura 3.12 Pestaña de proceso

3.7 Selección del solvente

La Tabla 3.3 presenta el grado de concentración en °Brix de los seis diferentes solventes (Figura 3.13) grado químicamente puro (Q.P.) a temperatura ambiente (25 °C).

Los solventes que presentaron el mayor grado de concentración de Reb A fueron el alcohol etílico (31.31 °Brix) y el alcohol isoamílico (27.02 °Brix). Al comparar éstos dos solventes se seleccionó el alcohol etílico por tres razones: la primera por que al tratarse de un alimento es necesario emplear solventes que no sean nocivos a la

Tabla 3.3 Concentración de Rebaudiósido A en diferentes solventes

Solvente	Concentración (°Brix)
Éter	2.70
Cloroformo	3.21
Alcohol metílico	11.35
Alcohol etílico	31.31
Alcohol isopropílico	13.63
Alcohol isoamílico	27.02

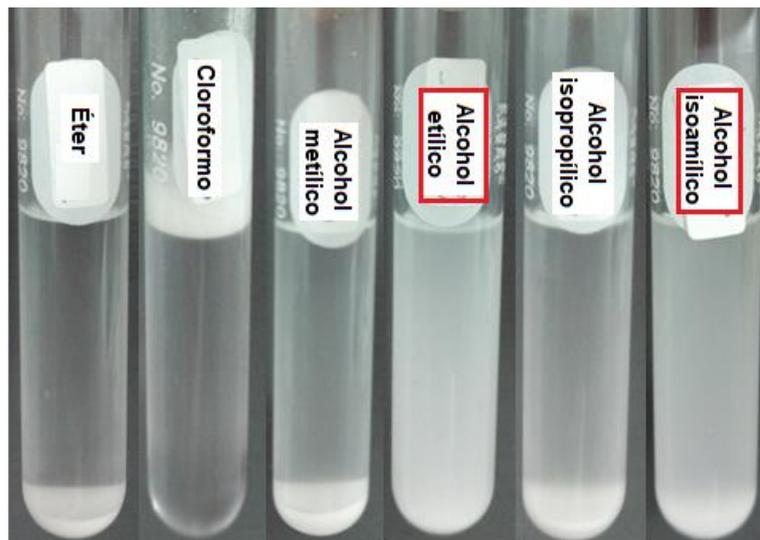


Figura 3.13 Muestras de Reb A en diferente solventes

salud y fáciles de retirar del producto, en este caso al haber una separación en el proceso mediante evaporación se consideraron los puntos de ebullición (alcohol etílico = 78 °C y alcohol isoamílico = 131°C); la segunda por el precio del solvente optando por bajos costos de producción (1 L de alcohol etílico = \$331.00 y alcohol isoamílico = \$1,020.00) y la tercera por referencia de Alves *et al.* (2007) dado que emplearon alcohol etílico acuoso para la solubilización y cristalización de glucosa (asimilación con Reb A mencionada en la Sección 2.2.6).

3.7.1 Mezclas alcohol etílico/agua

Se probaron cuatro pares de porcentajes de alcohol etílico y agua estableciendo un volumen de 100 mL de solvente. Considerando los resultados obtenidos del Reb A

en alcohol etílico y agua (31.31 y 5 °Brix), se seleccionó como condición inicial una proporción de partes iguales (50-50%), direccionando el experimento a mayores cantidades de alcohol dado que en el agua no hay un crecimiento significativo de los cristales. Teniendo en cuenta que el alcohol etílico Q.P. tiene alto grado de evaporación, el resto de los porcentajes se determinaron en base a dicha delimitación (60-40%, 70-30% y 80-20%).

La Tabla 3.4 presenta las cuatro diferentes proporciones de la mezcla de solventes, la cantidad de soluto para saturar la muestra a 60 °C y el grado de concentración (°Brix, densidad e IR). Las mezclas que tuvieron las concentraciones más altas (superiores a 50 °Brix) fueron la de 60-40 y 70-30, con cerca del 50% peso/volumen de Reb A/mezcla AE-A, es decir, se obtuvo una relación de 1:0.5 de soluto-solvente.

Tabla 3.4 Concentración de Reb A en 100 mL de solvente

Alcohol etílico- Agua (% v/v)	Cantidad agregada de Reb A (g)	Concentración (°Brix)	Densidad (g/cm³)	Índice de refracción (-)
50-50	65	35	0.94563	1.2632
60-40	55	53	1.02702	1.4268
70-30	45	50	0.99195	1.4185
80-20	35	40	0.9736	1.3956

El alcohol permitió incrementar la solubilidad del Reb A en el agua a temperatura de 60 °C, reflejándose en la elevación de la concentración, obteniendo soluciones madre de 35 a 53 °Brix en comparación con la del agua a la misma temperatura de 5 °Brix. A su vez se observó que, conforme aumentaba la cantidad de alcohol en la mezcla, había mayor disolución, pero al mismo tiempo un exceso de evaporación (debido al bajo punto de ebullición del alcohol etílico) que detuvo dicha disolución llevando a la muestra a saturarse rápidamente con pocas cantidades de soluto.

Los resultados satisfactorios se obtuvieron a concentraciones medias altas de alcohol etílico (60 y 70%) y medias bajas de agua (40 y 30%) dado que usar concentraciones al 100% de ambos solventes desfavorece el acondicionamiento de la muestra para el proceso de cristalización del Reb A (ver Figura 3.14).

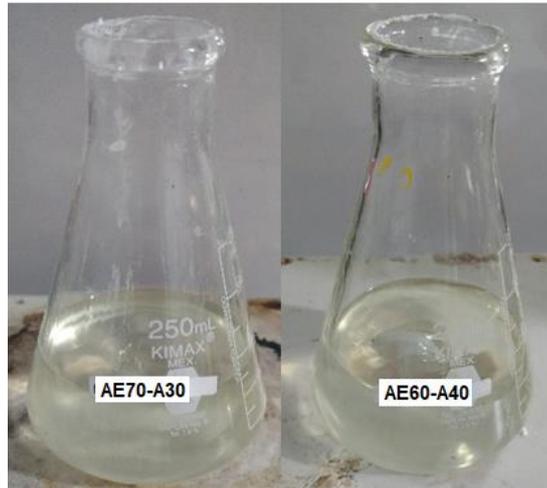


Figura 3.14 Proporciones de etanol-agua seleccionadas

3.8 Tamaño medio y masa de cristal

El cálculo del tamaño medio de los cristales se llevó a cabo mediante la toma de micrografías a las muestras extraídas de las ocho corridas en el minuto 60 (tiempo final de lote), empleando el software Vision Assistant de National Instruments 2014. Fue necesario medir y calcular la distribución longitud $D(2,1)$ y área $D(3,2)$ dado que los cristales formados en las mezclas de alcohol acuoso resultaron tener una morfología rectangular (tipo laminilla), en vez de tipo aguja como se obtuvo para el agua, como se observa en la Figura 3.15, es decir, para soluciones de Reb A en mezclas de alcohol etílico-agua, una distribución en función del área, representa apropiadamente el tamaño del cristal que la de longitud.



Figura 3.15 Morfología de cristales de Reb A en solución acuosa

En la Figura 3.16 se presentan dos micrografías de la corrida de alcohol etílico (60 %) – agua (40%) a 50 rpm donde es posible apreciar la formación de cristales de un tiempo inicial de 0 min a un tiempo final de 60 min.

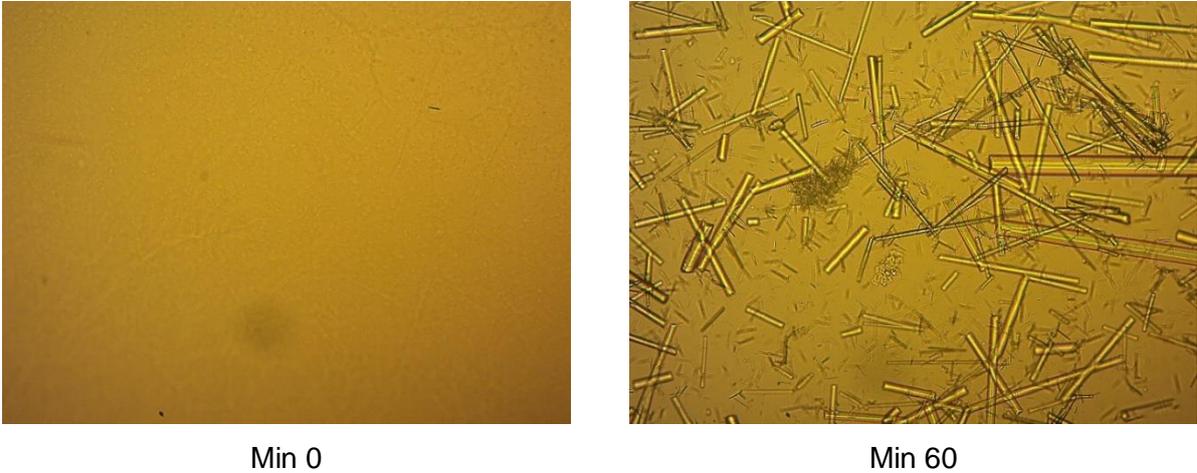


Figura 3.16 Micrografías de Reb A cristalizado en solución etanol/agua a 50 rpm

Respecto a la MCF, se obtuvo en promedio un 57% de soluto recuperado para la mezcla 60-40 y de 51% para la mezcla 70-30 (ver Figura 3.17). Es importante mencionar que la concentración en °Brix de la solución madre restante disminuyó en promedio para mezclas 60-40% de 55 a 40 °Brix y para mezclas 70-30% de 55 a 45 °Brix, lo que corrobora que sólo se agotó en promedio 55% de los sólidos disueltos en el solvente.



Figura 3.17 Muestras de MCF

3.9 Análisis estadístico del diseño experimental

La Tabla 3.5 presenta el diseño factorial con los valores obtenidos de dos réplicas para la D(2,1), D(3,2) en micras y para la MCF en gramos. Las variables de respuesta fueron D(2,1), D(3,2) y MCF.

Tabla 3.5 Resultados del diseño factorial 2² para la cristalización de Reb A

Combinación de tratamientos	Variables de respuesta					
	D(2,1)		D(3,2)		MCF	
	Réplica		Réplica		Réplica	
	I	II	I	II	I	II
(1)	80.87	94.8	47.4	50.76	105.87	111.65
A	91.3	88.3	52.7	46.81	108.76	107.95
B	64.18	53.05	37.45	30.80	83.48	79.33
ab	58.92	46.37	31.39	27.02	80.57	76.42

Los análisis de varianza para cada una de las variables mencionadas anteriormente se muestran en las Tablas 3.6 - 3.8 y las Figuras 3.18 - 3.20 presentan el efecto de los dos factores en dichas variables.

Tabla 3.6 Análisis de varianza para la D(2,1)

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F ₀	Valor P	Poder
A: Agitación	1	7.8408	7.8408	0.13	0.737804	0.059177
B: Mezcla	1	2199.834	2199.834	36.14	0.003855*	0.991147
AB	1	31.8402	31.8402	0.52	0.509550	0.087551
S	4	243.4699	60.86747			
Total (Adjusted)	7	2482.985				
Total	8					

*Término significativo

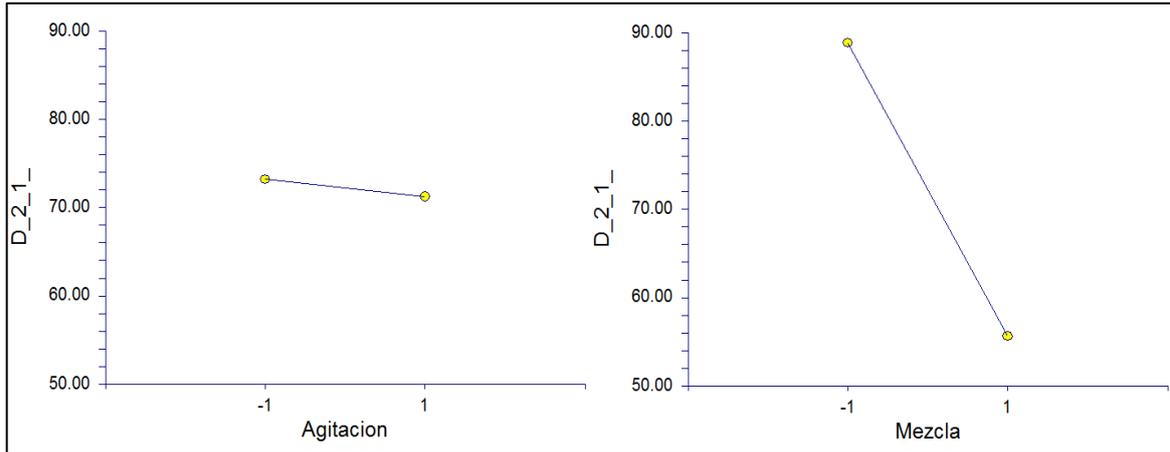


Figura 3.18 Gráfica de efectos para la D(2,1)

Tabla 3.7 Análisis de varianza para la D(3,2)

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F ₀	Valor P	Poder
A: Agitación	1	9.010013	9.010013	0.66	0.462311	0.097441
B: Mezcla	1	630.3025	630.3025	46.13	0.002454*	0.998049
AB	1	15.65201	15.65201	1.15	0.344758	0.132886
S	4	54.65055	13.66264			
Total (Adjusted)	7	709.6151				
Total	8					

*Término significativo

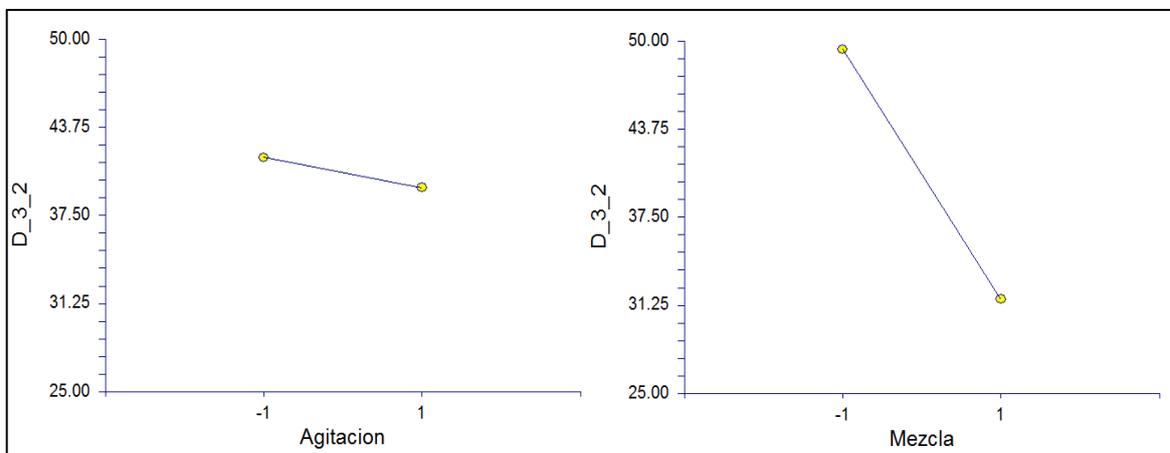


Figura 3.19 Gráfica de efectos para la D(3,2)

Tabla 3.8 Análisis de varianza para la MCF

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F ₀	Valor P	Poder
A: Agitación	1	5.494613	5.494613	0.64	0.468004	0.096145
B: Mezcla	1	1636.778	1636.778	191.13	0.000159*	1.000000
AB	1	3.137512	3.137512	0.37	0.577649	0.076227
S	4	34.25475	8.563687			
Total (Adjusted)	7	1679.665				
Total	8					

*Término significativo

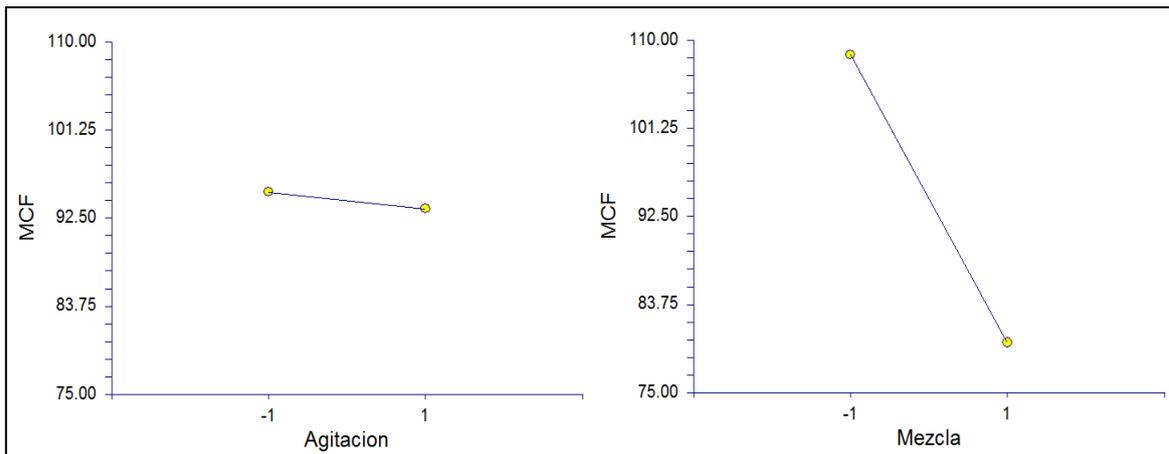


Figura 3.20 Gráfica de efectos para la MCF

El factor de la proporción en la mezcla de solventes presentó un efecto significativo en las tres variables de respuesta, en cambio la agitación y la interacción de ambos factores no tuvieron influencia sobre las mismas.

El modelo encontrado para cada variable de respuesta resultó de primer orden considerando la interacción entre los factores, dado que su contribución aporta 3% al ajuste del modelo (entre 50 y 75% similar al coeficiente del factor B), resultando:

- Modelo estimado para la D(2,1) con $R^2 = 0.9019$

$$D(2,1) = 72.2125 - 0.99 \cdot A - 16.5825 \cdot B - 1.995 \cdot A \cdot B \quad (3.5)$$

- Modelo estimado para la D(3,2) con $R^2 = 0.9229$

$$D(3,2) = 40.54125 - 1.06125 \cdot A - 8.87625 \cdot B - 1.39875 \cdot A \cdot B \quad (3.6)$$

- Modelo estimado para la MCF con $R^2 = 0.9796$

$$MCF = 94.25375 - 0.82875 \cdot A - 14.30375 \cdot B - 0.62265 \cdot A \cdot B \quad (3.7)$$

Las gráficas de efectos mostraron los niveles recomendados para el proceso de cristalización de Reb A dado que incrementan el tamaño de cristal en las distribuciones de longitud y área además de la masa de cristal formada. Éstos niveles fueron bajo para la velocidad de agitación (50 rpm) y bajo para la mezcla de solventes (Alcohol etílico 60% - Agua 40%) obteniendo con estas condiciones un tamaño máximo para $D(2,1) = 95 \mu\text{m}$, $D(3,2) = 51 \mu\text{m}$ y $MCF = 111.65 \text{ g}$.

3.10 Análisis de la comparación de productos

3.10.1 Longitud y área

La Tabla 3.9 muestra los tamaños promedio de cristal en las dos distribuciones: longitud y área, cabe mencionar que el valor de $D(3,2)$ para el Reb A original no pudo ser calculado debido a que las partículas eran amorfas y pequeñas (menores a $12 \mu\text{m}$) dificultando la medición de su área.

Tabla 3.9 Tamaños promedio de cristal

Sustancia	$D(2,1) - \mu\text{m}$	$D(3,2) - \mu\text{m}^2$
Rebaudiósido A original	25	---
Rebaudiósido A cristalizado	95	51
Sacarosa	148	134

La longitud del cristal del Reb A cristalizado fue de $95 \mu\text{m}$ siendo 4 veces mayor a la del Reb A original con longitud de $25 \mu\text{m}$, sin embargo, resultó ser 2 veces menor a la longitud de la sacarosa con $148 \mu\text{m}$. El área del cristal del Reb A cristalizado fue de $51 \mu\text{m}^2$ siendo 3 veces menor que el área de la sacarosa con $134 \mu\text{m}^2$.

3.10.2 Color y blancura

Los resultados de la evaluación de color se muestran en la Tabla 3.10. El ΔE indica la diferencia general de color de las muestras respecto a la placa blanca estándar. El azúcar refinada de caña (ARC) tiene la mayor desviación de color seguido del Rebaudiósido A cristalizado (RBC) y por último el Rebaudiósido A como materia prima (RMP), donde todas tendieron a una región de color verdosa amarillenta.

Tabla 3.10 Promedio de parámetros de color (escala Hunter)

Muestra	L	A	b	ΔE
Placa Blanca Estándar	92.57	-1.11	1.19	---
RMP	72.78	-0.45	1.57	16.35
ARC	65.04	-0.38	1.54	23.12
RBC	70.37	-0.54	1.96	18.45

Respecto a la blancura basada en el parámetro L se obtuvo que la muestra más cercana al estándar fue la RMP con 78.6%, seguido del RBC 76% y el ARC con 70.2%, respectivamente.

Con lo anterior es posible determinar que el RMP fue el producto que se asimiló mayormente al patrón seguido del RBC y finalmente el ARC. Aunque en este caso coincidió el análisis del comportamiento de ΔE con L, no siempre es de esta manera dado que ΔE considera dos parámetros más de medición (a= tendencia de rojo o verde y b= tendencia de amarillo o azul).

3.10.3 Propiedades organolépticas

Se evaluaron las características de las tres muestras mencionadas en la sección 3.10.2 en el siguiente orden: 1RBC, 2ARC y 3RMP (ver Figura 3.21).

Las puntuaciones asignadas de los panelistas a cada muestra se encuentran en el Anexo C.2. Las Tablas 3.11 - 3.17 (impares) presentan los resultados obtenidos del programa NCSS del análisis de varianza y las Tablas 3.12 - 3.18 (impares) la

comparación de medias (Prueba de Tukey-Kramer) para el olor, color, sabor y apariencia, respectivamente.



Figura 3.21 Muestras a evaluación para panel no entrenado

Existieron diferencias significativas en olor (Tabla 3.11) entre las muestras. El olor que presentó en promedio mayor agrado (Tabla 3.12) fue el ARC (6=me gusta levemente), seguido del RBC (5=no me gusta ni me disgusta) y por último RMP (4=me disgusta levemente).

Tabla 3.11 Análisis de varianza para el olor

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F ₀	Valor P	Poder
A: Muestra	2	25.03333	12.51667	4.22	0.019575*	0.717607
S	57	169.15	2.967544			
Total (Adjusted)	59	194.1833				
Total	60					

*Término significativo

Tabla 3.12 Comparación de medias para el olor

Grupo	Total muestra	Media	Grupos diferentes
3	20	4.6	2
1	20	5.1	
2	20	6.15	3

En la Tabla 3.13 existieron diferencias significativas de color entre las muestras. El color que presentó en promedio mayor agrado (Tabla 3.14) fue el ARC (6=me gusta levemente), seguido del RMP, a su vez igualado con el RBC (5= no me gusta ni me disgusta).

Tabla 3.13 Análisis de varianza para el color

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F₀	Valor P	Poder
A: Muestra	2	16.03333	8.016666	3.24	0.046401*	0.595362
S	57	140.95	2.472807			
Total (Adjusted)	59	156.9833				
Total	60					

*Término significativo

Tabla 3.14 Comparación de medias para el color

Grupo	Total muestra	Media	Grupos diferentes
3	20	5	2
1	20	5.25	
2	20	6.2	3

En la Tabla 3.15 se observa que existieron diferencias significativas de sabor entre muestras. El sabor que presentó en promedio mayor agrado (Tabla 3.16) fue el ARC (7=me gusta moderadamente), seguido del RMP (4=me disgusta levemente) y por último RBC (2=me disgusta mucho). Para este atributo todos los grupos son diferentes entre sí, debido a la diferencia de promedios obtenidos.

Tabla 3.15 Análisis de varianza para el sabor

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F₀	Valor P	Poder
A: Muestra	2	262.0333	131.0167	55.44	0.000000*	1.000000
S	57	134.7	2.363158			
Total (Adjusted)	59	396.7333				
Total	60					

*Término significativo

Tabla 3.16 Comparación de medias para el sabor

Grupo	Total muestra	Media	Grupos diferentes
3	20	2.05	1, 2
1	20	3.6	3, 2
2	20	7.05	3, 1

Para el atributo de apariencia no existieron diferencias significativas (Tabla 3.17) entre las muestras. La apariencia que presentó en promedio mayor agrado (Tabla 3.18) fue el ARC (6=me gusta moderadamente), seguido del RBC que a su vez está igualado con el RMP (5=no me gusta ni me disgusta).

Tabla 3.17 Análisis de varianza para la apariencia

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F₀	Valor P	Poder
A: Muestra	2	14.93333	7.466667	3.13	0.051396	0.579065
S	57	136.05	2.386842			
Total (Adjusted)	59	150.9833				
Total	60					

*Término significativo

Tabla 3.18 Comparación de medias para la apariencia

Grupo	Total muestra	Media	Grupos diferentes
3	20	4.95	2
1	20	5.35	
2	20	6.15	3

Los resultados promedio generales de cada atributo de la escala de 9 puntos situaron al RMP como un producto de categoría 4 (disgusta levemente), seguido del RBC categoría 5 (no gusta ni disgusta) y la ARC categoría 6 (me gusta levemente). Es decir, se obtuvo un producto potencialmente aceptable (categoría 5) para un público general (panel no entrenado).

CONCLUSIONES

Y

RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Se caracterizó la curva de solubilidad y el límite de la primera zona metaestable, estableciendo un rango de temperatura para la cristalización por enfriamiento de Rebaudiósido A (60–10°C), se determinaron las concentraciones de saturación para dicho rango de temperatura éstas fueron a 60°C con densidad de 0.99498 g/cm³ e IR de 1.3387 y a 10°C con densidad de 1.0019 g/cm³ e IR de 1.3336.

El límite de la primera zona metaestable fue de 57°C=0.99697 g/cm³-1.3404 de IR y a 7°C=1.00324 g/cm³-1.3349 IR. Estos valores fueron muy cercanos, es por esto que la zona de crecimiento fue de baja amplitud limitando el crecimiento de los cristales, debido a que la cinética de nucleación se produjo súbitamente obteniendo que dichos núcleos fueran de tamaño pequeño (37 μm).

Para la cristalización por enfriamiento se diseñó e instrumentó un sistema por lotes a escala laboratorio, implementando un sistema SCADA mediante el diseño de una interfaz gráfica en LabVIEW 2016 para el monitoreo y control de las variables críticas de este proceso: temperatura (°C) y agitación (rpm), desarrollando un panel de uso fácil y de ambiente amable con el usuario.

El alcohol etílico se utilizó como solvente, dado que el Reb A es parcialmente soluble en este alcohol, es por esto que se utilizó en mezcla con el agua para aumentar la solubilidad (%volumen alcohol etílico/volumen agua), las mezclas que presentaron el mayor grado de concentración (°Brix) para la cristalización fueron 60-40%: 53 °Brix y 70-30%: 50 °Brix.

Los resultados del diseño factorial 2² fueron significativos para la mezcla de solventes pero no para la agitación ni en la interacción de estos factores. Los mejores resultados fueron en la mezcla 60-40% y a 50 rpm, obteniendo una D(2,1)=95 μm, D(3,2)=51 μm² y una MCF= 111.65 g.

Las morfologías presentes en la cristalización de Reb A con agua fueron de tipo aguja, presentando sólo crecimiento longitudinal (37 μm) y no transversal del cristal. La cristalización con mezclas de alcohol etílico y agua modificaron la superficie de dicho crecimiento obteniéndose cristales rectangulares tipo laminilla, haciendo necesario el uso de la distribución área para la medición de los tamaños.

En una comparación con la sacarosa el tamaño de cristal del Reb A cristalino fue en promedio menor en un 40% para la D(2,1) y 62% para la D(3,2) sin embargo, comparado con el Reb A original se obtuvo un aumento en el tamaño de partícula del 85%.

Los resultados de las pruebas hedónicas para los cuatro atributos evaluados del Reb A, mostraron que se obtuvo un producto neutro (no gusta ni disgusta) solo una categoría debajo del azúcar, teniendo un producto potencialmente aceptable.

RECOMENDACIONES

Realizar una búsqueda más amplia respecto a los solventes (puros o en mezcla) que favorezcan las condiciones iniciales para la cristalización.

Caracterizar la curva de solubilidad del Reb A para la mezcla de 60% etanol- 40% agua.

Determinar si otros factores como perfil de enfriamiento, perfil de presión de vacío, perfil de agitación influyen en el proceso de cristalización del Reb A.

Acondicionar un cristalizador para implementar presión de vacío en base al diseño ya establecido, para cambios de temperatura en menor tiempo y extracción de vapores.

Utilizar como siembra un falso núcleo, además de un agente coadyuvante que maximice el crecimiento de cristal facilitando la aglomeración de partícula para generar un grano de mayor tamaño.

Investigar acerca del extracto crudo de estevia dado que existen cristalizaciones previas que pueden tener influencia en el proceso final.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abelyan, V. H., Ghochikyan, V. T., Markosyan, A. A., Adamyan, M. O. y Abelyan, L. A. 2006. Extraction, separation and modification of sweet glycosides from the stevia rebaudiana plant. USA. US20060134292A1 (US7838044). 22 Jun 2006. US 11/016,781. 21 Dic 2006.
2. Acevedo, D. y Nagy, Z. K. 2014. Systematic classification of unseeded batch crystallization systems for achievable shape and size analysis. *Journal of Crystal Growth*. **394**:97-105.
3. Acosta, N. 2015. Las potencialidades de la stevia nacional en el mercado nacional. Observatorio de Economía Internacional. Recuperado el 02 de agosto de 2015 del sitio Web del Centro de Análisis y Difusión de la Economía Paraguaya.
4. Aguilar, R. N. y Román, G. C. 2006. Aspectos teóricos y aplicaciones de la operación unitaria de cristalización. *Ingeniería*. **16(1)**:123-133.
5. Akrap, M., Kuzmanic, N. y Prlic, K. J. 2010. Effect of mixing on the crystal size distribution of borax decahydrate in a batch cooling crystallizer. *Journal of Crystal Growth*. **312**:3603-3608.
6. Alvarado-Sánchez. J. 2009. Optimización de la operación del sistema presión de vapor del proceso de cristalización batch, empleando el método de superficie de respuesta. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
7. Álvarez, A. J. C, Viera, P. J. C., Ferrero, M. F. J., González, V. M., Blanco, V. C., Campo, R. J. C. y Valledor, L. M. 2009. Instrumentación virtual con LabVIEW. Textos universitarios EdiUNO. España.
8. Alves, A. L, e Silva, A. J. B y Giuliatti, M. 2007. Solubility of D-Glucose in water and ethanol/water mixtures. *J. Chem. Eng. Data*. **52**: 2166-2170
9. Antonio-Acatzihua, A. 2011. Determinación experimental de las zonas de concentración de mieles de azúcar de caña para su implementación experimental a través de instrumentos virtuales. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

10. Badui, D. S. 2013. Química de los alimentos. Quinta edición. PEARSON EDUCACIÓN. México.
11. Baines, D., Seal, R. y Fry, J. C. 2012. Natural food additives, ingredients and flavourings. Woodhead Publishing Limited. U. K.
12. Bathinapatla, A., Kanchi, S., Singh, P., Sabela, I. M. y Bisetty, K. 2016. An ultrasensitive performance enhanced novel cytochrome c biosensor for the detection of rebaudioside A. *Biosensors and Bioelectronics*. **77**: 116–123.
13. Beckmann, W. 2013. Crystallization: Basic concepts and industrial applications. WILEY-VCH. Germany.
14. Bolaños, R. E. 2000. Control y optimización de las condiciones de operación de cristalizadores batch por enfriamiento. Tesis de Doctorado en Ciencias en Ingeniería Química. I.T. de Celaya. México.
15. Bolaños, R. E., Xaca, X. O., Álvarez, R. J. y López, Z. L. 2008. Effect Analysis from Dynamic Regulation of Vacuum Pressure in an Adiabatic Batch Crystallizer Using Data and Image Acquisition. *Ind. Eng. Chem. Res.* **47**: 9426-9436.
16. Brandle, J. E., Starratt, A. N. y Gijzen, M. 1998. Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Can. J. Plant. Sci.* **78(4)**: 527-536.
17. Capper, P. y Rudolph, P. 2010. Crystal Growth Technology: Semiconductors and dielectrics. WILEY-VCH. USA.
18. Çengel, Y. A. y Ghajar, A. J. 2011. Transferencia de calor y masa: fundamentos y aplicaciones. Cuarta edición. McGraw-Hill. México.
19. Chranioti, C., S. Chanioti y C. Tzia. 2016. Comparison of spray, freeze and oven drying as a means of reducing bitter aftertaste of steviol glycosides (derived from Stevia rebaudiana Bertoni plant) - Evaluation of the final products. *Food Chemistry*. **190**: 1151-1158.
20. Díaz-Nicolás, R. 2011. Estudio comparativo del tamaño y masa de cristal formado provenientes del proceso de cristalización industrial (área de crudo y refinado) y de una planta piloto. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

21. EFSA (European Food Safety Authority) y EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). 2010. Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA Journal*. **8**(4):1537.
22. Esmat, A. A. A., Azza, A. A. A. y Ferial, A. S. M. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana bertonii* plant. *African Journal of Food Science*. **4**(5): 269- 281.
23. Fitch, C. y Keim, K. S. 2012. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. **112**(5):739-758.
24. Frawley, J. P., Mitchell, A. N., Ó'Ciardhá, T. C. y Hutton, W. K. 2012. The effects of supersaturation, temperature, agitation and seed surface area on the secondary nucleation of paracetamol in ethanol solutions. *Chem. Eng. Sci.* **75**:183-197.
25. Galvis-López, E. 2009. Evaluación de la utilización de *Stevia* en yogurt. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
26. Gasmalla, M. A. A., Yang, R., A., Musa, X., Hua y Ye, F. 2014. Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia (Stevia rebaudiana bertonii)* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*. Artículo en impresión. Doi:10.1016/j.arabjc.2014.06.012.
27. Gherras, N. y Fevotte, G. 2012. Solution crystallization-developments and new trends. *Journal of Crystal Growth* **342**:88-98.
28. Heising, F. y Küchler, T. 2012. Analysis of sweeteners. *Food Testing News*. Eurofins. **No.** 39. Alemania.
29. Hojjati, H., Sheikhzadeh, M. y Rohani, S. 2007. Control of supersaturation in a semibatch antisolvent crystallization process using a fuzzy logic controller. *Ind. Eng. Chem. Res.* **46**:1232-1240.
30. Hunterlab™. 2012. Hunter L, a, b vs. CIE L*, a*, b*. Hunter Associates Laboratory Inc.
31. Jackson, M., Francis, G. y Chase, R. High yield method of producing rebaudioside A. USA. US20060083838A1 (CA2583909A1, CA2583909C,

- CN101090642A, CN101090642B, CN102432649A, EP1809124A2, EP1809124A4, EP2428124A1, US7923552, US20110124587, US20110207918, US20110251380, WO2006045023A2, WO2006045023A3). 20 Abr 2006. US 11/252,430. 18 Oct 2004.
32. JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2007. Steviol glycosides. In: Combined Compendium of Food Additive Specifications. Rome.
33. Kadam, S. S., Kulkarni, A. S., Coloma, R. R., Stankiewicz, I. A., ter-Horst, H. J. y Kramer. J. M. H. 2012. A new view on the metastable zone width during cooling crystallization. *Che. Eng. Sci.* **72**:10-19.
34. Khalaf, H. K., Raheem, N. R., Shaker, H. I. y Abid, S. E. 2014. Qualitative and quantitative determination of artificial sweetener saccharin sodium by FTIR spectroscopy. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry.* **3**(3): 617-625.
35. Kinghorn, A. D., Wu, C. D. y Soejarto, D. D. 2001. Stevioside In: O'Brien Nabors. Alternative sweeteners. Third ed. Marcel Dekker, New York.
36. LabVIEW™. 2013. Getting Started with LabVIEW. National Instruments Corporation.
37. Lajara, V. J. R. y Pelegrí, S. J. 2012. LabVIEW entorno gráfico de programación. Segunda edición. Alfaomega-Marcombo. España.
38. Lewis, W. H. 1992. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. *Econ. Bot.* **46**: 336-337.
39. Li, J., Chen, Z. y Di, D. 2012. Preparative separation and purification of Rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* Bertoni crude extracts by mixed bed of macroporous adsorption resins. *Food Chemistry.* **132**: 268–276.
40. Magomet, M., Tomov, T., Somann, T. y Abelyan, V. Process for manufacturing a sweetener and use thereof. USA. US20070082103 A1 (US7862845). 12 Abr 2007. US 11/246,152. 11 Oct 2005.
41. Mendiburu, D. H. A. 2010. Instrumentación virtual industrial. INDECOPI. Perú.
42. Misra, H., Soni, M., Silawat, N., Mehta, D., Mehta, B. K. y Jain, D. C. 2011. Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia*

- rebaudiana Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **3**(2): 242-8.
43. Molina, M. J. M. y Jiménez, B. M. 2010. Programación gráfica para ingenieros. Marcombo. España.
44. Montgomery, D. C. 2013. Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición. Universidad estatal de Arizona, Limusa Wiley. D. F., México.
45. Nagy, K. Z. 2009. Model based robust control approach for batch crystallization product design. *Computers and Chemical Engineering.* **33**:185-1691.
46. Nagy, K. Z., Fujiwara, M. y Braatz, D. R. 2008. Modelling and control of combined cooling and antisolvent crystallization processes. *J. Process Control.* **18**: 856-864.
47. Ni, X. y Liao, A. 2010. Effects of mixing, seeding, material of baffles and final temperature on solution crystallization of l-glutamic acid in an oscillatory baffled crystallizer. *Che. Eng. Jou.* **156**:226-233.
48. Pérez, L. E. 2015. Los sistemas SCADA en la automatización industrial. *Tecnología en Marcha.* **28**:4.
49. Perry, R. H., Green, D. W. y Maloney, J. O. 2010. Manual del ingeniero químico. Séptima ed. Vol. III. McGraw-Hill. España.
50. Pineda, O. A. 2011. Instrumentación virtual. Fundamentos de programación básica con LabVIEW. Editorial Digital. Tecnológico de Monterrey. México.
51. Pollak, P. 2011. Fine Chemicals: The industry and the busines. Second edition. WILEY-VCH.
52. Prakash, I., DuBois, G. E., King, G. A. y Upreti, M. Rebaudioside A composition and method for purifying rebaudioside A. USA. US20070292582 A1 (CA2655440A1, CA2655440C, EP2037761A2, EP2037761B1, US8791253, WO2007149672A2, WO2007149672A3). 20 Dic 2007. US 11/751,627. 19 Jun 2006.
53. Prakash, I., Clos, J. y DuBois, G. E. 2007b. Unpublished results. The Coca-Cola Company, Atlanta, GA, USA.

-
-
54. Prakash, I., DuBois, G. E., Clos, J. F., Wilkens, K. L. y Fosdick, L. E. 2008. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food and Chemical Toxicology*. **46**: S75–S82.
55. Purkayastha, S. y Markosyan, A. Granulation of a stevia sweetener. USA. WO2011059954A1 (CA2780561A1, EP2498625A1, EP2498625A4, US20120282389, WO2011059954A1). 19 Sep 2012. PCT/US2010/055960. 9 Nov 2010.
56. Rabesiaka, M., Porte, C., Bonnin-Paris, J. y Havet, J. L. 2011. An automatic method for the determination of saturation curve and metastable zone width of lysine monohydrochloride. *Journal of Crystal Growth*. **332**:75-80.
57. Ramírez, N. J. S. 2012. Análisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor. ReCiTeIA. Colombia.
58. Ramos, C. J. D. y Valdés, R. C. A. 2016. Estudio para la estandarización de técnicas de medición de tamaño de cristal DTC mediante fotomicrografías. Instituto Tecnológico de Orizaba. Residencia profesional. Orizaba. México
59. Rodríguez, P. A. 2007. Sistemas SCADA. Segunda edición. Marcombo. México.
60. Rumelhard, M., Hosako, H., Eurlings, M. J. I., Westerink, M. A. W., Staska, M. L., van de Wiel, A. G. J. y La Marta, J. 2016. Safety evaluation of rebudioside A produced by fermentation. *Food and Chemical Toxicology*. **89**: 73-84.
61. Saengchan, A., Kittisupakorn, P., Paengjuntuek, W. y Arpornwichanop, A. 2011. Improvement of batch crystallization control under uncertain kinetic parameters by model predictive control. *Journal of Ind. & Eng. Chem.* **17**(3):430-438.
62. Sander, A. y Prlic, K. P. 2012. Pentaerythritol crystallization. Influence of the process conditions on the granulometric properties of crystals. *Advanced Powder Tech.* **23**:191-198.
63. Sangwal, K. 2010. On the effect of impurities on the metastable zone width of phosphoric acid. *Journal of Crystal Growth*. **312**:3316-3325.
64. Secretaría de Economía. 2012. Análisis de la situación económica, tecnológica y de política comercial del sector edulcorantes en México.

65. Scheel, H. J. y Fukuda, T. 2003. *Crystal Growth Technology*. Wiley. Gran Bretaña.
66. Sumathi S. y Surekha, P. 2007. LabVIEW based advanced instrumentation system. Springer Verlag. Berlin.
67. Tarot-Gálvez, M. E. L. 2004. Planteamiento del uso de instrumentación virtual para adquisición de datos. Universidad de San Carlos de Guatemala. Escuela de Ingeniería Mecánica Eléctrica. Tesis de licenciatura. Guatemala.
68. Vanneste, J., Sotto, A., Courtin, C. M., Craeyveld, V. V., Bernaerts, K., Impe, V. J., Vandeur, J., Taes, S. y Van der Bruggen, B. 2011. Application of tailor-made membranes in a multi-stage process for the purification of sweeteners from *Stevia rebaudiana*. *Journal of Food Engineering*. **103**: 285-293.
69. Velázquez, C. O., Bolaños, R. E., López, Z. L. y Álvarez, R. J. 2010. Experimental evaluation of the concentration zone widths in cane sugar crystallization using data and image acquisition. World Congress on Engineering by International Association of Engineers. London, U.K., 30 June-2 July, 2010.
70. Vetter, T., Burcham, C. L. y Doherty, M. F. 2014. Regions of attainable particle sizes in continuous and batch crystallization processes. *Che. Eng. Sci.* **106**:167-180.
71. Well, C., Frank, O. y Hofmann, T. 2013. Quantitation of sweet Steviol Glycosides by means of a HILIC-MS/MS-SIDA approach. **61**:11312-11320.
72. Wheeler, A., Boileau, A. C., Winkler, P. C., Compton, J. C., Prakash, I., Jiang, X. y Mandarino, D. A. 2008. Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food Chem. Toxicol.*
73. Wu, S., Feng, F., Zhou, L. y Gong, J. 2012. Experimental determination of the solid–liquid equilibrium, metastable zone, and nucleation parameters of the flunixin meglumine–ethanol system. *Journal of Crystal Growth*. **354**:164-168.

ANEXOS

ANEXO A RESULTADOS DEL DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE CRISTALIZACIÓN

El resultado del diseño y la construcción del cristalizador se muestran en la Figura A.1. Las partes que complementaron el equipo fueron un agitador con dos configuraciones y una abrazadera de anillo representadas por las Figuras A.2 y A.3, respectivamente. El sistema embebido está conformado por dos placas electrónicas: una está conformada por una fuente conmutada que suministra la energía al motor pololu 19:1 y un módulo de regulación de ancho de pulsos para el mismo (ver Figura A.4); y la otra es un panel de control físico conformado por pantalla LCD, tarjeta arduino, tarjeta SD, botones y potenciómetro, en donde se adquieren, muestran y controlan las señales de las variables del proceso: temperatura y velocidad de agitación (ver Figura A.5).



Figura A.1 Cristalizador por lotes de vidrio de borosilicato



Figura A.2 Agitadores de acero inoxidable tipo propela y paleta plana



Figura A.3 Abrazadera de acero inoxidable tipo anillo



Figura A.4 Fuente conmutada



Figura A.5 Panel de control físico

ANEXO B CÓDIGO DE ARDUINO

A continuación se presenta el código desarrollado en el software Arduino Genuino versión 1.6.9 para la adquisición y control de la temperatura y velocidad de agitación programado y cargado en la tarjeta Nano.

```

// encoder
#define encoder0PinA 2
#define encoder0PinB 3
volatile unsigned int encoder0Pos = 0;
unsigned int tmp_Pos = 1;
boolean A_set;
boolean B_set;
/////sensor
#include <OneWire.h>
#include <DallasTemperature.h>
OneWire ourWire1(5);
OneWire ourWire2(4);
DallasTemperature sensors1(&ourWire1);
DallasTemperature sensors2(&ourWire2);
//lcd
#include <Wire.h>
#include <LiquidCrystal_I2C.h>
LiquidCrystal_I2C lcd(0x27,20,4);
byte grado[8] = {B00100, B01110, B00100, B00000, B00000, B00000, B00000, B00000};
// sd
#include <SPI.h> //sd
#include <SD.h> //sd
File myFile; //sd
const int chipSelect = 7; //sd
//reloj
#include <RTClib.h>
RTC_Millis rtc;
float Degrees, OldValue, NewValue, NewValueDegrees, OldValueDegrees;
int Bmanual, Bparo, PotControl,Pwm, RPM, Speed, randNumber;
float temp1,temp2;
String inString = "";
void setup() {
  Serial.begin(9600);
  sensors1.begin();
  sensors2.begin();
  Wire.begin();
  lcd.begin();
  lcd.backlight();
  lcd.createChar (0, grado);
  rtc.begin(DateTime(F(__DATE__), F(__TIME__)));
  //Serial.print("iniciando memoria SD...");
  // if (!SD.begin(chipSelect))
  // { //sd
  //   Serial.println("problema en la memoria");
  //   return;
  // }
  // Serial.println("Memoria lista");
  randomSeed(analogRead(3));

```

```

pinMode(SS, OUTPUT);
pinMode( 7, OUTPUT); // sd
pinMode( 8, OUTPUT); // Pin buzzer
pinMode( 6, OUTPUT); // pin M1
pinMode( 9, OUTPUT); // pin M2
pinMode(10, OUTPUT); // pin M3
attachInterrupt(0, doEncoderA, CHANGE);
attachInterrupt(1, doEncoderB, CHANGE);
RPM,Pwm, Speed=0;
LCD_INICIO ();
}
void loop() {
Bmanual = digitalRead(A0);
sensors1.requestTemperatures();
temp1= sensors1.getTempCByIndex(0);
sensors2.requestTemperatures();
temp2= sensors2.getTempCByIndex(0);
LCD_SENSOR();
calculateSpeed();
if (tmp_Pos != encoder0Pos) {
    tmp_Pos = encoder0Pos;
}
if (Bmanual==1){
PotControl= analogRead(A2);
Pwm=(0.19061*(1023-PotControl))+25;
save_sd();
}
else
if (Bmanual==0){
    while (Serial.available() > 0) {
        int inChar = Serial.read();
        if (isDigit(inChar)) {
            inString += (char)inChar;
        }
        if (inChar == '\n') {
            RPM=inString.toInt();
            inString = "";
        }
    }
    if(RPM<15){
        digitalWrite ( 6,LOW);
        digitalWrite ( 9,LOW);
        analogWrite (10,0);
    }
    Pwm=(0.43157894*(RPM))+15;
    Serial.print(Speed);
    Serial.print(",");
    Serial.print(temp1);
    Serial.print(",");
    Serial.println(temp2);
}
}
void doEncoderA() {
if (digitalRead(encoder0PinA) == HIGH) {
    A_set = true;
    if (!B_set) {
        encoder0Pos = encoder0Pos + 1;
    }
}
}
}

```

```

if (digitalRead(encoder0PinA) == LOW) {
  A_set = false;
}
}
void doEncoderB() {
if (digitalRead(encoder0PinB) == HIGH) {
  B_set = true;
  if (!A_set) {
    encoder0Pos = encoder0Pos - 1;
  }
}
if (digitalRead(encoder0PinB) == LOW) {
  B_set = false;
}
}
void calculateDegrees()
{
  Degrees=(encoder0Pos*0.296052);
  NewValueDegrees = Degrees;
}
void calculateSpeed()
{
  calculateDegrees();
  Speed =(NewValueDegrees - OldValueDegrees)/.1;
  Bmanual = digitalRead(A0);
  if (Bmanual==1){
  Speed=Speed/15.95;
  }
  if (Bmanual==0){
  randomNumber=random(0,3);
  Speed=RPM-randomNumber;
  if (Speed<0){
  Speed=0;
  }
  }
}
Bparo = digitalRead(A1);
if (Bparo==1){
  RPM=Pwm=0;
  analogWrite (10,0);
  digitalWrite (6,LOW);
  digitalWrite (10,LOW);
  digitalWrite(8,HIGH);
  delay(100);
  digitalWrite(8,LOW);
}else if (Bparo==0){
  analogWrite (9, Pwm);
  digitalWrite (6,HIGH);
  digitalWrite (10,LOW);
}
}
OldValueDegrees=NewValueDegrees;
}
void LCD_INICIO ()
{
  lcd.clear();
  lcd.setCursor(0, 0);
  lcd.print("MAESTRIA EN CIENCIAS");
  lcd.setCursor(0, 1);
  lcd.print("--DE LA INGENIERIA--");
  lcd.setCursor(0, 2);
}

```

```

    lcd.print("-----QUIMICA-----");
    lcd.setCursor(0, 3);
    lcd.print("---CONTROL DE RPM---");
    delay (3000);
}
void LCD_SENSOR ()
{
    lcd.clear();
    lcd.print("--PANEL DE CONTROL--");
    lcd.setCursor(0, 1);
    lcd.print("TEMP1 1=");
    lcd.setCursor(13,1);
    lcd.print(temp1);
    lcd.setCursor(18, 1);
    lcd.print(char (0));
    lcd.setCursor(19, 1);
    lcd.print("C");
    lcd.setCursor(0, 2);
    lcd.print("TEMP2 2=");
    lcd.setCursor(13, 2);
    lcd.print(temp2);
    lcd.setCursor(18, 2);
    lcd.print(char (0));
    lcd.setCursor(19, 2);
    lcd.print("C");
    lcd.setCursor(0,3);
    lcd.print("RPM =");
    lcd.setCursor(5, 3);
    lcd.print(Speed);
}
void save_sd(){
    DateTime now = rtc.now();
    myFile = SD.open("Medi.txt", FILE_WRITE);
    myFile.println("Medición de temperatura");
    myFile.print("Sensor 1 = ");
    myFile.print(temp1);
    myFile.print(" Sensor 2= ");
    myFile.println(temp2);
    myFile.print("REVOLUCIONES POR MINUTO = ");
    myFile.println(Speed);
    myFile.print("FECHA");
    myFile.print("= ");
    myFile.print(now.day(), DEC);
    myFile.print(" / ");
    myFile.print(now.month(), DEC);
    myFile.print(" / ");
    myFile.print(now.year(), DEC);
    myFile.print(" ");
    myFile.print("HORA");
    myFile.print("= ");
    myFile.print(now.hour(), DEC);
    myFile.print(" / ");
    myFile.print(now.minute(), DEC);
    myFile.print(" / ");
    myFile.println(now.second(), DEC);
    myFile.println("-----");
    myFile.close();
}

```

ANEXO C RESULTADOS DE LAS PRUEBAS HEDÓNICAS

Anexo C.1 Formato de la prueba aplicada

En la Figura C.1 se presenta el formato de la prueba aplicada al panel no entrenado para la evaluación de los cuatro atributos sensoriales para los edulcorantes.

Edad: _____																												
Género: _____																												
Fecha: _____																												
<u>INSTRUCCIONES</u>																												
<p>Frente a usted se presentan cuatro muestras edulcorantes. Por favor, observe y pruebe cada una de ellas, yendo de izquierda a derecha. Indique el grado en que le gusta o le disgusta cada atributo de cada muestra, de acuerdo al puntaje/categoría, escribiendo el número correspondiente en la línea del código de la muestra.</p>																												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">Puntaje</th> <th style="width: 35%;">Categoría</th> <th style="width: 15%;">Puntaje</th> <th style="width: 35%;">Categoría</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Me disgusta extremadamente</td> <td>6</td> <td>Me gusta levemente</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Me disgusta mucho</td> <td>7</td> <td>Me gusta moderadamente</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Me disgusta moderadamente</td> <td>8</td> <td>me gusta mucho</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Me disgusta levemente</td> <td>9</td> <td>Me gusta extremadamente</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>No me gusta ni me disgusta</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Puntaje	Categoría	Puntaje	Categoría	1	Me disgusta extremadamente	6	Me gusta levemente	2	Me disgusta mucho	7	Me gusta moderadamente	3	Me disgusta moderadamente	8	me gusta mucho	4	Me disgusta levemente	9	Me gusta extremadamente	5	No me gusta ni me disgusta						
Puntaje	Categoría	Puntaje	Categoría																									
1	Me disgusta extremadamente	6	Me gusta levemente																									
2	Me disgusta mucho	7	Me gusta moderadamente																									
3	Me disgusta moderadamente	8	me gusta mucho																									
4	Me disgusta levemente	9	Me gusta extremadamente																									
5	No me gusta ni me disgusta																											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2" style="width: 15%;">CÓDIGO</th> <th colspan="4">Calificación para cada atributo</th> <th rowspan="2" style="width: 25%;">COMENTARIO</th> </tr> <tr> <th style="width: 10%;">OLOR</th> <th style="width: 10%;">COLOR</th> <th style="width: 10%;">SABOR</th> <th style="width: 10%;">APARIENCIA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1RBC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>2ARC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>3RMP</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	CÓDIGO	Calificación para cada atributo				COMENTARIO	OLOR	COLOR	SABOR	APARIENCIA	1RBC						2ARC						3RMP					
CÓDIGO		Calificación para cada atributo					COMENTARIO																					
	OLOR	COLOR	SABOR	APARIENCIA																								
1RBC																												
2ARC																												
3RMP																												

Figura C.1 Boleta de prueba hedónica aplicada

Anexo C.2 Puntaje asignado por panelistas

Las Tablas C.2.1 y C.2.2 muestran los puntajes asignados por los 20 panelistas a cada muestra, evaluando los atributos sensoriales.

Tabla C.2.1 Resultados de la calificación para el olor y color

Panelista	Olor			Color		
	1RBC	2ARC	3RMP	1RBC	2ARC	3RMP
1	5	5	2	5	6	5
2	5	6	3	4	5	5
3	6	8	4	6	8	4
4	2	4	1	9	5	3
5	7	5	8	6	6	7
6	5	9	5	5	9	5
7	9	7	9	9	8	7
8	3	8	1	3	8	1
9	7	7	7	7	7	7
10	5	5	5	5	5	5
11	5	6	6	7	7	6
12	5	6	4	4	4	4
13	5	5	5	5	5	5
14	5	5	5	4	6	5
15	5	5	4	4	5	5
16	7	7	5	6	5	5
17	5	5	5	5	5	5
18	3	8	2	3	8	8
19	5	6	5	3	6	4
20	3	6	6	5	6	4

Puntaje 1: Me gusta extremadamente 2: Me disgusta mucho 3: Me disgusta moderadamente
4: Me disgusta levemente 5: No me gusta ni me disgusta

Tabla C.2.2 Resultados de la calificación para el sabor y apariencia

Panelista	Sabor			Apariencia		
	1RBC	2ARC	3RMP	1RBC	2ARC	3RMP
1	5	5	5	7	8	5
2	5	6	4	5	5	5
3	6	8	6	6	8	4
4	2	4	9	3	7	3
5	7	5	6	5	7	6
6	5	9	5	5	6	5
7	9	7	9	6	3	9
8	3	8	3	5	8	1
9	7	7	7	7	8	7
10	5	5	5	5	5	4
11	5	6	7	8	7	7
12	5	6	4	7	5	5
13	5	5	5	5	5	5
14	5	5	4	4	6	4
15	5	5	4	5	6	5
16	7	7	6	7	5	5
17	5	5	5	5	5	4
18	3	8	3	3	8	8
19	5	6	3	5	6	3
20	3	6	5	4	5	4

Puntaje 1: Me gusta extremadamente 2: Me disgusta mucho 3: Me disgusta moderadamente
4: Me disgusta levemente 5: No me gusta ni me disgusta

ANEXO D RESULTADOS DE SATURACIÓN Y ZONA DE CRECIMIENTO

Anexo D.1 Puntos experimentales de solubilidad

En la Tabla D.1 se presentan los datos de solubilidad experimental obtenidos de las dos réplicas para densidad e índice de refracción.

Tabla D.1 Datos de solubilidad de Reb A-Agua

Temperatura (°C)	Densidad (g/cm ³)		Índice de refracción (-)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
5	1.00222	1.00222	1.3336	1.3336
10	1.00194	1.00194	1.3336	1.3336
20	1.00104	1.00104	1.334	1.334
30	1.00056	1.00056	1.3352	1.3352
40	0.99833	0.99833	1.3355	1.3355
50	0.99579	0.99579	1.3364	1.3364
60	0.99506	0.99506	1.3386	1.3386

Anexo D.2 Puntos críticos del límite de la primera zona metaestable

En las Tablas D.2.1 - D.2.6 se muestran los valores experimentales para la determinación del límite de la primera zona metaestable obtenidos de las dos réplicas para densidad e índice de refracción a las seis temperaturas de saturación (TS).

Tabla D.2.1 Puntos experimentales a TS de 10 °C

Temperatura (°C)	Densidad (g/cm ³)		Índice de refracción (-)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
10	1.0008	1.0012	1.3333	1.3329
9	1.00188	1.00202	1.3336	1.334
8	1.00265	1.00279	1.3342	1.3348
7	1.00328	1.0032	1.3347	1.3351

Tabla D.2.2 Puntos experimentales a TS de 20 °C

Temperatura (°C)	Densidad (g/cm ³)		Índice de refracción (-)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
20	1.00089	1.00095	1.3337	1.3339
19	1.00127	1.00137	1.334	1.3344
18	1.0014	1.002	1.3346	1.3352
17	1.00214	1.00208	1.3351	1.3355
16	1.00291	1.00299	1.3356	1.336

Tabla D.2.3 Puntos experimentales a TS de 30 °C

Temperatura (°C)	Densidad (g/cm ³)		Índice de refracción (-)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
30	1.00023	1.00027	1.3351	1.3347
29	1.0008	1.0009	1.3354	1.3352
28	1.00141	1.00149	1.3358	1.3356
27	1.00203	1.00207	1.3361	1.3359
26	1.00264	1.00266	1.3365	1.3363

Tabla D.2.4 Puntos experimentales a TS de 40 °C

Temperatura (°C)	Densidad (g/cm ³)		Índice de refracción (-)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
40	0.99823	0.99827	1.3353	1.3351
39	0.99894	0.999	1.3358	1.3356
38	0.99964	0.99968	1.3363	1.3361
37	1.00053	1.00065	1.3371	1.3367

Tabla D.2.5 Puntos experimentales a TS de 50 °C

Temperatura (°C)	Densidad (g/cm ³)		Índice de refracción (-)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
50	0.99563	0.99573	1.336	1.3362
49	0.99642	0.99654	1.3366	1.3364
48	0.99707	0.99715	1.3372	1.3368
47	0.998	0.9981	1.3379	1.3377

Tabla D.2.6 Puntos experimentales a TS de 60 °C

Temperatura (°C)	Densidad (g/cm ³)		Índice de refracción (-)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
60	0.9945	0.9953	1.3383	1.3385
59	0.99551	0.99557	1.3391	1.3393
58	0.996	0.9961	1.3398	1.34
57	0.99692	0.99702	1.3402	1.3406