



**EDUCACIÓN**

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“ANÁLISIS DE EFECTOS PARA EL INCREMENTO DE LA  
DTC Y MFC EN LA CRISTALIZACIÓN DE LA MEZCLA  
STEVIA (REBAUDIÓSIDO A) - AZÚCARES LEVÓGIROS”

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

PRESENTA:

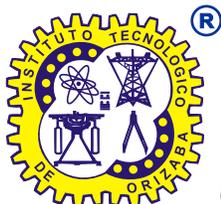
*I.Q. Vianey Rosas Calderón*

DIRECTOR DE TESIS:

*Dr. Eusebio Bolaños Reynoso*

CODIRECTOR DE TESIS:

*Dra. Rosalía Cerecero Enríquez*



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

NOVIEMBRE 2021



## “2021: Año de la Independencia”

Orizaba, Veracruz, 29/11/2021

Dependencia: División de Estudios de  
Posgrado e Investigación

Asunto: Autorización de Impresión  
OPCION: I

C. VIANEY ROSAS CALDERÓN

Candidato(a) a Grado de Maestro(a) en:  
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA  
P R E S E N T E.-

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:

"ANÁLISIS DE EFECTOS PARA EL INCREMENTO DE LA DTC Y MFC EN LA CRISTALIZACIÓN DE LA MEZCLA STEVIA (REBAUDIÓSIDO A) – AZÚCARES LEVÓGIROS".

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

**ATENTAMENTE**  
Excelencia en Educación Tecnológica®  
CIENCIA – TÉCNICA - CULTURA®



Dr. MARIO LEONCIO ARRIJOJA RODRÍGUEZ  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OG-13-F06



Avenida Oriente 9 No. 852  
Col. Emiliano Zapata, C.P. 94320  
Orizaba, Veracruz, México.  
Teléfono: 272-110-53-60  
Email: [cyd\\_orizaba@tecmm.mx](mailto:cyd_orizaba@tecmm.mx)  
[www.orizaba.tecmm.mx](http://www.orizaba.tecmm.mx)





Instituto Tecnológico de Orizaba  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, **Noviembre 16, de 2021.**  
Asunto: **Revisión de trabajo escrito**

**C. MARIO LEONCIO ARRIJOA RODRÍGUEZ**  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
**PRESENTE.-**

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

**VIANEY ROSAS CALDERÓN**

La cual lleva el título de:

**ANÁLISIS DE EFECTOS PARA EL INCREMENTO DE LA DTC Y MFC EN LA CRISTALIZACIÓN DE LA MEZCLA STEVIA (REBAUDIÓSIDO A) - AZÚCARES LEVÓGIROS.**

Y concluyen que se acepta.

**ATENTAMENTE**

Excelencia en Educación Tecnológica®  
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

PRESIDENTE: DR. EUSEBIO BOLAÑOS REYNOSO

FIRMA

SECRETARIO: DRA. ROSALÍA CERECERO ENRÍQUEZ

FIRMA

VOCAL: DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA

FIRMA

VOCAL SUP.: DR. GALO RAFAEL URREA GARCÍA

FIRMA

TA-09-26



Avenida Oriente 9 No. 852  
Col. Emiliano Zapata, C.P. 94320  
Orizaba, Veracruz, México.  
Teléfono: 272-110-53-60  
Email: [depi\\_orizaba@tecnm.mx](mailto:depi_orizaba@tecnm.mx)  
[www.orizaba.tecnm.mx](http://www.orizaba.tecnm.mx)

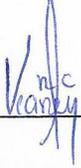


## Declaración

Yo, Vianey Rosas Calderón, certifico que esta tesis, que tiene una extensión de 113 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección de Dr. Eusebio Bolaños Reynoso y Dra. Rosalía Cerecero Enríquez y no ha sido sometida en ningún otra institución previamente.

Fui admitido como estudiante de la maestría en enero de 2019 y mi trabajo de tesis fue liberado para su impresión el 29 de noviembre de 2021.

También declaro que, al presentar esta tesis, el Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba tiene permiso para publicarla en formato electrónico bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Fecha: 29 de noviembre de 2021 Firma: 

Vo. Bo.

Asesor: Dr. Eusebio Bolaños Reynoso

Firma del asesor: 

## DEDICATORIAS

*A Dios quien me permitió llegar hasta aquí, del Señor diré mi refugio es él, mi fortaleza, el Dios en quien confío.*

*A mis **padres** por siempre mostrar su apoyo incondicional, por darme vida, salud y sabiduría, a mi papá **Filiberto Rosas Páez** † por ser un excelente padre, por dirigirme por el camino correcto y siempre apoyarme en cada momento y, aunque tu deseo fue el que terminara una carrera, hoy te dedico este logro aún mayor. A mi madre **Felipa Calderón Rodríguez** por ser una guerrera en toda la expresión de la palabra, por estar conmigo siempre, por su esfuerzo y amor para que yo siguiera en este camino. Los tiempos de Dios son perfectos madre y pronto habrá recompensa.*

*A mis **hermanos** por todo sacrificio hecho, a mi hermano **José Alberto** por su esfuerzo y trabajo, asumiendo el rol de hermano mayor y hacer que esto fuera posible, a mi hermano **Octavio**, por cada inicio de semana de llevarme a tomar el carro y traerme de nuevo a casa y, a la pequeña **Alondra**, por mostrarme amistad y escucharme siempre.*

*A mis tíos **Arturo, Francisco, Jesús, Marcelino, Marino, Octaviano, Oliva y Vic**, por estar siempre al pendiente de mí. A mis tías **Adriana y Rocío** por su apoyo y a mi madrina **Carolina** por sus consejos.*

*A mi Abuela **Isidora Rodríguez Ochoa** por siempre preocuparse en mis días malos y buscar el bienestar para mí.*

*A mis **primas** las Rosas bellas, **Azucena, Citlalli, Cristina, Dalia, Diana Karen, Itzayana, Janeth, Luz del Carmen, Marisol, Maritza, Mirian, Rebeca, Selene, Shaira y Tania**, por brindarme una familia tan maravillosa como la que tenemos.*

*Y finalmente dedico este trabajo lleno de esfuerzo, experiencias, conocimiento, dedicación, sorpresas y oportunidades... a mis amigos **Candelario, Eduardo Martínez, Eleuterio, Mayo, Rafael** y **Tony** que estuvieron presentes en este viaje que aunque no fue fácil, siempre encontré en ellos apoyo, risas, llantos, desvelos y una gran amistad.*

## AGRADECIMIENTOS

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: **la voluntad**”-*

*Albert Einstein*

*Principalmente quiero agradecer a mi director de tesis el **Dr. Eusebio Bolaños Reynoso** por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, al mismo tiempo por sus asesorías durante el desarrollo de ésta tesis, su paciencia e impulsarme a no rendirme pese a cada circunstancia en el trayecto, viendo siempre el lado positivo. ¡Gracias Dr.!*

*Agradezco a la **Dra. Rosalía Cerecero Enríquez**, por la disponibilidad de tiempo que me brindo, por su visión crítica, por cada una de las aportaciones para este trabajo y por los conocimientos impartidos durante mis estudios de maestría como profesora.*

*De igual manera agradezco a la **Dra. Leticia López Zamora** por sus excelentes críticas constructivas y observaciones que, me ayudaron en gran medida a dar orden y plasmar correctamente las ideas, parte metodológica y resultados de este trabajo de investigación.*

*Al **Dr. Galo Rafael Urrea García** por su enorme disponibilidad de tiempo en la revisión de esta tesis, por sus aportes en la mejor comprensión de los resultados, por compartir sus conocimientos en el aula y ser un excelente profesor.*

*A la **Dra. Ofelia Landeta Escamilla** por su enorme paciencia y confianza brindada, por esas charlas en tutoría que además de ser un buen momento para hablar de lo bueno o malo que me acontecía, siempre ayudaron a encontrar una solución para cada situación. Por su gran apoyo en el desarrollo de esta tesis y por ser una excelente tutora y coordinadora ¡muchas gracias Dra.! ... ¡Si se pudo!*

*Agradezco al **M.I.A Adrián Reyes Benítez** por ser ejemplo de constancia y perseverancia, quien fungió de mi tutor al inicio de esta maestría, por siempre estar atento de mis tutorías y pendiente al seguimiento de mis avances.*

*Al **Colegio de Posgraduados Campus Córdoba** por abrir sus puertas y permitirme realizar parte de esta investigación en sus laboratorios. Gracias **David** y **Juliana** por hacer de mi estancia una gran experiencia.*

*Finalmente agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca no. 960239 otorgada durante el periodo comprendido de Febrero del 2019 a Enero del 2021.*

La presente Tesis se efectuó en el periodo Enero 2019-Agosto 2021 en el Tecnológico Nacional de México campus Orizaba. A continuación, se enlistan las presentaciones en congresos y publicaciones como parte de la productividad:

## **PRESENTACIONES EN CONGRESOS**

- **Ponencia 2021**

Caracterización Físicoquímica y Organoléptica de Varios Tipos de Miel de Abeja (*Apis Mellifera*) Provenientes de Distintas Regiones del Estado de Veracruz. Presentación en el Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Puebla 2021. Puebla, Puebla, México. 12-13 Agosto 2021.

- **Ponencia 2021**

Comportamiento de la Cristalización por Enfriamiento de la Mezcla Stevia (Rebaudiósido A)-Miel de Abeja a través del Estudio de la DTC. Presentación en el Congreso Internacional de Investigación Academia Journals México 2021. Iztapalapa, Ciudad de México. 9-10 Septiembre 2021.

## **PUBLICACIONES**

- Dr. Eusebio Bolaños Reynoso, Ing. Vianey Rosas Calderón, Dra. Rosalía Cerecero Enríquez, Dra. Leticia López Zamora y Dr. Galo Rafael Urrea García. Caracterización Físicoquímica y Organoléptica de Varios Tipos de Miel de Abeja (*Apis Mellifera*) Provenientes de Distintas Regiones del Estado de Veracruz. Memorias Congreso Internacional de Investigación Academia Journals. ISSN online 1946-5351. Vol. **13**, No. 7, 2021.
- Dr. Eusebio Bolaños Reynoso, Ing. Vianey Rosas Calderón, Lic. José Luis Bolaños Reynoso, Dra. Rosalía Cerecero Enríquez y Dra. Leticia López Zamora. Comportamiento de la Cristalización por Enfriamiento de la Mezcla Stevia (Rebaudiósido A)-Miel de Abeja a través del Estudio de la DTC. Memorias Congreso Internacional de Investigación Academia Journals. ISSN 1946-5351 online, Vol. **13**, No. 11, 2021.

## RESUMEN

### **Análisis de efectos para el incremento de la DTC y MCF en la cristalización de la mezcla Stevia (Rebaudiósido A) – azúcares levógiros**

**Elaborado por:** Ing. Vianey Rosas Calderón

**Dirigido por:** Dr. Eusebio Bolaños Reynoso

**Dra. Rosalía Cerecero Enríquez**

En el presente trabajo se enfoca en determinar las condiciones en la cristalización e incrementar el tamaño y masa de cristal  $D(2,1)$  del Rebaudiósido A (Reb A), para usar como una alternativa de edulcorante en vez de la sacarosa. De los azúcares levógiros como miel de abeja, fructosa de la hidrólisis enzimática de la sacarosa y, fructosa pura; se seleccionó miel de abeja, que presenta buenas condiciones de operación para la cristalización de la mezcla de Reb A-agua-alcohol etílico.

Mediante una caracterización fisicoquímica, se validó la pureza y calidad de los componentes. Se experimentó con diferentes proporciones de alcohol etílico-agua como solvente, obteniendo un mayor grado de concentración de saturación en porcentajes de 65-35 % con 1.4284 IR y 70-30 % con 1.4242 IR seleccionando estas mezclas para la cristalización. Se obtuvo la curva de solubilidad a 10, 20, 40, 50 y 60 °C. Mediante un diseño factorial  $2^2$  se evaluó la proporción de alcohol etílico y velocidad de agitación en el tamaño de partícula  $D(2,1)$  y la masa de cristal formado (MCF). La mejores resultados en DTC y MCF se dieron a niveles bajos para la mezcla de solventes alcohol etílico 65 % - agua 35 % y, alta velocidad de agitación 250 rpm. Bajo estas condiciones un tamaño  $D(2,1)$  y MCF de 67.6251  $\mu\text{m}$  y 159.9 g respectivamente.

Las pruebas organolépticas en escala hedónica, indicaron que se obtuvo un producto neutro (me gusta moderadamente) y potencialmente aceptable.

## **ABSTRACT**

Analysis of effects for the increment of the DTC and MFC on the crystallization of the mixture Stevia (Rebaudioside A)- sugars levorotatory

**By:** **Ing. Vianey Rosas Calderón**

**Advisor(s):** **Dr. Eusebio Bolaños Reynoso**

**Dra. Rosalía Cerecero Enríquez**

The present work focuses on determining the conditions in the crystallization and increment the size  $D(2,1)$  and formed mass size the Rebaudioside A (Reb A) as a sweetener alternative for sucrose. From the sugars levorotatory as honey bee, fructose from to the hydrolysis enzymatic of the saccharose and, fructose pure; It was selected the honey bee because was presented best conditions of operation for the crystallization in the mix of Reb A-water- ethyl alcohol.

Through a physicochemical characterization of said sugar, was validated its purity and the quality of its components. It was to experience different proportions of the ethyl alcohol-water as a solvent, obtaining a higher degree of saturation concentration in percentages of 65-35 % with 1.4284 IR and 70-30 % with 1.4242 IR selecting these mixtures for crystallization. The solubility curve was obtained to 10, 20, 40, 50, and 60 °C. Through a factorial  $2^2$  design was evaluated the proportion of ethyl alcohol and speed agitation on particle size  $D(2,1)$  and the formed crystal mass (MCF). The best results in DTC and MCF were given at low levels for the solvent mixture Ethyl Alcohol 65 % - Water 35 % and high for the speed agitation 250 rpm. Under these conditions a maximum size for  $D(2,1)$  and MFC of 67.6251  $\mu\text{m}$  and 159.9 g respectively.

The hedonic tests showed that a neutral (I like moderately) and potentially acceptable product was obtained.

## ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
NOMENCLATURA	xiii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
JUSTIFICACIÓN	4
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
1.1 Antecedentes científicos	6
1.2 Avances	7
1.3 Edulcorante	9
1.3.1 Clasificación	9
1.4 <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	10
1.4.1 Composición	11
1.4.2 Rebaudiósido A	13
1.5 Miel de abeja	14
1.5.1 Clasificación	15
1.5.2 Composición	15
1.5.3 Constituyentes minoritarios	17
1.5.4 Características fisicoquímicas	17
1.6 Fructosa	18

1.6.1	Obtención de fructosa a partir de la sacarosa (Azúcar invertido)	19
1.7	Métodos cuantitativos	20
1.7.1	Polarimetría	20
1.7.2	Rotación Óptica	20
1.7.3	Espectrofotometría UV	21
1.7.4	Espectroscopia infrarroja (FTIR)	21
1.8	Cristalización	22
1.8.1	Fundamentos teóricos de la cristalización	22
1.8.2	Saturación y Sobresaturación	23
1.8.3	Curvas de solubilidad	24
1.8.4	Ventajas de la cristalización por lotes (batch)	24
1.9	Distribución de tamaño de cristal (DTC)	25
1.9.1	Antecedentes en el control de la DTC	26
1.9.2	Técnicas para medición de la DTC	26
1.9.3	Control de Distribución del Tamaño de Cristal (DTC)	27
1.9.4	Trayectoria óptima de enfriamiento	27
1.10	Masa de Cristal Formado (MCF)	28
1.11	Factores influyentes en el proceso de cristalización	29
1.12	Análisis de parámetros físicos y organolépticos	29
1.12.1	Análisis físicos	29
1.12.2	Análisis sensorial	30
1.13	Diseño de experimentos	31
1.13.1	Diseño factorial 2 <sup>2</sup>	31
<b>CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>		
2.1	Metodología general	34
2.2	Cristalizador de vidrio tipo Batch y enfriamiento a presión atmosférica	35
2.3	Sistema de adquisición de datos e imágenes	36

2.4	Refractómetro automático	37
2.5	Reb A	37
2.6	Selección de la mezcla a emplear en la cristalización	38
2.7	Análisis cualitativo por espectroscopia infrarroja (FTIR)	39
2.8	Preparación de las muestras	39
2.9	Características fisicoquímicas	40
2.9.1	Medición de pH	40
2.9.2	Análisis de Acidez Titulable	41
2.9.3	Medición de viscosidad	41
2.9.4	Medición de Color	41
2.9.5	Conductividad eléctrica	42
2.9.6	Actividad de agua	42
2.9.7	Análisis de humedad	42
2.9.8	Cálculo de °Brix	42
2.9.9	Análisis de Sacarosa	43
2.9.10	Azúcares Reductores	43
2.9.11	Proteínas	43
2.9.12	Medición de Hidroximetilfurfural	44
2.10	Pruebas de diferentes mezclas de alcohol acuoso variando %v/v.	44
2.11	Determinación de la Curva de Solubilidad	45
2.12	Implementación de las zonas de concentración	46
2.13	Diseño experimental factorial 2 <sup>2</sup>	47
2.14	Procedimiento experimental para la cristalización	50
2.14.1	Solución saturada	50
2.14.2	Cristalización del Reb A-miel de abeja	51
2.15	Metodología para el cálculo de la DTC	52
2.15.1	Determinación de tamaño promedio de cristal	52

2.15.2	Captura de imágenes	53
2.16	Determinación de masa de cristal formada	54
2.17	Análisis de parámetros físicos y organolépticos	55
2.17.1	Determinación de color	55
2.17.2	Determinación de características organolépticas	56
<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		
3.1	Determinación de adulteración de miel de abeja por Infrarrojo	58
3.2	Caracterización fisicoquímica	61
3.3	Pruebas de mezclas de alcohol etílico/agua	62
3.4	Obtención de la curva de solubilidad	64
3.5	Seguimiento experimental de la cristalización del Reb A-miel de abeja	66
3.6	Sobresaturación relativa	71
3.7	Distribución de tamaño de cristal y masa de cristal formado	74
3.8	Evaluación del diseño factorial 2 <sup>2</sup>	79
3.9	Caracterización del producto final	83
3.9.1	Pruebas organolépticas	84
<b>CONCLUSIONES</b>		<b>87</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>		<b>89</b>
<b>ANEXOS</b>		<b>91</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pág.</b>
1.1	Planta Stevia: a) arbusto y hojas y b) flores	10
1.2	Estructuro molecular de la sacarosa	19
1.3	Perfiles de enfriamiento y de sobresaturación en un cristalizador batch	28
2.1	Proceso de la cristalización del Reb A-miel de abeja	34
2.2	Cristalizador tipo batch	35
2.3	Microscopio óptico profesional Primo Star iLED	36
2.4	Reb A	38
2.5	Representación de la zona metaestable (nucleación) determinada a partir de índice de refracción	47
3.1	a) Miel de Amatlán, b) Miel de Álamo y c) Miel de Córdoba	58
3.2	Espectroscopia infrarroja (FTIR) de la muestra de miel de abeja de referencia	59
3.3	Espectroscopia infrarroja (FTIR) de la muestra de referencia vs muestra de miel de abeja de Amatlán y Álamo	60
3.4	Espectroscopia infrarroja (FTIR) del ajuste de la muestra de referencia vs muestra de miel de abeja de Amatlán y Álamo	60
3.5	Porcentajes de mezclas de alcohol etílico/agua	62
3.6	Mezclas de alcohol etílico/agua seleccionadas	64
3.7	Puntos experimentales de solubilidad (Índice de refracción)	65
3.8	Instrumentación virtual para el registro de la muestra	66
3.9	Instrumentación virtual para el control de la velocidad de agitación	67
3.10	Paquetería de JULABO EasyTemp Professional para el control de la temperatura	67

3.11	Índice de refracción vs temperatura (°C)	68
3.12	Temperatura interna del cristizador	69
3.13	Índice de refracción vs tiempo (min)	71
3.14	Sobresaturación relativa vs tiempo (min) corrida 1 y 5	72
3.15	Sobresaturación relativa vs tiempo (min) corrida 2 y 7	73
3.16	Sobresaturación relativa vs tiempo (min) corrida 3 y 6	73
3.17	Sobresaturación relativa vs tiempo (min) corrida 4 y 8	74
3.18	Seguimiento experimental de la cristalización del Reb A-miel de abeja: a) minuto 30, b) minuto 60, c) minuto 90, d) minuto 120, e) minuto 150 y f) minuto 180	75
3.19	D(2,1) (µm) vs tiempo (min)	76
3.20	D(2,1) (µm) vs tiempo (min)	77
3.21	S(2,1) vs tiempo (min)	77
3.22	Masa de cristal formado (MCF)	78
3.23	Diagrama de Pareto sobre la variable de respuesta de DTC	80
3.24	Diagrama de Pareto sobre la variable de respuesta de MFC	81
3.25	Grafica de efectos principales sobre la variable de respuesta de DTC	82
3.26	Grafica de efectos principales sobre la variable de respuesta de MFC	83
A.1.1	Curva Patrón de Glucosa	91
A.1.2	Curva Patrón de Fructosa	91
D.1.1	Boleta de evaluación sensorial	105

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Pág.</b>
1.1 Clasificación de edulcorantes	9
1.2 Taxonomía de la <i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni	11
1.3 Glucósidos dulces en las hojas de Stevia	12
1.4 Datos físicos y de solubilidad de glucósidos de esteviol	13
1.5 Composición química de la miel de abeja	16
1.6 Rotación Específica de la Fructosa	18
2.1 Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del Reb A	38
2.2 Muestras de miel analizadas provenientes del estado de Veracruz	40
2.3 Escala Pfund	41
2.4 Proporciones de alcohol etílico-agua	45
2.5 Proporción de la mezcla de solventes (%v/v) y velocidad de agitación	47
2.6 Diseño factorial 2 <sup>2</sup> para la cristalización del Reb A-miel de abeja	48
3.1 Caracterización fisicoquímica de las mieles de abeja	61
3.2 Concentración de Reb A y miel de abeja en 100 mL de solvente	63
3.3 Puntos de solubilidad experimentales	64
3.4 DTC (2,1) y S (2,1) experimentales	78
3.5 Resultados del diseño factorial 2 <sup>2</sup> para la cristalización del Reb A-miel de abeja	79
3.6 Análisis de Varianza para la D(2,1)	80
3.7 Análisis de Varianza para la MFC	82
3.8 Determinación de color en escala de Hunterlab	83
3.9 Puntaje asignado en la evaluación sensorial del producto final	84

3.10	Análisis de Varianza de las pruebas sensoriales (sabor, apariencia, color y olor)	85
3.11	Análisis de medias de las pruebas sensoriales (sabor, apariencia, color y olor)	85
3.12	Prueba Tukey para las pruebas sensoriales	85
A.2.1	Determinación de pH	92
A.2.2	Determinación de acidez Libre	92
A.2.3	Determinación de viscosidad	92
A.2.4	Determinación de color	93
A.2.5	Determinación de conductividad Eléctrica	93
A.2.6	Determinación de actividad de agua	93
A.2.7	Determinación de Humedad	93
A.2.8	Determinación de °Brix	94
A.2.9	Determinación de % sacarosa método polimétrico	94
A.2.10	Determinación de azúcares reductores % Fructosa método DNS	94
A.2.11	Determinación de azúcares reductores % Glucosa método DNS	94
A.2.12	Determinación de proteínas	95
A.2.13	Determinación de hidroximetilfurfural	95
B.1.1	Concentración de Reb A-miel de abeja en 100 mL de solvente (55 mL alcohol etílico-45 mL agua)	96
B.1.2	Concentración de Reb A-miel de abeja en 100 mL de solvente (60 mL alcohol etílico-40 mL agua)	96
B.1.3	Concentración de Reb A-miel de abeja en 100 mL de solvente (65 mL alcohol etílico-35 mL agua)	97
B.1.4	Concentración de Reb A-miel de abeja en 100 mL de solvente (70 mL alcohol etílico-30 mL agua)	97

B.2.1	Datos experimentales de solubilidad de la mezcla Reb A-miel de abeja	98
C.1.1	Puntos experimentales orden de corrida 1	99
C.1.2	Puntos experimentales orden de corrida 2	99
C.1.3	Puntos experimentales orden de corrida 3	100
C.1.4	Puntos experimentales orden de corrida 4	100
C.1.5	Puntos experimentales orden de corrida 5	101
C.1.6	Puntos experimentales orden de corrida 6	101
C.1.7	Puntos experimentales orden de corrida 7	102
C.1.8	Puntos experimentales orden de corrida 8	102
C.2.1	Distribuciones en % número, % longitud, % área y % volumen, corrida 1 y 5	103
C.2.2	Distribuciones en % número, % longitud, % área y % volumen, corrida 2 y 7	103
C.2.3	Distribuciones en % número, % longitud, % área y % volumen, corrida 3 y 6	104
C.2.4	Distribuciones en % número, % longitud, % área y % volumen, corrida 4 y 8	104

## NOMENCLATURA

<b>LETRA LATINA</b>		<b>UNIDADES</b>
<i>DTC</i>	Distribución del tamaño de cristal	$\mu\text{m}$
<i>D(1,0)</i>	Diámetro de tamaño de cristal promedio en número	$\mu\text{m}$
<i>D(2,1)</i>	Diámetro de tamaño de cristal promedio en longitud	$\mu\text{m}$
<i>D(3,2)</i>	Diámetro de tamaño de cristal promedio en área	$\mu\text{m}$
<i>D(4,3)</i>	Diámetro de tamaño de cristal promedio en volumen	$\mu\text{m}$
MCF	Masa de cristal formada	g
<i>IDA</i>	Ingesta diaria aceptada	mg/kg peso corporal/día
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos	-----
SGs	Glucósidos de esteviol	-----
RMC	Reb-A-miel de abeja cristalizado	-----
 <b>LETRA GRIEGA</b>		 <b>UNIDADES</b>
$y_{ij}$	(ij)-ésima observación.	-----
$\mu$	Media global	-----
$\tau_i$	Efecto del tratamiento <i>i</i> -ésimo.	-----
$\epsilon$	Componente aleatoria del error.	-----

## INTRODUCCIÓN

El aumento en la incidencia de trastornos metabólicos como diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares debido al consumo excesivo de azúcar de mesa, además de las modificaciones en los estilos de vida de la población, han resultado en un aumento en la demanda de edulcorantes alternativos naturales, no nutritivos, de alta intensidad y bajos en calorías como sustitutos en la dieta. Al no existir un edulcorante perfecto, la variedad ayuda a desarrollar productos cada vez más amigables para el consumidor y, a su vez, prevenir y / o reducir problemas de salud graves como la obesidad y la diabetes.

Actualmente una alternativa como uso de edulcorante son los glucósidos de esteviol, los cuales se originan en las hojas de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. Los glucósidos de esteviol poseen cero calorías y se pueden emplear como sustituto del azúcar. Son ideales en las dietas para diabéticos. Además, tienen propiedades sensoriales y funcionales superiores a otros edulcorantes de alta intensidad (Galicia, 2017).

El Rebaudiósido A (Reb A) uno de los glucósidos con mayor proporción en la planta, no produce calorías, tiene un sabor agradable, se puede obtener con una pureza superior al 97 %, está aprobado por el Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA por sus siglas en inglés) como edulcorante seguro para consumo.

La comercialización de Stevia hoy en día como edulcorante contiene de 98 a 99 % de sacarosa (azúcar refinada) y 1 % de Stevia. Por lo que no existe como tal un producto solo a base de Stevia, además que conserva un sabor amargo poco agradable al consumidor. Por lo que es necesario purificar la Stevia comercial (Reb A) a través de técnicas como la cristalización. Por otro lado, se ha observado que la stevia (Reb A) es altamente levógiro por lo que se tiene la hipótesis de que complementado con azúcares levógiros; como puede ser la fructosa proveniente de la hidrólisis enzimática

de la sacarosa, la miel de abeja (hidrolizada por *Apis mellifera*) en glucosa y fructosa de manera natural o fructosa pura, podría incrementar su tamaño (masa) de producto formado y a través de la cristalización de la mezcla evitar el amargor original de la Stevia; obteniéndose un producto factible de ser comercializado.

La purificación del glucósido de esteviol (Reb A) se realiza de forma artesanal, “obteniendo un producto de tamaño pequeño ( $D_{prom}(2,1) \sim 37 \mu\text{m}$ ) que dificulta su comercialización y consumo por el alto costo de producción” (Galicia, 2017). Dado lo anterior, es necesario considerar una técnica de purificación que permita su producción a escala industrial y obtener un producto competitivo en el mercado actual.

En este trabajo, se tiene como objetivo general analizar los efectos fenomenológicos y, de las condiciones de operación para incrementar el tamaño (DTC) y masa (MFC) de cristal formado mediante la cristalización de la mezcla Stevia (Reb A) + azúcares levógiros como sustituto edulcorante de la sacarosa, de bajo aporte calórico, con cierto valor nutricional, potencialmente levógiro, promoviendo así su producción industrial, comercialización y competencia ante otros edulcorantes y favoreciendo la disminución del consumo de azúcar de caña.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar los efectos fenomenológicos y de condiciones de operación para el incremento del tamaño (DTC) y masa (MFC) de cristal formado mediante la cristalización de la mezcla Stevia (Rebaudiósido A) + Azúcares levógiros.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar las zonas de concentración (proceso de nucleación) por medio del diagrama temperatura/concentración para identificar condiciones de operación de la cristalización de la mezcla Stevia (Rebaudiósido A) – Azúcares levógiros.
- Identificar estadísticamente el efecto de la proporción de alcohol etílico-agua como solvente y velocidad de agitación mediante un diseño experimental aplicado a la cristalización de la mezcla Stevia (Rebaudiósido A) – Azúcares levógiros, para incrementar el tamaño de cristal  $D(2,1)$  y masa formada del producto.
- Determinar las velocidades de agitación constante que mejoren la cristalización de la mezcla Stevia (Reb A)-miel de abeja considerando variación en viscosidad por efecto de la temperatura.
- Evaluar a través de un análisis organoléptico la aceptación del producto final y obtener un edulcorante de bajo aporte calórico con valor nutricional viable de consumo para diabéticos.

## JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que la Stevia (Reb A) es altamente levógiro que complementado con azúcares levógiros; como puede ser la fructosa proveniente de la hidrólisis enzimática de la sacarosa, la miel de abeja (hidrolizada por *Apis mellifera*) en glucosa y fructosa de manera natural o fructosa pura, podría incrementar tamaño (masa) de producto formado y a través de la cristalización de la mezcla evitar el amargor original de la stevia; obteniéndose un edulcorante sustituto de la sacarosa, de bajo aporte calórico, con cierto valor nutricional, potencialmente levógiro, propiciando así su producción industrial, factible de comercialización y competencia ante otros edulcorantes favoreciendo el decremento del consumo de azúcar de caña.

# **CAPÍTULO 1**

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

## CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 1.1 Antecedentes científicos

Rumelhard *et al.*, (2016), investigaron la seguridad del Reb A, que se obtuvo por fermentación de *Yarrowia lipolytica* que codifica la vía metabólica de Stevia rebaudiana (Reb A fermentativo). Según el estudio de toxicidad, “los Niveles de Efectos Adversos No Observados (NOAEL) podrían ser consecuencia de al menos 2000 mg/kg de peso corporal/día o como mínimo 660 mg de esteviol equivalentes/kg de peso corporal/día”, ésta fue la dosis probada más alta. La seguridad del Reb A fermentativo producido a partir de *Y. lipolytica* fue apoyada por los resultados de los estudios de toxicidad.

Chranioti *et al.*, (2016), aplicaron distintos métodos de secado y encapsularon los glucósidos de esteviol (SGs). Utilizaron secado por aspersión, liofilización y secado en horno de vacío con el fin de eliminar el sabor amargo de los glucósidos de esteviol así como para mejorar sus propiedades. El porcentaje de micro encapsulación eficiente (MEE) varió entre 63.72 % y 82.46 %. Los productos de glucósidos de esteviol presentaron las mejores características fisicoquímicas y organolépticas empleando secado por aspersión.

Ritu y Nandini (2016), realizaron un estudio de 60 días en 20 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 para evaluar si el polvo de hoja de Stevia administrado por vía oral (1 g por día) mostró efectos hipoglucémicos e hipolipidémicos. Los resultados mostraron que los niveles de glucosa en sangre en ayunas y posprandial disminuyeron significativamente al final del ensayo en el grupo tratado con la preparación de Stevia. Además, el polvo de hoja de Stevia redujo los niveles de colesterol VLDL y triglicéridos. El experimento mostró el potencial de las preparaciones de Stevia para regular los parámetros bioquímicos asociados con la diabetes mellitus tipo 2.

Urrego (2017), desarrolló una colecta de 10 muestras de miel de abeja proveniente de dos regiones del departamento de Antioquia (Oriente y Suroeste) y realizó análisis

fisicoquímicos contemplados por la normatividad colombiana encontrando un valor de rotación óptica de -9,40 y -7,14 respectivamente, siendo la fructuosa (levógira) la sustancia en mayor proporción en la miel de abeja.

## 1.2 Avances

Sánchez *et al.*, (2015), expusieron una técnica para la determinación de la DTC a partir de la velocidad de sedimentación empleando una solución de cristales de azúcar de caña – etanol anhidro. En base a los perfiles de % transmisión-extinción los cuales fueron obtenidos mediante un equipo LUMiReader® que utiliza la tecnología STEP® (Space- and Time- resolved Extinction Profiles), junto a la técnica de seguimiento de interfaz, fue determinada la velocidad de sedimentación de las partículas. El cálculo de la DTC, se obtuvo mediante la solución de la ecuación de Stokes, por lo que, el tiempo de análisis fue corto. Al final, se presentaron validaciones con mediciones realizadas en un equipo especializado MasterSizer 2000® de Malvern Instruments, arrojando errores en el rango de 0.55 – 1.75 % y tiempos de medición de 50 – 100 s, lo que permitió confirmar que la técnica establecida cuantifica la DTC satisfactoriamente.

Galicia (2017), determinó la curva de solubilidad y la línea intermedia del soluto en agua en la cristalización por enfriamiento de Reb A para el incremento del tamaño de cristal  $D(2,1)$ ,  $D(3,2)$  y masa de cristal formada, como un posible edulcorante sustituto de la sacarosa, obteniendo una condición de temperatura para la cristalización de 60 a 10 °C.

Sánchez y Bolaños (2017), llevaron a cabo un estudio comparativo de técnicas para la cuantificación de distribución de tamaño de cristal (DTC) en % volumen por medio de adquisición de imágenes. Ésta técnica se fundamenta en la construcción de la curva de distribución log-normal característica de los volúmenes de los cristales y la segunda técnica en un algoritmo con cálculos simplificados.

Los resultados comprueban que las dos técnicas de cuantificación de DTC en % volumen mediante adquisición de imágenes generaron errores menores al 5 % y pueden ser utilizadas con confiabilidad para la cuantificación en pseudolínea de DTC de cristales, sin error significativo entre ambas, pero si una reducción del tiempo de procesamiento del 50 %.

Bolaños *et al.*, (2019a), emplearon la técnica de adquisición de imágenes a través de la generación de secuencias micrográficas de los núcleos cristalinos visibles a una temperatura de saturación, permitiendo conocer los puntos críticos que limitan una zona de concentración para la cristalización de Reb A en la mezcla de etanol-agua. El rango de temperatura viable para su cristalización fue de 60 a 10 °C, generando una mayor concentración y máxima solubilidad del soluto. A partir de las curvas de solubilidad para las mezclas de Reb A-etanol-agua (55-45 y 65-35 % v/v), con velocidad de agitación de 100 rpm y tiempo de enfriamiento de 60 min, se determinó la amplitud de sus zonas de concentración. Concluyendo que la curva de mayor amplitud que favorece la masa y tamaño de producto formado de rebaudiósido A puro, fue la mezcla de etanol-agua con 65-35 % v/v.

Bolaños *et al.*, (2019b), desarrollaron interfaces gráficas diseñadas en LabVIEW 2017 para el estudio de perfiles de transmisión-extinción a partir de velocidades de sedimentación para la determinación de tamaño de partícula, en conjunto con las funciones del módulo de comunicaciones NI-Visa y funciones JULABO. Las interfaces desarrolladas lograron la integración de los dispositivos de medición a una corrida experimental de un cristizador por lotes, que requiere del seguimiento en pseudolínea del tamaño de la partícula del cristal formado. La mezcla empleada para medir velocidades de sedimentación y efectuar el cálculo de tamaño de partícula fue una solución saturada de azúcar en agua tridestilada (53.6 mL de agua y 154.4 g de azúcar a 60 °C).

### 1.3 Edulcorante

Generalmente suele denominarse “edulcorante” al aditivo alimentario que puede reproducir el efecto dulce del azúcar y que, suele aportar menos energía. “Varios de ellos son extractos naturales en tanto que otros son sintéticos, en este último caso frecuentemente se le denominan edulcorantes artificiales” (García *et al.*, 2013).

#### 1.3.1 Clasificación

Referente a su clasificación global, ante la gran variedad de edulcorantes existentes, los edulcorantes se pueden agrupar en torno a su contenido calórico (calóricos o no calóricos), en función de su origen (natural o artificial) o incluso respecto a su estructura química (García *et al.*, 2013).

La clasificación actual de los principales edulcorantes se presenta en la Tabla 1.1

Tabla 1. 1 Clasificación de edulcorantes

Calóricos	Naturales	Azúcares	Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa y trehalosa, tagatosa. Sucromalat*
		Edulcorantes naturales calóricos	Miel, jarabe de arce, azúcar de palma o de coco y jarabe de sorgo
	Artificiales	Azúcares modificados	Jarabe de maíz de alto fructosa, caramelo, azúcar invertido
		Alcoholes del azúcar	Sorbitol, xilitol, manitol, eritritol maltitol, isomaltulosa, lactitol, glicerol
No calóricos	Naturales	Edulcorantes naturales sin calorías	Luo Han Guo, stevia, taumatina, pentadina, monelina, brazzeína
	Artificiales	Edulcorantes artificiales	Aspartamo, sucralosa, sacarina, neotamo, acesulfame K, ciclamato, neohesperidina DC, alitamo, advantamo
Fuente: (García <i>et al.</i> , 2013). *Valor calórico similar a la fructosa, si bien realmente se trata de un oligosacárido artificial.			

#### 1.4 *Stevia rebaudiana* Bertoni

La *Stevia* es una planta herbácea de la familia de los crisantemos (Figura 1.1). La planta de nombre científico *Stevia rebaudiana* Bertoni es famosa por su gran dulzura debida al contenido de glucósidos de esteviol, que están clasificados como aditivos alimentarios con el número E960 en la Unión Europea.

Proviene del nordeste de Paraguay en la región de la Cordillera de Amambay, donde todavía se encuentra en estado silvestre. También conocida como “hierba dulce” debe su nombre al botánico y médico español Pedro Jaime Esteve, quien fue el primero en investigar la *Stevia* como edulcorante natural.

El nombre completo de la planta se refiere a Moisés Santiago Bertoni, quien fue el primero en describir este espécimen oficialmente en Paraguay en 1899. En 1970, la *Stevia* se introdujo comercialmente en el mercado en Japón como edulcorante (Jakub y Zbigniew, 2019).



Figura 1. 1 Planta *Stevia*: a) arbusto y hojas y b) flores (Galicia, 2017)

En las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae) se acumulan grandes concentraciones de glucósidos de esteviol, incluidos el Esteviósido (4–20 %), el Rebaudiósido A (1–3 %) y otros glucósidos de esteviol menores (<0.1 %). Estos

glucósidos de esteviol son 200–300 veces más dulces que el azúcar de caña con buena biocompatibilidad.

Estos diterpenoides también muestran una amplia actividad terapéutica, ya que el consumo regular de glucósidos de esteviol disminuye los niveles de azúcar y colesterol en la sangre, suprime el crecimiento neoplásico, mejora la regeneración celular y fortalece los vasos sanguíneos (Adari *et al.*, 2016). La taxonomía de la planta de *Stevia* se presenta en la Tabla 1.2

Tabla 1. 2 Taxonomía de la *Stevia Rebaudiana* Bertoni

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Género	<i>Stevia</i>
Especie	<i>S. Rebaudiana</i> Bertoni
Fuente: (Esmat <i>et al.</i> , 2010 citado por Galicia, 2017).	

#### 1.4.1 Composición

Los glucósidos de esteviol son el principio dulce de la *Stevia* y aproximadamente componen el 10 % - 20 % del peso seco total. Éstos se encuentran en porcentajes variables en las hojas de la planta (Tabla 1.3). Los glucósidos de esteviol consisten en una mezcla de compuestos que contienen un esqueleto de esteviol conjugado a cualquier número o combinación de los principales restos de azúcar en cualquiera de

las orientaciones que se producen en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, incluyendo glucosa, ramnosa, xilosa, fructosa y desoxiglucosa (JECFA, 2016).

Tabla 1. 3 Glucósidos dulces en las hojas de Stevia

Glucósidos	Contenido en % de las hojas en peso seco		
Esteviósido	5.8 ± 1.3	9.1	5 – 10
Rebaudiósido A	1.8 ± 0.2	3.8	2 – 4
Rebaudiósido C	1.3 ± 0.4	0.6	1 – 2
Dulcósido	ND	0.3	0.4 – 0.7
Fuente: Tomado y adaptado de Salvador <i>et al.</i> , (2014); Gardana <i>et al.</i> , (2003), Goyal <i>et al.</i> , (2010)			

Los glucósidos de esteviol no se acumulan en el cuerpo y tienen numerosas propiedades promotoras de la salud, ya que exhiben efectos antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, anticánceres, hipotensivos o hipoglucémicos (Harriet, 2004).

Se ha aislado un total de 8 glucósidos de esteviol diterpenoides identificados como esteviósido, rebaudiósido A, B, C, D y E, dulcósido A a partir de este extracto, que consiste en un polvo blanco-amarillo obtenido después de procesar las hojas secas por métodos fisicoquímicos (Vázquez *et al.*, 2018). Desde 1990, un gran número de países han sido incluidos como productores de stevia, como China, India, Brasil, Corea, México, Estados Unidos, Indonesia, Tanzania y Canadá (Martines *et al.*, 2016).

En la Tabla 1.4 se muestra el punto de fusión comparativo, la rotación específica, el peso molecular y el porcentaje de solubilidad en agua para los ocho glucósidos de diterpeno dulces de las hojas de *Stevia rebaudiana*.

El Reb A { Mp 242–244 ° C;  $[\alpha]_D^{24}$  -20,8 ° (c 0,84, MeOH)  $C_{44}H_{70}O_{23}$ ; peso molecular de 966}, el segundo glucósido de diterpeno dulce más abundante en las hojas de *Stevia rebaudiana*, debido a que contiene una unidad de glucosa adicional en su

molécula, es considerablemente más soluble en agua que el esteviósido (Douglas, 2002).

Tabla 1. 4 Datos físicos y de solubilidad de glucósidos de esteviol

Componente	Mp(°C)	Rotación específica $[\alpha]_D^{25}$ (grado)	Peso molecular	Solubilidad en agua (%)
Steviosido	196-198	-39.3	804	0.13
Rebaudiosido A	242-244	-20.8	966	0.80
Rebaudiosido B	193-195	-45.4	804	0.10
Rebaudiosido C	215-217	-29.9	958	0.21
Rebaudiosido D	283-286	-22.7	1128	1.00
Rebaudiosido E	205-207	-34.2	966	1.70
Esteviolbiosido	188-192	-34.5	642	0.03
Dulcosido A	193-195	-50.2	788	0.58
Fuentes: Datos tomados de Kinghorn <i>et al.</i> , (1985), Crammer e Ikan (1987) y Phillips (1987). Citado por (Douglas, 2002).				

#### 1.4.2 Rebaudiósido A

El Rebaudiósido A (Reb A) es el segundo glucósido de diterpeno dulce más abundante (1–3 %) presente en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, y actualmente se le considera una alternativa como sustituto de la sacarosa debido a sus agradables propiedades organolépticas y beneficios para la salud asociados. El Reb A, contiene una unidad de glucosa en la posición C-13 extra en comparativa con el esteviósido, cuenta con propiedades superiores en términos de dulzura y perfil de sabor, por lo cual es un elemento potencialmente importante en las hojas de Stevia (Adari *et al.*, 2016).

Varios estudios han comprobado sus propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antihipertensivas, anticancerígenas y reductoras de la glucosa en sangre (Vázquez *et*

*al.*, 2018). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha fijado la ingesta diaria aceptable (IDA) de glucósidos de esteviol en 0-4 mg/kg de peso corporal “correspondiente a una IDA de 12.15 mg/kg de peso corporal/día para el Reb A” (Jakub y Zbigniew, 2019).

Adicionalmente la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) reconoció la stevia como un suplemento dietético y recientemente otorgó al glucósido de esteviol el Reb A (generalmente reconocido como seguro) como edulcorante de uso general para alimentos y bebidas, en diciembre de 2008 (Ulbricht *et al.*, 2010).

### **1.5 Miel de abeja**

La miel es una sustancia dulce elaborada por abejas *Apis mellifera*, a base del néctar de las flores y demás secreciones extraflorales, las cuales liban, trasladan, transforman, mezclan con otras sustancias específicas propias, deshidratan, concentran y almacenan en panales para que madure y añeje (Codex Alimentarius, 2019).

Es una sustancia de origen natural, consistencia viscosa y de sabor dulce elaborada por las abejas melíferas, particularmente por la especie *Apis mellifera* y “es una fuente alterna para el azúcar” (Cortés *et al.*, 2011). Las abejas producen miel del néctar de las plantas, por acción de la invertasa. Los azúcares en la miel pueden no aparecer en el néctar, pero se desarrollan como resultado de las enzimas agregadas por la abeja durante la maduración de la miel o por acción química en la mezcla concentrada de azúcar ácido conocido como miel.

El azúcar invertido es obtenido de forma natural en la miel de abeja, razón por la cual dicho producto es sumamente dulce; también en los jugos de frutas con pH ácido y que sufren algún tratamiento térmico se distingue un ligero aumento de la dulzura, resultado de la hidrólisis de la sacarosa (Badui, 2006).

Atribuido a la presencia de componentes fenólicos, la miel presenta actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antiaterogénicas, antitrombóticas, inmunomoduladoras y analgésicas (Jabbar *et al.*, 2016).

### **1.5.1 Clasificación**

La composición química de la miel es variable y depende de las condiciones regionales y climáticas y del tipo de flores visitadas por las abejas, por lo tanto, su clasificación como unifloral o polifloral (Cortés *et al.*, 2011).

- Origen floral

La miel es un producto elaborado por las abejas de la especie *Apis mellifera* producida de las secreciones provenientes de plantas. La cual usualmente no contiene aditivos o preservativos. La composición química de la miel está íntimamente ligada al origen floral del néctar con el cual fue elaborada (Cuevas-Glory *et al.*, 2007 citado por Barojas, 2015).

- Mieles uniflorales

Son comúnmente utilizadas para la comercialización formal debido a su homogeneidad y presentación. Este tipo de miel es elaborada por las abejas utilizando el polen y néctar proveniente en su mayoría por un solo tipo de especie vegetal.

- Mieles poliflorales

Es elaborado de néctar y polen proveniente de dos o más especies vegetales. Dándole propiedades poco homogéneas y es usualmente utilizado para la comercialización tradicional en mercados y plazas (Alfaro, 2010 citado por Barojas, 2015).

### **1.5.2 Composición**

La dextrosa y la levulosa son azúcares que se encuentran principalmente en la miel, son azúcares simples, o monosacáridos, y son los componentes básicos de los

azúcares. Los azúcares de la miel son de una mezcla simple de dextrosa, levulosa y sacarosa y un material de carbohidratos definido llamados "dextrina de miel" (Rajalakshmi *et al.*, 2017). La Tabla 1.5 muestra los valores numéricos en porcentaje respecto al contenido de sus componentes.

La composición promedio de la miel se encuentra de la siguiente manera fructosa (38.19 %), glucosa (31.28 %), maltosa (7.97 %), sacarosa (4.5 %), azúcares superiores (0.86 %), agua (17.2 %) y algunos minerales traza (Rajalakshmi *et al.*, 2017).

Tabla 1. 5 Composición química de la miel de abeja

Componente	Rango	Contenido típico
Agua	14 – 22 %	17 %
Fructosa	28 – 44 %	38 %
Glucosa	22 – 40 %	31 %
Sacarosa		4 %
Maltosa		7.5 %
Otros azúcares	0.1 – 8 %	5 %
Proteínas y aminoácidos	0.2 – 2 %	
Vitaminas, enzimas, hormonas, ácidos orgánicos otros	0.5 – 1 %	
minerales	0.5 – 1.5 %	
cenizas	0.2 – 1.0 %	
Fuente: (CODEX STAN- 1 -2007 Miel de abeja citado por Ríos, 2010).		

Dentro de los monosacáridos, la fructosa es el carbohidrato que se encuentra en mayor porcentaje, lo que convierte a la miel de néctar en una solución de azúcares levorrotatorios. El ángulo de rotación específica es el resultado de los diferentes ángulos de rotación de los azúcares que existen en la miel; y dado que, la glucosa y la fructosa son los carbohidratos predominantes, este ángulo se encuentra sujeto por la cantidad presente de estos dos compuestos.

### 1.5.3 Constituyentes minoritarios

Constan de menos del 1.5 % sobre la materia seca.

**Ácidos orgánicos (0.6 %):** ácidos glucónico (principal), butírico, acético, láctico, cítrico, fórmico (también presente en el veneno de las abejas), málico, piroglutámico y succínico. Estos ácidos otorgan a la miel un pH ácido, entre 3.4 y 6.1.

**Compuestos nitrogenados (0.4 %):** proteínas (0.3 %), aminoácidos (0.05-0.1 %) (Principalmente prolina), enzimas (amilasa, glucooxidasa).

**Minerales (0.1 %):** mayoritariamente potasio (0.05 %), fósforo (0.005 %), calcio (0.0048 %), sodio (0.0029 %) y magnesio (0.002 %) (Ríos, 2010).

### 1.5.4 Características fisicoquímicas

Las características fisicoquímicas de la miel varían de acuerdo a su origen floral, región, temporada, especie, etc. Los parámetros que comúnmente determina la calidad de la miel son la acidez, cuantificada en mili equivalente de ácido gluónico por kilogramo de miel, pH, el cual debe estar dentro de un rango de 3 a 4.5. Enzimas, las cuales determinan el grado de madurez de la miel entre las cuales destacan la glucosoxidasa. Diastasa ( $\alpha$ - y  $\beta$ - amilasa) e invertaza, minerales o cenizas con un promedio de 1.7 % de humedad el cual debe estar abajo del 20 %.

Hidroximetilfurfural demuestra el grado de frescura de la miel, este aumenta con el calor por lo cual también es un indicador para mieles tratadas térmicamente. Densidad, la cual debe estar entre el 1.39 y 1.44 g/cm<sup>3</sup> y propiedades organolépticas como color, textura y aroma (Luna, 2012 citado por Barojas, 2015).

Según la norma CODEX STAN 12-1981 (Codex Alimentarius, 2019), el contenido de agua de la miel es la medida más importante para evaluar la madurez y la vida útil y está directamente relacionado con la calidad de la miel. Con un contenido de agua de más del 18 % una miel puede verse afectada por la fermentación.

## 1.6 Fructuosa

La fructosa se encuentra principalmente en jugos de diversas frutas y en las mieles; se genera en cantidades equimoleculares con glucosa, cuando se hidroliza la sacarosa. En cantidades semejantes, es más dulce que la glucosa o la sacarosa y, por ello, se usa usualmente como edulcorante. La fructosa es un azúcar reductor y, debido a que la fructosa es altamente levorrotatorio, se le identifica con el nombre de levulosa (Badui, 2006). La rotación específica de fructosa medida a temperaturas de 0 a 90 °C y para concentraciones del 5 al 40 % se muestra en la Tabla 1.6.

La fructosa posee un índice glucémico más bajo en comparación con la glucosa, no produce una respuesta de la insulina, y tiene una capacidad como edulcorante un tanto mayor (Carvallo *et al.*, 2019). “Dispone de una absorción restringida en el intestino delgado; se ha evaluado que la mitad de la población no podría exponerse a una cantidad de consumo de fructosa superior a 25 g” (Riveros *et al.*, 2014).

Tabla 1. 6 Rotación Específica de la Fructosa

T (°C)	Concentración (%)					
	5	10	15	20	30	40
0	-103.25	-104.09	-104.87	-105.27	-106.63	-108.19
10	-98.49	-98.57	-99.52	-100.22	-101.36	-102.85
15	-95.49	-95.99	-96.95	-97.34	-98.51	-100.08
20	-92.49	-93.17	-93.72	-94.37	-95.66	-97.11
25	-89.53	-90.02	-90.76	-91.42	-92.78	-94.09
30	-86.69	-87.24	-87.70	-88.43	-89.62	-91.08
40	-80.62	-81.20	-81.73	-82.41	-83.65	-84.95
50	-74.57	-75.33	-75.88	-76.33	-77.54	-78.73
60	-68.63	-69.27	-69.86	-70.58	-71.53	-72.82
70		-63.50	-64.00	-64.44	-65.67	-66.92
80		-57.62	-58.26	-58.81	-59.82	-61.00
90		-51.75		-52.74		-55.41
Fuente: (Tsuzuk <i>et al.</i> , 1950).						

### 1.6.1 Obtención de fructosa a partir de la sacarosa (Azúcar invertido)

La sacarosa ( $\beta$ -D-fructofuranosil- $\alpha$ -D-glucopiranososa) (Figura 1.2) comúnmente denominada azúcar de mesa, es el edulcorante más conocido en la industria y el hogar. Es un disacárido compuesto de glucosa y fructosa, extraído de la caña de azúcar y de la remolacha. Posee una fórmula molecular de  $C_{12}H_{22}O_{11}$  y peso molecular de 342.29 g/mol (Badui, 2006).

Desde el punto de vista en lo que concierne a nutrición, el problema del azúcar consiste en que, por tratarse de una sustancia químicamente pura no contiene más que azúcar. De hecho, carece de otros nutrientes como las proteínas, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales, que son indispensables para nuestra nutrición (Sánchez, 2014).

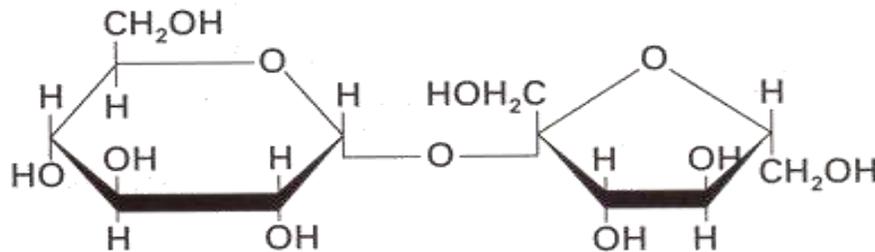


Figura 1. 2 Estructura molecular de la sacarosa

Fuente: (Sánchez, 2014).

La mezcla de azúcares producida cuando la sacarosa se hidroliza química o enzimáticamente (el uso de una invertasa), se conoce como azúcar invertido. La palabra “invertido” se refiere básicamente al cambio del poder rotatorio que obedece durante la hidrólisis: la sacarosa es dextrorrotatoria ( $+66^\circ$ ), pero cuando se convierte en glucosa ( $+52^\circ$ ) y en fructosa ( $-92^\circ$ ), la mezcla resultante impulsa una fuerza levorrotatoria ( $-20^\circ$ ) debido a la fuerte influencia de la fructosa. La glucosa es dextrorrotatoria (esto es, sobre el plano de la luz polarizada gira a la derecha) y también se le identifica con el nombre de dextrosa (Badui, 2006).

## 1.7 Métodos cuantitativos

### 1.7.1 Polarimetría

La polarimetría es una técnica en la que se puede distinguir entre isómeros ópticamente activos calculando la rotación óptica de una sustancia; también es un criterio esencial para la pureza e identidad enantiomérica, pudiendo aplicarse con fines cuantitativos.

Las sustancias que giran la luz en el sentido de las agujas del reloj son dextrógiras o isómeros ópticos (+), por otro lado, las que giran la luz en la dirección contraria son levógiras o isómeros ópticos (-). (Los símbolos d- y l- que se usaban anteriormente para denotar isómeros dextro- y levo no se utilizan, debido a la confusión con los símbolos D- y L- que hace referencia a las configuraciones relacionadas con el D-gliceraldehído (Urrego,2017).

### 1.7.2 Rotación Óptica

El fundamento de este método se basa en la medición de la rotación angular ( $\alpha$ ) del plano de polarización de la luz polarizada generada por sustancias ópticamente activas, particularmente los hidratos de carbono.

Los principales factores de los que depende la rotación angular son:

- Concentración de azúcar (sobre todo si se trata de glucosa o azúcar invertido)
- Solvente (si la medición no se realiza en solución acuosa debe aclararse).
- Otras sustancias disueltas como por ejemplo, sales.
- Temperatura.
- Mutarrotación.
- Longitud del tubo.

Es un fenómeno tiende a suceder en aquellas soluciones que tienen moléculas quirales tal como la sacarosa (azúcar), este distintivo es utilizada en la industria que la produce

para medir la concentración de azúcar en los siropes. Este parámetro suele ser empleado en la industria mielera para realizar diferenciaciones de las mieles originarias de néctar, que suelen tener un comportamiento levógiro de las mieles que se obtienen de mielada que poseen un comportamiento dextrógiro (Urrego, 2017).

### 1.7.3 Espectrofotometría UV

El método por espectrofotometría UV hace referencia al uso de la luz para determinar las concentraciones de ciertas sustancias químicas. Para que sea posible la medición de dicho fenómeno, se debe considerar la concentración de las especies absorbentes dado a que esta es proporcional a la absorbancia según la ley de Lambert-Beer (Ec 1.1).

$$A = e * b * c \quad (1.1)$$

Donde **A** es la absorbancia (magnitud adimensional), **e** representa el coeficiente de proporcionalidad denominado coeficiente de extinción molar, el cual indica la absorbancia de una determinada sustancia a una longitud de onda dada y se expresa en  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ , **b** es el ancho o espesor de la celda donde se deposita la muestra y se expresa en cm y **c** es la concentración expresada en moles / Litro (M) (Cristancho y Monroy, 2014).

### 1.7.4 Espectroscopia infrarroja (FTIR)

La espectroscopia FTIR es una técnica analítica rápida que proporciona información de manera cuantitativa y cualitativa útil a partir de muestras sólidas, líquidas y gaseosas y tiene un gran potencial para la elucidación de estructuras moleculares. El espectro infrarrojo de una molécula poliatómica está fundamentado en las vibraciones moleculares y la energía para crear esas vibraciones necesita de la masa relativa de cada parte de la molécula (a mayor masa requerirá forzosamente más energía) y de la longitud del enlace y puede medirse en la modalidad de transmisión o de reflectancia, siendo más popular la primera de ellas. La absorción de radiación es el producto de los cambios energéticos que se generan durante las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales a otros. Como resultado, el

espectro infrarrojo completo de un compuesto orgánico dona una huella dactilar original, sencillamente reconocible del patrón de absorción infrarroja de otros compuestos, incluidos los isómeros. Además, la intensidad de la absorción es proporcional a la concentración de la especie absorbente (similar a la ley de Lambert-Beer), por lo que el análisis cuantitativo, que se ha desarrollado considerablemente durante los últimos años es permisible.

La región del infrarrojo del espectro que corresponden a longitudes de onda de 0,78 a 1000  $\mu\text{m}$ , abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12.800 y 10  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro infrarrojo está dividido en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (12.800-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), medio (4000-200  $\text{cm}^{-1}$ ) y lejano (200-10  $\text{cm}^{-1}$ ). De acuerdo en la bibliografía, las regiones del infrarrojo medio y cercano han sido las más utilizadas (Tewari et.al, 2004 citado por Ríos, 2010).

## **1.8 Cristalización**

El proceso de separación sólido-líquido en el cual ocurre una transferencia de masa de un soluto de la solución líquida a una fase cristalina sólida pura, se le denomina cristalización. En dicho proceso generalmente la solución se concentra y se enfría hasta que la concentración del soluto es superior a su solubilidad a dicha temperatura. En cuanto a su operación, los cristalizadores se clasifican en continuos y por lotes (Geankoplis, 2006).

### **1.8.1 Fundamentos teóricos de la cristalización**

La cristalización está fundamentada en cierto conceptos básicos como la sobresaturación, crecimiento y nucleación de los cristales, el número de cristales dentro de la mezcla en equilibrio, el tamaño y distribución de los cristales, las condiciones de temperatura y concentración, en las cuales es factible la cristalización; así como algunos métodos para propiciar la cristalización (Barojas, 2015).

La sobresaturación es el potencial impulsor para que suceda la nucleación y/o el crecimiento del cristal, la cual es función de la temperatura de enfriamiento.

La sobresaturación puede ser alcanzada por diferentes maneras:

- Por enfriamiento de una solución (Cristalización por enfriamiento).
- Por evaporación de solventes (Cristalización por evaporación).
- Por adición de otra sustancia (Cristalización con agente de desplazamiento)
- Por reacción química (Cristalización por congelamiento)
- Por combinación de técnicas (Cristalización por combinación)

### 1.8.2 Saturación y Sobresaturación

La cifra de colisiones entre unidades elementales (átomos, iones, moléculas) en la fase fluida o en la interface de la fase cristalina del soluto, está en dependencia del número de unidades por unidad de volumen de la fase líquida. Presenta un equilibrio termodinámico, una fase fluida saturada que tiene concentración  $C^*$  o  $\rho^*$  con una fase sólida, a una temperatura pertinente. Cuando la solución es líquida, la concentración de saturación depende intensamente de la temperatura y solo ligeramente de la presión. Se dice que una fase fluida esta sobresaturada o supersaturada si posee más unidades que  $C^*$ .

El proceso de cristalización únicamente puede ocurrir en fases sobresaturadas y la velocidad de cristalización está definida por el grado de sobresaturación. La sobresaturación es expresada como una diferencia en concentración (Ec 1.2 y Ec 1.3):

$$\Delta C = C - C^* \quad (1.2)$$

$$\Delta \rho = \rho - \rho^* \quad (1.3)$$

O como sobresaturación relativa (Ec 1.4 y Ec 1.5):

$$S_r = \frac{C - C^*}{C^*} \quad (1.4)$$

$$\sigma = \frac{\Delta C}{C^*} = \frac{\Delta \rho}{\rho^*} \quad (1.5)$$

En el caso de que la concentración de soluto en la solución sea menor que la concentración de saturación, se producirá el fenómeno inverso a la cristalización, la dilución (Aguilar y Román, 2006 citado por Barojas, 2015).

La interacción de las velocidades de nucleación y crecimiento determinan la cristalización, y el proceso global es cinéticamente complicado. Para ambas velocidades, el potencial impulsor es la sobresaturación y en una disolución no saturada o insaturada no puede ocurrir ni nucleación ni crecimiento (McCabe *et al.*, 2007 citado por Barojas, 2015).

### **1.8.3 Curvas de solubilidad**

A menudo, el balance entre el soluto y el solvente es descrito a través de la curva de solubilidad y representa las condiciones bajo las cuales los cristales y el licor madre coexisten en un equilibrio termodinámico. Dichas curvas, representan el punto de saturación máximo puede tolerar el sistema en el cual la nucleación empieza a presentarse de manera espontánea. Las curvas de solubilidad, para un sistema dado son definibles y reproducibles.

La concentración de saturación en un solvente es alcanzada experimentalmente por la determinación de la máxima cantidad de soluto que es soluble a determinada temperatura donde, la solubilidad frecuentemente se incrementa con esta última (Aguilar y Román, 2006).

### **1.8.4 Ventajas de la cristalización por lotes (batch)**

La cristalización batch es una operación unitaria extensamente usada, a través de la cual es posible generar cristales partiendo de una solución sobresaturada. Dentro de las ventajas que brinda, está la de ser un mecanismo de separación que posibilita la obtención de productos de elevada pureza a partir de soluciones relativamente

impuras, empleando consumos de energía bajos y proporcionando una apariencia del producto final atractiva (Bolaños *et al.*, 2016).

La cristalización por lotes tiene como principal objetivo producir una DTC uniforme y reproducible, en donde se desean obtener tamaños de cristal grandes con angosta DTC, para facilitar las operaciones posteriores, como lo es el lavado, el filtrado y el secado (Sánchez *et al.*, (2015).

La calidad del producto cristalino está en función de la distribución del tamaño de cristal (DTC) y la masa del cristal formado (MCF), estos parámetros están sujetos a las cinéticas de cristalización, nucleación y crecimiento (Bolaños *et al.*, 2016).

### **1.9 Distribución de tamaño de cristal (DTC)**

La DTC es la forma en como los cristales están presentes en el proceso de separación. Es el aspecto más importante a analizar puesto que, si existe una buena distribución de tamaño de cristal, se puede alcanzar un mejor producto en términos de pureza, tamaño de cristal y rendimiento. “Obtener una DTC específica es de suma importancia por ello, se debe controlar la sobresaturación (en la primera zona metaestable), ya que es el prerrequisito para la nucleación y el crecimiento del producto cristalino” (Bolaños, 2000). Lo anterior mencionado puede lograrse a través de cambios programados en la temperatura de enfriamiento, presión de vacío, velocidad de agitación y sembrado de cristales, entre otros (Bolaños, 2000).

La DTC es de fundamental importancia ya que influye en el rendimiento de las operaciones posteriores, por ejemplo: filtración (separación), secado, transporte y almacenaje, así como la calidad del producto cristalino, la cual es determinada por el diámetro promedio del cristal en % longitud  $D(2,1)$  y su desviación estándar en % longitud  $S(2,1)$ . La DTC es fuertemente afectada por la  $D(2,1)$  y  $S(2,1)$  de la semilla empleada al inicio del lote (Sánchez *et al.*, 2015).

### 1.9.1 Antecedentes en el control de la DTC

La cristalización batch es ampliamente utilizada en la industria química, donde se tiene por objetivo obtener una producción de materiales con una pureza y una determinada distribución de tamaño de cristal. Si una DTC no es aceptable y no se tiene una pureza estándar en los productos, la operación tendrá que sufrir nuevas etapas de procesamiento, tales como molienda o recristalización, causando un aumento en el costo de producción.

Los cristalizadores batch trabajan de manera transiente y por ello, la sobresaturación y otras variables del proceso varían significativamente. En los cristalizadores batch, el control de la DTC es establecido de varias formas: (Bolaños, 2000).

- Sembrado con una distribución reducida de cristales.
- Disolución de finos, adición de reactantes.
- Enfriamiento óptimo para formar una sobresaturación constante.
- Mezclado mejorado en niveles macro y micro molecular.

### 1.9.2 Técnicas para medición de la DTC

Normalmente la cuantificación de la DTC puede ser determinada en equipos especializados mediante técnicas de análisis de imágenes, difracción laser, dispersión dinámica de luz y espectroscopia ultrasónica. Dichas técnicas han permitido cuantificar adecuadamente la DTC de dispersiones de partículas con concentraciones medias y bajas. Por otro lado, los costos de operación y mantenimiento son muy elevados y requieren de un gran tiempo para la obtención de los resultados, por ejemplo en el análisis de imágenes.

El estudio de la velocidad de sedimentación es una técnica alternativa que ha dado resultados favorables para la determinación de la DTC en suspensiones. Dicha técnica puede emplearse mediante la obtención de perfiles de transmisión-extinción (%) y luego aplicar la técnica de seguimiento de interfaz, la cual define como una función

dependiente del tiempo el movimiento entre la fase dispersa (partículas) y la fase continua (líquido).

La sedimentación aumenta la posición absoluta de la frontera entre fase dispersa y continua, lo que permite calcular la velocidad de sedimentación. La ecuación de la ley de Stokes se puede emplear para calcular el tamaño promedio de las partículas (Sánchez *et al.*, 2015).

### **1.9.3 Control de Distribución del Tamaño de Cristal (DTC)**

Para lograr una DTC definida se pueden examinar estrategias de control que posibiliten manipular ciertas variables por ejemplo, el flujo de la corriente de alimentación, la temperatura de alimentación, etc. Evidentemente, la DTC se ve influenciada por la temperatura a la cual es operado el cristalizador, puesto que, la temperatura del cristalizador influye al grado de sobresaturación y las velocidades de nucleación y crecimiento.

Para crear un control sobre la DTC, se necesita que las especificaciones de los productos, estén dirigidas hacia la minimización de la nucleación espontánea y al incremento del tamaño del cristal, puesto que la DTC y la Masa de Cristal Formado (MCF) son producto de la interacción entre los fenómenos de nucleación y crecimiento de cristales. Por lo que, “es muy importante controlar la velocidad de agitación ya que ésta variable afecta directamente a las velocidades de nucleación y crecimiento” (Bolaños, 2000).

### **1.9.4 Trayectoria óptima de enfriamiento**

La velocidad de enfriamiento en el cristalizador influye sobre la producción de la sobresaturación. Se han notado significativas mejoras en la DTC cuando se ha implementado una velocidad de enfriamiento óptima en contraste con una velocidad de enfriamiento lineal o natural (Mersmann 1995 citado por Bolaños, 2000).

En el perfil de enfriamiento natural, se utiliza una temperatura de enfriamiento constante en todo el lote. Al principio, cuando la diferencia de temperatura entre el medio enfriante y la solución es la más grande, la sobresaturación excederá el límite metaestable y se presentará una nucleación espontánea, dejando una DTC indeseable, pérdida de producto y un incremento en el tiempo de ciclo de limpieza (Rawlings *et al.* 1993 citado por Bolaños, 2000). La Figura 1.3 ilustra los perfiles de enfriamiento y de sobresaturación para un cristalizador batch, considerando una velocidad de agitación constante en el sistema.

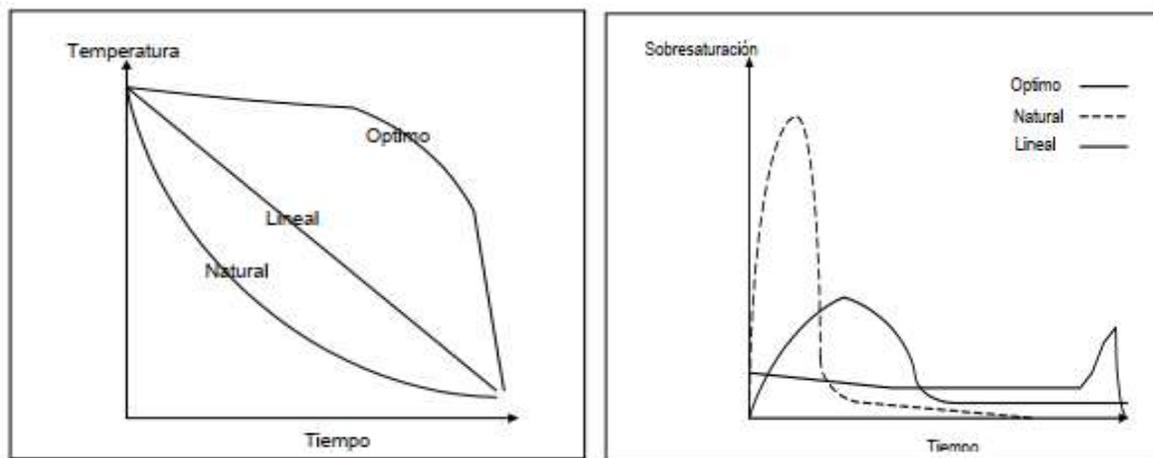


Figura 1. 3 Perfiles de enfriamiento y de sobresaturación en un cristalizador batch

Fuente: (Bolaños, 2000)

Considerando una velocidad de agitación constante, con el perfil de enfriamiento óptimo (también llamado cúbico), se forma una mínima cantidad de núcleos en el sistema. Esto permite un amplio gradiente de sobresaturación en la fase final del proceso, lo que beneficia el crecimiento de los cristales (Bolaños, 2000).

### 1.10 Masa de Cristal Formado (MCF)

La masa de cristal formada (MCF) es un parámetro de rendimiento usado en el proceso de cristalización por lotes la cual depende de la trayectoria de enfriamiento, las propiedades de la semilla introducida en el cristalizador por lotes y el perfil de presión

de vacío. La DTC y MCF están en función de los fenómenos fisicoquímicos tales como la nucleación, el crecimiento y aglomeración de cristales que surgen debido a la presencia de una fase continua y una fase dispersa (Bolaños *et al.*, 2016).

### **1.11 Factores influyentes en el proceso de cristalización**

La distribución de tamaño de cristal está en función de las variables del sistema que producen efectos sobre ésta, tales como la temperatura de la solución, la concentración y la presión que exista en el sistema, además de la agitación. Si se alcanza un buen control de dichos parámetros, “se podrá alcanzar una distribución de cristal uniforme, lo que conllevará a obtener un producto (cristal) con una mayor pureza” (Bolaños *et al.*, 2017).

Las cinéticas de cristalización (nucleación y crecimiento) las cuales están delimitadas por la sobresaturación de la solución influyen sobre ciertos parámetros tales como, la calidad del producto cristalino el cual está determinada por la pureza, la distribución del tamaño de cristal (DTC) y por la masa del cristal formado (MCF) primordialmente. El proceso general de cristalización en una solución sobresaturada constituye de las etapas básicas de formación de núcleos (nucleación) y crecimiento de los cristales (Bolaños *et al.*, 2017).

### **1.12 Análisis de parámetros físicos y organolépticos**

#### **1.12.1 Análisis físicos**

El color es una propiedad física que determina la aceptación de los alimentos por los consumidores, es evaluado mediante la absorción selectiva de diferentes cantidades de longitud de onda dentro de la región visible (Rettig y Hen, 2014).

Un procedimiento fundamental para medir el color es el método instrumental, que consiste en el uso de técnicas en la que se mide la reflectancia o transmitancia de la muestra. La escala de color Hunterlab evoluciono de 1950 a 1960, basada en la teoría

de los colores opuestos. Esta teoría asume que los receptores en el ojo humano perciben el color como los pares de colores opuestos que se describen a continuación:

- Escala L: negro vs blanco, donde la escala va de 0 (color negro) a 100 (color blanco), los valores bajos (0-50) indican colores oscuros, y los valores altos (51-100) indican colores claros.
- Escala a: verde vs rojo, donde los valores negativos indican colores verdes, y los valores positivos indican colores rojos.
- La escala b: azul vs amarillo, donde los valores negativos indican colores azules y los valores positivos indican colores amarillos.
- La escala L representa la luminosidad y la escala a y b representa la cromaticidad. Son necesarios los tres valores para definir totalmente el color de un objeto (Rettig y Hen, 2014).

### **1.12.2 Análisis sensorial**

El análisis sensorial es una disciplina científica que posibilita evaluar, medir, analizar e interpretar las características sensoriales que posee un alimento (olor, color, textura y sabor) a través de uno o más órganos de los sentidos humanos. La prueba sensorial es un análisis subjetivo, puesto que el ser humano es el instrumento de medición, a menudo define el grado de aprobación o rechazo de un producto.

Cabe aclarar que ninguno de los métodos señalados anteriormente tiene mayor o menor importancia que los otros y todos llevan a cabo un gran papel en la decisión del valor de los alimentos. De esta forma, solo la información articulada y resultado de los métodos físico-químicos, sensoriales y microbiológicos puede proporcionar pruebas objetivas de la calidad global de un alimento (Ramírez, 2012).

### 1.13 Diseño de experimentos

El diseño experimental es un recurso importante en el entorno de la ingeniería para enriquecer el desempeño de un proceso de manufactura. Además, tiene múltiples aplicaciones en el desarrollo de procesos nuevos y perfeccionamiento de procesos.

Usualmente se define como diseño de experimento a la ejecución de una prueba o conjunto 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).

#### 1.13.1 Diseño factorial 2<sup>2</sup>

Los diseños factoriales son extensamente usados en pruebas en las que participan varios factores para analizar el impacto de éstos sobre una respuesta. En el diseño factorial se investigan todas las interacciones posibles 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<sup>2</sup> tiene dos factores (Factor A y Factor B) representados por el exponente, y estos a su vez, con dos niveles (alto y bajo), haciendo un total de cuatro combinaciones. El orden estándar de las combinaciones de tratamientos es (1), a, b y ab. En el presente diseño factorial los datos son insuficientes para calcular 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 (Ec 1.6):

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad \left\{ \begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, b \\ k = 1, 2, \dots, n \end{array} \right. \quad (1.6)$$

Donde  $\mu$  es el efecto medio general,  $\tau_i$  es el efecto del  $i$ -ésimo nivel del factor A de los renglones,  $\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo nivel del factor B de las columnas,  $(\tau\beta)_{ij}$  es el efecto de la interacción entre  $\tau_i$  y  $\beta_j$ , y  $\epsilon_{ijk}$  es el elemento del error aleatorio

que considera la replicación k-ésima. Al principio, se deduce que ambos factores son fijos y que los efectos de tratamiento se identifican como desviaciones de la media general (Montgomery, 2013).

Dentro del diseño factorial, los factores (o tratamientos) de los renglones y las columnas, A y B, son de igual interés. Teóricamente, el interés se encuentra en probar hipótesis sobre la igualdad de los efectos de los tratamientos de los renglones:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0 \quad (1.7)$$

$$H_1: \text{al menos una } \tau_i \neq 0 \quad (1.8)$$

Prueba de la equidad de los efectos de los tratamientos de las columnas:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_b = 0 \quad (1.9)$$

$$H_1: \text{al menos una } \beta_j \neq 0 \quad (1.10)$$

Evaluación de la interacción de los tratamientos de los renglones y las columnas interactúan:

$$H_0: (\tau\beta)_{ij} = 0 \text{ para todas las } i, j \quad (1.11)$$

$$H_1: \text{al menos una } (\tau\beta)_{ij} \neq 0 \quad (1.12)$$

Los efectos de los factores A y B, pueden tener un aporte negativo o positivo, esto está sujeto a, si existen diferencias significativas entre los niveles y si se busca mejorar la variable de respuesta (producción, rendimiento, resistencia, etc.) o disminuir la misma (tiempo, costo, etc.). El modelo de efectos fijos se emplea cuando el analista sugiere los niveles de los factores, en esta circunstancia se evalúan hipótesis acerca de los tratamientos, y las conclusiones se llevan a cabo solamente a los niveles de los factores tomados en cuenta en el análisis, es decir, las conclusiones no pueden aplicarse a tratamientos similares que no estuvieron contemplados específicamente (Montgomery, 2013).

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Metodología general

En la Figura 2.1 se describe de manera general las etapas del proceso completo que se seguirá a lo largo de esta investigación para obtener las condiciones de operación para el incremento del tamaño (DTC) y masa (MFC) de cristal formado mediante la cristalización de la mezcla Stevia (Reb A) – Azúcares levógiros. Dentro de los azúcares levógiros propuestos (fructosa proveniente de la hidrólisis enzimática de la sacarosa, fructosa pura y miel de abeja), se ha seleccionado la miel de abeja como complemento a la mezcla de Reb A-alcohol etílico-agua, en base a la justificación presentada en el apartado 2.6.

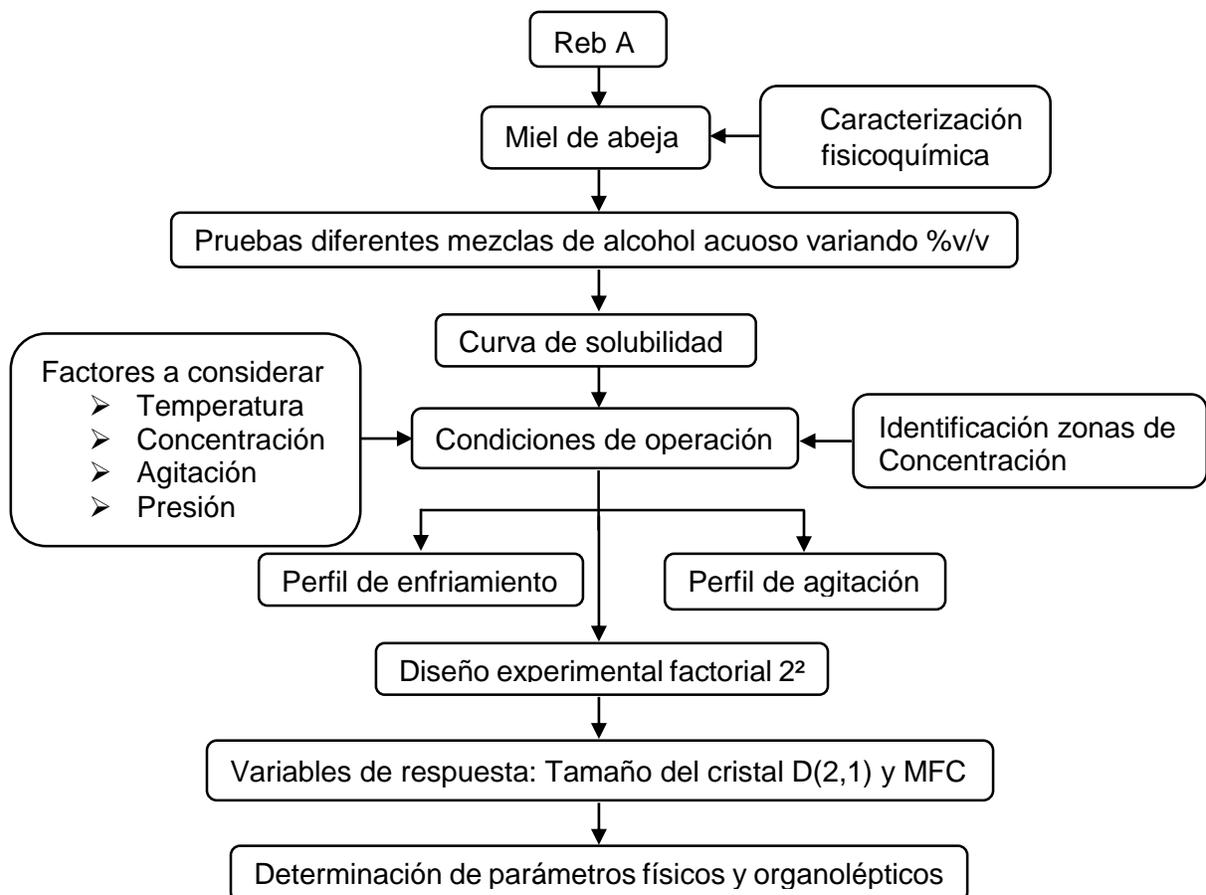


Figura 2. 1 Proceso de la cristalización de la Stevia (Reb A)-miel de abeja

## 2.2 Cristalizador de vidrio tipo Batch y enfriamiento a presión atmosférica

El equipo empleado para el desarrollo experimental es un cristalizador por lotes de vidrio tipo tanque agitado con chaqueta de calentamiento - enfriamiento aislado con dos capas de fibra de vidrio (Figura 2.2), dotado de un sistema de regulación de la velocidad de agitación (rpm) y dispositivos para adquirir la temperatura del interior y de la chaqueta (termopar tipo J).

El cristalizador se encuentra instalado en una estructura metálica anclada al suelo para evitar vibraciones que afecten la estructura del equipo y generen ruido en las mediciones.

El equipo cuenta con baño de recirculación programable marca JULABO modelo F34, motor de agitación acoplado a un variador de frecuencia Allen-Bradley para la regulación de la velocidad de agitación, medidor de concentración (densidad) y un sistema de adquisición de imágenes a través de un microscopio y una cámara digital de alta resolución.



Figura 2. 2 Cristalizador tipo batch

### 2.3 Sistema de adquisición de datos e imágenes

El microscopio óptico profesional Primo Star iLED modelo 37081 de la marca Carl Zeiss (Figura 2.3), tiene un diseño compacto. Dispone de un módulo de iluminación de lámpara halógena, indicadores de la intensidad luminosa en azul, iluminación LED, platina de movimientos en cruz 75x30 para manipulación desde la derecha/izquierda con sujetaobjetos, gran poder resolutivo de los objetivos con óptica corregida a infinito del tipo “Plan-ACHROMAT” con aumentos de 4x, 10x, 40x 100x/Oil (aplicaciones con aceite de inmersión) para campo oscuro, claro y contraste de fases en luz transmitida.

Está equipado con una cámara digital de microscopio de la marca Zeiss, modelo AxioCam ERc-5s, conectividad USB y HDMI, tiene un sensor Micron MT9P031 de 5 Mp tipo CMOS, sensibilidad espectral entre 400 y 700 nm y emplea el programa AxionVision, software predeterminado accesible para la adquisición, análisis, procesamiento y almacenamiento de imágenes.



Figura 2. 3 Microscopio óptico profesional Primo Star iLED

La metodología para la adquisición de las micrografías es la siguiente:

Se toma una muestra de solución empleando una manguera reforzada y se deposita sobre un portaobjetos. Dependiendo de la DTC esperada se emplea el objetivo de 4x o 10x. Cabe mencionar que es necesario e importante la toma de 10 imágenes de cristales de diferentes partes de la muestra, de esta manera se podrá obtener una buena distribución. Posteriormente, se realiza una medición manual de las áreas con ayuda del software Vision Assistant 2016 de National Instruments. Finalmente, se realiza la conversión de pixeles a micras empleando un factor de conversión calculado mediante cámara de Neubauer mejorada.

#### **2.4 Refractómetro automático**

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

Tiene una exactitud de 0.0001, el equipo cuenta con un rango de medición del IR de 1.3320 a 1.5320, para los °Brix y glucosa el límite de medición va de 0 a 95 % con una exactitud de 0.05 % y temperatura de operación de 10 a 40 °C, cuenta con un prisma de cristal de zafiro sintético resistente al rozamiento, el compartimiento de la muestra es de acero inoxidable y su recubrimiento de vitron. El volumen requerido de muestra es de 0.5 mL.

#### **2.5 Reb A**

La Stevia (Reb A) es un polvo cristalino color blanco con pureza del 95 % de la marca Stevia Bonda (Figura 2.4), presenta un olor agradable además es fácilmente soluble en agua y tiene un sabor dulce característico de los glucósidos extraídos de las hojas

de Stevia. Puede ser ingerido de manera segura por una persona, como niños, mujeres embarazadas, personas que padecen hipertensión y/o diabetes. Aporta un contenido energético de 0 kcal, proteínas, fibra dietética, grasas, colesterol y sodio de 0 g por un tamaño de porción de 1 g. Se emplea como endulzante de alimentos y bebidas. En la Tabla 2.1 se presentan las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del Reb A.



Figura 2. 4 Reb A

Tabla 2. 1 Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del Reb A

Propiedades fisicoquímicas	Propiedades microbiológicas
Humedad < 5 %	Coliformes totales < 10 ufc/g
Punto de Fusión 198 °C - 202 °C	Hongos y levaduras < 10 ufc/g
Cenizas < 2 %	<i>E. Coli.</i> Ausente
pH (1 % en solución) Entre 4.5 y 7.0	Salmonella en 25 g. Ausente
Metales pesados < 1 mg/Kg	
Plomo residual < 1 mg/Kg	
Arsénico residual < 1 mg/Kg	

## 2.6 Selección de la mezcla a emplear en la cristalización

Se eligió la miel de abeja como azúcar levógiro como complemento en la mezcla de Stevia Reb A –alcohol etílico –agua, por las siguientes razones:

- La miel es un producto alimenticio de alto valor nutricional, tiene un poder edulcorante, con virtudes dietéticas y terapéuticas
- El efecto que causa la miel ayuda a cristalizar mejor, ya que la miel tiene un comportamiento en la cristalización similar al de la Stevia.
- Las condiciones de operación de la miel son similares en el rango de cristalización de la Stevia.
- La miel cristaliza en el mismo sistema, con velocidades de agitación similares y ayuda a producir núcleos más rápido con forma de cristal definido sobre la que crece la stevia (Barojas, 2015).

Establecidas las razones se procedió a preparar y analizar las muestras de miel de abeja.

## **2.7 Análisis cualitativo por espectroscopia infrarroja (FTIR)**

Para tal determinación se empleó como muestra patrón la miel procedente del Colegio de Posgraduados, Córdoba (miel de referencia), de la cual se tiene control y estudios, se tiene la veracidad de que se trata de miel pura. Sin embargo, en el apartado 2.9 se valida mediante otras técnicas la calidad de la miel así como mieles procedentes de Álamo y Amatlán, las cuales fueron estudio del presente trabajo. Se comparó contra la muestra de miel de referencia, trátase de una miel de abeja virgen la cual se tiene control y, se midieron los espectros de las mieles y cualitativamente se observó si hubo un cambio. Si las muestras de miel (Miel de abeja de Álamo y Amatlán) se salen del patrón que lleva la muestra original de miel virgen (miel de referencia) se podrá ver de manera cualitativa si presentan una adulteración.

## **2.8 Preparación de las muestras**

Se recolectaron 3 muestras de miel de abeja directamente de apicultores de las zonas de Amatlán, Álamo y Córdoba en el estado de Veracruz.

Las muestras de miel se almacenaron sin refrigeración desde el momento de la recolección hasta que fueron analizadas. A cada muestra se le evaluó: pH, acidez libre, viscosidad, color, conductividad eléctrica, actividad de agua, humedad, °Brix, sacarosa, azúcares reductores, proteínas e hidroximetilfurfural. La Tabla 2.2 presenta la numeración asignada a cada miel de abeja, lugar de procedencia y fecha de obtención de las muestras de miel estudiadas en el presente trabajo de investigación.

Tabla 2. 2 Muestras de miel analizadas provenientes del estado de Veracruz

Muestras de Miel		
N° de muestra	Lugar de procedencia	Fecha
1	Amatlán	Enero/2021
2	Álamo	Marzo/2021
3	Córdoba	Marzo/2021

## 2.9 Características fisicoquímicas

La caracterización fisicoquímica en la miel suele realizarse para determinar la calidad de sus componentes. Para analizar la composición de la miel se emplearon parámetros establecidos por las normas (Codex Alimentarius, 2019) así, como los parámetros establecidos por las Normas Oficiales Mexicanas (PROY-NOM-004-SAG/GAN, 2018).

### 2.9.1 Medición de pH

La medición de pH se realizó según el método establecido por la AOAC (2005), donde se pesaron 10 g de miel a los que posteriormente se le adicionan 75 mL de agua destilada, se diluyen mediante agitación y se procede a medir el pH con un potenciómetro (Orion star 3 ThermoScientific).

### 2.9.2 Análisis de Acidez Titulable

Se realizaron las determinaciones de la acidez titulable empleando el procedimiento establecido por la Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-004-SAG/GAN, 2018). Los resultados son expresados en miliequivalentes de ácido por kilogramo de miel (meq/Kg).

### 2.9.3 Medición de viscosidad

La viscosidad expresada en Poise se determinó mediante el Viscosímetro vibratorio de diapasón modelo Serie SV-A. Se depositó la muestra de 10 mL de miel sobre una taza del viscosímetro. Las mediciones se hicieron por triplicado y a temperatura promedio de 20 a 30 °C.

### 2.9.4 Medición de Color

El color en la miel se determinó utilizando un colorímetro digital marca Hanna, modelo HI 96785 (0 to 150 nm Pfund), se empleó glicerol como medio de calibración, según el método establecido por la Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-004-SAG/GAN, 2018). Se obtuvo el color de la muestra de miel comparando el dato obtenido contra la escala Pfund la cual se muestra en la Tabla 2.3.

Tabla 2. 3 Escala Pfund

Color	Graduación en mm
Blanco agua	0-8
Extra blanco	9-16
Blanco	17-34
Ámbar extra claro	35-50
Ámbar claro	51-84
Ámbar	85-114
Obscuro	115-140

### 2.9.5 Conductividad eléctrica

La evaluación de la conductividad eléctrica de la miel se realizó empleando la Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-004-SAG/GAN, 2018), la cual establece pesar una solución de 20 g de materia seca de miel en 100 mL de agua destilada a 20 °C, utilizando una celda de conductividad eléctrica. Los resultados se denotan en miliSiemens por centímetro ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) en un rango de  $0.1\text{-}^3 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### 2.9.6 Actividad de agua

Se estimó la actividad de agua presente en las muestras de miel utilizando un medidor de actividad de agua portátil (Marca Meter, modelo Aqualab pawkit). La precisión del equipo es de  $\pm 0.02 \text{ aw}$ .

### 2.9.7 Análisis de humedad

Se determinó el porcentaje de humedad (Ec 2.1) mediante el método gravimétrico mediante secado en estufa (MEMMERT 100-800) siguiendo la norma oficial Mexicana (PROY-NOM-211-SSA1, 2002).

$$\% \text{ de humedad} = \frac{M2 - M3}{M} * 100 \quad (2.1)$$

Donde **M2** es el Peso de la cápsula más muestra húmeda (g), **M3** es el Peso de la cápsula más muestra seca (g) y **M** es el Peso de la muestra (g).

### 2.9.8 Cálculo de °Brix

Se calculó los sólidos solubles en las muestras de miel según lo establecido en el libro de métodos ICUMSA (1964), para lo cual se colocó una gota de miel directamente en el prisma del refractómetro digital (0-93 %) (Marca ATAGO modelo Pocket PAL-3). Se registró directamente la medición.

### 2.9.9 Análisis de Sacarosa

Se estimó la cantidad de sacarosa en por ciento (g/100 cm<sup>3</sup>) presente en las mieles de acuerdo a lo establecido en el libro de métodos ICUMSA (1964), empleando el polarímetro modular circular Anton Paar modelo MCP 200. Se pesaron 26 g de muestra de miel y se disolvió en un volumen de 100 mL con agua destilada, a 20 °C. La solución diluida se depositó directamente sobre el orificio del polarímetro y se siguió a correr la lectura (Cristancho y Monroy, 2014).

### 2.9.10 Azúcares Reductores

La evaluación de azúcares reductores se realizó mediante el método de ácido dinitrosalicílico DNS (Miller, 1959); (Cristancho y Monroy, 2014). Los resultados colorimétricos se miden a una longitud de onda de 575 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 10, Thermo Scientific. En el Anexo A.1, (Figura A.1.1) se ilustra la curva patrón para la glucosa en un rango de detección: 78-5000 µg/ml generada en el presente trabajo para la determinación de azúcares reductores. Así mismo en el Anexo A.1 (Figura A.1.2) se muestra la curva patrón para la Fructosa en un rango de detección de 39.0625-1250 µg/mL.

### 2.9.11 Proteínas

Se empleó el método kjendal en la determinación de nitrógeno orgánico de productos alimenticios (Ec 2.2), de esta determinación se deduce el porcentaje de proteína presente, para convertir el nitrógeno a proteína los valores obtenidos por este método se multiplicaron por los factores publicados para una amplia gama de alimentos basados en un análisis detallado de aminoácidos (Méndez, 2021).

$$\%N = \frac{G * N * 0.14}{M} * 100 \quad (2.2)$$

Dónde **G** son los mililitros de la solución gastados en la titulación (mL), **N** es la normalidad de la solución usada en la titulación, **0.014** es el mili equivalentes de nitrógeno, **M** es el peso (g) o volumen de la muestra (mL).

Para convertir el nitrógeno a proteína (Ec 2.3), los valores obtenidos de % de nitrógeno se multiplicaron por los factores publicados de los alimentos.

$$\%P = \%N * F \quad (2.3)$$

Donde **%P** es el porcentaje de proteína, **%N** es el porcentaje de nitrógeno y **F** es el factor de conversión

### 2.9.12 Medición de Hidroximetilfurfural

Se pesaron 5 g de miel a los cuales se le adicionaron 20 mL de agua destilada, se diluyó mediante agitación durante 3 min, posteriormente se sumergieron las tiras reactivas HMF en la disolución por 30 s, se retiró el exceso de líquido con una toalla absorbente y se tomó la lectura correspondiente en el Reflectómetro digital (Reflectoquant®).

### 2.10 Pruebas de diferentes mezclas de alcohol acuoso variando %v/v.

Debido a que al cristalizar las soluciones acuosas de Reb A no se observó un crecimiento significativo de los cristales atribuido a la baja solubilidad del solvente, se optó por realizar pruebas de solventes seleccionando el alcohol etílico entre los solventes propuestos; alcohol metílico, alcohol isopropílico, alcohol isoamílico y cloroformo. El alcohol etílico permitió aumentar la solubilidad del Reb A a  $T < 60$  °C de acuerdo con los datos experimentales por Bolaños *et al.*, (2019a). Una vez seleccionado el alcohol etílico como solvente, que contenía la mayor cantidad de soluto disuelto mediante determinación de los °Brix, donde la concentración se ha visto que es un factor crucial en el proceso de cristalización, se procedió a evaluar diferentes mezclas de alcohol etílico acuoso con un índice de v/v en porcentaje, para mantener y aprovechar el beneficio que ofrece emplear agua.

Según los datos experimentales generados por Galicia (2017), las mezclas (alcohol etílico-agua) para 100 mL de solvente, que presentaron altas concentraciones en °Brix (superiores a los 50 °Brix) e IR, fueron la de 60-40 y 70-30 %. De este modo, se generó la Tabla 2.4 de porcentajes para una cantidad de solvente de 100 mL de alcohol etílico-agua y como soluto empleado Reb A- miel de abeja como materia prima.

Tabla 2. 4 Proporciones de alcohol etílico-agua

<b>Alcohol etílico-Agua (%v/v)</b>
55-45
60-40
65-35
70-30

Para determinar la cantidad de Reb A + miel de abeja requerida para saturar las mezclas acuosas de etanol, se prepararon muestras de 100 mL de solución (base porcentual), a tales muestras se les adicionó soluto en cantidades dosificadas a una temperatura de 60 °C, hasta obtener soluciones saturadas sin precipitados (soluciones claras). Se determinó el grado de concentración en IR, seleccionando las mezclas que presentaron mayores valores de concentración obtenida, con el fin de favorecer la cristalización.

### **2.11 Determinación de la Curva de Solubilidad**

Se generó una curva de solubilidad para una proporción de alcohol etílico-agua específica de 65-35 % (195 ml alcohol etílico -105 agua) y se añadieron 50 mL de miel de abeja, estableciendo un volumen de 350 mL. Posteriormente, se prosiguió a saturar la solución mediante agitación constante y a una determinada temperatura (60 °C), se añadieron porciones de 20 g de stevia y 15 minutos después de haber agregado el soluto y asegurándose que estuviese disuelto se muestreo tomando el IR de refracción

y se visualizó en el microscopio para observar que no hubiesen cristales, se repitió cuantas veces hasta alcanzar el equilibrio entre el soluto y el solvente. Finalmente, se registró el IR de la solución a la temperatura de 60 °C a la cual se deseó saturar la solución.

Dado que en rango de 10 °C a 60 °C es donde se da la mayor pendiente en la solubilidad en dicha mezcla, debido a que arriba de 60 °C hay degradación de Stevia y se rompe la molécula y según (Galicia, 2017), observó que cuando calentaba arriba de 60 °C y enfriaba los cristales eran diferentes y se hacían cúmulos y debajo de 10 °C es difícil llevar el equipo que se tiene a esa temperatura, además demostró que no es factible bajar más la temperatura dado que no hay variación significativa en el producto final. Para ello se proponen cinco temperaturas (10, 20, 40, 50 y 60 °C). Así, se generó la curva de solubilidad para obtener el rango de temperatura donde es posible llevar la Cristalización, el cual fue de 60 a 10 °C, debido a que en este rango fue donde se dio la mayor pendiente.

## **2.12 Implementación de las zonas de concentración**

A partir del diagrama temperatura vs concentración para la cristalización generado por Bolaños *et al.*, (2019a), se analizó la concentración (IR) en función de la velocidad de agitación y temperatura de enfriamiento, se identificó el límite de la primera zona metaestable, el cual se obtuvo observando en las micrografías el primer núcleo visible, registrando el índice de refracción y temperatura en donde se localizó el límite de la zona de crecimiento (Figura 2.5). Este valor promedio (índice de refracción) es graficado para cada temperatura de saturación determinada en el intervalo de cristalización y sujeta a enfriamiento, donde es necesario descender la temperatura entre - 5 y - 8 °C para alcanzar al punto crítico de la zona de crecimiento, es decir, el punto donde comienza la aparición de núcleos a una determinada temperatura y concentración.

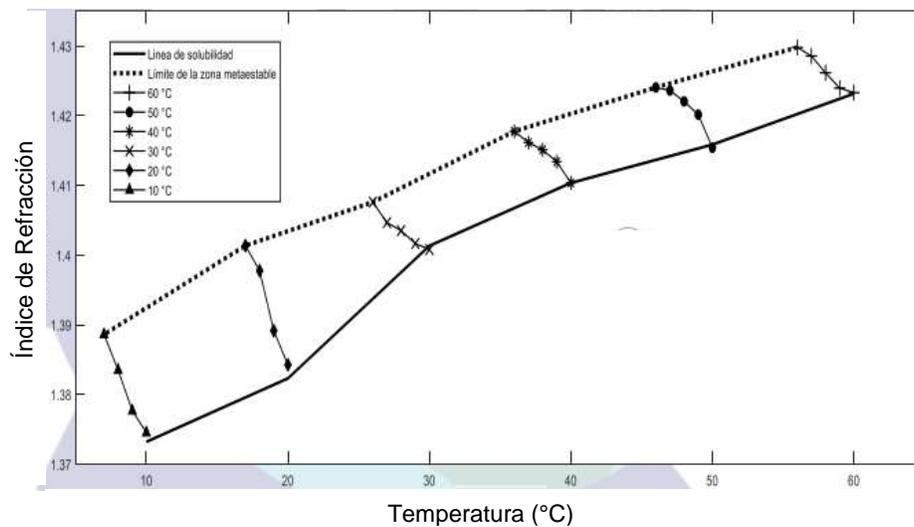


Figura 2. 5 Representación de la zona metaestable (nucleación) determinada a partir de índice de refracción

Fuente: (Bolaños *et al.*, 2019a)

### 2.13 Diseño experimental factorial 2<sup>2</sup>

La Tabla 2.5 muestra la proporción de la mezcla de solventes %v/v en sus dos niveles así como la velocidad de agitación, seguidamente se ilustra en la Tabla 2.6 el diseño factorial 2<sup>2</sup> para saber el efecto de los factores involucrados en dos parámetros de cristalización. Tales experimentos han sido realizados aleatoriamente y por duplicado con lo que se obtuvo un total de 8 corridas (4 para cada réplica). Las variables de respuesta fueron dos de tipo cuantitativas: el tamaño de cristal D(2,1) reportado en micras y la masa de cristal formado (MCF), en g recuperados (en 300 mL de solución).

Tabla 2. 5 Proporción de la mezcla de solventes (%v/v) y velocidad de agitación

Factores	Nivel	
	Bajo	Alto
Proporción en la mezcla de solventes (%v/v).	65-35 % alcohol etílico – agua	70-30 % alcohol etílico – agua
Velocidad de agitación (rpm).	150	250

Tabla 2. 6 Diseño factorial 2<sup>2</sup> para la cristalización del Reb A-miel de abeja

Orden de experimento	Factor			Respuesta	
	A	B	AB	MCF	DTC
1	-	-	+		
2	+	-	-		
3	-	+	-		
4	+	+	+		
5	-	-	+		
6	-	+	-		
7	+	-	-		
8	+	+	+		

Se establecieron dos factores cada uno con un nivel alto y bajo; factor A (la proporción en la mezcla de solventes %v/v) con dos niveles, 65 % alcohol etílico–35 % agua (bajo) y 70 % alcohol etílico–30 % agua (alto), siendo seleccionadas de la Sección 2.10 debido a que presentaron el grado de concentración más alto reportado en IR; y factor B (la velocidad de agitación) con dos niveles 150 rpm (bajo) y 250 rpm (alto).

#### Prueba de hipótesis:

- Efecto del tratamiento  $\tau_i$  del factor A (%v/v del solvente):

**Hipótesis nula:** El efecto del porcentaje v/v de la mezcla de solventes no modifica la D(2,1) y la MCF.

$$H_0: 65 - 35 \% = 70 - 30 \% = 0 \quad (2.4)$$

**Hipótesis alterna:** El efecto del porcentaje v/v de la mezcla de solventes modifica la D(2,1) y la MCF.

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

- Efecto del tratamiento  $\beta_j$  del factor B (Velocidad de agitación):

**Hipótesis nula:** La velocidad de agitación es igual sobre la D(2,1) y la MCF.

$$H_0: 150 \text{ rpm} = 250 \text{ rpm} = 0 \quad (2.6)$$

**Hipótesis alterna:** La velocidad de agitación es diferente sobre la D(2,1) 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) y la MCF.

$$\begin{aligned} H_0: 65 - 35 \% \text{ y } 150 \text{ rpm} &= 65 - 35 \% \text{ y } 250 \text{ rpm} = 70 - 30 \% \text{ y } 150 \text{ rpm} \\ &= 70 - 30 \% \text{ y } 250 \text{ rpm} \end{aligned} \quad (2.8)$$

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

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

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) de los datos experimentales obtenidos usando el programa Minitab 18 se evaluó el efecto de la velocidad de agitación, el %v/v de la mezcla de solventes y su interacción sobre la D(2,1) y la MCF.

## 2.14 Procedimiento experimental para la cristalización

### 2.14.1 Solución saturada

Para iniciar el proceso de cristalización de Reb A-miel de abeja, es necesario preparar una solución saturada de la misma. La solubilidad del sistema está fuertemente en dependencia de la temperatura, por lo cual, las cantidades de solvente (alcohol etílico-agua) y soluto (Reb A-miel de abeja) que se utilizan están definidas por la temperatura a la cual se desea saturar la solución.

La metodología utilizada para obtener una solución saturada de Reb A-miel de abeja para la cristalización es la siguiente:

Se inicia definiendo la temperatura de saturación de la solución. Posteriormente, se especifica las proporciones de solvente a emplear alcohol etílico-agua (65-35 y 70-30 %). De acuerdo a los datos de solubilidad obtenidos experimentalmente en la sección 2.10, se determina la concentración de saturación a la temperatura (temperatura de 60 °C) especificada en IR. Seguidamente, se prepara la solución en un matraz de 500 mL en el cual se mantiene a la temperatura especificada (temperatura de 60 °C) y con una velocidad agitación constante (150 rpm y 250 rpm), con el objeto de mantener los cristales suspendidos y lograr una rápida disolución. Se mide la concentración de la solución con un refractómetro (IR) manteniendo la temperatura constante. La saturación de la solución se alcanza cuando la medición de IR concuerda con el resultado obtenido de la sección (2.11) a la temperatura especificada y el valor permanece constante. Es importante asegurar que la solución haya alcanzado el IR de saturación, si no es así, agregar más soluto en pequeñas porciones hasta alcanzar el IR deseado o que tenga cristales. Si hay cristales y se ha alcanzado la concentración de saturación, dejar la solución en agitación por 15 min, si no se disuelven agregar de 1 a 2 mL de agua, seguir diluyendo por 10 min, hasta la desaparición de los cristales. Tomar el IR e iniciar la corrida experimental.

### 2.14.2 Cristalización del Reb A-miel de abeja

Para llevar a cabo la cristalización del Reb A-miel de abeja, la solución debe estar saturada en el interior del cristalizador y a su temperatura de saturación. Asimismo, la temperatura del agua en la chaqueta de enfriamiento debe tener un valor cercano a la temperatura de saturación.

El procedimiento experimental fue el siguiente:

Se preparó una solución saturada (Solución saturada 1) con 166.5 g de Reb A con pureza del 95 % en 300 mL de alcohol etílico-agua (65-35 %) y 50 mL de miel (temperatura de 60 °C) de acuerdo al procedimiento de la Sección 2.14.1. Se repite este procedimiento (Solución saturada 2) con 153.5 g de Reb A en 300 mL de alcohol etílico-agua (70-30 %) y 50 ml de miel (temperatura de 60 °C). Se verifica su concentración por medio de un refractómetro comprobando así, la concentración de inicio encontrada en la Sección 2.11, también es importante tomar micrografías para verificar la disolución de todas las partículas de Reb A. Esta solución se cargó ocupando un volumen de 400 mL en el cristalizador batch.

Previamente, se activó el equipo de cristalización, sistema de adquisición de datos, software y hardware por medio de las conexiones eléctricas y con el encendido de la computadora central.

Seguidamente se especificó la trayectoria del perfil de temperatura y se verifica las temperaturas del proceso mediante la interface gráfica del software de control "JULABO EasyTemp Professional". Se ajusta las rpm mediante el programa "RPM\_T1\_T2\_DIF" para el control de la trayectoria de la velocidad de agitación, ambos factores son manipulados para el control del proceso.

Se estableció un perfil de enfriamiento natural, dado que, según Bolaños *et al.*, (2008), encontraron que el enfriamiento natural propicio mayor formación de tamaño y masa de cristal formado entre los perfiles propuestos (cubico, lineal y natural) en la

cristalización de azúcar de caña. Establecida esta condición, se efectuó un cambio escalón en la temperatura de la chaqueta por medio del tanque de enfriamiento:

Se envía por medio de la computadora la señal de cambio en la temperatura, con el fin de provocar el cambio escalón a la temperatura de enfriamiento deseada, siguiendo una trayectoria de enfriamiento natural pero lento. El rango de cristalización por enfriamiento para el presente trabajo fue de 60 °C a 10 °C, debido a que en este rango es donde se presenta la mayor pendiente, además temperaturas por debajo de los 10 °C es difícil llevar el equipo de cristalización con el cual se trabaja y temperaturas por arriba de 60 °C, se ha encontrado que la stevia presenta degradación (Galicia, 2017).

Se estableció un perfil de agitación constante, así para las corridas experimentales se propusieron dos agitaciones (150 RPM y 250 RPM). Se activó el cronómetro que registra el tiempo de proceso y la computadora almacena la información de la adquisición de datos en tiempo real.

Se tomó una muestra de la solución de 3 mL al inicio y durante cada 30 min hasta finalizar el proceso para la medición de IR y captura de micrografías. La masa de cristal formada fue cuantificada sólo al final. Las micrografías fueron tomadas en cada muestreo realizado cada 30 min durante 3 h y con el software de análisis de imágenes Digimizer Versión 5.7.0 se midieron las áreas en pixeles posteriormente el programa DTC.ipynb desarrollado en Julia 1.5.2, se efectúa la conversión de pixeles a micras para las diferentes distribuciones de tamaño del cristal en función de número, longitud, área y volumen. Finalmente, el tiempo de desarrollo del proceso para los perfiles de agitación y de temperatura fue de 180 min.

## **2.15 Metodología para el cálculo de la DTC**

### **2.15.1 Determinación de tamaño promedio de cristal**

Para cuantificar el tamaño promedio de cristal ( $D(2,1)$ ) se tomaron micrografías de los cristales ubicados 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 píxeles a micras de los cristales. Cabe mencionar, que se requiere de una modificación a dicha técnica elaborada por Ramos y Valdés (2016) que consiste en la calibración y ajuste del factor de conversión del objetivo 10x (1 pixel = 0.432364615).

Las áreas de los cristales obtenidas fueron transformadas a micras mediante un factor de conversión calculado para el sistema de adquisición de imágenes empleado.

### **2.15.2 Captura de imágenes**

Esta es la primera etapa comprendida en la medición de DTC, en donde las micrografías fueron tomadas en cada muestreo realizado cada 30 min durante 3 h y con el software de análisis de imágenes Digimizer Versión 5.7.0 se midieron las áreas en píxeles posteriormente en el programa DTC.ipynb desarrollado en Julia 1.5.2, se lleva a cabo la conversión de píxeles a micras y se generan los valores para los diferentes distribuciones. Esta etapa es primordial en el análisis de DTC, ya que, si la captura de imágenes no se lleva a cabo de forma correcta, el algoritmo no obtendrá datos que representen adecuadamente la DTC experimental. La muestra de cristales puede estar dispersa en una solución de algún solvente (etanol anhidro, cloroformo, etc.) que no disuelva los cristales obtenidos o modifique su tamaño, o pueden ser muestras obtenidas directamente del interior del cristizador, en donde los cristales se encuentran en equilibrio termodinámico con la solución, por lo que no se afectará su tamaño si la muestra se mantiene sin cambios en la temperatura. Por tal motivo, se presentan algunas directrices que facilitan el llevar a cabo esta tarea de manera adecuada.

1. Si la muestra es obtenida del interior del cristizador, procurar mantenerla a la misma temperatura o evitar la captura de imágenes por largos períodos de tiempo (10 min).

2. Se establece un periodo de muestreo en función del tiempo en que tarda en realizarse una corrida experimental, por lo cual el muestreo se realizó cada 30 minutos durante un periodo de 3 h.
3. Colocar la muestra en un portaobjetos limpio y distribuirla sobre toda el área empleando otro portaobjetos limpio disponible sin realizar demasiada presión o esfuerzo mecánico. El portaobjetos debe estar libre de incrustaciones o rayones, ya que producen ruido durante el análisis automatizado.
4. Seleccionar el objetivo (aumento) adecuado. Si los cristales son núcleos formados se recomienda emplear 10X, por el contrario, si los cristales son semillas o cristales en formación se recomienda usar 4X.
5. Tomar en promedio de 5 imágenes de distintas zonas del portaobjetos sin realizar modificaciones en la intensidad de la luz. Esto facilita la identificación de las partículas y evita una etapa de calibración de histograma.
6. La configuración de la cámara digital debe ser elegida con la mayor resolución y no ser modificada para análisis posteriores, ya que esto modifica el factor de conversión específico para el sistema de adquisición de imágenes.

### **2.16 Determinación de masa de cristal formada**

La masa de cristal formada (MCF) fue cuantificada en base a la técnica de peso seco. En cada cristalización se muestrearon 20 mL de solución cristalizada (licor madre + cristales) en tubos que con anticipación se acondicionaron es decir, se pesaron vacíos en una balanza analítica y se colocaron en una centrífuga por un tiempo de 5 min a 3000 rpm, este proceso se repitió de dos a tres veces por muestra con el fin de eliminar la mayor cantidad de solvente.

En seguida, el producto obtenido se sometió a calentamiento en una estufa a 80 °C por un tiempo de 6 h con la finalidad de evaporar el solvente residual y obtener una muestra seca (cristales secos). En todo el proceso de secado fue necesario mover la muestra contenida en los tubos cada hora, de esta manera fue posible el contacto de aire caliente con la muestra húmeda y prevenir que los cristales se apelmacen.

## 2.17 Análisis de parámetros físicos y organolépticos

El producto cristalino obtenido de la mezcla de Reb A- miel de abeja es caracterizado a partir de dos parámetros, los de tipo físico: tamaño de cristal D(2,1) y color; y los de tipo organolépticos que incluyen: color, sabor, olor y apariencia.

### 2.17.1 Determinación de color

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

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.

Se necesita de tres valores ( $\Delta L$ ,  $\Delta a$  y  $\Delta b$ ) que indican la diferencia de L, a y b entre un estándar y una muestra para definir completamente el color de un objeto, estos son:

- Si  $\Delta L$  es: positivo, la muestra es más clara que el estándar; si es negativo, es más oscura que el estándar.
- Si  $\Delta a$  es: positivo, la muestra es más roja (o menos verde) que el estándar; si es negativo es más verde (o menos roja).
- Si  $\Delta b$  es: positivo la muestra es más amarilla (o menos azul) que el estándar; si es negativo es más azul (o menos amarilla).

### **2.17.2 Determinación de características organolépticas**

Se realizó un análisis sensorial donde se evaluaron cuatro atributos importantes de los edulcorantes como: olor, sabor, color y apariencia. Utilizando una prueba hedónica de aceptación-rechazo en base a los atributos antes mencionados, se efectuó la evaluación sensorial a un panel no capacitado conformado de 20 personas con la finalidad de conocer las recomendaciones y preferencias de los consumidores en función de las propiedades tangibles y bien definidas del producto, para así impulsar su desarrollo o mejora dirigida a la comunidad científica del área de alimentos y/o directivos de empresas.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Determinación de adulteración de miel de abeja por Infrarrojo

Mediante el análisis cualitativo, las muestras de miel se compararon contra la muestra patrón (Miel proveniente del Colegio de Posgraduados campus Córdoba, la cual se tiene bajo control de estudio). Con respecto a lo observado en las gráficas se presentó un comportamiento similar a la muestra patrón, es decir, en términos de absorbancia la pureza de las muestras de miel de abeja fue analizada, donde dicho parámetro fue satisfactorio. Las muestras de miel recolectadas se ilustran en la Figura 3.1 donde, la Figura 3.1a corresponde a miel de la zona de Amatlán, la Figura 3.1b a miel proveniente de Álamo y la Figura 3.1c a miel de la región de Córdoba.

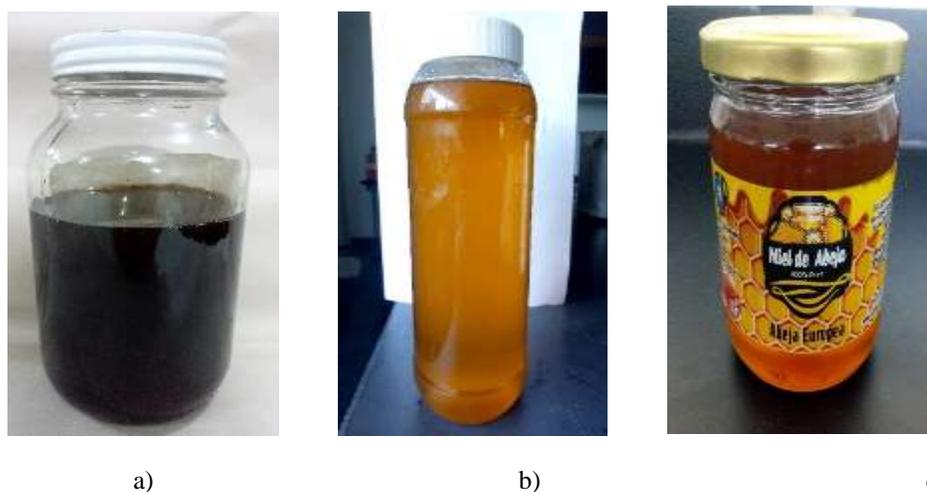


Figura 3. 1 a) Miel de Amatlán, b) Miel de Álamo y c) Miel de Córdoba

A continuación se presentan los espectros en términos de absorbancia generados por infrarrojo para el estudio de las muestras de miel.

El espectro FTIR de la muestra de miel de abeja de referencia se presenta en la Figura 3.2 donde, se refleja la composición química desde el punto de vista vibracional-

estructural. Aunque estos son en ocasiones complejos, es posible definir algunas bandas características de grupos funcionales presentes y su abundancia.

Para tal caso de dicha miel de abeja, el espectro FTIR muestra diferentes bandas de absorción, por ejemplo en la región ( $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ), la cual está asociada a la absorción de los azúcares presentes en miel de abeja. Además de lo anterior, es posible también observar bandas de absorción que están ligadas a la presencia de agua ( $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ ) y de ( $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ ).

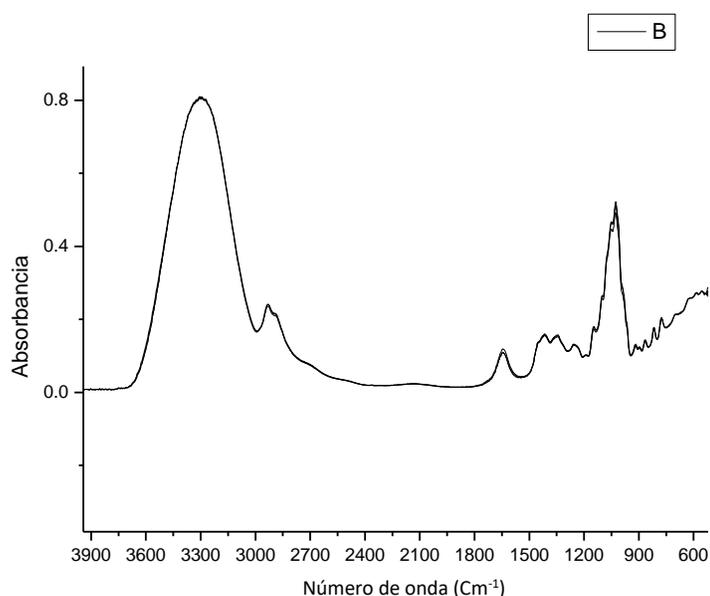


Figura 3. 2 Espectroscopia infrarroja (FTIR) de la muestra de miel de abeja de referencia

En la Figura 3.3 se presenta nuevamente el espectro FTIR de la miel de la muestra de referencia en conjunto con los espectros FTIR de las muestras de miel de abeja de Amatlán y Álamo, donde, en la región de  $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  se muestran algunas de las principales frecuencias y grupos funcionales característicos de los monosacáridos como son glucosa y fructosa, así como a otra pequeña proporción debida a los disacáridos como la sacarosa.

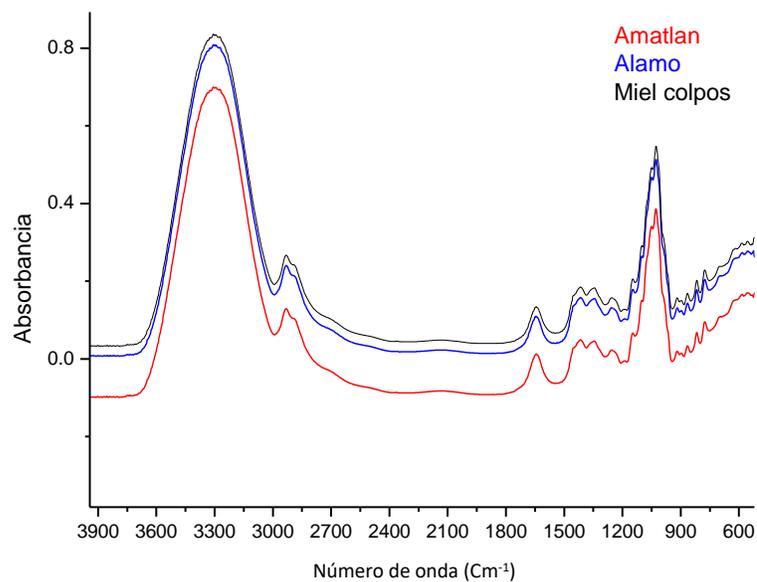


Figura 3. 3 Espectroscopia infrarroja (FTIR) de la muestra de referencia vs muestra de miel de abeja de Amatlán y Álamo

En la Figura 3.4 se observa solamente el espectro FTIR de la región de los azúcares; a este mismo intervalo se le conoce como la región de la huella digital donde cada azúcar presenta una banda de absorción característica.

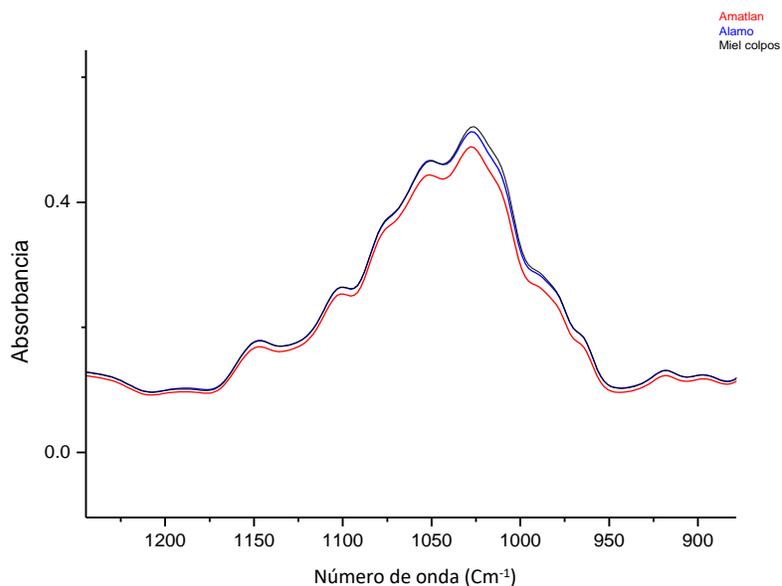


Figura 3. 4 Espectroscopia infrarroja (FTIR) del ajuste de la muestra de referencia vs muestra de miel de abeja de Amatlán y Álamo

### 3.2 Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica en la miel suele realizarse para determinar la calidad de sus componentes. Para analizar la composición de la miel se emplearon parámetros establecidos por las normas (Codex Alimentarius, 2019) así, como los parámetros establecidos por las Normas Oficiales Mexicanas (PROY-NOM-004-SAG/GAN, 2018).

En la Tabla 3.1 se presenta una recopilación de resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica así como los parámetros establecidos por normas que rigen los métodos para la evaluación y estudio de la composición de mieles de abeja. Los valores de las réplicas de las pruebas mencionadas anteriormente se presentan en el Anexo A.2.

Tabla 3. 1 Caracterización fisicoquímica de las mieles de abeja

Prueba	Miel de abeja			Parámetros (Codex Alimentarius, 2019)	Parámetros Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-004-SAG/GAN, 2018)
	1	2	3		
pH	3.942	3.865	4.411	No establecido	No establecido
Acidez libre (meq/Kg)	6.7	6.4	6.9	< 50 meq de ácido por kg	Máximo 50.00 meq/kg
Viscosidad (poise)	36	116	176.6	No establecido	No establecido
Color (Escala Pfund)	95	35	46	No establecido	No establecido
Conductividad eléctrica (mS/cm)	0.732	0.181	0.428	< 0.8 mS/cm	Máximo 0.80 mS/cm
Actividad de agua (Aw)	0.57	0.52	0.47	< 0.85 (Para alimentos) CXC 75-2015	No establecido
Humedad % (g/100g)	14.22	12.64	11.32	< 20 %	Máximo 20.00 %
°Brix o % de sólidos solubles / 100 g miel	79.7	82.0	81.9	No establecido	No establecido
Sacarosa % (g/100 cm <sup>3</sup> )	1.11	1.22	1.91	< 5 g/100g	Máximo 5.00 %
Azúcares reductores % (g/100g)	60.43	76.47	69.94	> 60 g/100g	Mínimo 60 g/100g
Proteínas (%)	0.466	0.241	0.519	0.2 - 2 % (CODEX STAN-1-2007)	No establecido
Hidroximetilfurfural (mg HMF/kg miel)	20.4	22.1	20.6	< 40 mg/kg.	Máximo 40.00 mg/kg

Los resultados son comparados a los reportados por Moguel Ordoñez *et al.*, (2005), en un estudio de la calidad fisicoquímica de las mieles de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) producidas en el estado de Yucatán, los cuales presentaron un contenido de azúcares reductores (78.5 %), HMF (17.9 mg/kg) y los parámetros de humedad (19.2 %), sacarosa (1.5 %) y acidez libre (31.3 meq/kg). Dichos resultados se encuentran dentro de los valores obtenidos en este trabajo, es importante mencionar que estos valores varían como consecuencia de la flora de origen, de la zona, y de las condiciones climáticas. De acuerdo a los datos generados en la caracterización fisicoquímica de las mieles, se determinó que cualquier miel de abeja analizada en el presente trabajo era apta como materia prima para la cristalización de la mezcla stevia (Reb A)- Azúcares levógiros puesto que las tres mieles cumplieron con los parámetros establecidos por las normas de Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2019), así como los parámetros establecidos por las Normas Oficiales Mexicanas (PROY-NOM-004-SAG/GAN, 2018) en la determinación de calidad de sus componentes.

### 3.3 Pruebas de mezclas de alcohol etílico/agua

Se estudiaron cuatro pares de porcentaje de alcohol etílico y agua para un volumen de 100 mL de solvente. Considerando los datos experimentales del Reb A en alcohol etílico y agua reportados por Galicia (2017) y Bolaños *et al.*, (2019a), donde dichas mezclas presentaron concentraciones altas en °Brix (superiores a los 50 °Brix) e IR. En base a dicha delimitación se establecieron los porcentajes (55-45 %, 60-40 %, 65-35 % y 70-30 %) para la prueba de mezclas (Figura 3.5).



Figura 3. 5 Porcentajes de mezclas de alcohol etílico/agua

Los datos experimentales de las cuatro diferentes proporciones de la mezcla de solvente, la cantidad de soluto requerido para saturar la muestra a una temperatura de 60 °C así como el grado de concentración reportado en IR se presentan en la Tabla 3.2. En el Anexo B.1 se muestran las cantidades dosificadas hasta alcanzar el punto de saturación de la mezcla a la temperatura de 60 °C. Las concentraciones más altas se hallaron en mezclas de 65-35 y 70-30 %.

Tabla 3. 2 Concentración de Reb A y miel de abeja en 100 mL de solvente

<b>Alcohol etílico- Agua Destilada (%v/v)</b>	<b>Cantidad de Reb A agregada (g)</b>	<b>Cantidad agregada de Miel de abeja (mL)</b>	<b>Índice de refracción</b>
55-45	66.5	16.6	1.4205
60-40	60.4	16.6	1.4210
65-35	54.5	16.6	1.4284
70-30	49	16.6	1.4242

Se observó que el alcohol etílico ayudó a incrementar la solubilidad del Reb A-miel de abeja en el agua a temperatura de 60 °C, como consecuencia de ello, se obtuvo un aumento de la concentración, obteniéndose soluciones madre de 1.4205 a 1.4284 IR. Sin embargo, se observó paralelamente una mayor disolución conforme aumentaba la cantidad de alcohol en la mezcla, pero al mismo tiempo había un exceso de evaporación (a causa del bajo punto de ebullición del alcohol etílico) que limitó dicha disolución llevando a la muestra a saturarse de inmediato con pocas cantidades de soluto. Así, la concentración de saturación de la mezcla de stevia (Reb A) - miel de abeja en alcohol etílico/agua obtenida experimentalmente fue determinada por la máxima cantidad que fue soluble a temperatura de 60 °C. Las proporciones de alcohol etílico-agua que favorecieron el aumento de concentración tomando como base un volumen de 100 mL fueron en cantidades de alcohol etílico (65 y 70 %) y de agua (35

y 30 %), puesto que emplear concentraciones al 100 % de ambos solventes desfavorece el acondicionamiento de la muestra para la cristalización del Reb A-miel de abeja (ver Figura 3.6).



Figura 3. 6 Mezclas de alcohol etílico/agua seleccionadas

### 3.4 Obtención de la curva de solubilidad

Se presentan los valores promedio de las dos réplicas de IR realizadas para cada temperatura de saturación propuesta (Tabla 3.3). Los resultados de la replicas se encuentran en el Anexo B.2, donde la concentración de saturación del Reb A-miel de abeja en el solvente fue obtenida experimentalmente por la determinación de la máxima cantidad que fue soluble en el alcohol etílico a diferentes temperaturas de saturación. Para el cual se estableció un volumen de 300 mL (%v/v) para la mezcla alcohol etílico-agua (195 mL alcohol etílico -105 mL agua).

Tabla 3. 3 Puntos de solubilidad experimentales

Temperatura °C	IR (-)
60	1.4291
50	1.4268
40	1.4244
20	1.4228
10	1.4219

Se pudo observar que la concentración aumentó conforme se incrementaba la temperatura, dado que la solubilidad frecuentemente se incrementa con la temperatura.

La Figura 3.7 presenta el comportamiento del índice de refracción respecto a la temperatura, donde el índice de refracción aumento conforme se incrementaba la temperatura, puesto que, al agregar más soluto a un solvente se generan mayor número de partículas junto a un incremento de temperatura, en consecuencia, la concentración tiende a aumentar. La variación del índice de refracción respecto a la temperatura es pequeña ( $\pm 0.001$ ) lo que indica que, la concentración no varió significativamente en el rango de temperatura de trabajo, dicho de otra manera, el Reb A es en cierta medida soluble en agua de 10 a 60 °C y a temperaturas superiores es sumamente soluble lo que obstaculiza su cristalización por la elevada sobresaturación.

Según (Galicia, 2017), observó que cuando calentaba arriba de 60 °C y enfriaba, la morfología de los cristales era indefinida y se hacían cúmulos y debajo de 10 °C es difícil llevar el equipo que se tiene, además demostró que no es factible bajar más la temperatura dado que no hay variación significativa en el producto final.

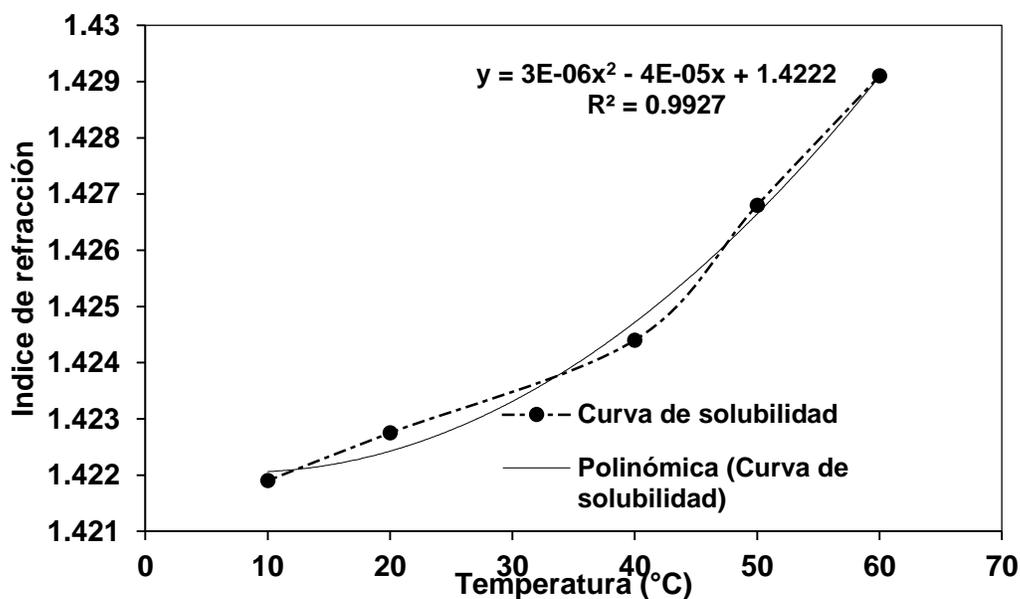


Figura 3. 7 Puntos experimentales de solubilidad (Índice de refracción)

### 3.5 Seguimiento experimental de la cristalización del Reb A-miel de abeja

A partir de la instrumentación virtual realizado en LabVIEW para el control de la velocidad de agitación desarrollado por Bolaños *et al.*, (2019a), donde para el presente trabajo se ajustó una agitación constante en cada corrida experimental, 150 rpm y 250 rpm nivel bajo y alto, respectivamente; del diseño de experimentos.

Primero se inició registrando el nombre de la muestra o número de Experimento, así como la agitación a emplear (Figura 3.8). Posteriormente, en la Figura 3.9 se ajustó las rpm así como el registro de datos, también se puede visualizar las variaciones en la velocidad de agitación del proceso. Para el control de la temperatura se programó un perfil de enfriamiento natural combinado con un perfil de enfriamiento lineal en la paquetería de JULABO EasyTemp Professional (Figura 3.10).

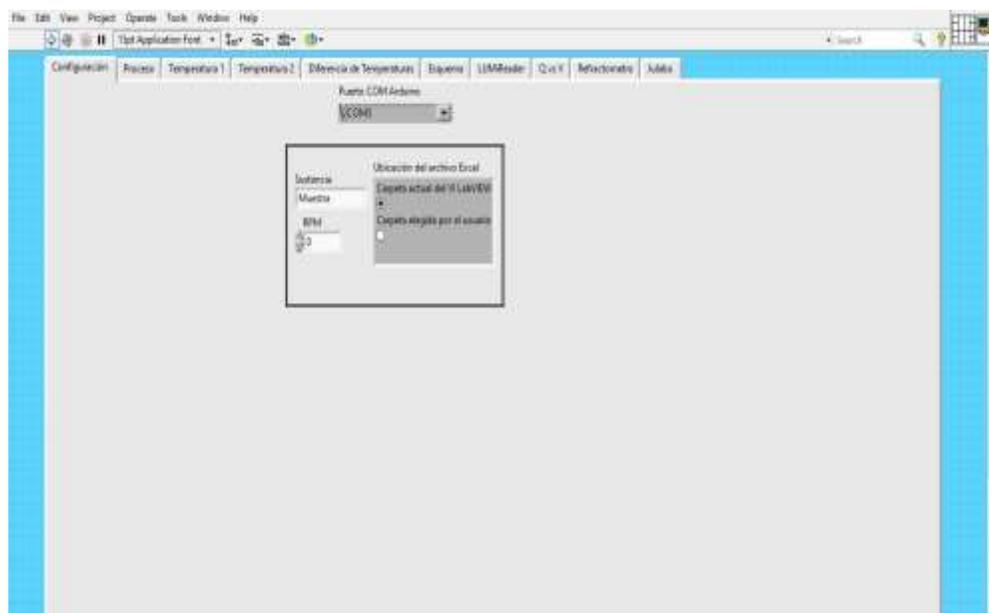


Figura 3. 8 Instrumentación virtual para el registro de la muestra

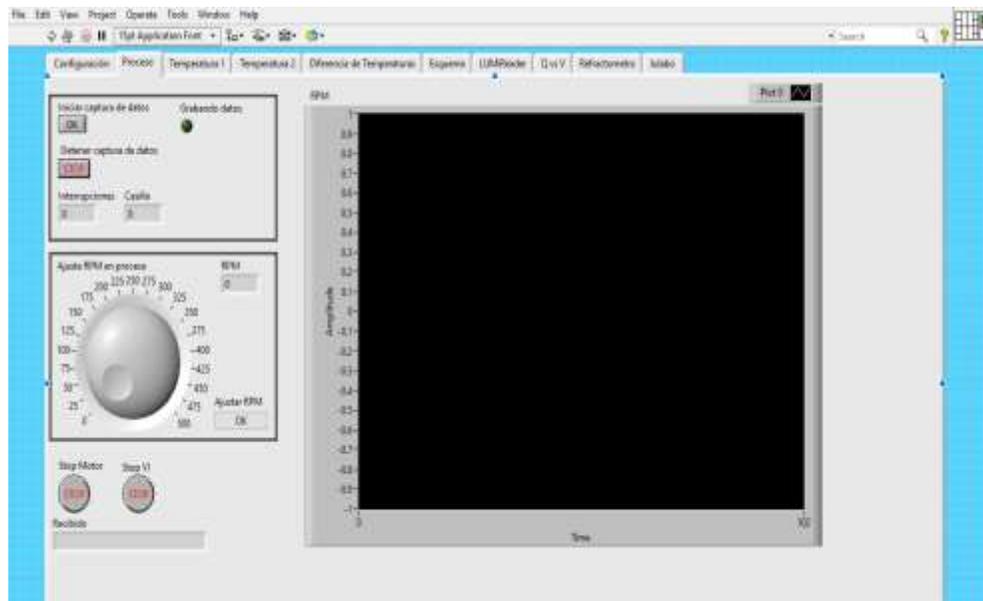


Figura 3. 9 Instrumentación virtual para el control de la velocidad de agitación



Figura 3. 10 Paquetería de JULABO EasyTemp Professional para el control de la temperatura

Se utilizó la metodología descrita en la sección 2.14. Se realizaron los experimentos en los cuales se efectuó un cambio escalón en la temperatura de la chaqueta del cristizador, las diferencias de temperatura fueron de 60 °C a 50 °C y de 50 °C a 9 °C siguiendo un perfil de enfriamiento lineal.

Se monitoreo la temperatura interna del cristalizador y se registraron en base a muestreos realizados en lapso de 30 min los datos experimentales de cada experimento. Los datos experimentales se muestran en el Anexo C.1. El cristalizador esta acoplado a un baño de enfriamiento marca Julabo. El proceso se efectuó a presión atmosférica. Al inicio de la cristalización se observó un incremento en la sobresaturación generando con ello núcleos, posteriormente la concentración baja debido a que los núcleos absorben el soluto logrando que la transferencia de masa sea rápida y la solución se queda sobre la línea de la saturación. Referente a la DTC en la fase de crecimiento, se encontró que el perfil de enfriamiento natural produjo una alta tasa de velocidad de crecimiento, esto en correspondencia con la mayor sobresaturación producida por el cambio más rápido en la temperatura en el cristalizador (Figura 3.11). La nucleación así como crecimiento de los cristales se monitoreo desde el inicio hasta el final del proceso, tomando 3 mL de muestra desde el interior del cristalizador cada 30 min hasta finalizar el lote en el min 180.

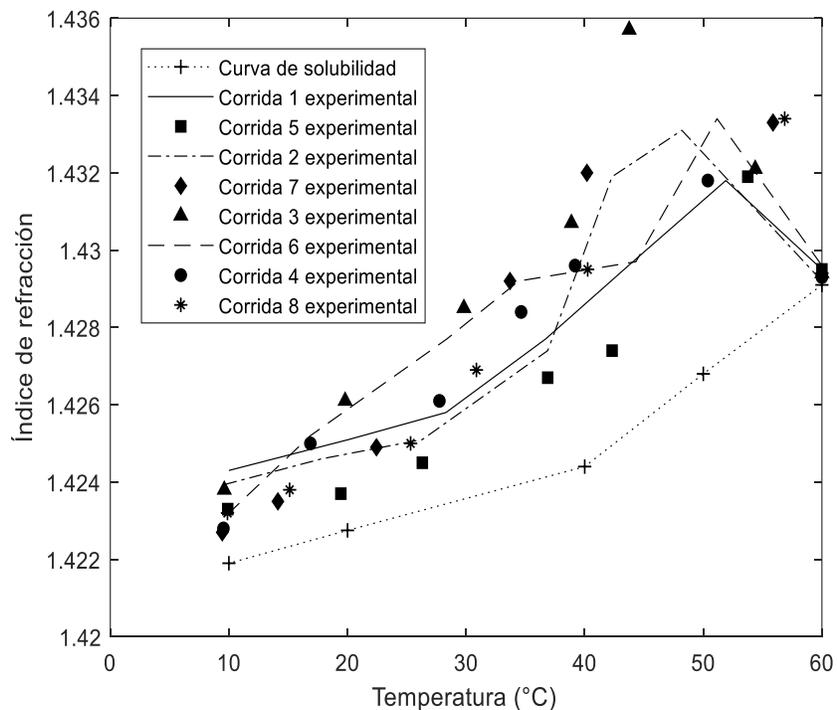


Figura 3. 11 Índice de refracción vs temperatura (°C)

La solución debe iniciar idealmente en el punto de saturación lo cual es muy difícil obtener una solución a la temperatura que se requiere sin cristales a la concentración de saturación, por lo cual se permitió iniciar un poco debajo del IR a temperatura de saturación de 60 °C. Se registró un decremento de 7 grados en promedio en un lapso de 30 min. En la Figura 3.12 se aprecia la temperatura interna del cristalizador para cada una de las corridas. Al utilizar el perfil natural para cada una de las corridas se efectuó un cambio brusco de temperatura de 60 °C a 50 °C, el cual propicia la nucleación, al comportarse posteriormente como perfil lineal se estabiliza el proceso, y sigue un trayecto de enfriamiento lento y estable.

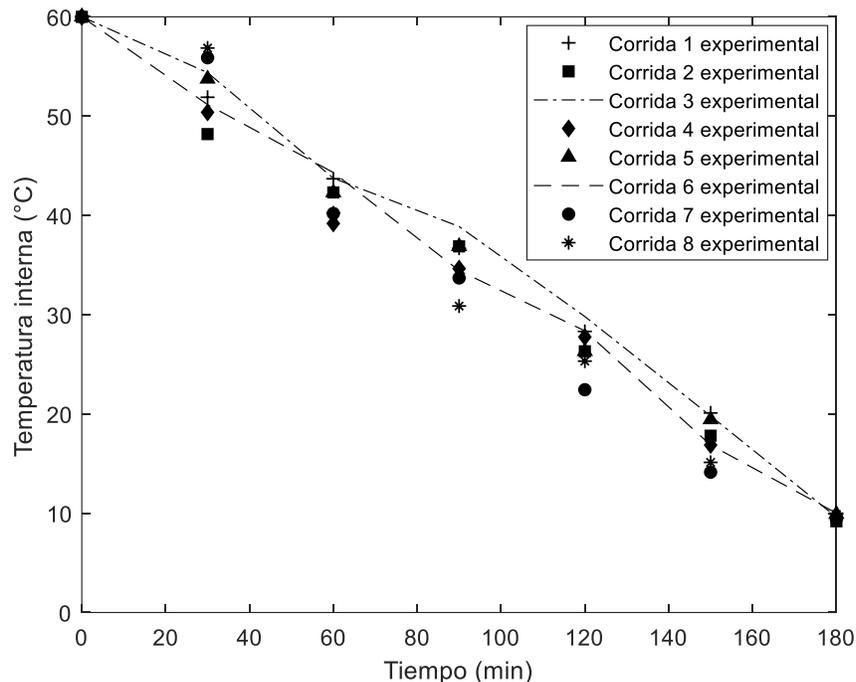


Figura 3. 12 Temperatura interna del cristalizador

Al implementar el perfil de enfriamiento natural (cambio escalón de temperatura de 60 °C a 50 °C) fue necesario iniciar enfriando lento, siguiendo una trayectoria de enfriamiento natural pero lento, es decir, descender la temperatura gradualmente, puesto que si es muy rápido dicho enfriamiento, (ejemplo variación en el descenso de

la temperatura) se produce demasiada nucleación y los cristales no crecen, después de efectuar el cambio de escalón en la temperatura de 60 °C a 50 °C del perfil de enfriamiento natural, se programó el sistema para un perfil de enfriamiento lineal de 50 °C a 10 °C, donde se observó que no hubo cambio significativo con el enfriamiento natural, ya que el perfil de enfriamiento natural después de estabilizarse tiende a comportarse como uno lineal.

En esta etapa, el enfriamiento natural de la solución promueve un aumento en el crecimiento de cristales y posteriormente disminuye hacia el final del lote. Se determinó que entre más lento sea el enfriamiento, en otros términos, un descenso de la temperatura gradualmente, el cristal tiende a crecer más ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Sin embargo el tiempo de lote para la cristalización del Reb A-miel de abeja fue de 3 h.

En la Figura 3.13 se observa el comportamiento del IR en función del tiempo, se puede apreciar que la concentración sube hasta alcanzar la sobresaturación, como consecuencia de ello se generan núcleos, estos crecen conforme transcurre el tiempo hasta el agotamiento del soluto y quedar sobre la línea de saturación. Es decir, al inicio se propició un enfriamiento brusco para generar núcleos y después despacio para hacer crecer esos núcleos.

El perfil de enfriamiento natural pudo originar un enfriamiento brusco por efecto del enfriamiento dentro del cristizador (por ejemplo, enfriamiento natural en cristalizadores por lotes operados a presión atmosférica), beneficiando el crecimiento de cristales de Reb A-miel de abeja. A su vez, el aumento en el crecimiento de cristales, la masa formada y el agotamiento de la sobresaturación disponible en el sistema.

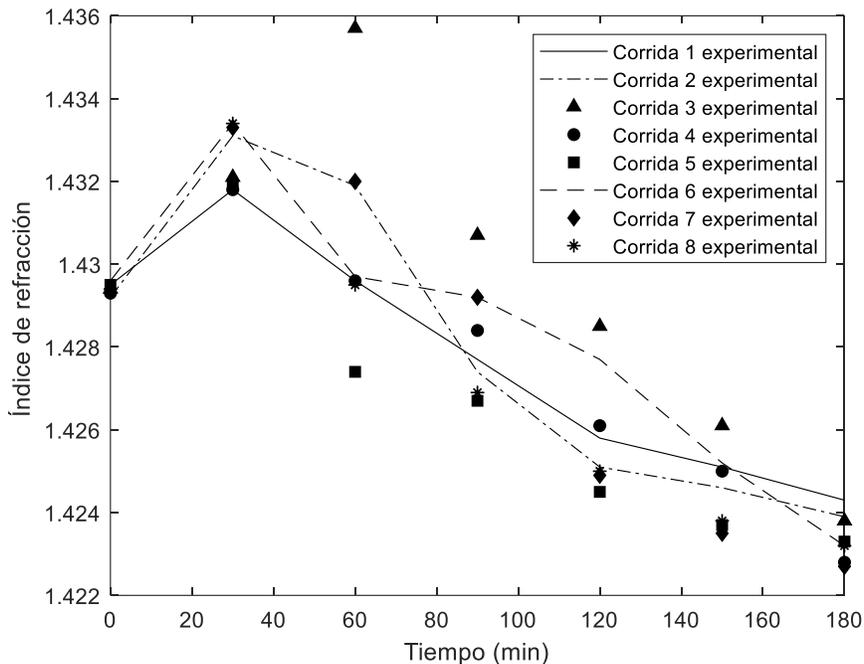


Figura 3. 13 Índice de refracción vs tiempo (min)

### 3.6 Sobresaturación relativa

Se presentan los valores experimentales de la sobresaturación con respecto al tiempo. La tendencia cualitativa de los datos experimentales sigue en su mayoría el mismo comportamiento para cada corrida experimental. En el orden experimental, la corrida 3 alcanzó valores mayores de sobresaturación relativa con 0.0067 en el intervalo de tiempo analizado que el resto de las corridas. Se observó que valores altos de sobresaturación conllevan a altas cantidades de formación de núcleos. La formación de cantidades grandes de núcleos se dio alrededor del min 30, posteriormente se presenta un rápido crecimiento de cristales que ocasiona que la sobresaturación disminuya hasta el min 60. Más tarde cuando la sobresaturación baja, por consiguiente, la nucleación decae y aumenta el crecimiento de cristales hasta alcanzar  $58.3988 \mu\text{m}$  de tamaño en el min 90. A partir de ese momento, el crecimiento se hace más lento causado al cambio de las propiedades del sistema cuando se tiene una cantidad considerable de cristales en la solución. Los primeros 30 min del proceso

provocan el mayor cambio de la temperatura y por consecuencia de las propiedades, la sobresaturación incrementa rápidamente y con ella la velocidad de nucleación. Cuando los valores de sobresaturación alcanzaron a descender a valores cercanos a cero y con ello un agotamiento significativo del soluto, dio la pauta a establecer la duración del lote o el proceso de crecimiento de cristales. Lo anterior no sólo demuestra que el sistema nucleó si no que el proceso finalizó de manera adecuada.

La sobresaturación relativa dio la pauta a dar por terminada cada corrida, dado que si esta tiende aproximarse a cero, se dice que está sobre la línea de sobresaturación y la cristalización ha terminado. El comportamiento de la sobresaturación relativa respecto a cada corrida experimental se muestra en la Figuras 3.14-3.17).

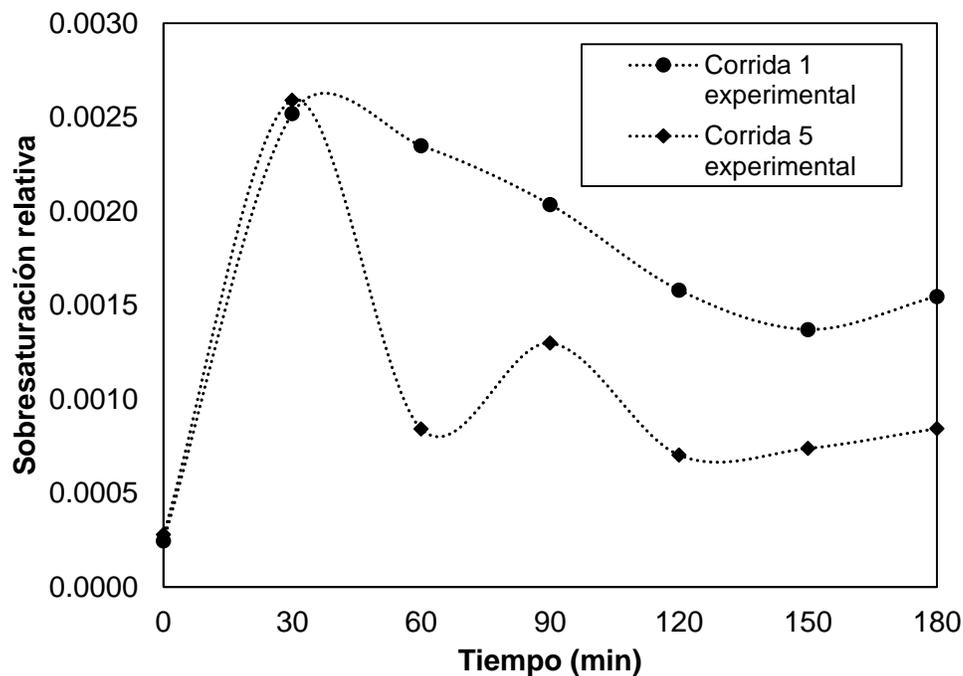


Figura 3. 14 Sobresaturación relativa vs tiempo (min) corrida 1 y 5

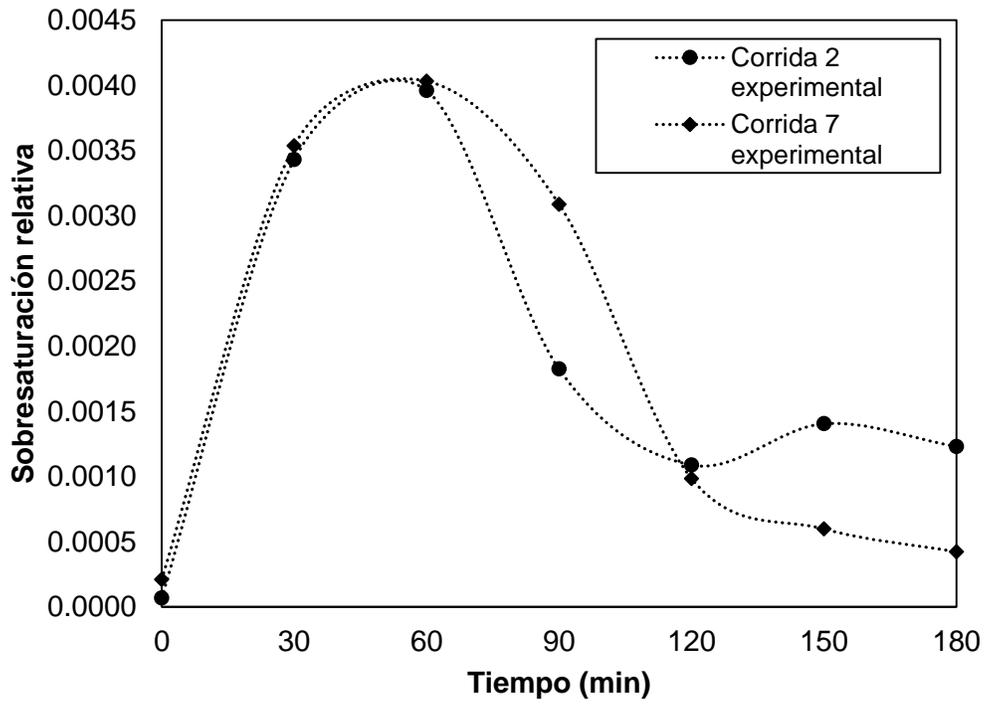


Figura 3. 15 Sobresaturación relativa vs tiempo (min) corrida 2 y 7

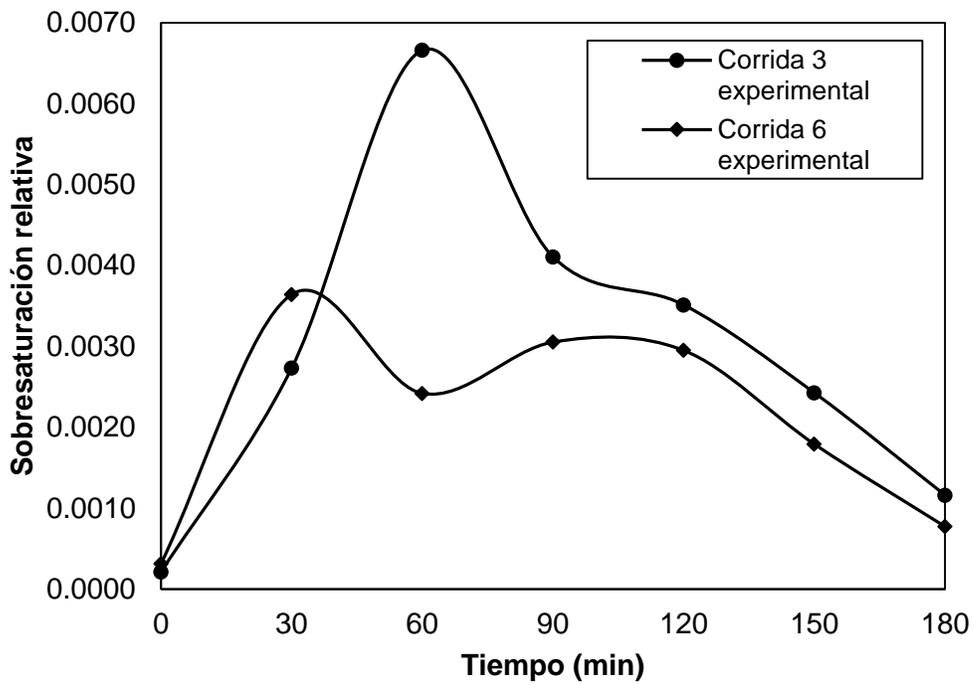


Figura 3. 16 Sobresaturación relativa vs tiempo (min) corrida 3 y 6

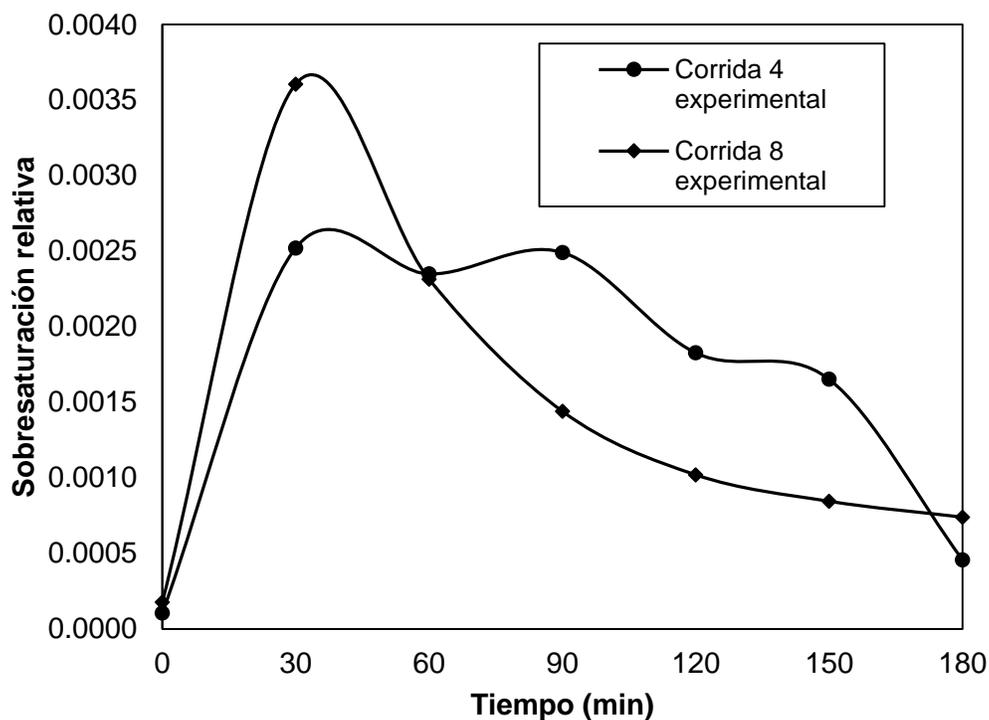


Figura 3. 17 Sobresaturación relativa vs tiempo (min) corrida 4 y 8

### 3.7 Distribución de tamaño de cristal y masa de cristal formado

El comportamiento en el avance del crecimiento y la morfología de los cristales se presenta en la Figura 3.18 donde se puede apreciar al inicio como consecuencia del salto de temperatura generado de 60 °C a 50 °C, la formación de núcleos los cuales afectados por los perfiles de agitación (agitación constante) y perfil de enfriamiento (enfriamiento natural) lograron la formación de cristales. El proceso se desarrolló en un periodo de tiempo de 3 h.

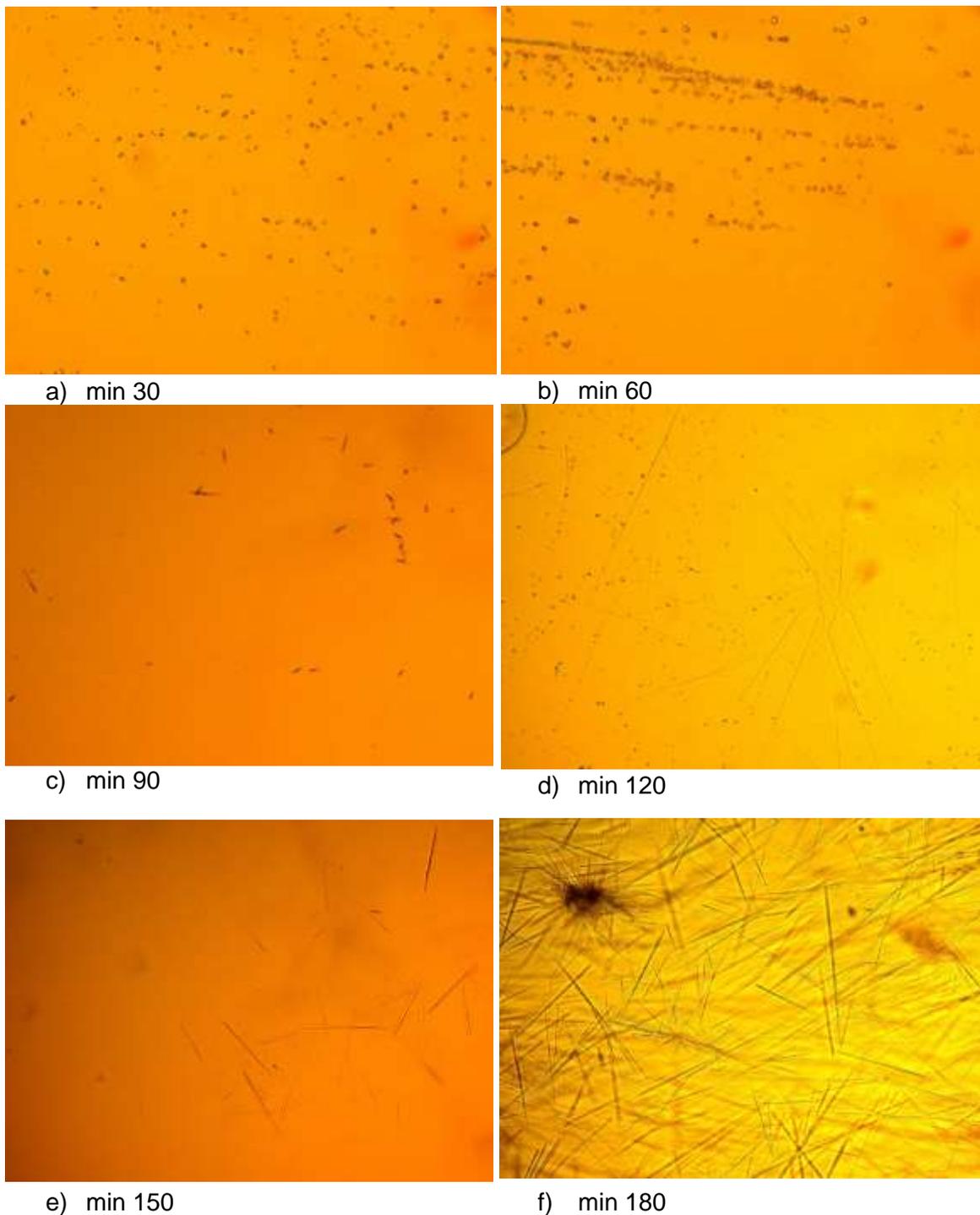


Figura 3. 18 Seguimiento experimental de la cristalización de Stevia (Reb A)-miel de abeja: a) min 30, b) min 60, c) min 90, d) min 120, e) min 150 y f) min 180

La determinación del tamaño medio de los cristales se realizó mediante la toma de muestras extraídas del interior del cristalizador en lapsos de 30 min las cuales fueron

analizadas tomando micrográficas hasta el minuto 180 (tiempo final de lote) empleando el software de análisis de imágenes Digimizer Versión 5.7.0. Se midieron las áreas en pixeles, posteriormente en el programa desarrollado en Julia 1.5.2 se realizó la conversión de pixeles a micras, conjuntamente el programa calcula los valores para las diferentes distribuciones (numero, longitud, área y volumen). Los cristales formados en las mezclas de alcohol acuoso presentaron tener una morfología rectangular (tipo laminilla). Dentro del perfil natural empleado, la trayectoria de agitación constante impulsó el crecimiento de cristales (área superficial) puesto que, la resistencia a la transferencia de masa se redujo con el mejor mezclado. En las Figuras 3.19 y 3.20 se muestra el comportamiento de la DTC en función del tiempo, donde se aprecia un crecimiento de tamaño de los cristales proporcional al tiempo, observándose que la velocidad de agitación, los perfiles de enfriamiento y el tiempo de proceso son importantes variables que definen las características del producto cristalino. Sin embargo, en la Figura 3.21, se aprecia que la desviación estándar fue muy variable y tendió a ser considerablemente alta, por lo que una excelente distribución no fue alcanzada.

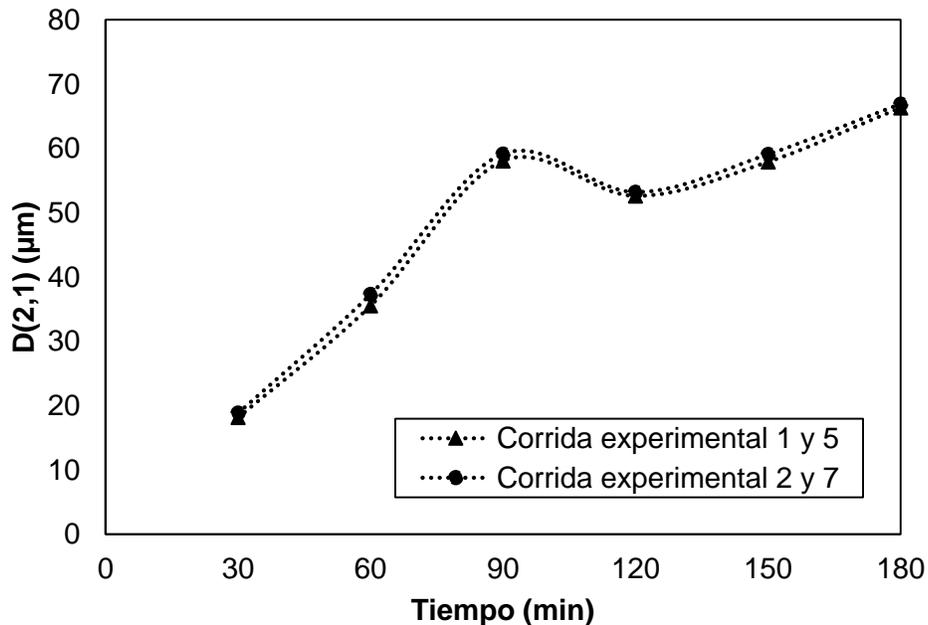


Figura 3. 19 D(2,1) ( $\mu\text{m}$ ) vs tiempo (min)

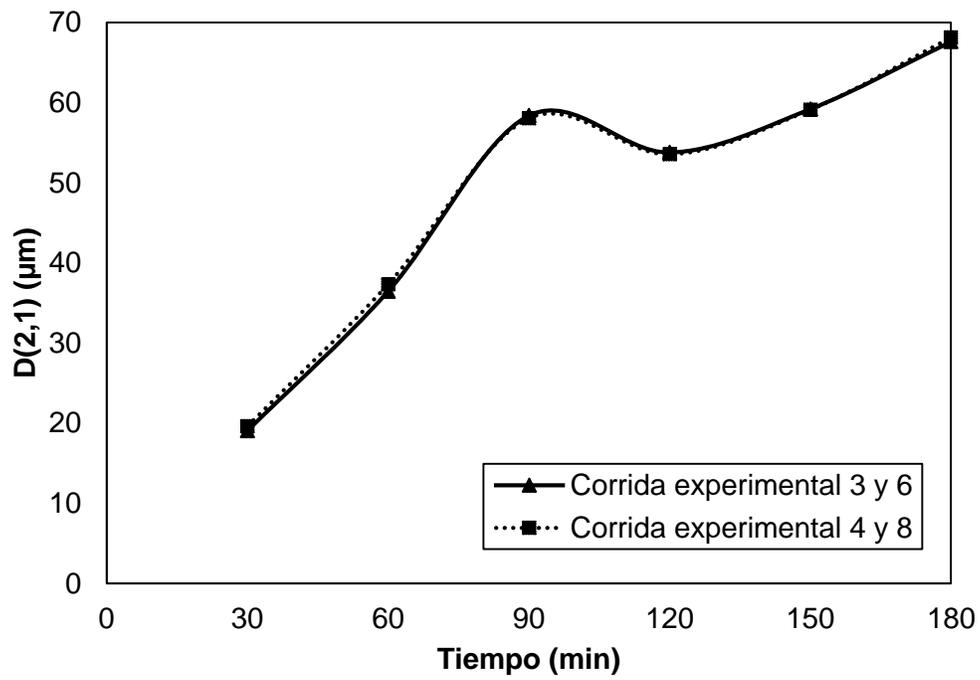


Figura 3. 20 D(2,1) (µm) vs tiempo (min)

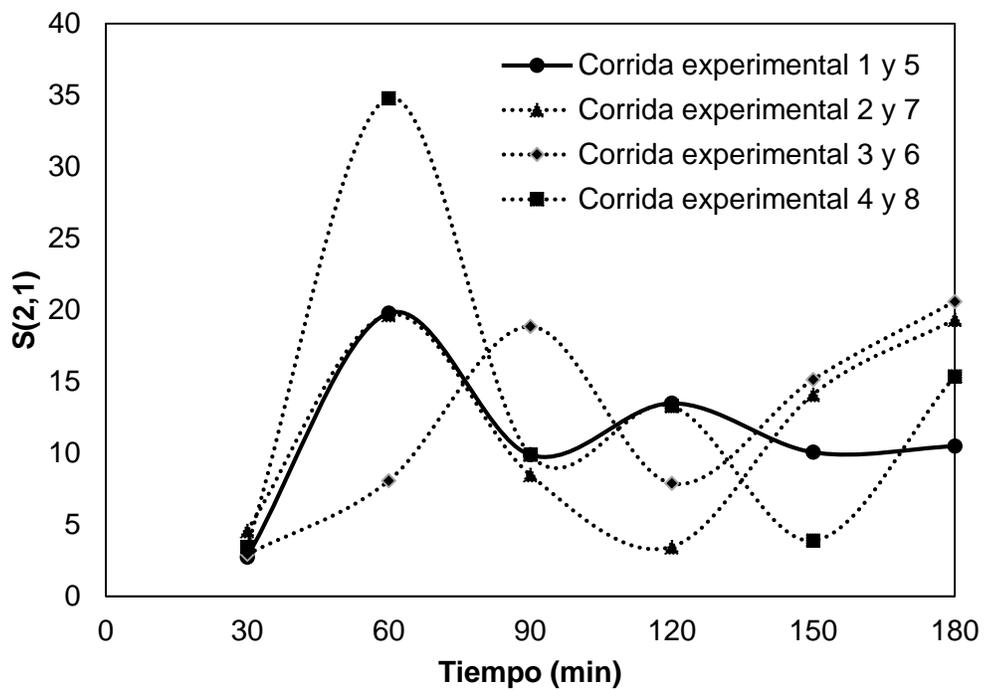


Figura 3. 21 S(2,1) vs tiempo (min)

En la Tabla 3.4 se presentan los resultados promediados obtenidos de la D(2,1) así como la desviación estándar de los experimentos. El cálculo de la DTC para las diferentes distribuciones en % número, % longitud, % área y % volumen se muestra en el Anexo C.2. Para las corridas experimentales 1, 2, 3 y 4 se ha calculado la D(2,1) en conjunto con su respectiva replica. Es posible observar que la D(2,1) mostró un incremento de tamaño en función del tiempo.

Tabla 3. 4 DTC (2,1) y S (2,1) experimentales

Tiempo (min)	Corrida 1 y 5		Corrida 2 y 7		Corrida 3 y 6		Corrida 4 y 8	
	D(2,1)	S(2,1)	D(2,1)	S(2,1)	D(2,1)	S(2,1)	D(2,1)	S(2,1)
30	18.1614	2.7379	18.8487	4.5707	19.0608	2.9265	19.6033	3.4300
60	35.5423	19.7769	37.3077	19.6666	36.4621	8.0667	37.3360	34.7974
90	58.0615	9.8828	59.1286	8.4782	58.3988	18.8404	58.0615	9.8828
120	52.6022	13.4822	53.1982	3.4446	53.8019	7.8903	53.5643	13.2890
150	57.8970	10.0582	59.0692	14.0966	59.2130	15.1346	59.1273	3.8897
180	66.3153	10.4847	66.9064	19.3348	67.6252	20.5823	68.1247	15.3576

Respecto a la MCF parámetro importante en este proceso de cristalización, el cual resulta ser la cantidad producida de producto al término de cada lote, se obtuvo en promedio 64.4 % de soluto recuperado para la mezcla 65-35 % alcohol etílico - agua con peso promedio inicial y final de carga de 237.355 g y 152.85 g respectivamente, para la mezcla 70-30 % se alcanzó un promedio de 59.33 % de soluto recuperado, con un peso inicial de 224.355 g y peso del producto al termino del lote de 133.125 g (ver Figura 3.22)



Figura 3. 22 Masa de cristal formado (MCF)

### 3.8 Evaluación del diseño factorial 2<sup>2</sup>

A continuación se presenta en la Tabla 3.5 los valores obtenidos del diseño experimental factorial 2<sup>2</sup> para cada corrida, donde las variables de respuesta fueron la masa de cristal formado (MCF) y la distribución de tamaño de cristal en función de la longitud (D(2,1)). Para cada una de las variables mencionadas se muestra a continuación los análisis de varianza, adicionalmente se presentan los efectos de los factores sobre dichas variables en las Figuras 3.23 y 3.24.

Tabla 3. 5 Resultados del diseño factorial 2<sup>2</sup> para la cristalización del Reb A-miel de abeja

Orden de experimento	Factor			Respuesta	
	A	B	AB	MCF	D(2,1)
1	-	-	+	148.8	66.3153
2	+	-	-	135.5	66.9064
3	-	+	-	159.9	67.6252
4	+	+	+	127	68.1247
5	-	-	+	152.1	66.3153
6	-	+	-	150.6	67.6252
7	+	-	-	133.3	66.9064
8	+	+	+	136.7	68.1247

Los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza para la variable de respuesta D(2,1) (Tabla 3.6) muestra que el efecto de ambos factores son significativos con un valor de  $p = 2 \times 10^{-5}$  por lo cual comparado con un factor de alfa de 0.05 se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de manera que, el Anova es significativo y hay diferencia entre los tratamientos del factor en estudio notando un mayor efecto del factor B, demostrando que la velocidad de agitación afecta potencialmente el crecimiento de los cristales, además si no se tiene un buen control sobre dicho factor, puede presentarse rotura de

cristales o una mala homogenización de la mezcla. Con respecto al factor A (%V/V), el efecto significativo de dicho factor pudo haberse dado, debido a que la solubilidad está fuertemente afectada por el solvente y la proporción de este mismo. Se obtuvo una  $R^2$  ajustada de 98 % para el modelo.

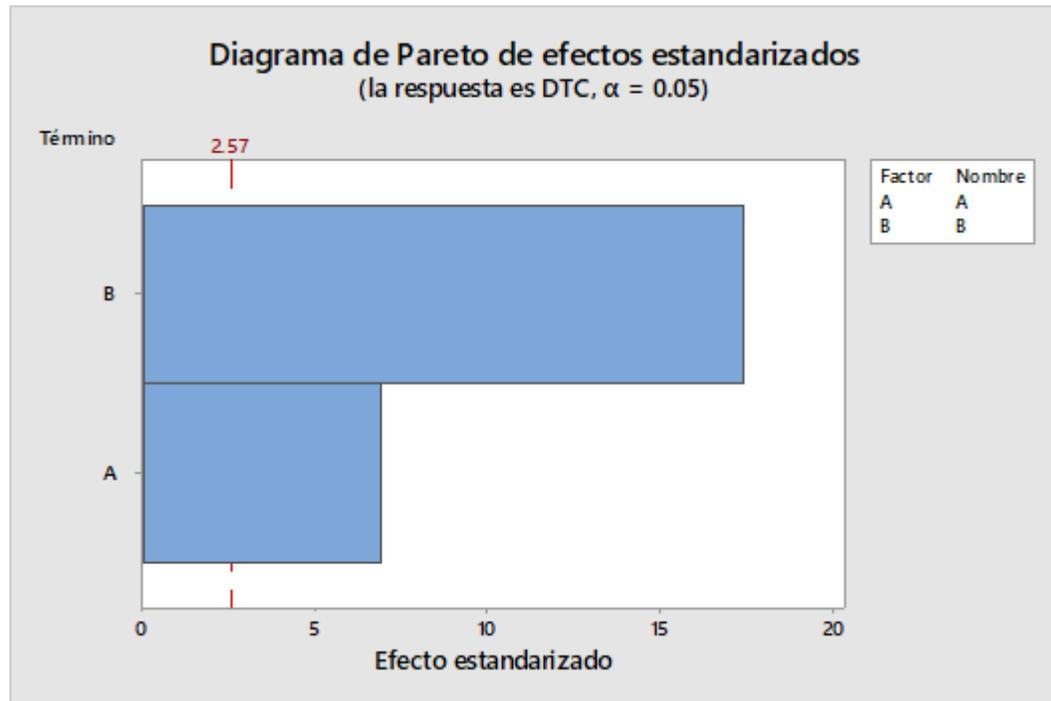


Figura 3. 23 Diagrama de Pareto sobre la variable de respuesta de DTC

Tabla 3. 6 Análisis de Varianza para la D(2,1)

Fuente	GL	Suma de Cuadrados Ajustado.	Media de Cuadrados Ajustado.	Valor F	Valor $\rho$
Modelo	2	3.27028	1.63514	175.00	$2 \times 10^{-5}$
Lineal	2	3.27028	1.63514	175.00	$2 \times 10^{-5}$
A: (%V/V)	1	0.44236	0.44236	47.35	$9.9 \times 10^{-4}$
B: Agitación	1	2.82792	2.82792	302.66	$1 \times 10^{-5}$
Error	5	0.04672	0.00934		
Falta de ajuste	1	0.00172	0.00172	0.15	$7.1596 \times 10^{-1}$
Error puro	4	0.04500	0.01125		
Total	7	3.31700			

En la Tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable de respuesta masa de cristal formado (MCF), donde sólo el factor A (%V/V) fue significativo (valor de  $p = 0.007$ ). El factor B (Agitación) no presentó efecto significativo sobre la MCF, debido que, la condición de agitación mecánica no generó efecto sobre el balance de masa, obteniéndose una  $R^2$  de 80 % para el ajuste del modelo.

El comportamiento es similar al observado por Bolaños *et al.*, 2014, donde estudiaron sobre los efectos de la tasa de agitación a una velocidad de agitación constante de 250 rpm, en la producción de cristales de caña de azúcar obtenidos en un proceso de cristalización por lotes a escala piloto, donde se determinó que la tasa de agitación no tiene efecto apreciable en la producción de FCM.

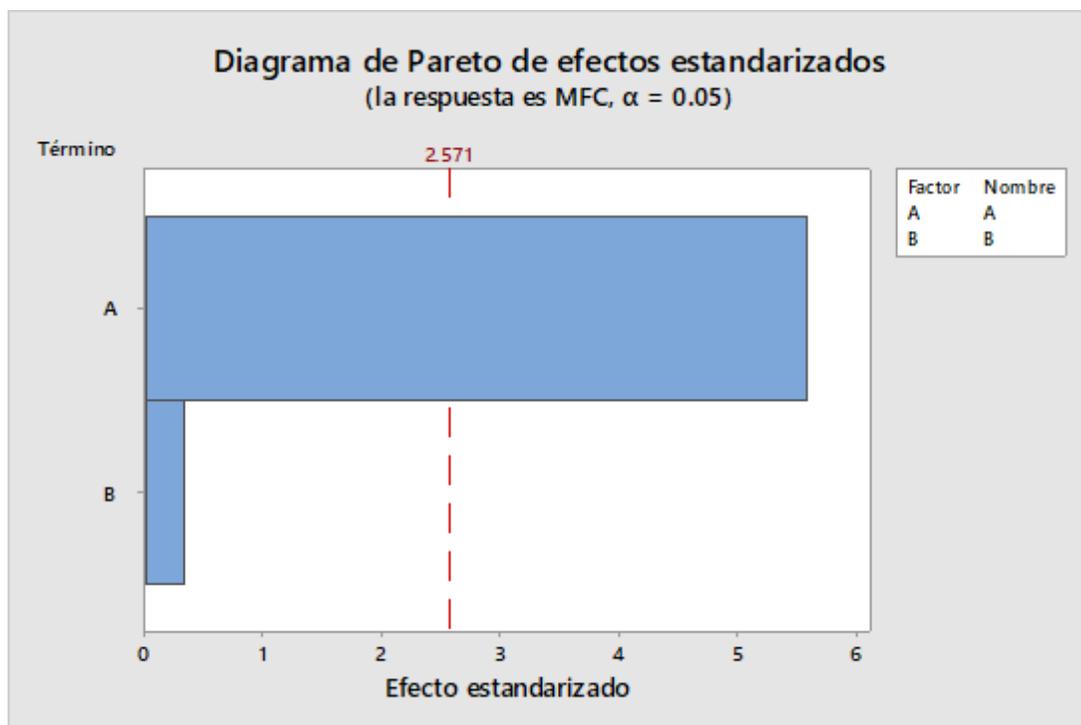


Figura 3. 24 Diagrama de Pareto sobre la variable de respuesta de MFC

Tabla 3. 7 Análisis de Varianza para la MFC

Fuente	GL	Suma de Cuadrados Ajuste.	Media de Cuadrados Ajuste.	Valor F	Valor $\rho$
Modelo	2	780.683	390.341	15.59	$7 \times 10^{-3}$
Lineal	2	780.683	390.341	15.59	$7 \times 10^{-3}$
A: (%V/V)	1	778.151	778.151	31.08	$3 \times 10^{-3}$
B:Agitación	1	2.531	2.531	0.10	$7.63 \times 10^{-1}$
Error	5	125.166	25.033		
Falta de ajuste	1	27.011	27.011	1.10	$3.53 \times 10^{-1}$
Error puro	4	98.155	24.539		
Total	7	905.849			

En las Figuras 3.25 y 3.26 se pueden identificar los efectos principales de los factores que influyen en la variable de respuesta, se observa que los mejores resultados en DTC y MCF se dieron en nivel alto para la velocidad de agitación (250 rpm), y nivel bajo para la proporción de alcohol etílico-agua (65-35 %), obteniendo con dichas condiciones de operación un tamaño máximo para  $D(2,1) = 67.6251 \mu\text{m}$  y  $MCF = 159.9 \text{ g}$ .

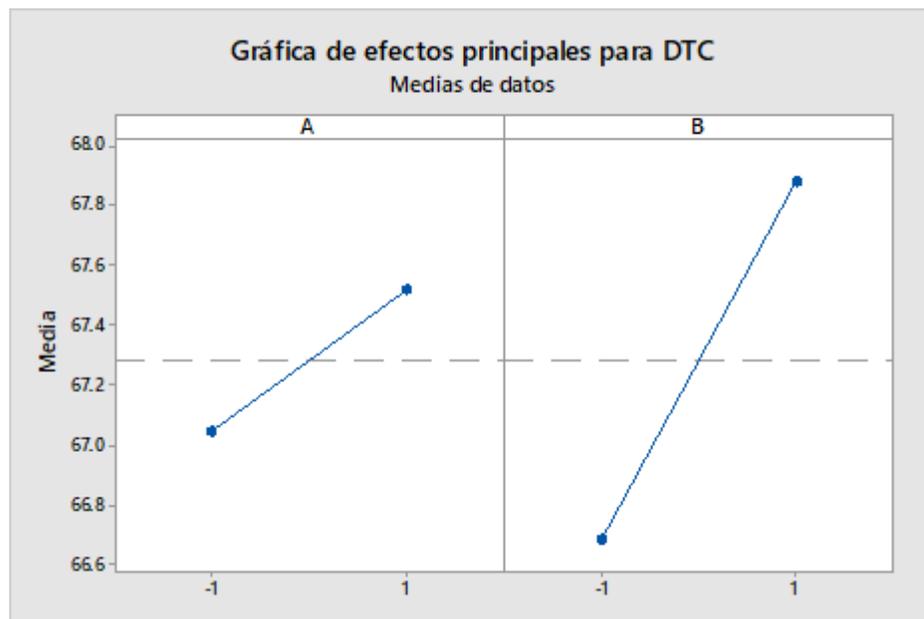


Figura 3. 25 Grafica de efectos principales sobre la variable de respuesta de DTC

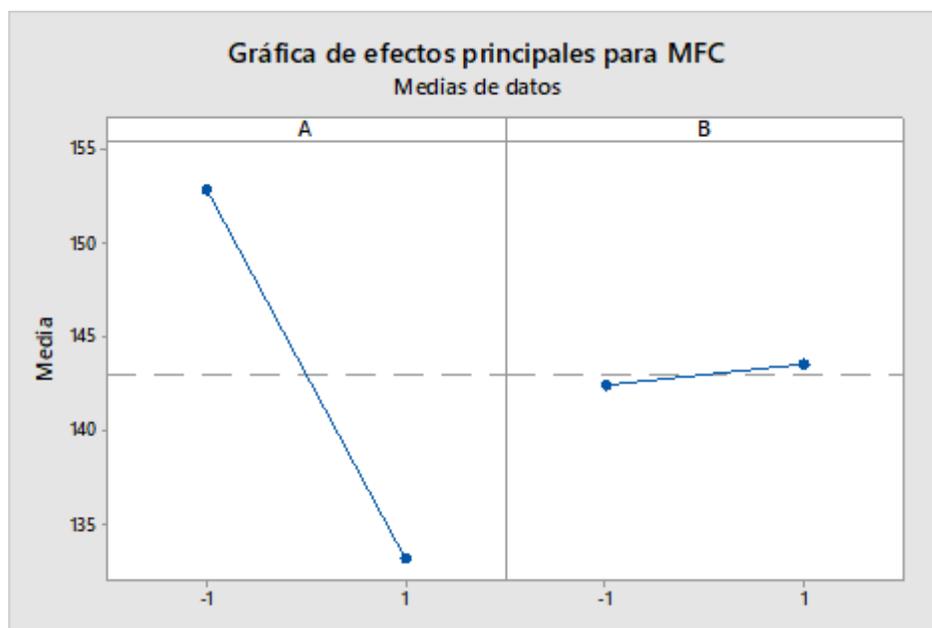


Figura 3. 26 Grafica de efectos principales sobre la variable de respuesta de MFC

### 3.9 Caracterización del producto final

En función de la escala de color indicada en el Capítulo 1 (escala de Hunter), se muestran a continuación los resultados promedio de la evaluación de color del Reb-A-miel de abeja cristalizado (RMC) en la Tabla 3.8. Los valores obtenidos representaron que la muestra tuvo tendencia a una luminosidad alta ( $L= 55.34$ ) y parámetros de color a negativo ( $a= -0.57$ ) y b positivo ( $b= 4.56$ ) indicando tonalidades de verde y amarillo respectivamente, derivado al contenido de flavonoides que presentan normalmente las mieles y que a su vez estos están directamente relacionados con el color, a medida que la miel es más oscura, se incrementa el valor de los flavonoides. Sin embargo, el producto mostro buena aceptación.

Tabla 3. 8 Determinación de color en escala de Hunterlab

Parámetros	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
<b>L</b>	54.83	56.51	54.67	55.34
<b>a</b>	-0.61	-0.50	-0.60	-0.57
<b>b</b>	3.50	4.97	5.21	4.56

### 3.9.1 Pruebas organolépticas

Se presenta en la Tabla 3.9 la puntuación asignada por los panelistas para cada atributo sensorial (sabor, apariencia, color y olor) para la evaluación del producto final.

Tabla 3. 9 Puntaje asignado en la evaluación sensorial del producto final

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

Los resultados generados en Minitab para el análisis de varianza de las pruebas sensoriales muestran que el valor de probabilidad resultó ser menor a alfa (valor de  $\rho = 0.007$ ) (Tabla 3.10), por lo cual existen diferencias significativas de sabor, olor, color y aspecto entre las muestras, es decir la evaluación realizada a los panelistas mostró que no todos los aspectos evaluados tuvieron la misma aceptación entre ellos,

sin embargo el nivel de agrado en general mostro ser relativamente aceptado de 6 a 8 en escala hedónica. A partir de los intervalos de confianza de 95 % para la media (Tabla 3.11) se realizó una comparativa de medias (Prueba de Tukey) para el olor, color, sabor y apariencia (Tabla 3.12). Se observó que los factores de color, sabor y olor en base a los intervalos de confianza de 95 % para la media comparten medias en la letra A, es decir no son significativamente diferentes, de igual manera el sabor, olor y apariencia hacen un traslape coincidiendo en la letra B.

Las medias generadas para los atributos de sabor, apariencia, color y olor fueron de 7.1, 6.45, 7.7 y 7.0, respectivamente.

Tabla 3. 10 Análisis de Varianza de las pruebas sensoriales (sabor, apariencia, color y olor)

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor F	Valor $\rho$
<b>Factor</b>	3	15.74	5.246	4.38	0.007*
<b>Error</b>	76	90.95	1.197		
<b>Total</b>	79	106.69			

\*Término significativo (alfa=0.1)

Tabla 3. 11 Análisis de medias de las pruebas sensoriales (sabor, apariencia, color y olor)

Factor	N	Media	Desv.Est.	Intervalos de Confianza de 95 %
<b>Sabor</b>	20	7.100	0.968	(6.613, 7.587)
<b>Apariencia</b>	20	6.450	1.146	(5.963, 6.937)
<b>Color</b>	20	7.700	1.081	(7.213, 8.187)
<b>Olor</b>	20	7.000	1.170	(6.513, 7.487)

Desv.Est. agrupada = 1.09394

Tabla 3. 12 Prueba Tukey para las pruebas sensoriales

Factor	N	Media	Agrupación	
<b>Color</b>	20	7.700	A	
<b>Sabor</b>	20	7.100	A	B
<b>Olor</b>	20	7.000	A	B
<b>Apariencia</b>	20	6.450		B

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

- Las mieles obtenidas en las diferentes zonas del estado de Veracruz, cumplieron con los requisitos de calidad fisicoquímica establecidos por las normas (Codex Alimentarius, 2019) y la Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-004-SAG/GAN, 2018).
- Las mieles provenientes de los tres lugares Amatlán, Álamo y Córdoba obtuvieron la misma aceptabilidad en cuanto al color, olor y consistencia, pero en cuanto al sabor la miel de Córdoba tuvo mayor aceptación.
- Se utilizó alcohol etílico como solvente, debido a que el Reb A es parcialmente soluble en este alcohol, por tal motivo que se empleó en mezcla con el agua para aumentar la solubilidad (%volumen alcohol etílico/volumen agua). El mayor grado de concentración reportado en IR para la cristalización fue alcanzado en mezclas de proporciones: 65-35 y 70-30 % con 1.4284 IR y 1.4242 IR respectivamente.
- El perfil de enfriamiento natural después de efectuar el cambio de escalón en la temperatura de 60 °C a 50 °C y estabilizarse mostro un comportamiento lineal.
- Al implementar el perfil de enfriamiento natural fue necesario iniciar enfriando lento, siguiendo una trayectoria de enfriamiento natural pero lento ya que si es muy rápido se crea un exceso de nucleación y los cristales no crecen, después de efectuar el cambio de escalón en la temperatura de 60 °C a 50 °C del perfil de enfriamiento natural, se programó el sistema para un perfil de enfriamiento lineal de 50 °C a 10 °C, pero se observó que no hubo cambio

significativo con el enfriamiento natural, ya que el perfil de enfriamiento natural después de estabilizarse tiende a comportarse como uno lineal.

- El área total de cristales está fuertemente influenciada por los perfiles de enfriamiento y de agitación, por lo cual se logró un notable crecimiento de los cristales con el perfil de enfriamiento natural y el perfil de agitación constante, favoreciendo la transferencia de masa.
- Los mejores resultados en cuanto a DTC y MCF se dieron en niveles bajos para la mezcla de solventes (Alcohol etílico 65 % - Agua 35 %) y alto para la velocidad de agitación (250 rpm), obteniendo con estas condiciones un tamaño máximo para  $D(2,1) = 67.6251 \mu\text{m}$  y  $\text{MCF} = 159.9 \text{ g}$ .

## RECOMENDACIONES

- Elaborar un programa de mantenimiento para el microscopio Zeis Primo Star y baño de recirculación programable Julabo F-34, para asegurar el correcto funcionamiento durante las corridas experimentales. Así mismo, de los termopares del cristizador.
- Incorporar una pestaña en el instrumento virtual de LabVIEW para el control del microscopio y así lograr una mejor manipulación del proceso.
- Acondicionar el sistema de muestreo del cristizador batch a presión atmosférica que facilite y permita la toma de muestra y asegurar que éstas sean representativas.
- Desarrollar un manual de operación de equipos del laboratorio de cristalización, para un mejor conocimiento y manejo de ellos y evitar descomponerlos.
- Configurar el refractómetro automático de ángulo crítico modelo ATR-BR de la marca SCHMIDT HAENSCH para poder trabajar los °Brix para la stevia, puesto que solo está configurado para sacarosa.

# **ANEXOS**

**ANEXO A CARACTERIZACIÓN DE MIEL DE ABEJA****Anexo A.1 Curvas de calibración para la determinación de azúcares reductores (glucosa y fructosa)**

En la Figura A.1.1 se ilustra la curva patrón para la glucosa en un rango de detección: 78-5000  $\mu\text{g/mL}$  generada en el presente trabajo para la determinación de azúcares reductores. Así mismo en la Figura A.1.2 se muestra la curva patrón para la Fructosa en un rango de detección de 39.0625-1250  $\mu\text{g/ml}$ .

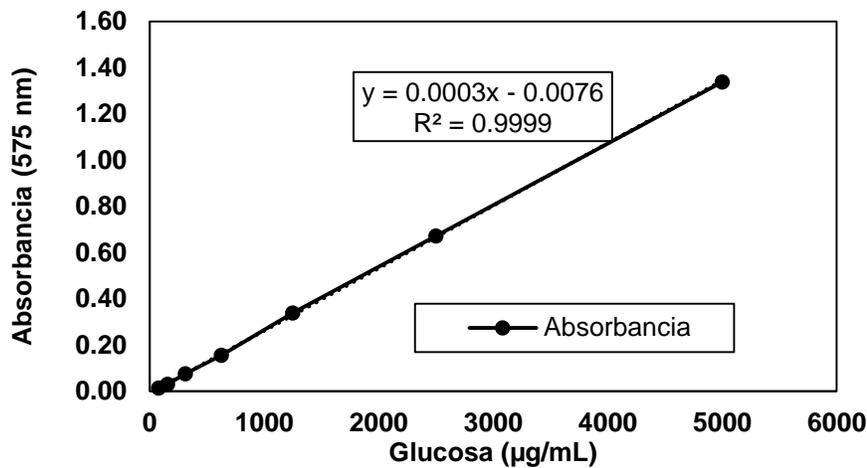


Figura A.1. 1 Curva Patrón de Glucosa

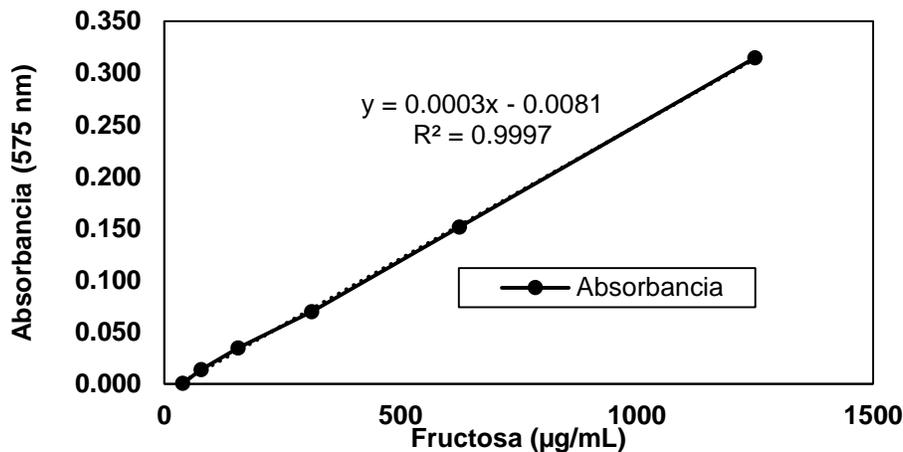


Figura A.1. 2 Curva Patrón de Fructosa

## ANEXO A.2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

En este apartado se presentan (Tablas A.2.1 - A.2.13) los valores experimentales para la caracterización físicoquímica de las mieles de abeja obtenidos en las réplicas para pH, acidez libre, viscosidad, color, conductividad eléctrica, actividad de agua, humedad, °Brix, sacarosa, azúcares reductores, proteína e hidroximetilfurfural.

Tabla A.2. 1 Determinación de pH

Miel	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	D.E.
1	3.916	3.946	3.966	3.943	0.0252
2	3.858	3.856	3.881	3.865	0.0139
3	4.392	4.41	4.432	4.411	0.0200

Tabla A.2. 2 Determinación de acidez Libre

Miel	Meq/Kg			Promedio	D.E.
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1	6.8	6.7	6.7	6.73	0.0577
2	6.5	6.5	6.4	6.47	0.0577
3	6.9	7	7	6.97	0.0577

Tabla A.2. 3 Determinación de viscosidad

Miel	Poise			Promedio	D.E
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1	36.7	34.1	37.2	36.00	1.6643
2	114	119	115	116.00	2.6458
3	177	176	177	176.67	0.5774

Tabla A.2. 4 Determinación de color

Miel	(Escala Pfund)			Promedio	D.E.
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1	96	95	95	95.33	0.5774
2	36	35	36	35.67	0.5774
3	46	47	46	46.33	0.5774

Tabla A.2. 5 Determinación de conductividad Eléctrica

Miel	(mS/cm)			Promedio	D.E.
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1	0.737	0.733	0.728	0.733	0.0045
2	0.185	0.184	0.176	0.182	0.0049
3	0.426	0.43	0.429	0.428	0.0021

Tabla A.2. 6 Determinación de actividad de agua

Miel	aw			Promedio	D.E
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1	0.57	0.58	0.57	0.57	0.0058
2	0.53	0.52	0.51	0.52	0.0100
3	0.48	0.48	0.47	0.48	0.0058

Tabla A.2. 7 Determinación de Humedad

Miel	% (g/100g)			Promedio	D.E.
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1	4.56	3.95	4.16	4.22	0.3099
2	2.42	2.26	3.25	2.64	0.5314
3	1.27	1.42	1.28	1.32	0.0839

Tabla A.2. 8 Determinación de °Brix

	% de sólidos solubles / 100 g de miel			Promedio	D.E.
<b>Miel</b>	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1	79.5	79.9	79.7	79.70	0.2000
2	82	82.2	81.9	82.03	0.1528
3	81.4	82.2	82.3	81.97	0.4933

Tabla A.2. 9 Determinación de % sacarosa método polimétrico

	(g/100 cm <sup>3</sup> )			Promedio	D.E.
<b>Miel</b>	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1	1.15	1.05	1.15	1.117	0.0577
2	1.23	1.2	1.25	1.227	0.0252
3	1.95	1.9	1.9	1.917	0.0289

Tabla A.2. 10 Determinación de azúcares reductores % Fructosa método DNS

	(g/100g)				Promedio	D.E.
<b>Miel</b>	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4		
1	32.28969	32.36667	27.80671	28.72405	30.2968	2.3756
2	39.0748	38.34316	38.27279	37.58535	38.3190	0.6089
3	38.29009	31.49093	35.95469	34.46069	35.0491	2.8479

Tabla A.2. 11 Determinación de azúcares reductores % Glucosa método DNS

	(g/100g)				Promedio	D.E.
<b>Miel</b>	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4		
1	32.13	32.20	27.66	28.57	30.1413	2.3672
2	38.91	38.18	38.11	37.43	38.1585	0.6052
3	38.12	31.35	35.79	34.31	34.8935	2.8371

Tabla A.2. 12 Determinación de proteínas

Miel	%			Promedio	D.E.
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1	0.322	0.54318489	0.53311258	0.4661	0.1249
2	0.21709817	0.2760631	0.2323903	0.2419	0.0306
3	0.49386503	0.51013942	0.55593923	0.5200	0.0322

Tabla A.2. 13 Determinación de hidroximetilfurfural

Miel	Prueba 1	
	mg/100 g de miel	mg HMF/Kg de miel
1	2.04	20.4
2	2.21	22.1
3	2.06	20.6

## ANEXO B RESULTADOS DE LA PROPORCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO/AGUA Y SATURACIÓN

### Anexo B.1 Proporción de alcohol etílico/agua

Se presentan en las Tablas B.1.1 - B.1.4 los valores experimentales de la prueba de proporciones de alcohol etílico-agua como solvente para la cristalización de la mezcla Reb A-miel de abeja.

Tabla B.1. 1 Concentración de Reb A-miel de abeja en 100 mL de solvente (55 mL alcohol etílico-45 mL agua)

Temperatura ° C	Cantidad agregada de Reb A (g)	Cantidad agregada de miel (mL)	Índice de refracción (-)	
			Réplica 1	Réplica 2
60	25	8.3	1.3908	1.3924
60	30	10	1.3982	1.3979
60	35	11.6	1.4030	1.4026
60	40	13.3	1.4117	1.4110
60	45	15	1.4178	1.4158
60	66.5	16.6	1.4215	1.4195

Tabla B.1. 2 Concentración de Reb A-miel de abeja en 100 mL de solvente (60 mL alcohol etílico-40 mL agua)

Temperatura ° C	Cantidad agregada de Reb A (g)	Cantidad agregada de miel (mL)	Índice de refracción (-)	
			Réplica 1	Réplica 2
60	25	8.3	1.3927	1.392
60	30	10	1.3976	1.3974
60	35	11.6	1.4028	1.4038
60	40	13.3	1.4103	1.411
60	45	15	1.4164	1.4152
60	60.4	16.6	1.4196	1.4224

Tabla B.1. 3 Concentración de Reb A-miel de abeja en 100 mL de solvente (65 mL alcohol etílico-35 mL agua).

Temperatura ° C	Cantidad agregada de Reb A (g)	Cantidad agregada de miel (mL)	Índice de refracción (-)	
			Réplica 1	Réplica 2
60	25	8.3	1.396	1.3967
60	30	10	1.4019	1.4018
60	35	11.6	1.4074	1.4093
60	40	13.3	1.4137	1.4163
60	45	15	1.418	1.4194
60	54.5	16.6	1.4273	1.4294

Tabla B.1. 4 Concentración de Reb A-miel de abeja en 100 mL de solvente (70 mL alcohol etílico-30 mL agua)

Temperatura ° C	Cantidad agregada de Reb A (g)	Cantidad agregada de miel (mL)	Índice de refracción (-)	
			Réplica 1	Réplica 2
60	25	8.3	1.3966	1.397
60	30	10	1.4039	1.4028
60	35	11.6	1.411	1.4105
60	40	13.3	1.4163	1.4174
60	45	15	1.4219	1.4222
60	49	16.6	1.4246	1.4237

## Anexo B.2 Puntos experimentales de solubilidad

A continuación se presenta en la Tabla B.2.1 los valores experimentales de las pruebas de solubilidad. Se propusieron cinco diferentes temperaturas de saturación, donde se estableció un volumen de 300 mL (%v/v) para la mezcla alcohol etílico-agua (195 mL alcohol etílico -105 agua). La prueba termino hasta alcanzar la máxima cantidad de soluto que ya no pudo diluirse a determinada temperatura.

Tabla B.2. 1 Datos experimentales de solubilidad de la mezcla Reb A-miel de abeja

Temperatura °C	Índice de refracción (-)		Promedio
	Réplica 1	Réplica 2	IR
60	1.4289	1.4293	1.4291
50	1.4275	1.4261	1.4268
40	1.4248	1.424	1.4244
20	1.4224	1.4231	1.4228
10	1.4215	1.4223	1.4219

## ANEXO C RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EXPERIMENTALES DE LA CRISTALIZACIÓN

### Anexo C.1 Puntos experimentales del diseño factorial 2<sup>2</sup>

En este anexo se presentan en las Tablas C.1.1 – C.1.8 los puntos experimentales de las ocho corridas realizadas del diseño factorial 2<sup>2</sup>. Cabe mencionar que fueron tomados dos registros por cada tiempo de muestreo para tener un mejor control del proceso.

Tabla C.1. 1 Puntos experimentales orden de corrida 1

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Índice de refracción (-)		Promedio
		Registro 1	Registro 2	
0	60	1.4297	1.4292	1.4295
30	51.9	1.4314	1.4322	1.4318
60	43.69	1.4298	1.4293	1.4296
90	36.7	1.4279	1.4275	1.4277
120	28.31	1.4259	1.4256	1.4258
150	20.1	1.4253	1.4248	1.4251
180	10	1.424	1.4246	1.4243

Tabla C.1. 2 Puntos experimentales orden de corrida 2

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Índice de refracción (-)		Promedio
		Registro 1	Registro 2	
0	60	1.429	1.4294	1.4292
30	48.19	1.4322	1.434	1.4331
60	42.31	1.4314	1.4323	1.4319
90	36.88	1.4285	1.4263	1.4274
120	26.31	1.4246	1.4255	1.4251
150	17.81	1.4243	1.4249	1.4246
180	9.19	1.4235	1.4242	1.4239

Tabla C.1. 3 Puntos experimentales orden de corrida 3

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Índice de refracción (-)		Promedio
		Registro 1	Registro 2	
0	60	1.4293	1.4295	1.4294
30	54.38	1.4315	1.4327	1.4321
60	43.75	1.4348	1.4366	1.4357
90	38.88	1.4309	1.4304	1.4307
120	29.81	1.4289	1.4281	1.4285
150	19.8	1.4264	1.4257	1.4261
180	9.61	1.4236	1.4239	1.4238

Tabla C.1. 4 Puntos experimentales orden de corrida 4

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Índice de refracción (-)		Promedio
		Registro 1	Registro 2	
0	60	1.4291	1.4294	1.4293
30	50.38	1.4317	1.4319	1.4318
60	39.19	1.4297	1.4294	1.4296
90	34.64	1.4282	1.4285	1.4284
120	27.75	1.4259	1.4263	1.4261
150	16.87	1.4252	1.4247	1.4250
180	9.54	1.4229	1.4226	1.4228

Tabla C.1. 5 Puntos experimentales orden de corrida 5

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Índice de refracción (-)		Promedio
		Registro 1	Registro 2	
0	60	1.4292	1.4298	1.4295
30	53.75	1.4326	1.4312	1.4319
60	42.31	1.4277	1.4271	1.4274
90	36.88	1.4268	1.4265	1.4267
120	26.31	1.4244	1.4246	1.4245
150	19.44	1.4238	1.4235	1.4237
180	9.9	1.4236	1.423	1.4233

Tabla C.1. 6 Puntos experimentales orden de corrida 6

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Índice de refracción (-)		Promedio
		Registro 1	Registro 2	
0	60	1.4294	1.4297	1.4296
30	51.16	1.4336	1.4332	1.4334
60	44.32	1.4307	1.4286	1.4297
90	34.44	1.4292	1.4291	1.4292
120	28.37	1.4279	1.4275	1.4277
150	16.87	1.4253	1.425	1.4252
180	10.01	1.4235	1.4229	1.4232

Tabla C.1. 7 Puntos experimentales orden de corrida 7

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Índice de refracción (-)		Promedio
		Registro 1	Registro 2	
0	60	1.4295	1.4293	1.4294
30	55.88	1.4336	1.4329	1.4333
60	40.19	1.4309	1.433	1.4320
90	33.7	1.4291	1.4293	1.4292
120	22.44	1.425	1.4248	1.4249
150	14.13	1.4238	1.4231	1.4235
180	9.44	1.4226	1.4228	1.4227

Tabla C.1. 8 Puntos experimentales orden de corrida 8

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Índice de refracción (-)		Promedio
		Registro 1	Registro 2	
0	60	1.4295	1.4292	1.4294
30	56.86	1.4337	1.433	1.4334
60	40.25	1.4299	1.4291	1.4295
90	30.87	1.427	1.4267	1.4269
120	25.32	1.4251	1.4248	1.4250
150	15.12	1.4237	1.4239	1.4238
180	9.88	1.423	1.4233	1.4232

## Anexo C.2 Cálculo de la DTC para las diferentes distribuciones en % número, % longitud, % área y % volumen

En este apartado se presentan en las Tablas C.2.1 – C.2.4 los valores experimentales para las diferentes distribuciones del diseño experimental, dichos resultados son generados por el mismo programa DTC.ipynb desarrollado en el software Julia 1.5.2.

Tabla C.2. 1 Distribuciones en % número, % longitud, % área y % volumen, corrida 1 y 5

Tiempo (min)	D(1,0)	S(1,0)	D(2,1)	S(2,1)	D(3,2)	S(3,2)	D(4,3)	S(4,3)
30	17.7874	2.5791	18.1614	2.7379	18.5741	2.8818	19.0213	3.0019
60	29.3466	13.4842	35.5423	19.7769	46.5468	24.2672	59.1985	22.9270
90	56.065	10.5798	58.0614	9.8827	59.7436	9.1595	61.1479	8.4476
120	49.3491	12.6702	52.6022	13.4822	56.0577	14.3796	59.7463	15.2078
150	56.2682	9.5734	57.8970	10.0581	59.6443	10.3765	61.4496	10.4903
180	64.5165	10.7725	66.3153	10.4847	67.9729	10.1370	69.4847	9.7566

Tabla C.2. 2 Distribuciones en % número, % longitud, % área y % volumen, corrida 2 y 7

Tiempo (min)	D(1,0)	S(1,0)	D(2,1)	S(2,1)	D(3,2)	S(3,2)	D(4,3)	S(4,3)
30	20.5819	6.4546	18.8486	4.5707	19.3440	0.5199	20.4245	2.4512
60	30.2464	25.6595	37.3077	19.6666	48.0497	11.4697	59.4504	27.4422
90	56.5991	11.6306	59.1286	8.4781	60.2081	16.4138	61.4605	3.3838
120	49.3553	11.4185	53.1981	3.4446	57.0411	3.0069	60.9974	28.8638
150	57.3600	0.8388	59.0692	14.0966	60.7935	12.9532	62.2274	11.0376
180	65.3296	15.6449	66.9063	19.3348	68.3679	11.7362	70.8232	9.1015

Tabla C.2. 3 Distribuciones en % número, % longitud, % área y % volumen, corrida 3 y 6

Tiempo (min)	D(1,0)	S(1,0)	D(2,1)	S(2,1)	D(3,2)	S(3,2)	D(4,3)	S(4,3)
30	19.6404	3.1009	19.0608	2.9264	19.6120	1.9071	19.9654	2.1941
60	29.9041	3.0741	36.4621	8.0666	46.9736	29.5098	59.3462	25.5876
90	57.1373	8.0265	58.3987	18.8404	60.0183	11.4096	62.4072	8.1305
120	50.8651	4.2861	53.8019	7.8902	56.4498	8.8194	60.6642	23.3263
150	56.5495	0.2875	59.2129	15.1345	60.9077	18.0767	62.2672	19.4099
180	65.6667	19.5166	67.6251	20.5823	68.2530	0.7350	69.6728	7.8567

Tabla C.2. 4 Distribuciones en % número, % longitud, % área y % volumen, corrida 4 y 8

Tiempo (min)	D(1,0)	S(1,0)	D(2,1)	S(2,1)	D(3,2)	S(3,2)	D(4,3)	S(4,3)
30	19.8752	2.8720	19.6033	3.4299	18.6383	2.7829	19.3132	3.9238
60	29.8727	15.1545	37.3359	34.7974	46.6180	44.8447	59.3088	34.0275
90	56.065	10.5798	58.0614	9.8827	59.7436	9.1595	61.1479	8.4476
120	49.4706	9.1356	53.5643	13.2890	57.0837	10.1585	60.4184	28.4096
150	57.2632	13.6091	59.1272	3.8897	59.8376	17.4782	63.2412	12.9620
180	64.6090	4.8695	68.1247	15.3576	68.0036	13.6233	69.8289	16.1663

## ANEXO D RESULTADOS DE LAS PRUEBAS HEDÓNICAS Y COLOR DEL PRODUCTO FINAL

### Anexo D.1 Boleta de evaluación sensorial

A continuación se presenta en la Figura D.1.1 el formato utilizado para utilizado para realizar la evaluación sensorial de los cuatro atributos (Sabor, apariencia, color y olor) para el edulcorante. La prueba fue aplicada a un panel no entrenado.

**BOLETA DE EVALUACION SENSORIAL. ESCALA HEDÓNICA ESTRUCTURADA**

Instrucción: Pruebe por favor la muestra e indique su nivel de agrado en la escala que mejor describe su reacción para cada uno de los atributos.

Fecha: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Género: Hombre    Mujer

Puntaje	Descripción	Sabor	Apariencia	Color	Olor
1	Incomible				
2	Me disgusta muchísimo				
3	Me disgusta mucho				
4	Me disgusta moderadamente				
5	Me disgusta poco				
6	No me gusta ni me disgusta				
7	Me gusta poco				
8	Me gusta moderadamente				
9	Me gusta mucho				
10	Me gusta muchísimo				

Comentarios: \_\_\_\_\_

Figura D.1. 1 Boleta de evaluación sensorial

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Adari, B. R., Alavala, S., George, S. A., Meshram, H. M., Tiwari, A. K., y Sarma, A. V. 2016. Synthesis of rebaudioside-A by enzymatic transglycosylation of stevioside present in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Food Chemistry* **200** (1): 154-158. doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.033
2. Aguilar Rivera, N., y Román Gamboa, C. 2006. Aspectos teóricos y aplicaciones de la operación unitaria de cristalización **16**(1): 123-133.
3. Badui Dergal, S. 2006. *Química de los alimentos* (Cuarta ed.). México: Pearson Educación.
4. Barojas Huerta, J. 2015. Evaluación de las condiciones de operativas para la cristalización de miel de abeja mediante el desarrollo e implementación de instrumentos virtuales (SCADA). Tecnológico Nacional de México campus Orizaba, Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Orizaba: División de estudios de posgrado e investigación. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química.
5. Bolaños Reynoso, E. 2000. Control y Optimización de las condiciones de operación de cristalizadores batch por enfriamiento. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato.: Tesis Doctoral.
6. Bolaños Reynoso, E., Cabrera Palacios, S. A., Urrea García, G. R., Sánchez Sánchez, K. B., y Cervantes Flores, A. 2017. Determinación de la amplitud de la zona metaestable en la cristalización de azúcar de caña empleando modelos mecanísticos. *Memorias del Congreso Internacional de Investigación Academia Journals* **9**(3): 395-399.
7. Bolaños Reynoso, E., Elizondo Sánchez, M., Sánchez Sánchez, K. B., Luna Solano, G., y Quintana Hernández, P. A. 2016. Condiciones de ensemillamiento de cristales para maximizar la MFC y la DTC en la cristalización de azúcar de

- caña. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. Puerto Vallarta, Jalisco, México: Encuentro Nacional de la AMIDIQ, 63-67.
8. Bolaños Reynoso, E., Preciado Vargas, A. G., Quintero Lobato, G. A., Cerecero Enríquez, R., y Sánchez Sánchez, K. B. 2019. Perfiles de transmisión-extinción a partir de velocidades de sedimentación empleando interfaces gráficas de Labview 2017 para la determinación de tamaño de partícula. Memorias del XL Encuentro Nacional de la AMIDIQ, 65-71.
  9. Bolaños Reynoso, E., Preciado Vargas, A. G., Rosas De Jesús, M., López Zamora, L., y Sánchez Sánchez, K. B. 2019. Determinación de la amplitud de la zona metaestable por método politérmico para la mezcla Rebaudiósido A-Etanol-Agua. Memorias del XL Encuentro Nacional de la AMIDIQ, 72-77.
  10. Bolaños Reynoso, E., Sánchez Sánchez, K. B., Urrea García, G. R., y Ricardez Sandoval, L. 2014. Dynamic Modeling and Optimization of Batch Crystallization of Sugar Cane under Uncertainty. *Ind. Eng. Chem.*, **53**(33), 13180–13194. doi:10.1021/ie501800j
  11. Bolaños Reynoso, E., Xaca Xaca, O., Alvarez Ramirez, J., y Lopéz Zamora, L. 2008. Effect Analysis from Dynamic Regulation of Vacuum Pressure in an Adiabatic Batch Crystallizer Using Data and Image Acquisition. *Ind. Eng. Chem.*, **47**(23), 9426–9436. doi:10.1021/ie071594i
  12. Carvalho, P., Carvalho, E., Barbosa da Silva, S., Mandarim de Lacerda, C. A., Hernández, A., y del Sol, M. 2019. Metabolic Effects of Excessive Fructose Consumption Added. *Int. J. Morphol* **37**(3): 1058-1060.
  13. Chranioti, C., Chanioti, S., y Tzia, C. 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**(1): 1151–1158. doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.083

14. Codex Alimentarius. 2019. (CODEX STAN 12-1981 Norma para la Miel. Normas internacionales de los alimentos.
15. Cortés, M. E., Vigil, P., y Mont, G. 2011. The medicinal value of honey: a review on its benefits to human health, with a special focus on its effects on glycemetic regulation. *Ciencia e Investigación Agraria* **38**(2): 303-317.
16. Cristancho Cruz, L. M., y Monroy Soler, R. A. 2014. Manual de métodos generales para determinación de carbohidratos. Manual de métodos.
17. Douglas Kinghorn, A. 2002. The genus Stevia (Vol. **19**). London and New York: Taylor y Francis e-Library, 2004.
18. Galicia Contreras, L. S. 2017. 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. Orizaba: Instituto Tecnológico de Orizaba. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química.
19. García Almeida , J. M., Casado Fernández, G. M., y García Alemán, J. Julio de 2013. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutrición Hospitalaria* **28**(4): 17-31.
20. Gardana , C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., y Pietta, P. 2003. Metabolism of Stevioside and Rebaudioside A from Stevia rebaudiana Extracts by Human Microflora. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(22): 6618–6622. doi:10.1021/jf0303619.
21. Geankoplis, C. J. 2006. Procesos de transporte y principios de procesos de separación. México: CECSA.
22. Goyal, S. K., Samsher, y Goyal, R. K. 2009. Stevia (Stevia rebaudiana) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **61**(1): 1-10. doi:10.3109/09637480903193049.

23. Harriet, W. 2004. Steviol Glycosides. Chemical and Technical Assessment. Organización Mundial de la Salud: JECFA.
24. Jabbar Siddiqui, A., Ghulam Musharraf, S., Iqbal Choudhary, M., y ur Rahman, A. 2016. Application of Analytical Methods in Authentication and Adulteration of Honey. *Food Chemistry*, **217**(1) : 687-698. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.001
25. Jakub, M. K., y Zbigniew, K. 2019. The functional and health-promoting properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni and its glycosides with special focus on the antidiabetic potential – A review. *Functional Foods*, **61**(1): 60-624.
26. JECFA. 2016. Steviol Glycosides From *Stevia Rebaudiana* Bertoni (Tentative). Organización Mundial de la Salud. Monograph. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
27. Martines, P. M., Thorat, B. N., Lanchote , A. D., y Freitas , L. A. 2016. Green extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bert.) with low solvent consumption: A desirability approach. *Resource-Efficient Technologies* **2**(4): 247-253. doi:10.1016/j.reffit.2016.11.007
28. Méndez Contreras, J. M. 2021. Manual de Técnicas para Lodos Residuales y Biosólidos. Orizaba, Veracruz.: Laboratorio de Posgrado e Investigación Ambiental II.
29. Moguel Ordóñez, Y. B., Echazarreta Gonzalez, C., y Mora Escobedo, R. 2005. Physicochemical quality of honey from honeybees *Apis mellifera*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 323-334.
30. Montgomery, D. C. 2013. Diseño y análisis de experimentos (Segunda edición ed.). D. F., México: Limusa Wiley. Universidad estatal de Arizona.

31. PROY-NOM-004-SAG/GAN. 2018. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones. México: Diario Oficial de la Federación.
32. PROY-NOM-211-SSA1. 2002. Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-211-SSA1-2002. Métodos de prueba fisicoquímicos. Determinación de humedad y sólidos totales en alimentos por secado en estufa. México: Diario Oficial de la Federación.
33. Rajalakshmi, G., Gopal, A., Kumar, A., y Kumar A., D. 2017. Identification of Moisture, Glucose, Sucrose, Fructose region in Honey sample using NIR spectroscopy. IEEE 3rd International Conference on Sensing, Signal Processing and Security (ICSSS), (págs. 389-391).
34. Ramírez Navas, J. S. 2012. Análisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor (Vol. **12**). Cali, Colombia: ReCiTeIA.
35. Ramos C, J. D., y Váldez R, C. A. 2016. Estudio para la estandarización de técnicas de medición de tamaño de cristal DTC mediante fotomicrografías. Instituto Tecnológico de Orizaba. Orizaba: Residencia profesional.
36. Rettig K, M., y Hen K, A. 2014. Color in food as a measurable quality criterion. *Agro Sur* **42**(2): 57-66. doi:10.4206/agrosur.2014.v42n2-07
37. Rios Corripio, M. A. 2010. Quimiometría en la miel de abeja para la determinación de azúcares y detección de adulteración utilizando espectroscopia infrarroja. Instituto Politécnico Nacional. Tepetitla, Tlaxcala: Centro de Investigación en biotecnología aplicada.
38. Ritu, M., y Nandini, J. 2016. Nutritional composition of Stevia rebaudiana, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**(12): 4231-4234. doi:10.1002/jsfa.7627

39. Riveros, M., Parada, A., y Pettinelli, P. 2014. Fructose consumption and its health implications; fructose malabsorption and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrición Hospitalaria* **29**(3): 494. Obtenido de versión On-line ISSN 1699-5198 versión impresa ISSN 0212-1611
40. Rumelhard, M., Hosako, H., Eurlings , I. M., Westerink, W. M., Staska, L. M., Van de Wiel, J. A., y La Marta, J. 2016. Safety evaluation of rebaudioside A produced by fermentation. *Food and Chemical Toxicology*, **89**(1): 73-84. doi:10.1016/j.fct.2016.01.005
41. Salvador Reyes, R., Sotelo Herrera, M., y Paucar Menacho, L. 2014. Study of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as a natural sweetener and its use in benefit of the health. *Scientia Agropecuaria* **5**(3): 157 - 163.
42. Sanchez Gomez, M. 2014. Edulcorantes: Utilización y aprovechamiento en diferentes procesos de la industria alimentaria. Toluca, Mex.: Tesina de Química en Alimentos.
43. Sánchez Sánchez, K. B., y Bolaños Reynoso, E. 2017. Estudio de técnicas de medición de DTC a través de adquisición de imágenes y velocidad de sedimentación. *Memorias del XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ*, 155-160.
44. Sánchez Sánchez, K. B., Bolaños Reynoso, E., Elizondo Sánchez, M., Cervantes Flores, A., y Urrea García, G. R. 2015. Distribución de tamaño de cristal (DTC) a partir de velocidad de sedimentación. *Revista Coloquio de Investigación Multidisciplinaria* **3**(1): 563-570.
45. Tsuzuk, Y., Yamaza, J., y Kagami, K. 1950. The specific rotation of fructose. *Journal of the American Chemical Society* **72**(3): 1071-1073. doi:10.1021/ja01159a004

46. Ulbricht, C., Isaac, R., Milkin, T., Poole, E. A., Rusie, E., Grimes Serrano, J. M., . . . Woods, J. 2010. An Evidence-Based Systematic Review of Stevia by the Natural Standard Research Collaboration. *Cardiovascular Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Cardiovascular Hematological Agents)* **8**(2): 113-127. doi:10.2174/187152510791170960
47. Urrego Ramírez, J. F. 2017. Caracterización de mieles de Abeja *Apis mellifera*, colectadas de diferentes regiones de Antioquia, de acuerdo con los parámetros establecidos por la legislación Colombiana y demás criterios que contribuyen a la calidad. Medellín, Colombia: Tesis de maestría de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
48. Vázquez Hernández , M. C., Alvarado Mariana, A., Aguirre Becerra , H., Soto Zarazúa, G. M., Feregrino Pérez , A. A., y Guevara Gonzalez , R. G. 2018. Effect of the application of elicitors on the amount of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni. XIV International Engineering Congress (CONIIN), 1-3. doi:10.1109/coniin.2018.8489805