



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**INTENSIFICACIÓN DE UN PROCESO MULTI-ETAPA CON MEMBRANAS PARA
LA OBTENCIÓN DE GLUCÓSIDOS DE *Stevia rebaudiana Bertoni***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

PRESENTA:

I.Q. Lizeth Nathalie Campos Puentes

ASESORES:

Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Dra. Patricia G. Mendoza García

H. VERACRUZ, VER. MÉXICO.

MARZO, 2018

CONTENIDO

CONTENIDO.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Composición de la hoja de stevia y sus extractos.....	2
2.2. Procesos con membranas para purificación de glucósidos de stevia	3
2.3. Intensificación de procesos	7
2.4. Optimización de procesos con membranas	9
2.5. Optimización de la microfiltración.....	12
2.6. Concentración de extractos de stevia mediante nanofiltración	15
2.7. Síntesis de antecedentes.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1. FASE 1. Extracción de glucósidos y caracterización.....	24
4.2. FASE 2. Clarificación (Microfiltración) y purificación (Ultrafiltración).....	25
4.2.1. Determinación de las condiciones de flux sostenible.....	26

4.2.2.	Evaluación de flux sostenible	29
4.2.3.	Operación en modo diafiltración	30
4.3.	FASE 3. Concentración (Nanofiltración).....	31
4.4.	FASE 4. Propuesta y evaluación del proceso	32
5.	RESULTADOS.....	33
5.1.	Caracterización de la hoja de stevia	33
5.2.	Permeabilidad de las membranas de microfiltración.....	34
5.3.	Determinación de condiciones para evaluar el flux sostenible	35
5.4.	Validación de flux sostenible en microfiltración	38
5.6.	Caracterización de los extractos en microfiltración en modo diafiltración. ...	44
5.7.	Permeabilidad de las membranas de ultrafiltración.....	46
5.8.	Validación de flux sostenible en ultrafiltración.....	47
5.9.	Operación de la etapa de purificación con membranas de ultrafiltración en modo diafiltración.....	49
5.10.	Caracterización de los extractos en ultrafiltración (UF) en modo diafiltración. 53	
5.11.	Etapa de concentración con membrana de nanofiltración (NF)	54
5.12.	Diagrama de proceso para la obtención de glucósidos de stevia	59
5.13.	Validación del diagrama de proceso para la obtención de glucósidos de stevia 60	
6.	CONCLUSIONES	63
7.	BIBLIOGRAFÍA	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición en peso seco de la hoja de stevia determinada por distintos autores.	3
Tabla 2. Condiciones hidrodinámicas evaluadas en modo recirculación por (Ortiz-Rubio, 2014).....	6
Tabla 3. Características de las membranas evaluadas en las etapas de microfiltración y ultrafiltración.	26
Tabla 4. Caracterización de las hojas de stevia de Mérida evaluadas en este trabajo y datos reportados por otros autores. Todos los valores están reportados en porcentaje peso/peso y base seca.....	34
Tabla 5. Parámetros de ajuste del modelo de Hermia modificado de flux sostenible de los diferentes extractos de stevia.	39
Tabla 6. Composición de los extractos de hoja limpia y hoja con breña de Mérida (SM1 y SM2).....	39
Tabla 7. Coeficientes de rechazo S_0 para los diferentes extractos en membrana de microfiltración de 8 canales y 0.2 μm , del rebaudiósido A y el steviósido.	40
Tabla 8. Caracterización de los extractos de hoja limpia y hoja con breña SM1 y SM2 en la alimentación, el permeado y el retenido con la membrana de 0.2 μm y 8 canales en el proceso microfiltración-diafiltración.	45
Tabla 9. Composición de los extractos de hoja limpia y hoja con breña de Mérida (SM1 y SM2).....	48
Tabla 10. Coeficientes de rechazo S_0 , del rebaudiósido A y el steviósido para los diferentes extractos en la membrana de ultrafiltración de 39 canales y 3 kDa.....	49
Tabla 11. Rendimientos teórico y experimental de rebaudiósido A para los extractos clarificados SM1 y SM2, en la purificación con membrana de UF de 3 kDa en modo diafiltración.	51
Tabla 12. Rendimientos teórico y experimental de rebaudiósido A para los extractos clarificados SM1 y SM2, en la purificación con membrana de UF de 3 kDa en modo diafiltración utilizando diagramas Y-P.	52

Tabla 13. Caracterización de los extractos de los lotes SM1 y SM2 en la alimentación, el permeado y el retenido operando en modo diafiltración la ultrafiltración. Membrana de 3 kDa.....	54
Tabla 14. Caracterización de los extractos de los lotes SM1 y SM2 en la alimentación, el permeado y el retenido en la etapa de concentración.	58
Tabla 15. Condiciones de operación y rendimientos obtenidos en la extracción, clarificación, purificación y concentración del extracto de hoja con breña SM3.	61
Tabla 16. Caracterización de los extractos del lote SM3 a través de la clarificación, purificación y concentración.	62

NO COPY PAST

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de un sistema de separación con membranas en flujo tangencial. (Arellano-Arriaga, 2013)	4
Figura 2. a) Flux vs ΔP_{TM} obtenido con extracto de stevia durante el protocolo de incrementos y decrementos de presión. $T = 30 \pm 1^\circ C$. b) Flux vs ΔP_{TM} obtenidos con extracto de Stevia durante el protocolo de incrementos en presión a distintas velocidades tangenciales. $T = 30 \pm 1^\circ C$. (Ortiz-Rubio, 2014).....	6
Figura 3. Diagrama general de proceso de obtención de glucósidos de stevia desarrollado en el laboratorio de Bioprocesos de la U.N.I.D.A	7
Figura 4. Determinación de flux crítico para diferentes aguas residuales de procesamiento de aceite de oliva con membrana de nanofiltración. Caso 1: Alimentación muy diluida (a). Caso 2: Alimentación con carga más contaminada (b) (Stoller, Bravi & Chianese 2013)	20
Figura 5. Estrategia experimental.....	24
Figura 6. Comportamiento de flux de látex y flux de agua respecto a la presión transmembrana encontrado por Espinasse, Bacchin, & Aimar (2002)	28
Figura 7. Ejemplo de modelo de resistencias para el flux de stevia a partir de las ecuaciones planteadas por Espinasse, Bacchin, & Aimar (2002)	29
Figura 8. Equipo de filtración tangencial. (1) Tanque de alimentación, (2) intercambiador de calor, (3) Bomba centrífuga, (4) Módulo de membrana, (5) Variador de frecuencia, (6) Válvula del permeado, (7) Sistema de control de la válvula.	30
Figura 9. Equipo de nanofiltración. (1) Tanque de alimentación, (2) intercambiador de calor, (3) Bomba centrífuga, (4) Módulo de membrana, (5) Válvula del permeado, (6) Sistema de control de la válvula.....	31
Figura 10. Vista esquemática lateral de las membranas cerámicas de $0.2 \mu m$ de 25 mm de diámetro y 580 mm de longitud disponibles en el laboratorio.....	34
Figura 11. Permeabilidad al agua de las membranas de $0.2 \mu m$ de 8 y 93 canales evaluadas con dos protocolos.....	35
Figura 12. Perfiles de flux <i>versus</i> presión transmembrana (TMP) obtenidos con extracto de stevia de hoja limpia SM1 a diferentes velocidades tangenciales. Membranas de 8 y 93 canales, $0.2 \mu m$. Temperatura $= 25^\circ C$	36

Figura 13. Evolución de las resistencias a medida que aumenta la presión transmembrana (TMP) para las diferentes velocidades evaluadas en la membrana de 93 canales, 0.2 μm . Extracto de hoja limpia SM1.....	36
Figura 14. Perfiles de flux <i>versus</i> presión transmembrana (TMP) obtenidos con extracto de stevia con breña SM2 a diferentes velocidades tangenciales, y modelo de resistencias. Membrana de 8 canales, 0.2 μm . Temperatura =25°C.....	37
Figura 15. Evolución del flux (L/m ² h) a través del tiempo operando en modo recirculación para la validación de flux sostenible en microfiltración. a) Extracto del lote SM1. b) Extracto del lote SM2.....	38
Figura 16. Diagrama de optimización para el extracto 1 de Mérida (SM1) utilizando membrana de microfiltración de 8 canales y 0.2 μm . Líneas verdes = Factor de concentración. Líneas azules = Número de diafiltraciones.	41
Figura 17. Evolución del flux a través del tiempo, operando en modo diafiltración, con membrana de 8 canales de 0.2 μm . Lote 1 de Mérida SM1.....	42
Figura 18. Diagrama de optimización para el extracto con breña (SM2) utilizando membrana de microfiltración de 8 canales y 0.2 μm . Líneas verdes = Factor de concentración. Líneas azules = Número de diafiltraciones.	43
Figura 19. Evolución del flux a través del tiempo, operando en modo diafiltración, con membrana de 8 canales de 0.2 μm . Lote 2 de Mérida (SM2).	44
Figura 20. Permeabilidad al agua de las membranas de ultrafiltración de 3, 8 y 15 kDa.	46
Figura 21. Evolución del flux (L/m ² h) a través del tiempo operando en modo recirculación para la validación de flux sostenible en ultrafiltración con extracto del lote SM1 (Permeabilidad \approx 400 L/m ² hBar).....	47
Figura 22. Diagrama de optimización para el extracto SM1 y SM2 utilizando una membrana de ultrafiltración de 39 canales y 3 kDa. Líneas verdes = Factor de concentración. Líneas azules = Número de diafiltraciones.	50
Figura 23. Permeabilidad al agua de la membrana de nanofiltración. Área = 0.38 m ² . Rechazo promedio al MgSO ₄ de 96%.....	55
Figura 24. Evaluación de flux crítico utilizando el protocolo de incrementos-decrementos de la presión. Extracto proveniente del lote SM1. Área = 0.38 m ² . Membrana de NF en espiral (96% de rechazo promedio al MgSO ₄).....	55

Figura 25. Validación de flux sostenible del lote SM1. PTM= 1.75 Bar. Lote SM1. Área=0.38 m ² . Rechazo promedio al MgSO ₄ de la membrana igual a 96%.	56
Figura 26. Validación de flux sostenible. Lotes SM1 y SM2. Área = 0.38 m ² . Rechazo promedio al MgSO ₄ de la membrana igual a 96%. Temperatura SM1=26°C y SM2=25°C	57
Figura 27. Diagrama de proceso para la obtención de glucósidos de stevia a partir de hoja de stevia.	60
Figura 28. Flux sostenibles determinados para las etapas de clarificación, purificación y concentración, en el procesamiento del lote SM3.	61

1. INTRODUCCIÓN

La stevia se ha convertido en un producto de importante interés comercial en los últimos años, debido a sus propiedades naturales capaces de reemplazar al azúcar y edulcorantes artificiales (González & Moralejo, 2011). El primer cultivo comercial se realizó en 1964 y a partir de los años 70 se inició la investigación para la purificación de sus principales glucósidos (steviosido y rebaudiosido A) responsables del sabor dulce, y de bajo contenido calórico (Madan et al. 2010; Zhang, Kumar, and Kutowy 2000). Actualmente, el consumo de stevia ha aumentado significativamente, y la industria alimentaria (Coca-Cola y Cargill entre otras) integra cada vez más este endulzante en sus productos (González & Moralejo, 2011).

Muchas empresas están produciendo edulcorantes a partir de stevia y es necesario continuar buscando tecnologías libres de aditivos, con la menor cantidad de etapas, que funcionen de manera sostenible, empleando tecnología limpia y segura para la obtención de glucósidos de stevia.

En el laboratorio de Bioprocesos de la Unidad de Investigación en Desarrollo de Alimentos (UNIDA) se ha estudiado e investigado la extracción y purificación de glucósidos de stevia utilizando membranas. El proceso que se ha desarrollado consta de 4 etapas: Extracción, microfiltración, ultrafiltración y concentración; y alcanza un rendimiento global de 41%.

Un concepto desarrollado y aplicado en la industria durante los últimos años es la intensificación de procesos (IP). La IP se puede definir como la utilización de equipos y/o métodos novedosos con el fin de obtener mejores resultados desde el punto de vista ambiental, económico y social.

El objetivo de este trabajo es aplicar el concepto de la intensificación de procesos (IP) para obtener un mayor rendimiento del proceso global de obtención de extractos de stevia.

2. ANTECEDENTES

2.1. Composición de la hoja de stevia y sus extractos

La *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni es un semi-arbusto (30 cm) nativo del noreste de Paraguay (González & Moralejo, 2011) que ha sido empleado por los indígenas guaraníes como un té dulce. Los glucósidos responsables del sabor dulce de la stevia fueron purificados e identificados en 1931 (Steviósido y Rebaudiosido A) (Lemus *et al.*, 2012). Estos glucósidos son aproximadamente 300 veces más dulces que el azúcar de caña (Hearn & Subedi 2009), su consumo es seguro y recomendado, debido a que aumenta la salud dental, previene caries, presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria, reduce la presión arterial y el nivel de glucosa en sangre (Recomendado para personas diabéticas y/o obesas). Además, no tiene implicaciones adversas de salud si se consume una dosis máxima de 2500 mg/kg por día. Se le atribuye también acción anticancerígena, aunque aún se llevan a cabo estudios para demostrar este efecto (Carakostas *et al.*, 2008; Madan *et al.*, 2010).

La stevia como endulzante se puede utilizar de diferentes formas, desde su forma natural (hoja fresca o seca) así como extractos líquidos o en polvo de la hoja. La calidad de cualquiera de estos productos va a depender, tanto de la cantidad de glucósidos presentes en la hoja como de su proceso de purificación (González & Moralejo, 2011). Las hojas tienen un contenido de glucósidos que varía entre el 4 y el 20% (Hearn & Subedi 2009), la mejor variedad proviene de América del sur (Paraguay, Brasil, Colombia) y de México con un contenido de glucósidos entre 12 a 13% en peso seco (González & Moralejo, 2011).

La hoja de stevia tiene otros compuestos como carbohidratos, proteínas, fibra cruda, y cenizas entre otros componentes (Lemus *et al.*, 2012). La concentración de estos compuestos puede variar por factores como condiciones climáticas, condiciones de cultivo, métodos de cosecha y variedad de la planta (Hearn & Subedi, 2009; Kaushik

et al., 2010; Rodríguez *et al.*, 2010). En la Tabla 1. se presenta la composición en peso seco reportada por diferentes autores. Se puede observar una diferencia en la composición para cada tipo de stevia evaluada, incluso para hojas provenientes del mismo país (India).

Tabla 1. Composición en peso seco de la hoja de stevia determinada por distintos autores.

Componente	Referencias				
	Savita <i>et al.</i> (2004)	Tadhani & Subhash (2006)	Kaushik <i>et al.</i> (2010)	Serio (2010)	Abou Arab <i>et al.</i> (2010)
Proteína	10.54	20.4	13	11.2	12.05
Grasa	2.69	4.34	2.93	5.6	3.94
Cenizas	11.29	13.1	9.1	S.D.	7.83
Carbohidratos	55.91	35.2	S.D.	53	65.41
Fibra cruda	19.89	S.D.	S.D.	15	16.38
Total	93.3	73.04	25.03	84.8	99.94
Procedencia	India	India	India	Sudamérica	Egipto

Algunos autores han evaluado otros componentes de la hoja de stevia. Por ejemplo, González *et al.*, (2014) evaluaron dos cultivos de stevia de diferente procedencia para establecer diferencias entre estos según genotipo y lugar donde son cultivados. Encontraron diferencias en el contenido de glucósidos, grasa y materia insoluble en alcohol (MIA).

De igual manera, Kaushik *et al.*, (2010) evaluaron la influencia en el sabor de otros componentes como lo son los polifenoles y la clorofila, encontrando que, aunque estos componentes tienen una influencia en el sabor amargo, tienen mayor aceptación que el steviósido, y en preparaciones como bebidas los polifenoles tienen una buena aceptación, pero no así las clorofilas. La concentración de polifenoles en la stevia evaluada por estos autores es de 4.2% en peso.

2.2. Procesos con membranas para purificación de glucósidos de stevia

Para el uso de los glucósidos de stevia como aditivos alimenticios o con fines farmacéuticos, es necesario que el producto final presente una pureza del 95% como

mínimo. De igual manera, no debe representar ningún peligro al consumidor, por lo tanto, las técnicas de purificación empleadas deben utilizar la menor cantidad de solventes y ser sustentables (Vanneste *et al.*, 2011).

Aunque para la extracción de los glucósidos se puede usar como solvente agua, algunas técnicas de extracción y purificación emplean solventes como metanol, etanol, cloroformo o hexano (Carakostas *et al.*, 2008; FAO, 2007; Lorenzo *et al.*, 2014). Por tal motivo, se han buscado técnicas más seguras y sostenibles como lo son los procesos con membranas.

Una membrana es una barrera física semipermeable que permite el paso de determinados solutos o partículas presentes en un fluido (Figura 1). El flujo de estas partículas está regulado por fuerzas impulsoras como la temperatura, presión, concentración, entre otras (Pal, Kumar, & Banerjee, 2016). Los procesos con membranas se pueden clasificar según su tamaño de poro en microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, osmosis inversa y procesos combinados.

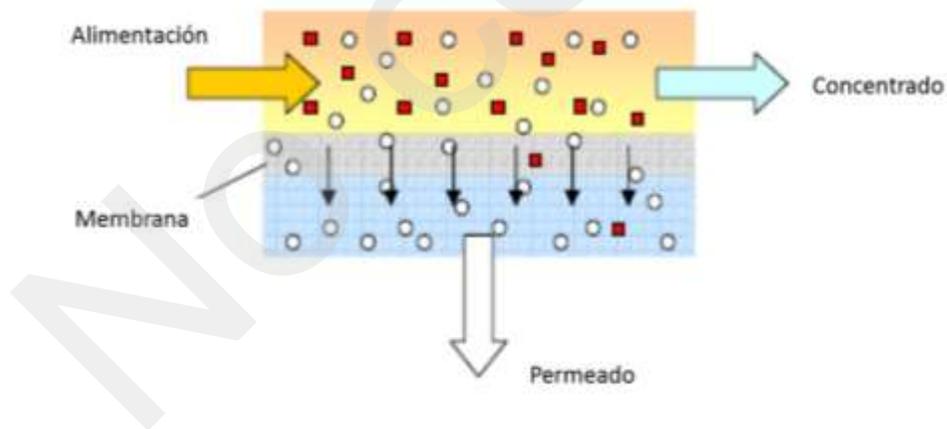


Figura 1. Diagrama de un sistema de separación con membranas en flujo tangencial. (Arellano-Arriaga, 2013).

La primera patente de un proceso de purificación de glucósidos con membranas la presentó Kutowy (1999), donde se emplean, después de una columna de extracción, tres etapas operadas en modo diafiltración: Microfiltración y ultrafiltración para remover impurezas con peso molecular superior al Rebaudiósido A y una tercera etapa de

nanofiltración para remover impurezas de menor peso molecular que el Rebaudiósido A.

Zhang *et al.*, (2000) evaluaron las tres etapas trabajadas por Kutowy (1999). En la etapa de microfiltración utilizaron una membrana cerámica tubular de 0.35 μm operando a una presión transmembrana de 1.04 Bar, y una diafiltración (ND = 1). No evaluaron el proceso de diafiltración. En la etapa de ultrafiltración utilizaron membranas de 2.5 kDa a una presión transmembrana de 4.4 Bar, y encontraron que un número de diafiltración de 3 es suficiente para lograr la purificación. Además, utilizaron agentes floculantes como pretratamiento y obtuvieron flux de permeado de hasta 130 L/m²h. Finalmente, utilizaron una última etapa de nanofiltración a una presión transmembrana de 5.1 Bar, en modo diafiltración para concentrar y remover impurezas de bajo peso molecular. Los autores no presentan resultados de la nanofiltración, ni de los rendimientos y purezas obtenidos.

Ortiz-Rubio (2014) estudió el proceso de extracción y clarificación de los glucósidos de stevia, estableciendo unas condiciones de extracción con agua, en una proporción 1:20 (P/V), pH de 7 y temperatura ambiente. Posteriormente se realiza una filtración y una sedimentación. De igual manera, Ortiz-Rubio (2014) evaluó una primera etapa de clarificación, trabajando en condiciones de flux sostenible, dos membranas de 0.2 μm y 150 kDa. Para establecer las condiciones de flux sostenible empleó dos metodologías (Beier & Jonsson, 2009; Espinasse, Bacchin, & Aimar, 2002): Protocolo de incrementos-decrementos en la TMP y protocolo de incrementos en la TMP (Figura 2).

Los resultados se validaron bajo condiciones de flux sostenible y por arriba del flux sostenible, para las dos membranas y los dos protocolos evaluados (Tabla 2). Finalmente, encontró que la membrana más adecuada en el proceso de clarificación es la membrana de 0.2 μm .

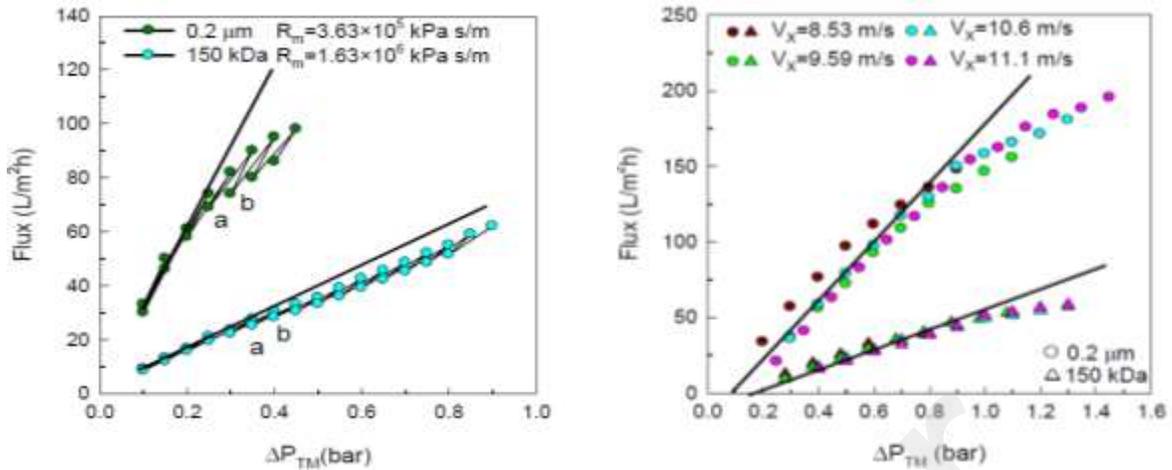


Figura 2. a) Flux vs ΔP_{TM} obtenido con extracto de stevia durante el protocolo de incrementos y decrementos de presión. $T = 30 \pm 1^\circ C$. b) Flux vs ΔP_{TM} obtenidos con extracto de Stevia durante el protocolo de incrementos en presión a distintas velocidades tangenciales. $T = 30 \pm 1^\circ C$. (Ortiz-Rubio, 2014)

Tabla 2. Condiciones hidrodinámicas evaluadas en modo recirculación por (Ortiz-Rubio, 2014).

Membranas para la clarificación	Protocolo I		Protocolo II	
	En el J_s	Por arriba de J_s	En el J_s	Por arriba de J_s
0.2 μm	$\Delta P_{TM} = 0.25 \text{ Bar}$ $V_x = 4.55 \text{ ms}^{-1}$	$\Delta P_{TM} = 0.30 \text{ Bar}$ $V_x = 4.91 \text{ ms}^{-1}$	$\Delta P_{TM} = 0.90 \text{ Bar}$ $V_x = 10.6 \text{ ms}^{-1}$	$\Delta P_{TM} = 0.90 \text{ Bar}$ $V_x = 10.6 \text{ ms}^{-1}$
150 kDa	$\Delta P_{TM} = 0.35 \text{ Bar}$ $V_x = 4.99 \text{ ms}^{-1}$	$\Delta P_{TM} = 0.55 \text{ Bar}$ $V_x = 618 \text{ ms}^{-1}$	$\Delta P_{TM} = 0.88 \text{ Bar}$ $V_x = 9.59 \text{ ms}^{-1}$	$\Delta P_{TM} = 0.88 \text{ Bar}$ $V_x = 9.59 \text{ ms}^{-1}$

Continuando con este estudio, Martínez *et al.*, (2016) trabajaron en la extracción y la microfiltración con estas condiciones, y evaluaron una etapa posterior de purificación usando membranas de ultrafiltración. Estos autores trabajaron con plantas de stevia de diferente procedencia (Chiapas y Oaxaca) y encontraron los mejores resultados para los extractos clarificados de hoja de Chiapas usando la membrana de ultrafiltración de 3 kDa, mientras que para los extractos clarificados de la hoja de Oaxaca con la membrana de ultrafiltración de 15 kDa.

Esto puede ser producto de la composición de la hoja, que como han demostrado Kaushik *et al.*, (2010), Rodríguez *et al.*, (2010), Hearn & Subedi, (2009), entre otros

autores, varía según factores climáticos, de cosecha y por supuesto de procedencia. La variación en la composición de la hoja ocasionó diferencias en los extractos y afectó las condiciones óptimas de operación de las etapas del proceso. Finalmente, Martínez *et al.*, (2015) concentró hasta un factor de 10 el extracto purificado por destilación osmótica (DO) y observó una disminución de flux de 30%. Además, concluyó que la aplicabilidad de la DO aún está limitada por la disponibilidad de membranas con características adecuadas para el proceso.

A partir de los trabajos presentados por Ortiz-Rubio (2014) y Martínez *et al.*, (2016) se estableció un proceso general para la obtención de glucósidos de stevia que consiste de 4 etapas: Extracción, clarificación, purificación y concentración, el cual tiene una eficiencia global de 41% (Figura 3). Esta eficiencia es muy baja para pensar en un proceso a nivel industrial. La etapa de menor rendimiento en este proceso es la de clarificación con membranas de microfiltración, la cual alcanza un rendimiento por etapa de 67%.

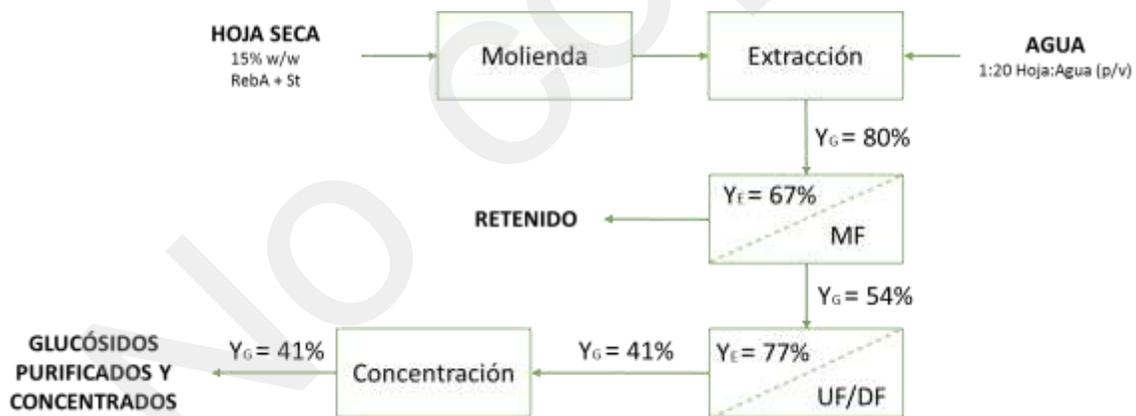


Figura 3. Diagrama general de proceso de obtención de glucósidos de stevia desarrollado en el laboratorio de Bioprocesos de la U.N.I.D.A

2.3. Intensificación de procesos

La intensificación de procesos (IP) es un área de reciente estudio en la ingeniería. Se puede definir como la puesta en marcha de equipos, técnicas de procesos y/o métodos

novedosos para hacer más eficiente un proceso, y obtener mejores resultados desde el punto de vista ambiental, económico y social (Moulijn *et al.*, 2008).

La intensificación de procesos se puede dividir en dos dimensiones: Equipo y métodos de procesamiento (Moulijn *et al.*, 2007). Los cuales se pueden enfocar en:

- Mecanismos, como la búsqueda de otras formas de transporte de energía como microondas, ultrasonido, luz, entre otros.
- Materiales, enfocado principalmente en elaboración de materiales de soporte.
- Estructura, relacionada con los aspectos de síntesis, orden, método de proceso y diseño del producto.
- Comportamiento y modelos, basado en desarrollo y aplicación de modelos descriptivos de estado estable y comportamiento dinámico de los sistemas.

Diversos autores han aplicado el concepto de intensificación de procesos sobre diferentes procesos ya establecidos con el fin de obtener mayor productividad, eficiencia, sostenibilidad, tecnologías más amigables al medio ambiente y mejora en general de un proceso.

Por ejemplo, Gajendragadkar & Gogate (2016), realizaron una mejora al proceso de ultrafiltración, secado por aspersion y cristalización para la recuperación de productos valiosos a partir de suero, usando una etapa de pretratamiento con ultrasonido y calentamiento. Ellos encontraron que este pretratamiento evita el taponamiento en el secado por aspersion y mejora la eficiencia en la ultrafiltración. Además, usaron nanofiltración, un proceso diferente al convencional, para producir un concentrado de proteína desmineralizado.

Por otro lado, Pal, Kumar & Banerjee (2016), hicieron un análisis crítico sobre la aplicación del concepto de la IP para un proceso verde o limpio de producción de ácido glucónico. Estos autores muestran como la implementación de la tecnología de membranas de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y electrodiálisis permiten

cumplir el objetivo de la intensificación de procesos en la fabricación limpia o verde del ácido glucónico.

2.4. Optimización de procesos con membranas

Uno de los objetivos específicos de la intensificación de procesos es el de mejorar el rendimiento de un proceso, y una de las muchas formas de llevar a cabo esta tarea es la optimización. Esta se puede definir como el trabajo para encontrar las mejores o más adecuadas condiciones de un proceso. Por lo tanto, el objetivo de la optimización es encontrar la mejor forma de operar un proceso basándose en algún criterio de efectividad o comportamiento (Julián & Ramos, 2014).

La mayor ventaja que ofrece la optimización es la posibilidad de mejorar la operación de este proceso, sin necesidad de invertir en el desarrollo de nuevas membranas o cambiar el diseño ya establecido en este caso (Jelemenský *et al.*, 2015).

La solución a un problema de optimización se da en varias etapas, primero la formulación de un modelo, luego la resolución de este modelo y por último la validación de los resultados obtenidos (Julián & Ramos, 2014). Generalmente en la etapa de resolución se encuentra más de una solución o ruta para llevar a cabo el proceso mediante métodos matemáticos, analíticos o numéricos. Por lo tanto, el problema de optimización también incluye elegir entre estas soluciones la más adecuada al proceso, basándose generalmente en las restricciones que este mismo ofrece (Jelemenský *et al.*, 2015).

En cuanto a procesos de membranas, se han estudiado diferentes técnicas de optimización, usando diferentes modelos y consideraciones propias del proceso. Los modelos son construidos a partir de los balances de masa parciales y globales del proceso, teniendo en cuenta parámetros y variables como las concentraciones de los macrosolutos y microsolutos, cantidad de diluyente añadido, coeficientes de rechazo, volumen mínimo y máximo permitido por el sistema, valores de flux de permeado y diluyente, entre otros posibles parámetros evaluados. En los párrafos siguientes, se

resumen los diferentes estudios de optimización reportados en los últimos años para procesos de membranas en general:

Van Reis & Saksena, (1997) emplearon un modelo basado en la selectividad en función de los coeficientes de separación y del rendimiento, para optimizar procesos con membranas de microfiltración y ultrafiltración. Utilizaron dos variables, el flux de permeado y dos coeficientes de separación de los solutos. Para solucionar el modelo de optimización emplearon un método gráfico (Diagramas Pureza - Rendimiento) y encontraron el número de diavolúmenes óptimo.

Foley & Garcia, (2000) evaluaron la optimización de la diafiltración basada en la presión osmótica y la dependencia de la viscosidad respecto al coeficiente de transferencia de masa. Al aplicar la optimización encontraron menores tiempos de operación, debido a que la concentración óptima aumenta con el aumento de la presión transmembrana, y es débilmente dependiente de la velocidad de alimentación y la resistencia de la membrana.

Venkiteshwaran & Belfort, (2010) optimizaron la microfiltración empleando un modelo basado en el coeficiente de separación, el número de diavolúmenes y el factor de concentración tomando las variables de selectividad, flux y presión transmembrana. Utilizando un método gráfico (Diagramas Rendimiento – Tiempo) lograron optimizar el tiempo y el rendimiento del proceso.

Fikar, Kovács, & Czermak, (2010) propusieron un modelo dinámico de optimización para cualquier proceso de membrana con área superficial conocida. El modelo se basó en rechazos dependientes de la concentración de macro y microsolutos en función del tiempo de proceso. Los autores evaluaron dos casos: el primero enfocado en la concentración y el segundo enfocado en la reducción de costos. Aunque la eliminación de algunos términos de la ecuación propuesta para el segundo caso, lo puede transformar en un problema de optimización del tiempo de proceso. El modelo propuesto en este caso presenta la ventaja de que puede emplear los datos

experimentales del proceso, lo que arroja resultados más confiables. Para resolver el modelo se usó el paquete DYNOPT de Matlab.

Paulen *et al.*, (2011) minimizaron el tiempo de proceso basándose en el flux de permeado dependiente de la capa de polarización variando la forma de agregar el diluyente. Resolvieron el problema mediante el principio del mínimo de Pontriaguin. Derivaron un modelo normalizado de ecuaciones diferenciales y aplicando la teoría de control óptimo encontraron las condiciones de optimización. Estos resultados analíticos fueron confirmados mediante análisis numérico, utilizando métodos numéricos de optimización dinámica. En este trabajo se tuvieron en cuenta tres parámetros los cuales mostraron efecto sobre la estrategia de control final para reducir el tiempo de operación. Más tarde estos autores Paulen *et al.*, (2012) optimizaron el tiempo de proceso y la cantidad de diluyente agregado al sistema. El modelo se basa en la concentración dependiente del flux y los rechazos. En este caso, manejaron dos modelos basados en un rechazo constante y dependiente de la concentración. Resolvieron el problema aplicando el mismo principio del mínimo de Pontriaguin. Las soluciones encontradas no siguieron la trayectoria tradicional de la diafiltración, sino una combinación de distintos modos de operación.

Paulen *et al.*, (2013) minimizaron costos reduciendo el volumen de alimentación, delimitando el flux de permeado y manteniendo constantes los rechazos en 0 y 1 para los macrosolutos y microsolutos, respectivamente. Posteriormente estos autores (Paulen *et al.*, 2015) optimizaron los costos de un proceso para concentrar componentes deseados y eliminar impurezas. En este caso la optimización se planteó como un problema multi-objetivo y se basó en los costos del diluyente consumido, el tiempo de operación y la pérdida del producto. La solución a las ecuaciones de optimización se llevó a cabo con el mismo principio del mínimo de Pontriaguin.

Jelemensky *et al.*, (2015), optimizaron el tiempo de operación de la diafiltración de múltiples componentes de una forma general, asumiendo coeficientes de rechazo constantes y su relación con las concentraciones finales. Al disminuir el tiempo de

proceso se encontró una reducción en los costos del proceso. El modelo propuesto fue resuelto por el principio del mínimo de Pontriaguin.

Como se puede observar, se han desarrollado mecanismos de optimización que se pueden aplicar a membranas de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y hasta osmosis inversa, empleando modelos y basándose en datos experimentales.

2.5. Optimización de la microfiltración

Todo proceso de separación con membranas se puede llevar a cabo en dos modos de operación según la dirección del fluido de alimentación respecto a la membrana: frontal o flujo pistón y tangencial o flujo cruzado. La microfiltración tangencial (MFT) es un proceso de separación de componentes (Macrosolutos y microsolutos), cuya fuerza impulsora es la presión y en el cual se utiliza una membrana semipermeable (Coronel, 2012). El diámetro de poro de las membranas de microfiltración se encuentra entre 0.1 y 10 micras. Estas membranas pueden ser cerámicas, metálicas, zeolíticas vítreas o de carbono, y se caracterizan por usar presiones de trabajo bajas y flujos altos.

La microfiltración se ha usado en la industria alimentaria para procesamiento de leche, purificación de agua y clarificación de jugos, entre otros. En el proceso desarrollado en el laboratorio de Bioprocesos para la obtención de glucósidos de stevia, la microfiltración se emplea en la etapa de clarificación.

Ortiz-Rubio (2014), estableció que las mejores condiciones de operación para la microfiltración de extractos de stevia eran, un tamaño de poro de 0.2 μm , presión transmembrana de 0.9 bar, velocidad tangencial de 10.6 m/s y temperatura ambiente. Bajo estas condiciones obtuvo un rendimiento por etapa de 67% con un factor de concentración volumétrica de 8.

Esta etapa de microfiltración se llevó a cabo en modo concentración con una disminución constante de volumen. Sin embargo, aunque el proceso operó en condiciones de bajo ensuciamiento, el flux descendió con el aumento de la concentración de macrosolutos y en el concentrado se retuvo una cierta cantidad de

glucósidos. Por lo tanto, para mejorar el desempeño de la clarificación se puede emplear la diafiltración (Lai *et al.*, 2012).

La diafiltración implica la adición de un diluyente (generalmente agua) al retenido para realizar nuevamente la filtración de esta solución. Fikar, Kovacs & Czemark (2010) plantearon tres modos de operación para la diafiltración:

- Modo concentración (C): no se agrega diluyente al sistema y por tanto ocurre una disminución constante del volumen.
- Dilución a volumen constante (DVC): el volumen de alimentación del sistema se mantiene constante gracias a la adición constante de diluyente. Es decir, el flujo de diluyente es igual al flujo de permeado.
- Dilución con volumen variable (DVV): el volumen de alimentación desciende en menor medida que en el modo concentración, gracias a que el flujo de diluyente es menor que el flujo de permeado.

A partir de estas definiciones la diafiltración puede clasificarse como:

- Diafiltración convencional (DF) que involucra tres pasos consecutivos: pre-concentración, para reducir volumen y eliminar algunos microsolutos; DVC para eliminar más microsolutos y post-concentración, para obtener el volumen final deseado y concentrar el macrosoluto.
- Pre-concentración combinada con dilución a volumen variable (PDVV) donde se plantean dos pasos: pre-concentración para alcanzar una concentración adecuada y modo DVV para alcanzar la concentración deseada de macrosolutos y microsolutos.
- Diafiltración con alimentación intermitente (DAI) en la cual el diluyente se agrega de modo intermitente. Se lleva a cabo una pre-concentración luego se agrega diluyente hasta alcanzar el volumen inicial y se repiten estos dos pasos varias

veces Finalmente se realiza una post-concentración para alcanzar el volumen deseado.

Venkiteshwaran & Belfort, (2010), proponen trabajar en modo DF la microfiltración con el fin de obtener mayor rendimiento de proteínas de *E. Coli* por lisis celular. El proceso de diafiltración debe ser optimizado para utilizar la menor cantidad de diluyente y obtener el menor tiempo de proceso. Para lograr esto proponen el uso de diagramas de rendimiento *versus* tiempo de proceso (Y-t).

Para la elaboración del diagrama se define el tiempo de proceso y el rendimiento en términos del coeficiente de separación (S_o), el factor de concentración (CF) y número de diavolumenes (N_D). Definidos como:

$$S_o = \frac{C_p}{C_f} \quad (1)$$

Donde, C_f es la concentración de soluto en la alimentación y C_p es la concentración de soluto en el permeado.

$$N_D = \frac{JAt}{V} \quad (2)$$

Donde, J es el flux del permeado, A es el área de la membrana, t es el tiempo de operación y V es el volumen del retenido.

$$CF = \frac{V_o}{V_f} \quad (3)$$

Donde, V_o es el volumen inicial de la alimentación y V_f el volumen final de la alimentación.

Se define el tiempo de proceso de concentración (t_c), de diafiltración (t_d) y total (t) como:

$$t_c = \frac{V_o (1 - (1/CF))}{JA} \quad (4)$$

$$t_d = \frac{V_o N_D}{JA CF} \quad (5)$$

$$t = \frac{V_o}{JA} \left(1 - \frac{1}{CF} + \frac{N_D}{CF} \right) \quad (6)$$

Igualmente se define el rendimiento en la concentración (Y_c), rendimiento de diafiltración (Y_d) y rendimiento total (Y):

$$Y_c = 1 - CF^{-S_o} \quad (7)$$

$$Y_d = CF^{-S_o} * (1 - e^{-N_D S_o}) \quad (8)$$

$$Y = 1 - CF^{-S_o} + CF^{-S_o} * (1 - e^{-N_D S_o}) \quad (9)$$

A partir de estas ecuaciones es posible construir los diagramas Y-t, en los cuales el rendimiento se puede determinar por la intersección entre entre CF y N_D . El tiempo de proceso debe ser comprobado experimentalmente.

2.6. Concentración de extractos de stevia mediante nanofiltración

La FAO en 2007 determinó que los endulzantes de stevia deben contener al menos un 95% de los principales siete glucósidos de steviol, y al menos 70% de Rebaudiosido A y steviosido. Por tal motivo, una etapa de gran importancia en el proceso de obtención de glucósidos es la concentración. Esta consiste en la eliminación de agua de los extractos para obtener una mayor concentración final de estos (Rao *et al*, 2012).

La operación unitaria más empleada para la concentración es la evaporación, sin embargo, el gran gasto energético y el impacto que esta puede presentar en los componentes nutricionales y parámetros sensoriales ha llevado a buscar otras formas de concentrar. Se han evaluado procesos con membranas para la concentración, debido a que se puede trabajar a temperatura ambiente, y permiten una reducción considerable de gastos energéticos (Sant'Anna et al. 2012).

Sant'Anna *et al.* (2012), presentaron las ventajas de utilizar osmosis directa (FO, por sus siglas en inglés) sobre el proceso convencional de evaporación en la industria alimentaria. Además, de presentar la ventaja de operar a bajas presiones hidráulicas, baja tendencia a ensuciamiento, capacidad para trabajar con altas concentraciones de sólidos y fácil escalamiento respecto a otros procesos con membranas.

Chhaya et al. (2012) utilizó membranas de nanofiltración para concentrar extractos de stevia ultrafiltrados, logrando obtener una pureza de 37%, con una presión transmembrana de 5.1 Bar, para una membrana de corte de peso molecular de 400 y área efectiva de 34.2 cm². Cabe mencionar que estos autores no evaluaron condiciones óptimas de operación.

Martínez-Alvarado (2015) concentró hasta aproximadamente 10 veces extractos puros de hojas de stevia empleando destilación osmótica (OD) y observó una disminución del flux de 30%. Martínez-Alvarado (2015) concluyó que este proceso aún está limitado por la disponibilidad de membranas con características específicas y deseadas.

Una forma de intensificar un proceso es reemplazar el proceso y en este caso, la nanofiltración (NF) puede ser una alternativa prometedora (Pal, Kumar & Banerjee, 2016) y que no ha sido evaluada sistemáticamente para la concentración de extractos de stevia. El tamaño de los glucósidos de stevia oscila entre los 800 y 1000 Da, además estos se caracterizan por ser moléculas neutras (No poseen carga) (Román *et al.*, 2011).

La nanofiltración se ha empleado en desalinización, concentración, separación y purificación de iones y ácidos orgánicos, así como en la producción de agua potable y tratamiento de aguas residuales (Wang *et al.*, 2009). Las membranas de nanofiltración también se han empleado para concentrar glucósidos de stevia y se ha reportado que estas pueden eliminar componentes no deseados que pueden dar sabores amargos al producto final (Lorenzo *et al.*, 2014) (Madan *et al.*, 2010) (Rao *et al.*, 2012,2). Además, diferentes autores como Lorenzo *et al.*, (2014), Zang, kumar y Kutowy (2000), Madan *et al.*, (2010) y Rao *et al.*, (2012) han utilizado la nanofiltración para remover impurezas de bajo peso molecular y el sabor amargo que pueden tener los edulcorantes de stevia.

Un aspecto único de la nanofiltración es que combina la separación de compuestos no cargados a nanoescala con el efecto de la carga entre la solución y la superficie de la membrana. El rechazo de solutos no cargados resulta únicamente por exclusión molecular, y por lo tanto no será afectado por el pH. Se ha reportado que puede existir una pequeña disminución en el rechazo en pH entre 8 y 12 (Luo & Wang, 2013). Rao *et al.*, (2012,2) reportaron un rechazo de 100% de glucósidos en una membrana de NF de 250 Da, operada a una presión transmembrana de 15 Bar y temperatura ambiente. No se reportó el pH, sin embargo, en la etapa previa de ultrafiltración, la alimentación se ajustó a un pH de 7.

La nanofiltración es un proceso intermedio entre la ultrafiltración y la ósmosis inversa, que puede retener o rechazar moléculas con tamaño del orden de 1nm (Van der Bruggen, Manttari & Nystromb, 2008). A pesar de tener características de ultrafiltración y ósmosis inversa, este proceso posee dos características únicas: Estructura microporosa con diámetro de poro inferior a 2 nm y cargas eléctricas asociadas al material de fabricación. Debido a la carga eléctrica, los mecanismos de transferencia en las membranas de nanofiltración son propias y particulares de cada aplicación. Además, se puede operar con presiones inferiores y flujo de solvente superiores que la ósmosis inversa.

Un aspecto muy influyente en el flux durante la nanofiltración es la colmatación. La colmatación es uno de los principales problemas en cualquier proceso con membranas. Puede ser causado por compuestos orgánicos o inorgánicos, partículas o sólidos suspendidos y/o bacterias (Hilal *et al.*, 2004). La colmatación se puede dar en los poros de la membrana por una reducción parcial del poro, debido a la adsorción de partículas en la pared del poro, por bloqueo total del poro o por la formación de una torta o capa en la superficie de la membrana. Esto conlleva principalmente a mayores costos de operación, mayor gasto de energía incrementos en los tiempos de limpieza de la membrana y disminución de la vida útil de esta (Hilal *et al.*, 2004). En la nanofiltración la colmatación puede ser más compleja debido a que las interacciones de los solutos con la superficie de la membrana son a nivel de nanoescala (Van der Bruggen *et al.*, 2008). Por lo tanto, un factor importante en la nanofiltración es el control de la colmatación, el cual puede hacerse reduciendo la afinidad entre partículas incrustantes variando el pH (Luo & Wang, 2013), o con protocolos de limpieza adecuados.

La fuerza impulsora en el proceso de nanofiltración es la diferencia de presión entre la alimentación y el permeado, y generalmente varía entre 1 y 40 bar. Para el caso de los glucósidos por no estar cargados su separación con membranas de NF se hace por exclusión molecular. El agua puede pasar libremente a través de la membrana, por lo que su uso para remover agua de los extractos es prometedor (Román *et al.*, 2011).

Por otro lado, en la nanofiltración existe una resistencia al flujo que puede ser afectada por la resistencia de la membrana (R_M); la resistencia por colmatación (R_F) y la resistencia por polarización de la concentración (R_P). La resistencia total (R_{TOT}) es igual a la suma de las tres:

$$R_{TOT} = R_M + R_F + R_P \quad (10)$$

La concentración del retenido aumenta continuamente durante el proceso de concentración, lo que significa un incremento gradual de la presión osmótica. El

aumento constante de la presión osmótica reduce la fuerza impulsora durante la operación a presión transmembrana constante. El flujo de permeado se reduce por el aumento de la presión osmótica y la resistencia por colmatación. Por lo tanto, el flux en la nanofiltración se puede describir en función de la fuerza impulsora (Presión), la presión osmótica y la resistencia al flujo:

$$J = \frac{\Delta p_{TM} - \Delta \pi}{\eta * R_{TOT}} \quad (11)$$

Donde, Δp_{TM} es la presión transmembrana, $\Delta \pi$ es la presión osmótica y η es la viscosidad.

Field et al., (1995) introdujeron el concepto de flux crítico, evaluándolo en membranas de microfiltración. El flux crítico es el mínimo valor de flux donde ocurre una colmatación irreversible. Trabajando en condiciones de operación por debajo del flux crítico el flux se mantiene constante durante el tiempo de operación del proceso (Flux sostenible). Este concepto se ha extendido a membranas de ultrafiltración (Espinasse, Bacchin & Aimar, 2002) y nanofiltración (Stoller, Bravi & Chianese 2013).

Evaluando el flux crítico con el método de incrementos-decrementos de la presión transmembrana, propuesto por Espinasse, Bacchin & Aimar (2002), pueden ocurrir dos casos (Figura 4) en membranas de nanofiltración. En el primer caso se observa claramente el inicio del flux crítico (Figura 4a. para EC=4500 ocurre para una PTM = 7), mientras que en el segundo caso (Figura 4b) con las PTMs más bajas ya se observa una colmatación.

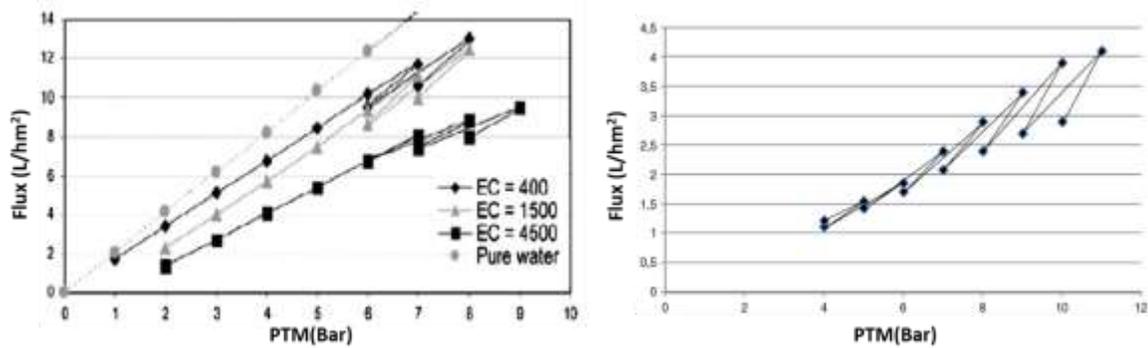


Figura 4. Determinación de flux crítico para diferentes aguas residuales de procesamiento de aceite de oliva con membrana de nanofiltración. Caso 1: Alimentación muy diluida (a). Caso 2: Alimentación con carga más contaminada (b) (Stoller, Bravi & Chianese 2013)

Para superar esta condición, Stoller, Bravi & Chianese (2013) introducen el concepto de flux límite (Threshold flux) (Field & Pearce, 2011), el cual, se puede definir como el flux que divide una región de baja formación de colmatación, de una región de alta formación de colmatación donde el descenso del flux es más rápido.

Stoller, Bravi & Chianese (2013) midieron el flux límite de un módulo de nanofiltración para la limpieza de aguas residuales del procesamiento de aceite de oliva con diferentes pretratamientos. Para la evaluación del flux límite se plantean las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dm}{dt} = 0 ; J_p(t) \leq J_c \quad (12)$$

$$\frac{dm}{dt} = B (J_p(t) - J_c) ; J_p(t) > J_c \quad (13)$$

$$\frac{dm}{dt} = -a ; J_p(t) \leq J_{th} \quad (14)$$

$$\frac{dm}{dt} = -a - b (J_p(t) - J_{th}); J_p(t) > J_{th} \quad (15)$$

Donde m es la permeabilidad, $J_p(t)$ es el flux en el tiempo t , J_{th} es el flux límite, J_c es el flux crítico y a , b y B son parámetros de ajuste. Si $a=0$ y $b=B$ se obtienen las ecuaciones 12 y 13, el flux límite sería el flux crítico y se obtiene un comportamiento como el caso 1. Mientras, que si $a \neq 0$ y $b \neq 0$ se obtiene un comportamiento como el caso 2. Con estas ecuaciones se observa la aplicación del concepto de división del flux en dos regiones.

2.7. Síntesis de antecedentes

La composición de la hoja de stevia varía en compuestos como proteína, cenizas, grasas, carbohidratos, glucósidos y material insoluble en alcohol (MIA) entre otros, según su lugar de origen, condiciones de climáticas, de cultivo, de cosecha y variedad.

En el laboratorio de Bioprocesos de la UNIDA se ha evaluado un proceso de purificación y concentración de glucósidos de stevia. Encontrando que al trabajar con hoja de stevia de diferente procedencia (Chiapas y Oaxaca) las condiciones de operación en membranas de ultrafiltración cambian. No se ha evaluado la influencia de la composición de la hoja en la clarificación de los extractos por microfiltración (clarificación), etapa previa a la purificación con ultrafiltración.

El proceso de purificación de glucósidos desarrollado en el laboratorio de bioprocesos alcanza una eficiencia global de recuperación del 41%, siendo un valor bajo para pensar en su implementación a escala industrial. Por lo tanto, se puede plantear el uso de la intensificación de procesos (IP) para aumentar la eficiencia global.

La etapa de clarificación con membranas de microfiltración tiene el menor rendimiento ($Y_E = 67\%$). Al trabajar en modo diafiltración se puede obtener mayor rendimiento. Sin embargo, es necesario optimizar la diafiltración para usar la menor cantidad de diluyente y emplear el menor tiempo de proceso posible. Para ello se pueden emplear diagramas rendimiento vs tiempo de proceso como lo reportó Venkiteshwaran & Belfort (2010).

Finalmente, una etapa importante dentro del proceso es la concentración, debido a que los endulzantes de stevia deben contener al menos un 95% de glucósidos. En esta etapa se evaluó un proceso de destilación osmótica, encontrando que su aplicación aún es limitada. Por lo tanto, se usará el proceso de nanofiltración, en el cual, no se han evaluado de forma sistemática las condiciones de operación de membranas de nanofiltración para la concentración de glucósidos de stevia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Intensificar los procesos de membranas para la purificación y concentración de glucósidos de Stevia, para aumentar su eficiencia global.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de la composición de la hoja de stevia en el desempeño de los procesos de membranas y en las propiedades de los extractos glucosídicos obtenidos en cada etapa.
- Optimizar los procesos de microfiltración y ultrafiltración empleados en la clarificación y purificación de extractos de stevia.
- Establecer condiciones para la concentración de los glucósidos de stevia por nanofiltración.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo los objetivos propuestos se plantea la siguiente estrategia metodológica.

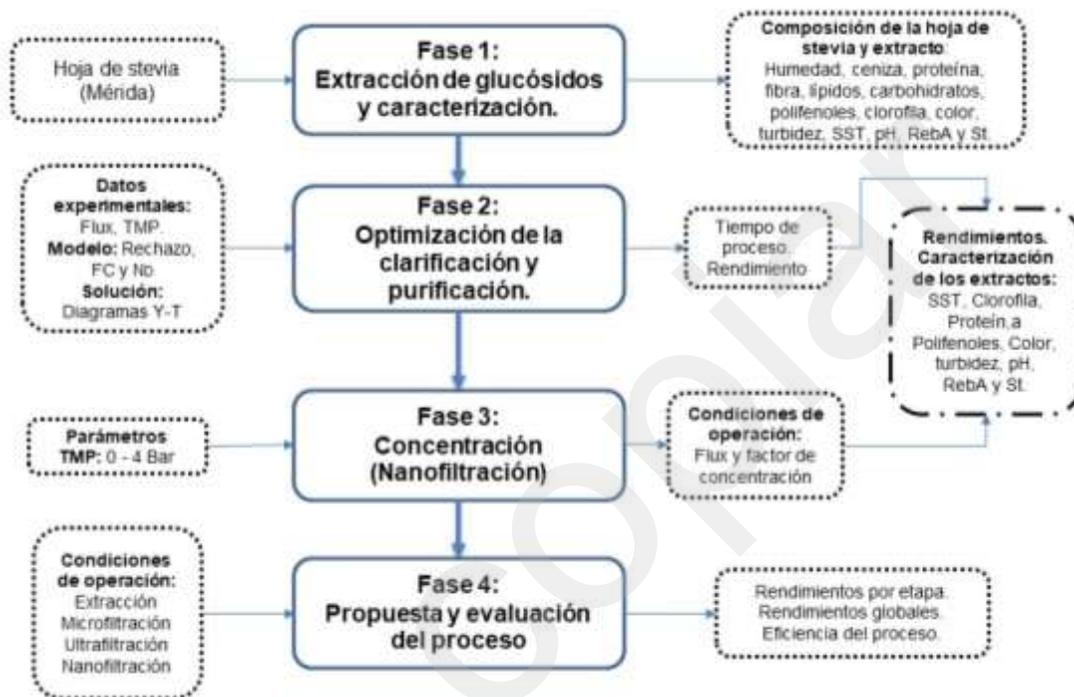


Figura 5. Estrategia experimental

4.1. FASE 1. Extracción de glucósidos y caracterización.

Se trabajó con hoja de stevia procedente de Mérida, las cuales son proporcionadas secas y se procesaron en un molino para obtener un tamaño de partícula adecuado para trabajar. Se utilizó el método de extracción propuesto por Luna-Santander (2017).

Posteriormente los extractos se pasaron por dos filtros de tela para retener partículas gruesas. El filtrado se dejó sedimentar por 12 h y se recogió el remanente. Este extracto fue llevado a las siguientes etapas.

La hoja de stevia se caracterizó con los siguientes métodos:

Análisis proximal:

- Humedad: A.O.A.C 925.10. Método gravimétrico.
- Proteínas: A.O.A.C 920.87. Método de kjeldahl.
- Cenizas: A.O.A.C 933.03. En mufla
- Lípidos: A.O.A.C 920.85. Extracción soxhlet.
- Fibra cruda: A.O.A.C. 978.10. Se realiza sobre el residuo de la prueba de extracto etéreo.
- Carbohidratos: Se reporta su contenido por diferencia de los resultados anteriores.

Rebaudiósido A y steviósido: La cantidad de glucósidos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por el método propuesto por Lavin *et al.*, (2008).

Polifenoles totales: Se usó el método modificado de Folin-Ciocalteu (D'Oliveira *et al.*, 2011), el cual utiliza una curva de calibración de una solución estándar de ácido gálico.

Clorofila: Se empleó el método de acetona propuesto por Kaushik *et al.*, (2010) modificado.

Los extractos acuosos se caracterizaron en términos de pH, sólidos totales disueltos (STD), polifenoles, steviósido, rebaudiósido A, turbidez, color, proteína y clorofila.

4.2. FASE 2. Clarificación (Microfiltración) y purificación (Ultrafiltración)

La etapa de clarificación se llevó a cabo con membranas de microfiltración de 0.2 μm (Ortiz-Rubio, 2014) con un diámetro exterior de 25 mm y una longitud de 580 mm, se

evaluaron dos geometrías de 8 y 93 canales. En la etapa de purificación se evaluó la permeabilidad de 3 membranas de 3, 8 y 15 kDa de diámetro de poro, todas con un diámetro exterior de 25 mm y longitud de 580 mm. En la Tabla 3 se resumen las diferentes membranas utilizadas.

Tabla 3. Características de las membranas evaluadas en las etapas de microfiltración y ultrafiltración.

Etapa	Poro	Canales	Área efectiva (m ²)	Material
Microfiltración	0.2 µm	8	0.1	Óxido de titanio (TiO ₂)
	0.2 µm	93	0.29	
Ultrafiltración	3 kDa	39	0.25	
	8 kDa	39	0.25	
	15 kDa	93	0.29	

4.2.1. Determinación de las condiciones de flux sostenible.

Para cada extracto se evaluó el flux sostenible con un protocolo de incrementos en la presión transmembrana, aplicando una contrapresión en el lado del permeado (Ortíz-Rubio, 2014). Los resultados de flux se analizaron con un modelo de resistencias en serie.

Durante los procesos de filtración, el flux de permeado decae a través del tiempo de procesamiento. Esto sucede por la adsorción de solutos sobre la superficie de la membrana, generando una capa o torta de micro y macrosolutos; o por la deposición de solutos al interior de los poros de la membrana (Li *et al.*, 2007). Este fenómeno se conoce como “fouling” o colmatación.

Esta disminución del flux de permeado implica un aumento en el costo de operación del proceso, no solo por el mayor gasto de energía en el mantenimiento del flux, sino también por el aumento en los tratamientos, así como en los tiempos y frecuencia de limpieza de las membranas (Espinasse, Bacchin, & Aimar, 2002).

Con el fin de evitar mayor costo y menor rendimiento en los procesos de filtración con membranas, se desarrolló el concepto de flux crítico. El flux crítico es el flux más bajo que crea una colmatación irreversible en la membrana, es decir que, operando por debajo del flux crítico no será necesaria una limpieza constante, mientras que por encima si lo es.

Para identificar el flux crítico se utilizó el modelo de resistencias en serie. El modelo de resistencias en serie es un mecanismo para entender los fenómenos que generan una disminución del flux a través del tiempo de proceso y la variación en la presión transmembrana (TMP) (Li et al., 2007).

El flux de permeado en un proceso de microfiltración o ultrafiltración se puede describir mediante la siguiente ecuación.

$$J = \frac{\Delta P}{\mu (R_m + R_c)} \quad (16)$$

Donde J es el flux, ΔP es la presión transmembrana, μ es la viscosidad del permeado, R_m es la resistencia propia de la membrana y R_c la resistencia generada por los depósitos o "fouling". R_m se puede calcular evaluando el flux de agua a través de la variación de la presión transmembrana; y R_c se puede calcular evaluando el flux de permeado a través de la variación de la presión transmembrana.

Espinasse, Bacchin, & Aimar (2002) encontraron comportamientos de flux *versus* presión transmembrana como los que se muestran en la Figura 6. Estos autores trabajaron con soluciones de látex y membranas cerámicas de microfiltración.

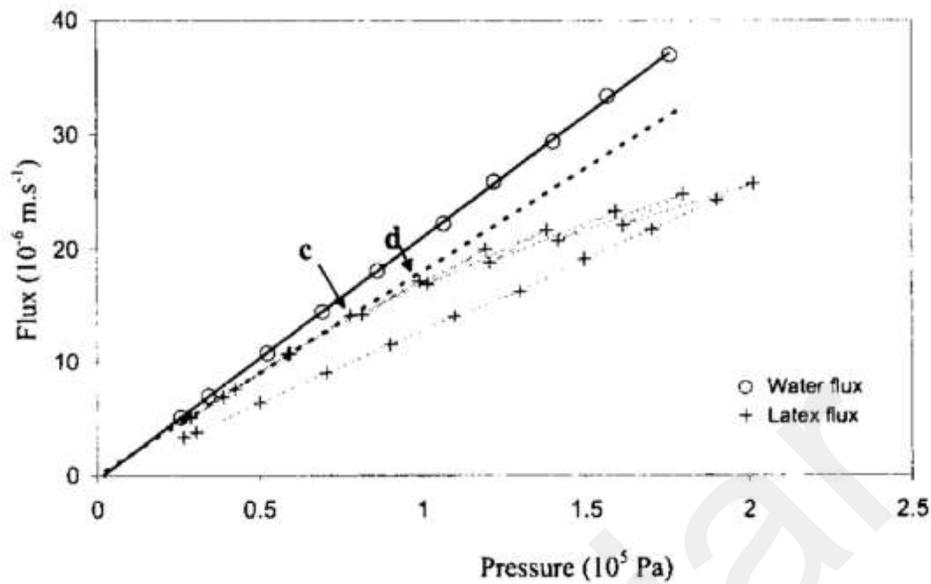


Figura 6. Comportamiento de flux de látex y flux de agua respecto a la presión transmembrana encontrado por Espinasse, Bacchin, & Aimar (2002)

Se observa que, al trabajar con las soluciones de látex, desde el inicio de la filtración hay una resistencia (Línea continua vs Línea punteada), por lo cual se adiciona una resistencia inicial al modelo.

$$J = \frac{\Delta P}{\mu (R_m + R_i + R_c)} \quad (17)$$

La cual se puede calcular evaluando el flux en los valores más bajos de presión transmembrana, donde el flux aún es dependiente de la presión (Antes del punto c, Figura 6).

Para hallar el punto de flux crítico se puede evaluar la evolución de la razón de resistencias debidas a la capa de polarización y resistencia inicial entre la resistencia intrínseca de la membrana $(R_c + R_i) / R_m$ a través del aumento de la presión. Cuando R_c adquiere valor se puede decir que el proceso ha alcanzado el flux crítico (Figura 7).

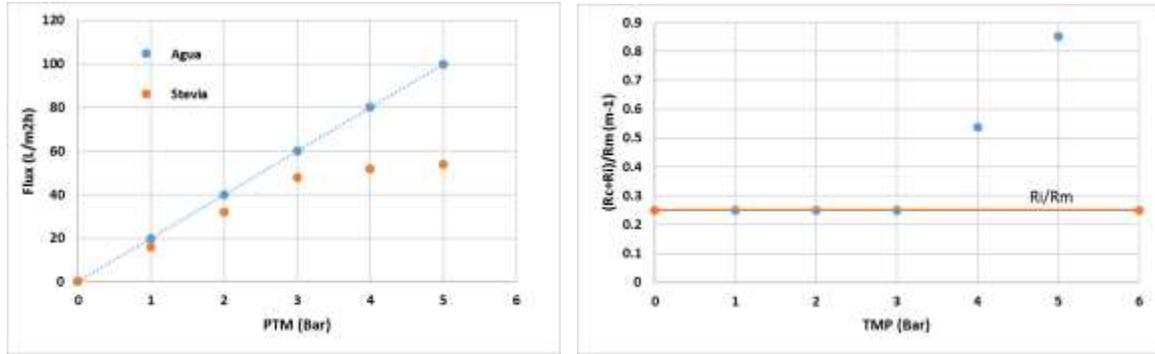


Figura 7. Ejemplo de modelo de resistencias para el flux de stevia a partir de las ecuaciones planteadas por Espinasse, Bacchin, & Aimar (2002)

Las condiciones de operación en modo flux sostenible en ultrafiltración fueron las determinadas por Martínez et al., (2016), a una velocidad de 8.21 m/s y una presión transmembrana de 1.2 bar.

4.2.2. Evaluación de flux sostenible

Una vez establecidas las condiciones de operación se validó el flux en modo recirculación, en función del tiempo. Para evaluar la velocidad de disminución del flux (k), se ajustaron los resultados al modelo de Hermia modificado (Constenla & Lozano, 1997).

$$J(t) = J^* + (J_o - J^*)e^{-kt} \tag{18}$$

Donde $J(t)$ es el flux en el tiempo t , J^* es el flux sostenible o final del tiempo evaluado, J_o es el flux inicial y k es la velocidad de decaimiento del flux.

Constenla & Lozano (1997), encontraron adicionalmente que al conocer el valor del parámetro k , es posible calcular el índice o grado de colmatación (GC) de la membrana mediante la siguiente relación.

$$GC = \left(\frac{J_o - J^*}{J_o} \right) k \quad (19)$$

4.2.3. Operación en modo diafiltración

La clarificación se trabaja en modo diafiltración para alcanzar un rendimiento de mínimo 90%, mediante diagramas rendimiento *versus* tiempo de proceso (Y-t) de acuerdo con el método de optimización reportado por (Venkiteshwaran & Belfort, 2010). Para construir los diagramas se utilizó el programa Scilab 6.0.0 y se tienen en cuenta las condiciones de operación en flux sostenible establecidas anteriormente. A partir de los diagramas de rendimiento *versus* tiempo de proceso se establecen condiciones de operación en modo diafiltración y se validan en un equipo de filtración tangencial marca SIVA-TAMI (Figura 8).

Los clarificados son llevados a la etapa de ultrafiltración donde igualmente se construyeron diagramas Y-t para aumentar el rendimiento y los resultados se compararon con los obtenidos por Martínez et al., (2015). Finalmente, los extractos purificados fueron evaluados en la siguiente etapa.



Figura 8. Equipo de filtración tangencial. (1) Tanque de alimentación, (2) intercambiador de calor, (3) Bomba centrífuga, (4) Módulo de membrana, (5) Variador de frecuencia, (6) Válvula del permeado, (7) Sistema de control de la válvula.

4.3. FASE 3. Concentración (Nanofiltración)

Se establecieron las condiciones hidrodinámicas adecuadas para operar el proceso en condiciones de flux sostenible empleando el protocolo de incrementos en la TMP (Espinasse *et al.*, 2002) (Beier & Jonsson, 2010) en un equipo de nanofiltración (Figura 9). A partir del comportamiento del flux respecto al tiempo con este protocolo, se eligió la forma de calcular el flux sostenible de acuerdo a las ecuaciones propuestas por Stoller *et al.*, (2013).



Figura 9. Equipo de nanofiltración. (1) Tanque de alimentación, (2) intercambiador de calor, (3) Bomba centrífuga, (4) Módulo de membrana, (5) Válvula del permeado, (6) Sistema de control de la válvula.

Una vez establecidas las condiciones de operación en flux sostenible, se realizó el proceso de concentración de los extractos de stevia purificados. Se calculó la relación de concentración como:

$$VCR = \frac{V_o}{(V_o - V_p)} \quad (20)$$

Donde, V_o es el volumen inicial en la alimentación y V_p es el volumen final de permeado. La eficiencia se evaluó en función del flux y factor de concentración obtenido en el proceso.

4.4. FASE 4. Propuesta y evaluación del proceso

Se construyó un nuevo diagrama de proceso para la concentración y purificación de glucósidos de stevia, teniendo en cuenta los resultados encontrados por Ortiz-Rubio (2014), Luna-Santander (2017) y Martínez *et al.*, (2015) en las fases anteriores.

Este proceso se evaluó en su totalidad para determinar así la eficiencia global obtenida.

No Copiar

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de la hoja de stevia

Se trabajaron hojas de stevia de diferentes lotes de Mérida, el primero de hoja sanitizada u hoja limpia (SM1), el segundo de hoja con breña o rama (SM2) y un tercer lote de hoja con breña de diferente cosecha (SM3).

Las hojas fueron caracterizadas en base a un análisis proximal y en términos del contenido de glucósidos. Además, se evaluó el contenido de polifenoles y de clorofila. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de materia prima de stevia evaluada comparados con los promedios obtenidos por Rodríguez et al., (2010), González et al., (2014) y Kaushik et al., (2010).

Se observa que hay una diferencia en la composición de la materia prima dependiendo de su composición (Hoja y/o breña) e incluso de su cosecha. Respecto a los glucósidos el contenido de rebaudiósido A y steviósido es significativamente diferente entre la hoja sanitizada (SM1) y la hoja con breña (SM2 y SM3), siendo la hoja sanitizada la que presenta mayor contenido de glucósidos, lo cual indica que, aunque en las ramas del arbusto de stevia también se encuentran glucósidos (Madan *et al.*, 2010) estos están en menor cantidad. También se destaca que el contenido de rebaudiósido A es superior al de steviósido, lo que demuestra una mejor calidad de estas hojas respecto a las evaluadas por otros autores donde se tiene un mayor contenido de steviósido (Tabla 4).

También se encontró diferencia significativa entre los lotes para ceniza, fibra y proteína y no se encontró diferencia en el contenido de lípidos, carbohidratos, polifenoles y clorofila, los cuales fueron inferiores en todos los casos reportados por Rodríguez et al., (2010), González et al., (2014) y Kaushik et al., (2010).

Tabla 4. Caracterización de las hojas de stevia de Mérida evaluadas en este trabajo y datos reportados por otros autores. Todos los valores están reportados en porcentaje peso/peso y base seca.

Compuesto	Mérida			Otros Autores
	SM1	SM2	SM3	
Ceniza	10.50 ^a	9.78 ^b	10.54 ^a	6.27 ⁺ - 9.95 [*]
Lípidos	3.83 ^a	2.56 ^a	3.29 ^a	2.03 [*] - 3.7 [∞]
Fibra	6.39 ^a	8.97 ^b	6.92 ^a	3.12 [*] - 7.28 [*]
Proteína	16.09 ^a	16.61 ^a	12.54 ^b	9.87 ⁺ - 15.59 [*]
Carbohidratos	65.68 ^a	64.69 ^a	68.65 ^a	46.8 [*] - 58.5 [*]
Rebaudiósido A	8.73 ^a	7.66 ^{ab}	7.25 ^b	1.2 [∞] - 7.5 [∞]
Steviósido	4.74 ^a	2.82 ^b	3.41 ^b	1.9 [∞] - 4.4 [∞]
Polifenoles	8.94 ^a	9.44 ^a	9.63 ^a	4.0 [∞] - 4.2 [∞]
Clorofila	0.18 ^a	0.21 ^a	0.18 ^a	No se reporta en hoja

*Rodríguez *et al.*, (2010), ⁺González *et al.*, (2014), [∞]Kaushik *et al.*, (2010). Los valores que comparten letra del alfabeto no son significativamente diferentes ($p < 0.05$); para una misma propiedad.

5.2. Permeabilidad de las membranas de microfiltración

Ortiz-Rubio (2014) encontró que la etapa de clarificación fue más eficiente con una membrana de 0.2 μm que con una membrana de UF de 15 kDa. En el laboratorio se tienen disponibles dos membranas de 0.2 μm de 58 cm de longitud. Una membrana de 8 canales y otra de 93 canales (Figura 10).



8 canales 93 canales

Figura 10. Vista esquemática lateral de las membranas cerámicas de 0.2 μm de 25 mm de diámetro y 580 mm de longitud disponibles en el laboratorio.

Se evaluó la permeabilidad de las dos membranas empleando agua destilada, midiendo el flux a diferentes gradientes de presión transmembrana. En este protocolo cada incremento de presión va acompañado de un incremento de velocidad. La permeabilidad fue de 814.21 L/m²hbar y 190.90 L/m²hbar para las membranas de 8 y 93 canales respectivamente. (Figura 11)

Considerando que las dos membranas poseen el mismo tamaño de poro, la permeabilidad de la membrana de 8 canales (área=0.1 m²) fue significativamente superior a la de 93 canales, lo cual, no es lo esperado debido a que el área efectiva es mayor en la membrana de 93 canales (área= 0.29 m²). Esto puede ser producto de un prolongado uso de la membrana de 93 canales lo cual ha generado un taponamiento irreversible en la membrana.

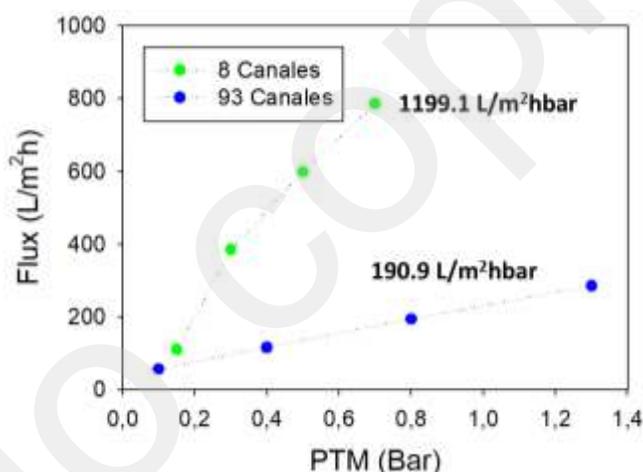


Figura 11. Permeabilidad al agua de las membranas de 0.2 μm de 8 y 93 canales evaluadas con dos protocolos.

5.3. Determinación de condiciones para evaluar el flux sostenible

La empresa Mayan Sweet Stevia de Mérida suministró la hoja de stevia y esta fue molida con la malla más grande del molino de discos 15-190x disponible en la UNIDA. Una vez molida la hoja se prepararon los extractos para las diferentes pruebas.

Se evaluó el flux crítico con el extracto de hoja limpia de Mérida (SM1) en las membranas de 8 y 93 canales (Figura 12), en ambos casos se observa que se alcanza el punto de inflexión que corresponde al flux crítico, el cual, se pudo comprobar con

las gráficas de relación de resistencias *versus* la presión transmembrana (TMP) (Figura 13), donde a partir de ciertos valores el valor de la resistencia generada por el ensuciamiento de la membrana se hace significativo.

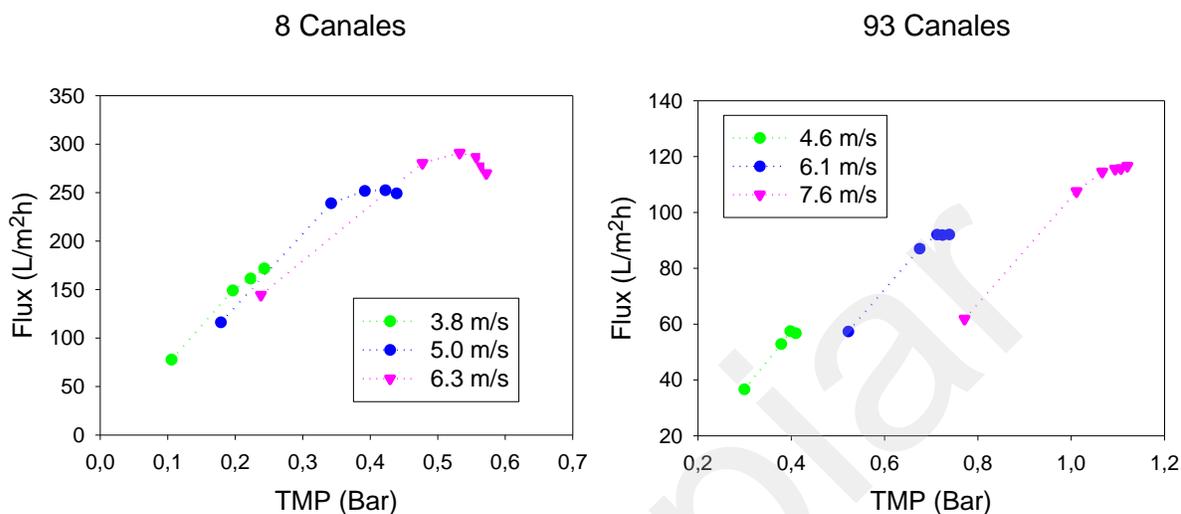


Figura 12. Perfiles de flux *versus* presión transmembrana (TMP) obtenidos con extracto de stevia de hoja limpia SM1 a diferentes velocidades tangenciales. Membranas de 8 y 93 canales, 0.2 μ m. Temperatura =25°C

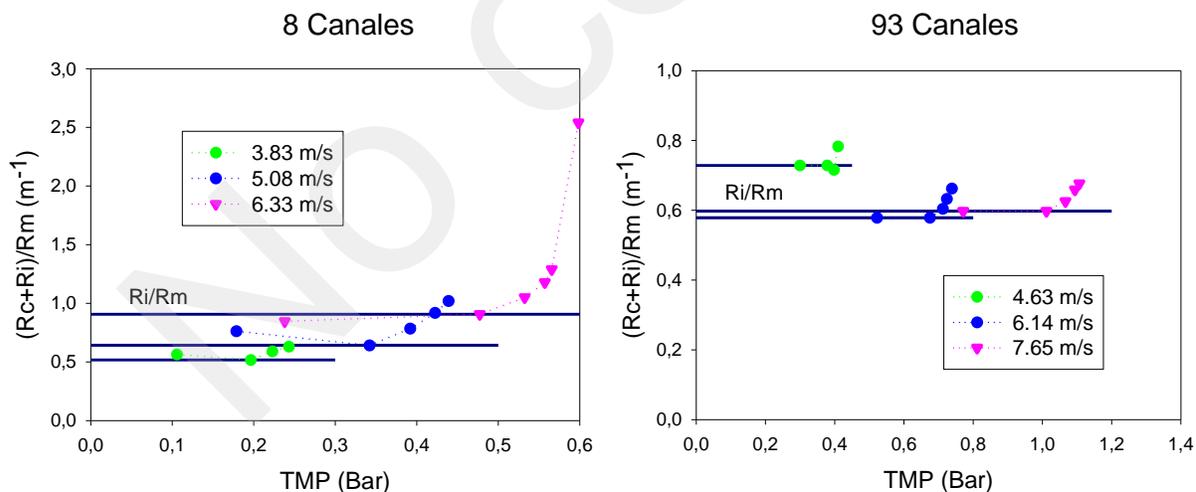


Figura 13. Evolución de las resistencias a medida que aumenta la presión transmembrana (TMP) para las diferentes velocidades evaluadas en la membrana de 93 canales, 0.2 μ m. Extracto de hoja limpia SM1.

A partir de estos resultados se puede evidenciar una gran diferencia en el rendimiento de las membranas de 8 y 93 canales. Mientras que con la membrana de 8 canales se

obtienen valores de flux superiores a 300 L/m²h (TMP=0.5 Bar) con la membrana de 93 canales no se alcanzan los 120 L/m²h (TMP=1.1 Bar). Por lo que se seleccionó la membrana de 8 canales para llevar a cabo los siguientes experimentos.

Se evaluó el extracto con breña de Mérida (SM2) con la membrana de 8 canales, para elegir las condiciones de flux sostenible. Se evaluó adicionalmente una velocidad intermedia entre 5.08 m/s y 6.38 m/s, debido al aumento considerable de las resistencias entre estos dos valores (Figura 13).

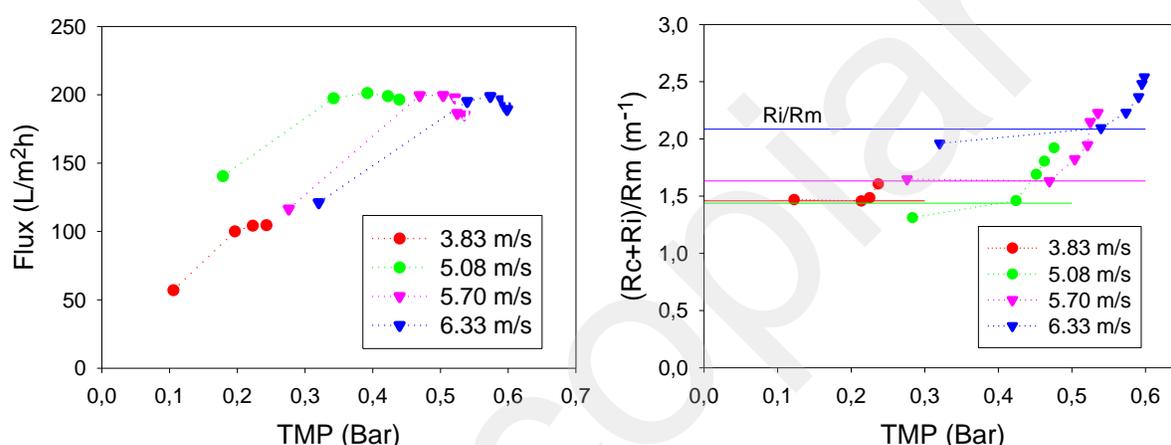


Figura 14. Perfiles de flux *versus* presión transmembrana (TMP) obtenidos con extracto de stevia con breña SM2 a diferentes velocidades tangenciales, y modelo de resistencias. Membrana de 8 canales, 0.2 μm. Temperatura =25°C

Nuevamente se observó que al procesar extractos de stevia con breña SM2 se alcanzó un flux crítico, el cual, se comprueba con el modelo de resistencias (Figura 14). También se observó que un valor de velocidad tangencial intermedio (5.70 m/s) genera una resistencia más cercana a los valores de velocidad bajos, concluyendo así que a la máxima velocidad probada (6.33 m/s) ocurre un aumento significativo de la resistencia y poco significativo respecto al flux, por lo tanto, se descarta trabajar a esta velocidad.

Comparando los valores de flux alcanzados utilizando los dos tipos de stevia, se observó que con la stevia sanitizada se obtuvieron valores de flux de alrededor de 300 L/m²h, mientras que con la stevia total el flux no superó los 200 L/m²h (Figura 12 y 14).

A partir de estos resultados se validará el flux sostenible, con la membrana de 8 canales, a una velocidad de 5.08 m/s y una presión transmembrana de 0.36 Bar, con contrapresión en el permeado de 0.13 bar. Pues a estas condiciones se observa la menor resistencia al flux, y es una condición de operación por debajo del flux crítico.

5.4. Validación de flux sostenible en microfiltración

Se evaluó el flux a través del tiempo, para validar las condiciones hidrodinámicas seleccionadas y el flux estable o sostenible, con los diferentes extractos. En la Figura 15 se muestran los resultados de flux a través del tiempo para los extractos de stevia SM1 y SM2 y su respectivo ajuste al modelo de Hermia modificado. Se observa que efectivamente a estas condiciones de operación se mantiene un flux sostenible con el extracto de stevia de hoja limpia SM1 de 166 L/m²h, y con el extracto de hoja con breña SM2 un flux de 155 L/m²h, lo que era de esperarse a partir de los resultados obtenidos en la determinación de las condiciones para operar en flux sostenible.

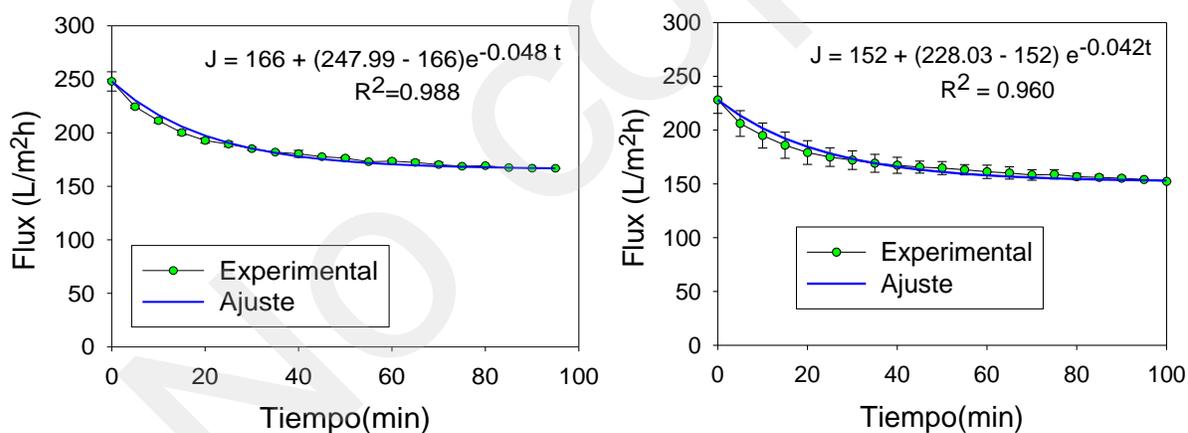


Figura 15. Evolución del flux (L/m²h) a través del tiempo operando en modo recirculación para la validación de flux sostenible en microfiltración. a) Extracto del lote SM1. b) Extracto del lote SM2.

En la Tabla 5 se comparan los valores de flux sostenible, velocidad de decaimiento (k) y grado de colmatación (GC) encontrados por Ortíz-Rubio (2014) con los resultados obtenidos para la misma membrana en este trabajo para el modelo de Hermia modificado (Figura 15). Se observa un aumento considerable en el flux sostenible. Esto puede atribuirse a diferencias en la composición de los extractos y a que en este

trabajo se tuvo una mayor precisión para establecer las condiciones de operación gracias a la automatización del módulo de membrana.

Se encontraron valores cercanos de velocidad de reducción del flux (k). Esto sugiere que una vez que se alcanzó el flux sostenible en cada caso, la velocidad a la que este cae es muy parecida. Por otro lado, el grado de colmatación (GC) fue mayor en este trabajo, esto significa que la velocidad reducción del flux y la diferencia entre el flux inicial y el flux sostenible es mayor en este trabajo a pesar de que se encontraron valores de flux sostenible más altos. Nuevamente este resultado puede estar asociado a la diferencia de composición y características del extracto (Tabla 6).

Tabla 5. Parámetros de ajuste del modelo de Hermia modificado de flux sostenible de los diferentes extractos de stevia.

	Flux sostenible (L/m ² h)	k (min ⁻¹)	GC (min ⁻¹)
Ortíz-Rubio (2014)	116.02	0.0043	0.0100
SM1	166.00	0.0048	0.0159
SM2	152.00	0.0042	0.0142

Tabla 6. Composición de los extractos de hoja limpia y hoja con breña de Mérida (SM1 y SM2).

Compuesto	SM1	SM2
Color	5.12 +/- 0.45	8.30 +/- 0.17
Turbidez	0.46 +/- 0.02	1.91 +/- 0.07
STD (g/ml)	2.48 +/- 0.07	1.46 +/- 0.04
pH	5.39 +/- 0.01	7.74 +/- 0.39
Polifenoles (mg/L)	3.01 +/- 0.15	1.67 +/- 0.03
Rebaudiósido A (mg/ml)	4.03 +/- 0.13	3.42 +/- 0.81
Stevióside (mg/ml)	1.99 +/- 0.18	1.32 +/- 0.03
Proteína (g/ml)	0.09 +/- 0.01	0.11 +/- 0.02
Clorofila (mg/L)	1.44 +/- 0.04	1.86 +/- 0.39

En la Tabla 6 se compara la composición de los 2 extractos de stevia. La primera diferencia por resaltar es el pH, es decir, que la presencia de breña influye en el pH del extracto. Esta variación de pH a su vez influye en la extracción de ciertos compuestos, como clorofila y polifenoles, en este caso, se encuentra mayor contenido de polifenoles en el extracto de hoja limpia que en el extracto de hoja con breña, caso contrario para la clorofila. Igualmente se observa una diferencia en los parámetros de color y turbidez, el extracto de hoja con breña tiene mayor color y turbidez, lo que puede explicar la diferencia en el desempeño de la membrana.

5.5. Operación de la etapa de clarificación con membranas de microfiltración en modo diafiltración.

Para la construcción del diagrama de optimización es necesario conocer el coeficiente de rechazo (S_o) de la membrana para cada uno de los glucósidos. El porcentaje de reducción de glucósidos en el extracto de hoja limpia de Mérida (SM1) fue considerablemente diferente para el rebaudiósido A respecto al steviósido, esto es, 10.24% y 37.09% respectivamente, pero con el extracto de hoja con breña SM2 se obtienen valores similares para ambos compuestos, 12.19% y 13.55% respectivamente. Es decir, hay un coeficiente de rechazo S_o diferente para cada glucósido y para cada extracto (Tabla 7).

Tabla 7. Coeficientes de rechazo S_o para los diferentes extractos en membrana de microfiltración de 8 canales y 0.2 μm , del rebaudiósido A y el steviósido.

Lote	Rebaudiósido A	Steviósido
SM1	0.898	0.629
SM2	0.878	0.864

A partir de los resultados obtenidos de flux sostenible y el coeficiente de rechazo del Reb-A se construyó el diagrama de optimización para el extracto SM1. Los parámetros para elaborar el diagrama Y-t (Ecuaciones 6 y 9) fueron el coeficiente de rechazo ($S_o = 0.898$), volumen inicial ($V_o = 5.8$ litros), flux de trabajo ($J = 167 \text{ L/m}^2\text{h}$) y área efectiva

de la membrana ($A = 0.1 \text{ m}^2$). Se trabajaron 5.8 litros de extracto como una evaluación inicial de la eficacia del diagrama.

El diagrama de optimización obtenido para estos valores se muestra en la Figura 16. Se eligió como objetivo de la diafiltración un rendimiento cercano al 90%, para una reducción de volumen $RV = 1$ (Debido a limitaciones en los volúmenes de operación requeridos para $RV > 1$) con un número de dia volúmenes, $ND=2.8$ y se obtuvo un tiempo de operación teórico de 0.94 h (58.2 min).

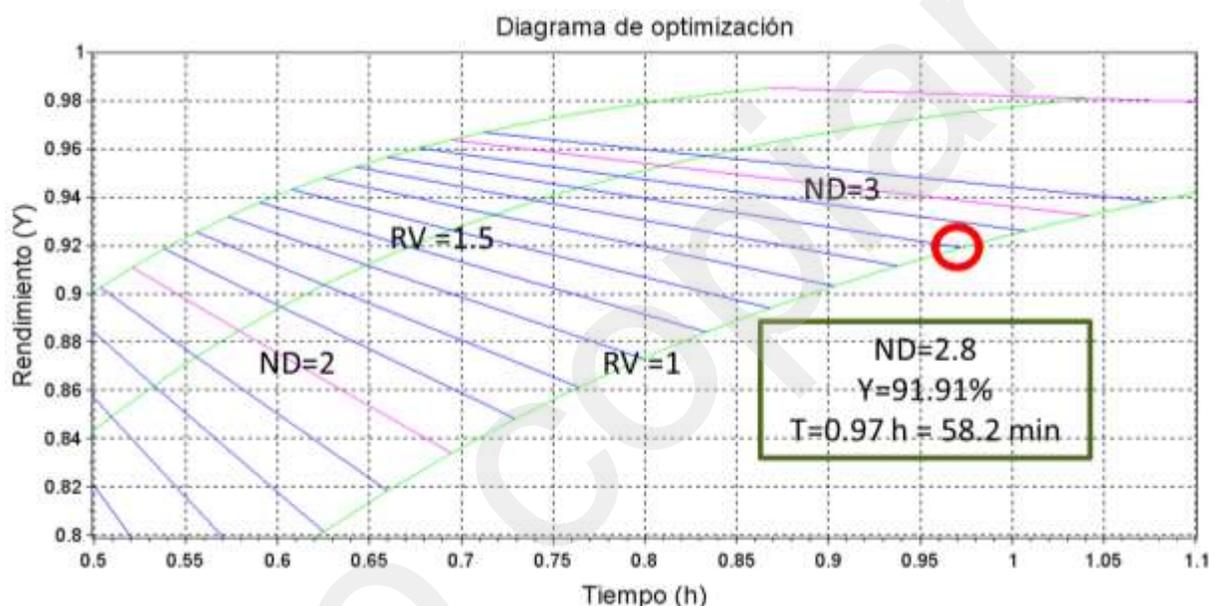


Figura 16. Diagrama de optimización para el extracto 1 de Mérida (SM1) utilizando membrana de microfiltración de 8 canales y $0.2 \mu\text{m}$. Líneas verdes = Factor de concentración. Líneas azules = Número de diafiltraciones.

Bajo estas condiciones el diagrama predijo un rendimiento del 91.91%. Usando las condiciones de operación para mantener el flux sostenible y los parámetros del diagrama de optimización se llevó a cabo la diafiltración, monitoreando la variación del flux a través del tiempo. En la Figura 17 se observa que una vez alcanzado el flux sostenible ($166 \text{ L/m}^2\text{h}$), éste se mantiene a través del tiempo. El tiempo de proceso fue de 54 min, es decir, 4 min menos que el tiempo teórico. Esto se atribuye a que inicialmente el flux fue mayor al valor del flux sostenible, pero desciende rápidamente hasta igualarlo.

Se obtuvo un rendimiento experimental de 89 +/- 4% frente a un rendimiento teórico del 91.91% aproximadamente, comprobando que el diagrama puede predecir el resultado del experimento y que se logró aumentar el rendimiento respecto al 67%, reportado en esta etapa por Ortíz-Rubio (2014).

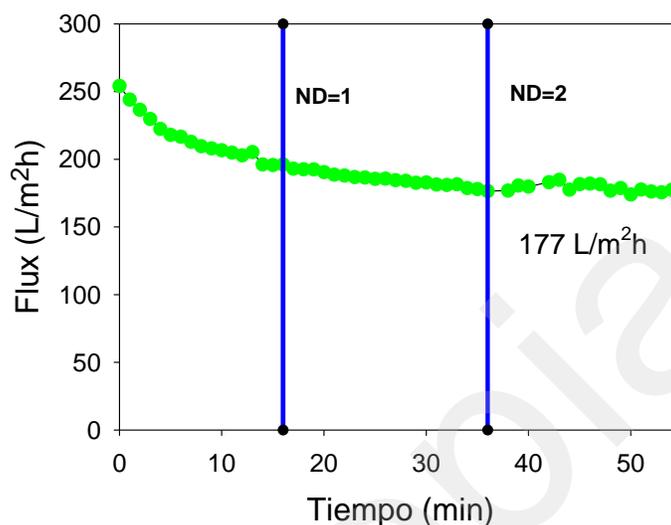


Figura 17. Evolución del flux a través del tiempo, operando en modo diafiltración, con membrana de 8 canales de 0.2 μm . Lote 1 de Mérida SM1.

Estos resultados fueron similares y en algunos casos superiores a los reportados por otros autores en aplicaciones diferentes. Por ejemplo, Jukkola *et al.*, (2016), utilizaron una membrana de 1.4 μm para remover proteínas de leche cruda (Permeado), alcanzando un rendimiento del 90% con un número de diafiltración de 3, sin realizar una concentración inicial. Por otro lado, Chaparro *et al.*, (2016) utilizaron una membrana de 0.8 μm para obtener licopeno (Permeado) a partir de jugo de sandía, obteniendo un rendimiento de 72% con un número de diafiltración de 1.3. Estos autores realizaron una concentración previa a la diafiltración, encontrando que al combinar los dos procesos se obtiene un mejor rendimiento. En ambos trabajos, no se calculó el número de diafiltraciones necesarias para alcanzar cierto rendimiento, el ND fue definido arbitrariamente. Esto demuestra la utilidad del diagrama para predecir el rendimiento experimental para cierto número de diafiltraciones, ya que permite elegir el rendimiento que se desea obtener sin realizar experimentos de diafiltración previos.

Se realizó de igual manera el diagrama de optimización para el extracto SM2, considerando un flux sostenible de 152 L/m²h, un coeficiente de rechazo $S_o = 0.878$, $V_o = 14$ L y un área de membrana $A=0.1$ m² (Figura 18). En este caso se aumentó el objetivo de rendimiento a 95.34%, y se estableció una reducción de volumen mayor a la anterior (RV=2) (Señalado en rojo en la Figura 18). Según el diagrama para alcanzar este rendimiento se necesita un ND=2.8 y un tiempo de proceso igual a 1.75 h (105 min).

En este caso, primero se realizó una reducción de volumen (RV=2), para lo cual se ponen 14 L de extracto en el tanque del módulo, y se reducen a 7 Litros. Una vez alcanzado este volumen se comienza la fase de diafiltración agregando 100 ml de agua destilada en el tanque por cada 100 ml de permeado, hasta agregar en total 19.6 L de agua destilada para tener un ND=2.8. Operando bajo estas condiciones se observó el mismo comportamiento del flux a través del tiempo.

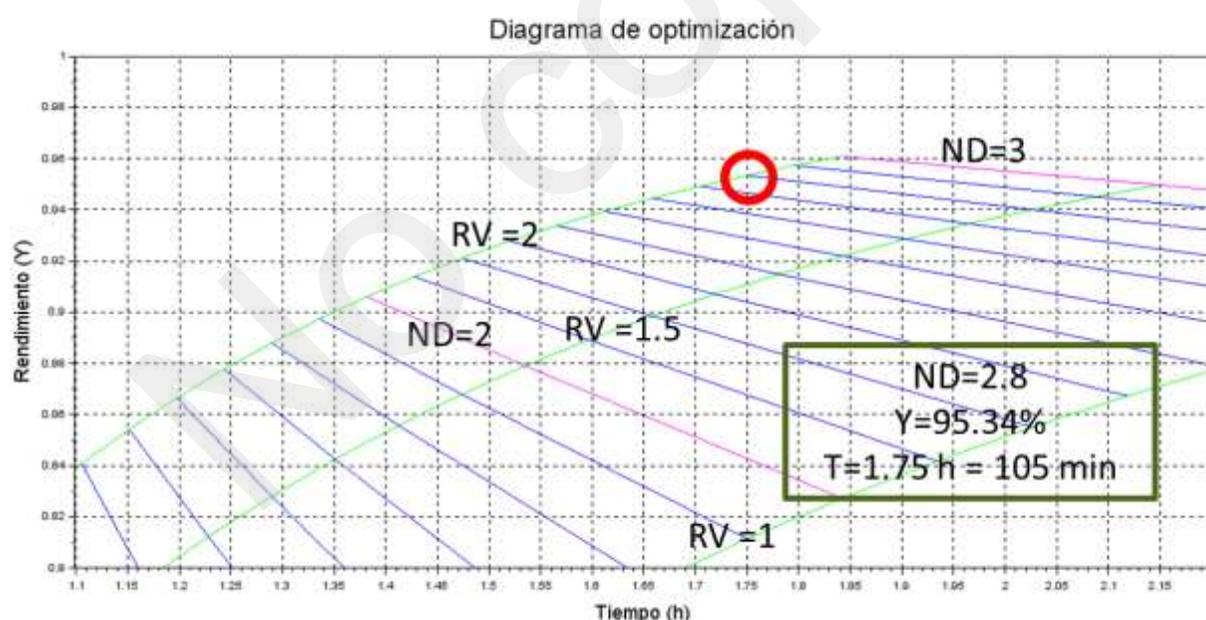


Figura 18. Diagrama de optimización para el extracto con breña (SM2) utilizando membrana de microfiltración de 8 canales y 0.2 μ m. Líneas verdes = Factor de concentración. Líneas azules = Número de diafiltraciones.

Puede verse en la Figura 19, que el flux comienza a decaer hasta estabilizarse en 151 L/m²h (Valor de flux sostenible encontrado para SM2), y el tiempo total de proceso fue de 99 min. Esto es 6 min menos que el tiempo predicho por el diagrama. El rendimiento experimental encontrado en este caso para el rebaudiósido A fue de 93 +/- 7%. Este valor es cercano al 95.34% señalado por el diagrama, con lo que se valida nuevamente la predicción del diagrama de optimización.

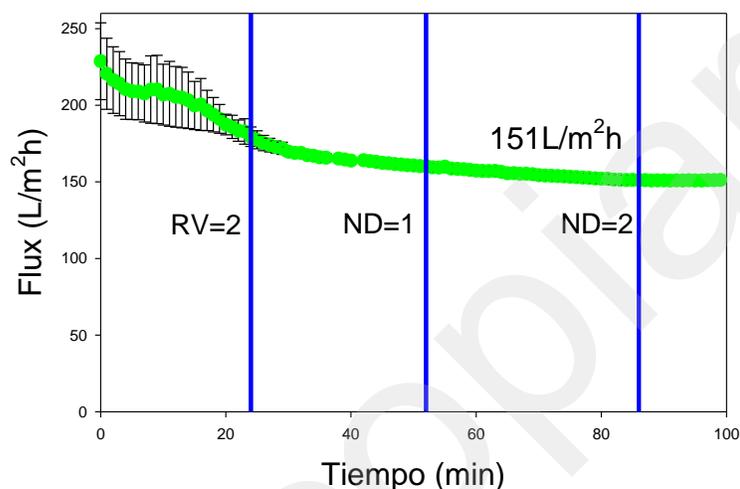


Figura 19. Evolución del flux a través del tiempo, operando en modo diafiltración, con membrana de 8 canales de 0.2 μm . Lote 2 de Mérida (SM2).

5.6. Caracterización de los extractos en microfiltración en modo diafiltración.

En la Tabla 9 se muestran las características de los extractos de alimentación, el permeado y el retenido de los extractos SM1 y SM2, clarificados con membrana de 0.2 μm en modo diafiltración. Se observa que en ambos casos los valores de todos los parámetros evaluados fueron menores en el permeado. Esto debido a que ocurre una dilución al agregar agua durante la diafiltración. Los parámetros que disminuyeron considerablemente fueron el color y la turbidez, lo cual cumple con el objetivo de la microfiltración de remover impurezas de alto peso molecular, para obtener un extracto con menos impurezas para la siguiente etapa de ultrafiltración.

También se observa que compuestos de bajo peso molecular como los polifenoles y la clorofila no se retienen mucho por esta membrana, lo cual está de acuerdo con lo

RESULTADOS

reportado por Cho, Lee, & Kim (2003), quienes utilizaron una membrana de 0.2 μm para purificar pectina de extractos de cáscara de mandarina. La membrana operada en modo diafiltración retuvo la pectina y permitió remover los polifenoles y pigmentos.

Tabla 8. Caracterización de los extractos de hoja limpia y hoja con breña SM1 y SM2 en la alimentación, el permeado y el retenido con la membrana de 0.2 μm y 8 canales en el proceso microfiltración-diafiltración.

Volumen (L)	5.8	16.24	5.8
SM1	Alimentación	Permeado	Retenido
Color	5.12 +/- 0.45	0.42 +/- 0.01	1.36 +/- 0.16
Turbidez	0.46 +/- 0.02	0.03 +/- 0.00	0.52 +/- 0.04
STD (g/ml)	2.48 +/- 0.07	0.25 +/- 0.02	0.10 +/- 0.02
pH	5.39 +/- 0.01	5.13 +/- 0.09	5.90 +/- 0.00
Polifenoles (mg/L)	3.01 +/- 0.15	0.27 +/- 0.01	0.05 +/- 0.01
Rebaudiósido A (mg/ml)	4.03 +/- 0.13	1.26 +/- 0.02	0.44 +/- 0.01
Steviósido (mg/ml)	1.99 +/- 0.18	0.54 +/- 0.02	0.44 +/- 0.01
Proteína (g/ml)	0.09 +/- 0.01	0.03 +/- 0.02	0.02 +/- 0.02
Clorofila (mg/L)	1.44 +/- 0.04	0.39 +/- 0.27	0.35 +/- 0.20
Volumen (L)	14	26.6	7
SM2	Alimentación	Permeado	Retenido
Color	8.30 +/- 0.17	2.87 +/- 0.05	4.54 +/- 0.04
Turbidez	1.91 +/- 0.07	0.24 +/- 0.01	2.01 +/- 0.01
STD (g/ml)	1.46 +/- 0.04	0.80 +/- 0.05	0.52 +/- 0.31
pH	7.74 +/- 0.39	7.91 +/- 0.39	7.58 +/- 0.45
Polifenoles (mg/L)	1.67 +/- 0.03	0.94 +/- 0.02	0.21 +/- 0.04
Rebaudiósido A (mg/ml)	3.42 +/- 0.81	1.68 +/- 0.25	0.22 +/- 0.00
Steviósido (mg/ml)	1.32 +/- 0.03	0.67 +/- 0.10	0.09 +/- 0.04
Proteína (g/ml)	0.11 +/- 0.02	0.03 +/- 0.01	0.07 +/- 0.02
Clorofila (mg/L)	1.86 +/- 0.39	0.69 +/- 0.34	1.23 +/- 0.11

5.7. Permeabilidad de las membranas de ultrafiltración

Martínez-Alvarado (2015) evaluó 3 membranas de ultrafiltración para la purificación de clarificados de stevia, y encontró que la membrana más eficiente (en términos de selectividad) fue distinta para los diferentes clarificados evaluados. Esto se atribuyó a diferencias en la composición de los extractos procesados.

Debido a que la variación de la composición de la stevia es inevitable, en este trabajo se decidió seleccionar, solo una de estas membranas para evaluar la ultrafiltración. El criterio de selección fue la permeabilidad de las membranas. En la Figura 25 se compara la permeabilidad de las 3 membranas que podrían ser utilizadas, todas de 25 mm de diámetro y 580 mm de longitud; las de 3 y 8 kDa con 39 canales (Área efectiva=0.25 m²) y la de 15 kDa con 93 canales (Área efectiva=0.29 m²).

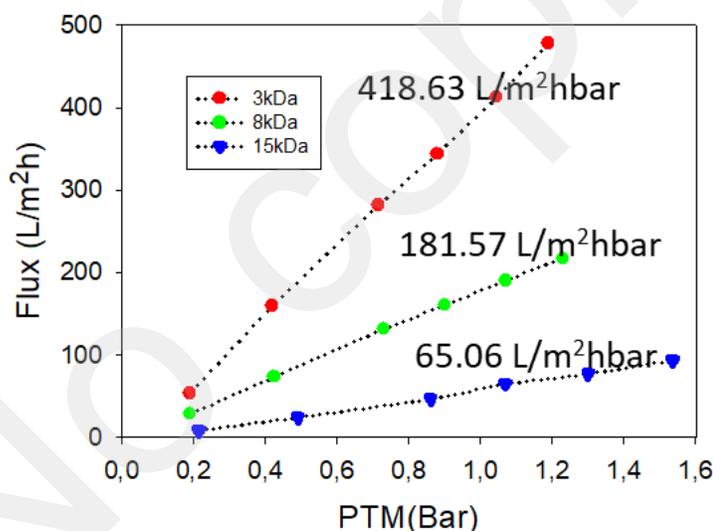


Figura 20. Permeabilidad al agua de las membranas de ultrafiltración de 3, 8 y 15 kDa.

La membrana que presentó la mayor permeabilidad fue la de 3 kDa con 418.63 L/m²hBar, por encima de las membranas de 8 y 15 kDa con 181.57 y 65.06 L/m²hBar, respectivamente. Por lo tanto, esta membrana (3 kDa) se utilizó en la etapa de purificación.

5.8. Validación de flux sostenible en ultrafiltración

Las condiciones reportadas por Martínez-Alvarado *et al.*, (2016) para trabajar la membrana de 3 kDa en flux sostenible fueron: velocidad tangencial de 8.21 m/s y presión transmembrana de 1.2 bar, sin contrapresión en el permeado. En la Figura 21 se muestran los perfiles de flux para los extractos clarificados SM1 y SM2. En este caso se observa mayor diferencia en el flux sostenible respecto a los que se determinaron en microfiltración entre los extractos SM1 y SM2, 155 y 90 L/m²h, respectivamente. Estos resultados sugieren que la diferencia en la composición de la materia prima y por lo tanto de los extractos tiene mayor impacto en la ultrafiltración. Mientras que en la microfiltración se encontró una diferencia de flux para los extractos obtenidos de hojas limpias (SM1) y de hoja con breña (SM2) de 14 L/m²h, en la ultrafiltración se observó una diferencia de 65 L/m²h.

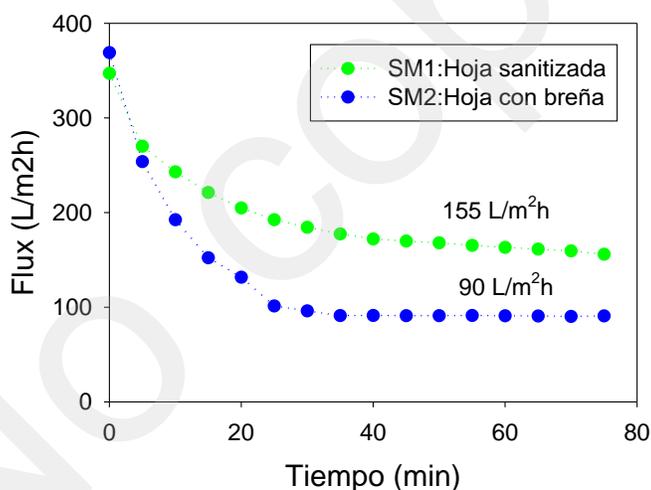


Figura 21. Evolución del flux (L/m²h) a través del tiempo operando en modo recirculación para la validación de flux sostenible en ultrafiltración con extracto del lote SM1 (Permeabilidad≈400 L/m²hBar)

Analizando la composición de los extractos procesados (Tabla 9), estas diferencias pueden ser atribuidas al pH que tiene cada extracto. Debido al tamaño de poro de las membranas de ultrafiltración, las interacciones de los componentes del fluido con la membrana juegan un papel muy importante en el flux de permeado obtenido. El punto isoeléctrico del TiO₂ se encuentra a pH= 6.5 (Valencia, Marín, & Restrepo, 2011), es decir que el extracto de hoja limpia SM1 tiene un pH por debajo del punto isoeléctrico

de la membrana (Cargad positivamente) y se obtuvo un flux de 155 L/m²h, mientras que el extracto de hoja con breña SM2 se trabajó por encima del punto isoeléctrico de la membrana (Cargada Negativamente) y se obtuvo un flux de 90 L/m²h.

La retención de los componentes de la alimentación a través de la membrana, en este caso, no depende únicamente del tamaño de poro de la membrana sino además del fenómeno conocido como Efecto Donan. Por lo que, en este caso el punto isoeléctrico de la membrana es un factor determinante en el desempeño de la misma.

Tabla 9. Composición de los extractos de hoja de stevia limpia (SM1) y hoja con breña de Mérida (SM2).

Compuesto	SM1	SM2
Color	0.42 +/- 0.01	2.87 +/- 0.05
Turbidez	0.03 +/- 0.00	0.24 +/- 0.01
STD (g/ml)	0.25 +/- 0.02	0.80 +/- 0.05
pH	5.13 +/- 0.09	7.91 +/- 0.39
Polifenoles (mg/L)	0.27 +/- 0.01	0.94 +/- 0.02
Rebaudiósido A (mg/ml)	1.26 +/- 0.02	1.68 +/- 0.25
Steviósido (mg/ml)	0.54 +/- 0.02	0.67 +/- 0.10
Proteína (g/ml)	0.01 +/- 0.00	0.06 +/- 0.00
Clorofila (mg/L)	0.49 +/- 0.27	0.69 +/- 0.34

Por otro lado, los valores de flux obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados por Martínez-Alvarado *et al.*, (2016), para la misma membrana utilizando stevia procedente de Chiapas y Oaxaca, 9.8 y 22.5 L/m²h. Sin embargo, los extractos usados por estos autores no fueron clarificados con diafiltración, por lo que no estaban diluidos antes de pasar a ultrafiltración, lo anterior puede explicar los valores más altos de flux sostenible encontrados en este trabajo.

5.9. Operación de la etapa de purificación con membranas de ultrafiltración en modo diafiltración.

La diferencia entre la microfiltración y la ultrafiltración se encuentra, además del tamaño de poro, en la estructura interna de las membranas; mientras que las membranas de microfiltración tienen una misma estructura en todo su espesor, siendo la totalidad del espesor la que opone resistencia durante el proceso; las membranas de ultrafiltración tienen una estructura asimétrica, en donde la capa superficial de poros más pequeños, es la que determina la mayor resistencia de la membrana (Guizard, 1999). Sin embargo, ambos procesos de membranas utilizan membranas porosas, por lo que se evaluó si los diagramas Y-t utilizados en microfiltración permiten optimizar también la etapa de ultrafiltración.

De igual manera, que en la microfiltración los coeficientes de rechazo del rebaudiósido A y el steviósido fueron diferentes en la ultrafiltración (UF) para cada extracto (Tabla 10). Nuevamente el objetivo de la optimización será el rebaudiósido A.

Tabla 10. Coeficientes de rechazo S_o , del rebaudiósido A y el steviósido para los diferentes extractos en la membrana de ultrafiltración de 39 canales y 3 kDa.

Lote	Rebaudiósido A	Steviósido
SM1	0.939	0.500
SM2	0.761	0.744

Se construyeron los diagramas Y-t para la UF de los dos extractos clarificados de los extractos SM1 y SM2 (Figura 22), teniendo como parámetros los respectivos valores de flux sostenible y los coeficientes de rechazo. En ambos casos se trabajó un volumen inicial de 14 L y un área de membrana de 0.25 m².

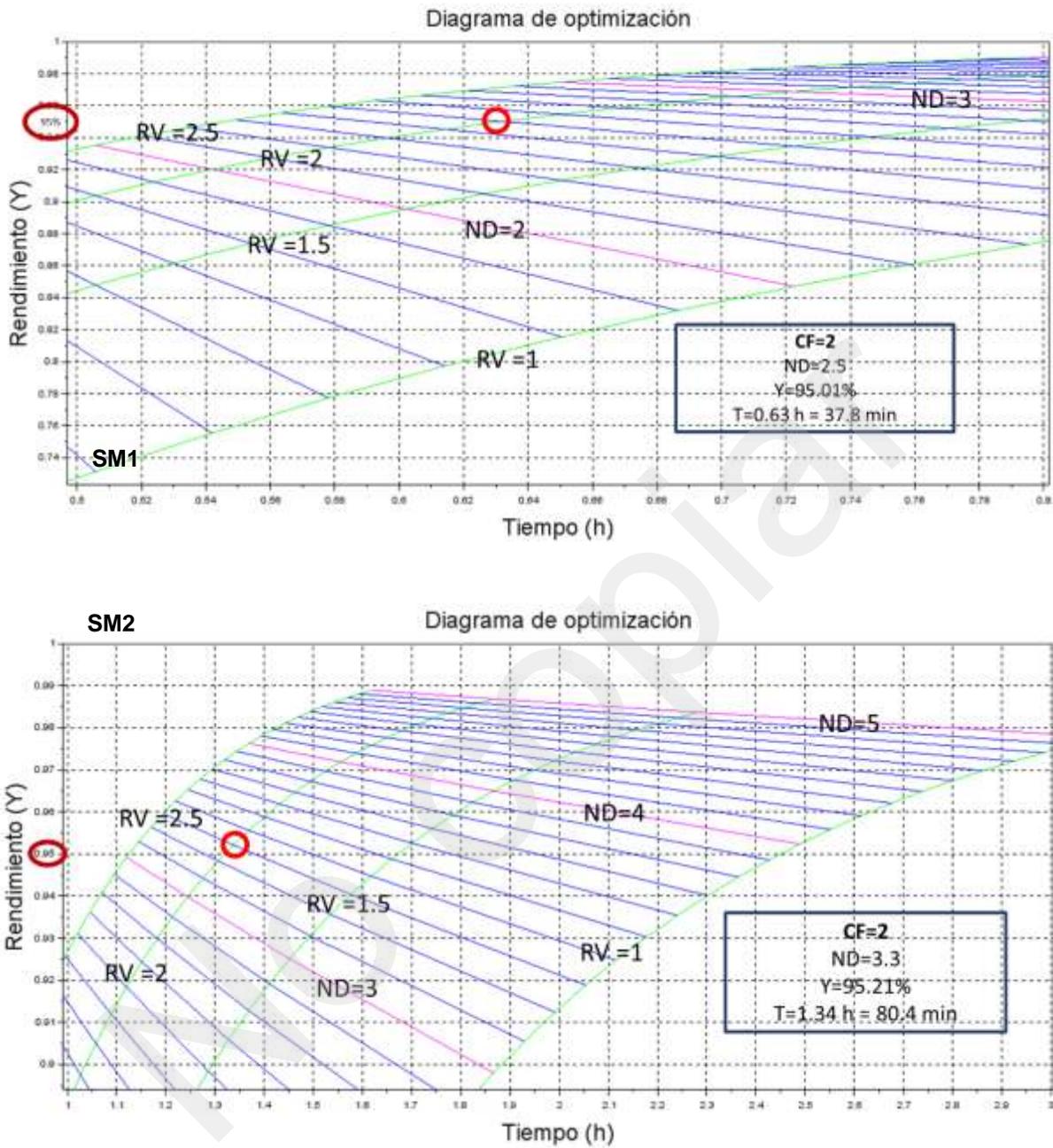


Figura 22. Diagramas de optimización para el extracto SM1 y SM2 utilizando una membrana de ultrafiltración de 39 canales y 3 kDa. Líneas verdes = Factor de concentración. Líneas azules = Número de diafiltraciones.

Operando la ultrafiltración en modo diafiltración, los diagramas predijeron un rendimiento de 95.01% para el lote 1 (SM1) y de 95.21% para el lote 2 (SM2). En ambos casos, el rendimiento experimental obtenido fue del 100%, teniendo una recuperación total de Rebaudiosido A en el permeado (Tabla 11).

Tabla 11. Rendimientos teórico y experimental de rebaudiósido A para los extractos clarificados SM1 y SM2, en la purificación con membrana de UF de 3 kDa en modo diafiltración.

Extracto	Y Teórico	Y Experimental
SM1	95.01	103* +/- 4
SM2	95.21	111* +/- 10

* Error experimental atribuido a la medición del volumen de permeado.

Martínez *et al.*, (2016) purificaron extractos de stevia clarificados combinando el proceso de reducción de volumen y diafiltración. La RV fue de 1.625, obtuvieron un coeficiente de separación S_0 de 0.571 y flux sostenible de 20 L/m²h con una membrana de área de 0.25 m². Analizando estos datos con el diagrama Y-t se obtuvo un rendimiento teórico de 75.81%, este valor es menor al rendimiento experimental reportado (80%) por estos autores. Esto sugiere que el modelo en el que se basa el diagrama Y-t para MF subestima el rendimiento real, en el proceso de ultrafiltración. La diferencia principal entre el modelo propuesto para predecir el rendimiento de recuperación en MF respecto al propuesto para UF son las variables empleadas para la elaboración de los modelos.

El modelo de Venkiteshwaran & Belfort (2010), incorpora los procesos de reducción de volumen y diafiltración, pero solo tiene en cuenta el coeficiente de separación del compuesto de interés, en este caso, de los glucósidos. Por otro lado, el modelo empleado por Martínez *et al.*, (2016) (Reis & Saksena, 1997) está enfocado en la separación multicomponente, por lo que tiene en cuenta la presencia de otros compuestos en los extractos procesados. El modelo utiliza dos variables con el fin de optimizar el rendimiento y la purificación: la selectividad (Ψ) que es la relación de los coeficientes de separación y ΔS la diferencia entre los coeficientes de separación. En

el caso de la purificación de extractos de stevia se tiene en cuenta el coeficiente de separación de los glucósidos y de las impurezas calculados a partir de las absorbancias a 420 y 670 nm (Vanneste *et al.*, 2011).

Se evaluaron los datos obtenidos en este trabajo con el modelo trabajado por Martínez *et al.*, (2016) (Tabla 12). Se observa que los rendimientos teóricos calculados en este caso son más cercanos al 100%. Por lo que nuevamente se confirma que en ultrafiltración las interacciones de los compuestos presentes en el extracto tienen una mayor influencia en el desempeño del proceso.

Tabla 12. Rendimientos teórico y experimental de rebaudiósido A para los extractos clarificados SM1 y SM2, en la purificación con membrana de UF de 3 kDa en modo diafiltración utilizando diagramas de rendimiento-Pureza (Y-P).

Extracto	Y Teórico	Y Experimental
SM1	99.83	103* +/- 4
SM2	98.81	111* +/- 10

* Error experimental atribuido a la medición del volumen de permeado.

Comparando los resultados obtenidos en UF en este trabajo con los reportados por Martínez *et al.*, (2016), se puede afirmar que se aumentó el rendimiento y se obtuvieron valores de flux considerablemente superiores a los reportados en la literatura para membranas de ultrafiltración (Roy & De, 2014; Vanneste *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2000), por lo que a pesar de que se utilizó un mayor ND (2.5 y 3.3 para los extractos SM1 y SM2 respecto a ND = 2) se obtuvo una mayor recuperación de glucósidos en menos tiempo de operación debido al aumento del flux. Igualmente, para un ND=3, similar al usado en este trabajo, Roy & De (2014), reportaron un rendimiento de tan solo el 82%. Los valores de flux sostenible encontrados en este trabajo fueron superiores.

5.10. Caracterización de los extractos en ultrafiltración (UF) en modo diafiltración.

En la Tabla 13 se resumen las características de la alimentación, el permeado y el retenido de los dos extractos de stevia de Mérida (SM1 y SM2) obtenidos durante la UF en modo diafiltración; de igual manera se señalan los volúmenes obtenidos de cada uno.

En esta etapa del proceso se obtuvo una reducción de color, de turbidez y de STD muy similar para los dos lotes. Sin embargo, los polifenoles y la clorofila tienen una retención diferente, la ultrafiltración del extracto clarificado de SM1 no retuvo estos compuestos ($\text{pH} < \text{punto isoelectrico}$) lo que si sucedió con el extracto de SM2 ($\text{pH} > \text{punto isoelectrico}$). Por lo que, nuevamente se encuentra una diferencia muy significativa en el desempeño de la ultrafiltración (Además de la diferencia de flux sostenible de $64 \text{ L/m}^2\text{h}$ de un extracto a otro). Chevereau *et al.*, (2010) encontraron que una modificación del pH ocasiona un incremento en la retención de MgCl_2 por membranas de ultrafiltración de óxido de titanio (TiO_2), debido a que la absorción de iones (Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2+}) reduce el tamaño de poro efectivo, y por tanto el flux de permeado.

Es importante mencionar que los extractos se obtuvieron bajo las mismas condiciones experimentales, siendo estos de misma procedencia, con la única diferencia de que un extracto es de solo hojas limpias, mientras que el otro es un extracto de hojas con breña.

Tabla 13. Caracterización de los extractos de los lotes SM1 y SM2 en la alimentación, el permeado y el retenido operando en modo diafiltración la ultrafiltración. Membrana de 3 kDa.

Volumen (L)	14	33.6	7
SM1	Alimentación	Permeado	Retenido
Color	0.42 +/- 0.01	0.00 +/- 0.01	0.41 +/- 0.01
Turbidez	0.03 +/- 0.00	0.00 +/- 0.00	0.04 +/- 0.01
STD (g/ml)	0.25 +/- 0.02	0.10 +/- 0.02	0.23 +/- 0.02
pH	5.13 +/- 0.09	7.58 +/- 0.07	6.48 +/- 0.03
Polifenoles (mg/L)	0.27 +/- 0.01	0.03 +/- 0.00	0.17 +/- 0.01
Rebaudiósido A (mg/ml)	1.26 +/- 0.02	0.54 +/- 0.02	0.01 +/- 0.01
Steviósido (mg/ml)	0.54 +/- 0.02	0.19 +/- 0.02	0.11 +/- 0.01
Proteína (g/ml)	0.01 +/- 0.00	0.00 +/- 0.01	0.00 +/- 0.00
Clorofila (mg/L)	0.49 +/- 0.27	0.35 +/- 0.27	0.05 +/- 0.03
Volumen (L)	14	30.1	7
SM2	Alimentación	Permeado	Retenido
Color	2.87 +/- 0.05	0.96 +/- 0.05	3.54 +/- 0.04
Turbidez	0.24 +/- 0.01	0.06 +/- 0.01	0.31 +/- 0.01
STD (g/ml)	0.80 +/- 0.05	0.12 +/- 0.05	0.82 +/- 0.31
pH	7.91 +/- 0.39	7.41 +/- 0.07	7.52 +/- 0.05
Polifenoles (mg/L)	0.94 +/- 0.02	0.31 +/- 0.02	0.72 +/- 0.04
Rebaudiósido A (mg/ml)	1.68 +/- 0.25	0.87 +/- 0.25	0.22 +/- 0.00
Steviósido (mg/ml)	0.67 +/- 0.10	0.44 +/- 0.10	0.09 +/- 0.04
Proteína (g/ml)	0.06 +/- 0.00	0.01 +/- 0.01	0.06 +/- 0.02
Clorofila (mg/L)	0.69 +/- 0.34	0.05 +/- 0.34	1.12 +/- 0.67

5.11. Etapa de concentración con membrana de nanofiltración (NF)

Los extractos diluidos y parcialmente purificados por UF-DF fueron concentrados usando una membrana de nanofiltración de espiral enrollado. Previamente se evaluó

la permeabilidad al agua de esta membrana de NF y se encontró una permeabilidad de 8.38 L/m²hBar (Figura 23). Este valor está en el rango de flux de agua dado por el fabricante de 2.58 a 10.33 L/m²hbar.

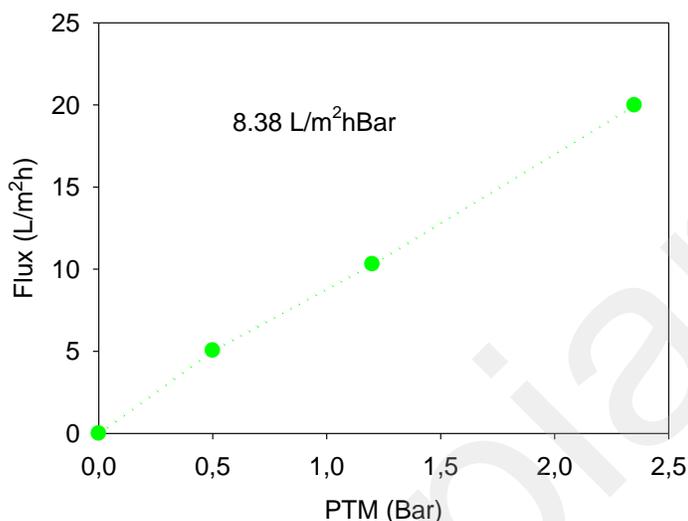


Figura 23. Permeabilidad al agua de la membrana de nanofiltración. Área = 0.38 m². Rechazo promedio al MgSO₄ de 96%.

Para determinar las condiciones de operación se utilizó el protocolo de incrementos-decrementos en la presión de entrada. En el intervalo de presiones evaluadas no se observa un flux crítico (Figura 24).

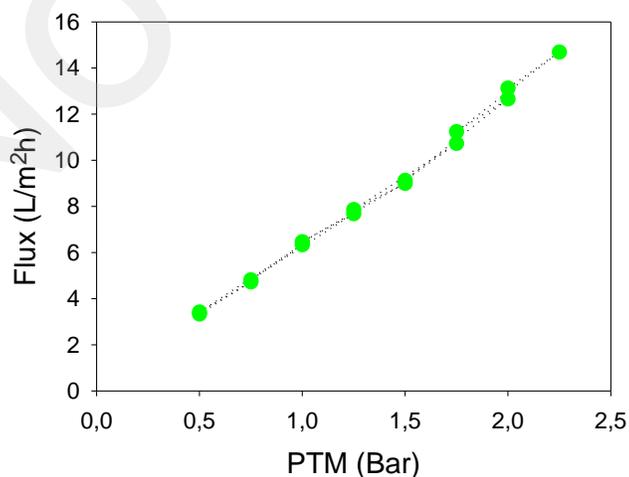


Figura 24. Evaluación de flux crítico utilizando el protocolo de incrementos-decrementos de la presión. Extracto proveniente del lote SM1. Área = 0.38 m². Membrana de NF en espiral (96% de rechazo promedio al MgSO₄).

Se llevo a cabo un experimento para validar que en este rango de presión el proceso opera en flux sostenible. El extracto SM1 fue recirculado usando una presión transmembrana de 1.75 Bar sin utilizar contrapresión. En la Figura 25 se muestra el flux obtenido a través del tiempo del extracto SM1. El pequeño aumento de flux en el tiempo se atribuye a que durante el proceso se presentó un aumento de temperatura del extracto, por lo que se confirma que la temperatura tiene gran influencia en el desempeño de membranas de nanofiltración.

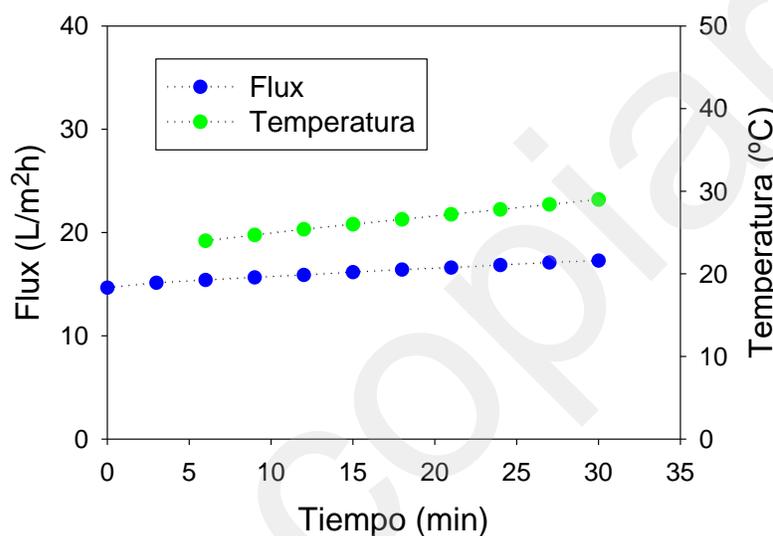


Figura 25. Validación de flux sostenible del lote SM1. PTM= 1.75 Bar. Lote SM1. Área=0.38 m². Rechazo promedio al MgSO₄ de la membrana igual a 96%.

Se realizó nuevamente la validación del flux sostenible controlando la temperatura (Figura 26). En este caso al mantener constante la temperatura se mantiene constante el flux a través del tiempo. Se observa también en la Figura 26 que la temperatura tiene gran influencia en el flux, ya que con el extracto SM1 se obtiene un flux de 11 L/m²h a 26°C, mientras que con el extracto SM2 el flux fue de 9.8 L/m²h a 25°C.

Posteriormente, se llevó a cabo un experimento de concentración, a PTM=1.75 bar sin contrapresión en el permeado, para lo cual se emplearon 30 L de stevia purificada, los cuales se redujeron a 20 L (FC=1.5).

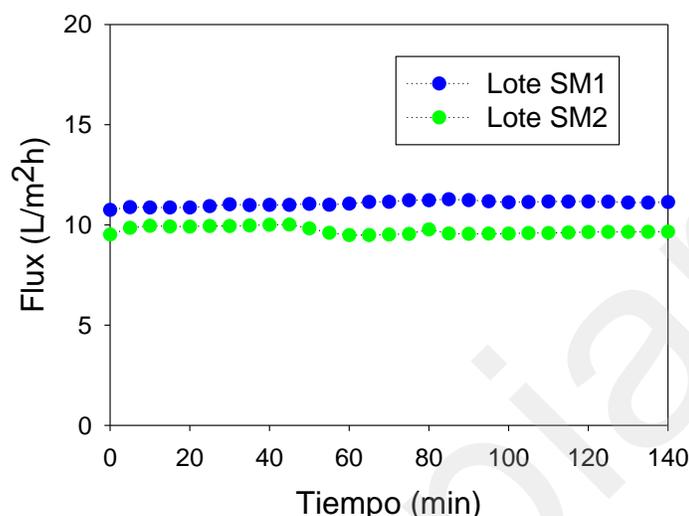


Figura 26. Validación de flux sostenible. Lotes SM1 y SM2. Área = 0.38 m². Rechazo promedio al MgSO₄ de la membrana igual a 96%. Temperatura SM1=26°C y SM2=25°C

En comparación con otros trabajos de nanofiltración los flux encontrados en este trabajo son notablemente superiores. Por ejemplo, Arend *et al.*, (2017) utilizaron una membrana de nanofiltración para concentrar compuestos fenólicos, aplicando una presión transmembrana de 6 Bar, y temperatura de 20°C, obtuvieron valores de iniciales de 3 a 4 L/m²h, sin embargo, después de 1 hora disminuyeron hasta menos de 1 L/m²h. Benedetti *et al.*, (2013) igualmente utilizaron membranas de nanofiltración para concentrar isoflavonas de aceite de soya, aplicando una presión transmembrana de 7 Bar a 16°C, obtuvieron un flux inicial de 25 L/m²h pero a los 5 min de operación disminuyó a 18 L/m²h y después de 40 min cayó a 5 L/m²h.

Finalmente, se evaluaron las características de los extractos obtenidos en esta etapa de concentración (Tabla 14). La membrana logra retener por completo los glucósidos. Además, permite el paso de polifenoles y clorofila, como encontraron Vanneste *et al.*, (2011) y Zhang *et al.*, (2000).

RESULTADOS

En esta etapa el porcentaje de clorofila y polifenoles es muy pequeño debido a la dilución que ya tiene el extracto y no es posible observar una diferencia en la retención de estos compuestos

Tabla 14. Caracterización de los extractos de los lotes SM1 y SM2 en la alimentación, el permeado y el retenido en la etapa de concentración.

Volumen (L)	30	10	20
SM1	Alimentación	Permeado	Retenido
Color	0.00 +/- 0.01	0.00 +/- 0.00	0.00 +/- 0.00
TURBIDEZ	0.00 +/- 0.00	0.00 +/- 0.00	0.00 +/- 0.00
STD (mg/L)	0.10 +/- 0.02	0.01 +/- 0.01	0.09 +/- 0.07
pH	7.58 +/- 0.07	8.01 +/- 0.15	7.90 +/- 0.09
Polifenoles (mg/L)	0.03 +/- 0.00	0.02 +/- 0.00	0.08 +/- 0.01
Rebaudiósido A (mg/ml)	0.54 +/- 0.02	0.00 +/- 0.00	0.94 +/- 0.08
Steviósido (mg/ml)	0.19 +/- 0.02	0.00 +/- 0.00	0.29 +/- 0.01
Proteína (g/ml)	0.00 +/- 0.01	0.00 +/- 0.00	0.00 +/- 0.00
Clorofila (mg/L)	0.35 +/- 0.27	0.05 +/- 0.02	0.40 +/- 0.03
Conductividad (μS/cm)	242 +/- 12	105 +/- 4	370 +/- 18
Volumen (L)	30	10	20
SM2	Alimentación	Permeado	Retenido
Color	0.96 +/- 0.05	0.02 +/- 0.02	1.40 +/- 0.04
TURBIDEZ	0.06 +/- 0.01	0.00 +/- 0.01	0.10 +/- 0.01
STD (mg/L)	0.12 +/- 0.05	0.01 +/- 0.01	0.16 +/- 0.06
pH	7.41 +/- 0.07	7.19 +/- 0.02	7.19 +/- 0.04
Polifenoles (mg/L)	0.31 +/- 0.02	0.02 +/- 0.01	0.39 +/- 0.04
Rebaudiósido A (mg/ml)	0.87 +/- 0.25	0.00 +/- 0.00	1.28 +/- 0.08
Steviósido (mg/ml)	0.44 +/- 0.10	0.00 +/- 0.00	0.68 +/- 0.12
Proteína (g/ml)	0.01 +/- 0.01	0.00 +/- 0.00	0.02 +/- 0.00
Clorofila (mg/L)	0.05 +/- 0.34	0.02 +/- 0.01	0.07 +/- 0.02
Conductividad (μS/cm)	1555.5 +/- 88.5	959.1 +/- 0.4	564.25 +/- 1.85

Los resultados obtenidos permiten afirmar que la nanofiltración es un proceso adecuado para la concentración. Además, teniendo en cuenta que para un factor de concentración de tan solo 1.5 el tiempo empleado fue de más de 2 horas (140 min), se hace necesario una optimización de las condiciones de operación para hacer eficiente el uso de nanofiltración para la concentración.

5.12. Diagrama de proceso para la obtención de glucósidos de stevia

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se planteó un nuevo diagrama de proceso (Figura 27). El cual consiste en una primera etapa de molienda con malla de tamaño grueso. A continuación, se pasa a la fase de extracción utilizando las condiciones de extracción propuestas por Luna-Santander (2016). Este extracto es filtrado y sedimentado durante al menos 12 horas.

Posteriormente, el extracto fue clarificado utilizando una membrana cerámica de microfiltración de 0.2 μm y 8 canales. Se determinó el flux sostenible de cada extracto de stevia a una velocidad de 5.08 m/s con una presión transmembrana de 0.36 Bar, y una contrapresión en el permeado de 0.13 bar. A partir de los datos de flux, coeficiente de rechazo y volumen inicial se construyó el Diagrama Y-t para trabajar en modo diafiltración.

El permeado obtenido en esta etapa, fue purificado con una membrana de ultrafiltración de 3 kDa. El flux sostenible para esta membrana se determinó a una velocidad de 8.21 m/s y PTM de 1.2 Bar sin contrapresión y se construyó el diagrama Y-t para operar en modo diafiltración.

Finalmente, el extracto purificado se concentró con una membrana de nanofiltración de rechazo promedio al MgSO_4 de 96%, la cual se trabajó a una presión transmembrana de 1.75 Bar sin contrapresión y a 25°C.

Con este proceso se alcanza un rendimiento global de aproximadamente 85.5%, es decir, un 44% superior al reportado por Martínez-Alvarado (2015) (RG=41%).

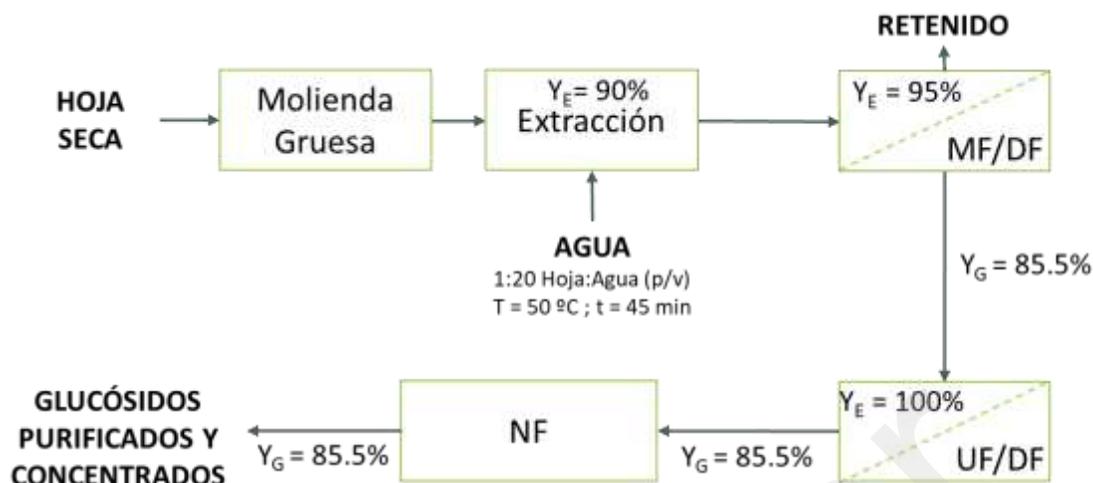


Figura 27. Diagrama de proceso para la obtención de glucósidos de stevia a partir de hoja de stevia.

5.13. Validación del diagrama de proceso para la obtención de glucósidos de stevia

Se validó el nuevo diagrama de proceso con otro extracto de hoja con breña de Mérida (SM3). En la Figura 28 se presentan los valores de flux sostenible encontrados en las etapas de clarificación, purificación y concentración. El flux sostenible encontrado en la etapa de clarificación es cercano a los calculados con los anteriores extractos. Por el contrario, se encontró un valor elevado flux en la ultrafiltración (250 L/m²h), comparado con los encontrados anteriormente (150 y 90 L/m²h). Esto puede deberse a que el extracto ultrafiltrado SM3 tuvo un pH=6.88 y el punto isoeléctrico de la membrana ocurre a un pH de 6.5, por lo que la interacción de los componentes de la alimentación con la membrana es mínima, y puede explicar el mayor valor de flux obtenido. Finalmente, el flux sostenible obtenido en la concentración está en el mismo rango de los valores de flux sostenible obtenido con los extractos anteriores.

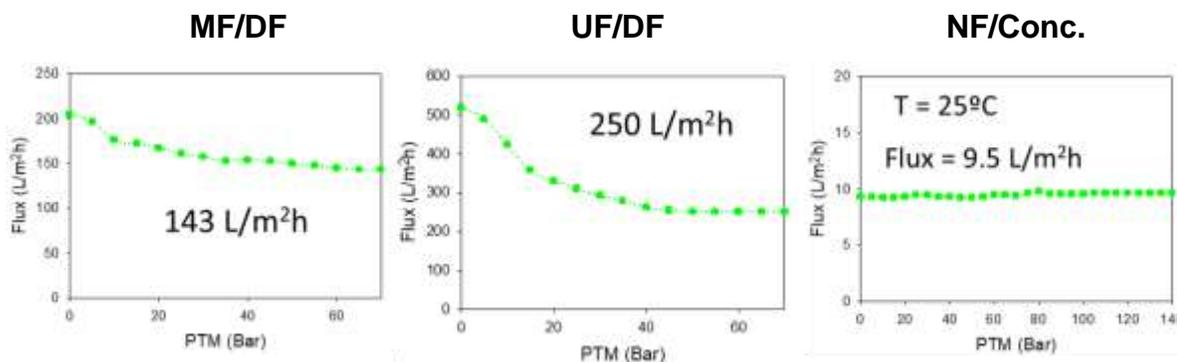


Figura 28. Flux sostenibles determinados para las etapas de clarificación, purificación y concentración, en el procesamiento del lote SM3.

Se construyeron los diagramas Y-t para las etapas de microfiltración y ultrafiltración a partir de los coeficientes de separación encontrados en cada etapa y los respectivos valores de flux. En la Tabla 15 se resumen las condiciones de operación determinadas con los diagramas y los rendimientos encontrados en cada etapa utilizando el extracto SM3. El rendimiento global obtenido fue de 86%, por lo que se puede afirmar que el proceso alcanza el rendimiento teórico calculado (85.5%)

Tabla 15. Condiciones de operación y rendimientos obtenidos en la extracción, clarificación, purificación y concentración del extracto de hoja con breña SM3.

ETAPA	CODICIONES DE OPERACIÓN	RENDIMIENTO
Extracción	T=50°C; 45 min	94
Clarificación	RV=2; ND=3	93
Purificación	RV=2; ND=2.5	98
Concentración	FC=2.13	100
TOTAL		86

En la Tabla 16 se resumen las características fisicoquímicas y visuales del extracto de stevia del lote SM3 a través de las distintas etapas del proceso. Nuevamente se observa que en la etapa de microfiltración se retienen compuestos de mayor tamaño molecular como el color y la turbidez, y en la ultrafiltración se retienen compuestos más pequeños como los polifenoles y clorofila. Globalmente este proceso es capaz de remover los solutos no deseados en el extracto, mejorando el aspecto visual del extracto y sus características organolépticas.

Tabla 16. Caracterización de los extractos del lote SM3 a través de la clarificación, purificación y concentración.

Parámetros	CLARIFICACIÓN - MICROFILTRACIÓN		PURIFICACIÓN - ULTRAFILTRACIÓN		CONCENTRACIÓN - NANOFILTRACIÓN		
	Alimentación	Retenido	Perm(M) - Alim(U)	Retenido	Perm(M) - Alim(U)	Permeado	Retenido
Color	4.47 +/- 0.17	2.51 +/- 0.04	1.56 +/- 0.07	0.43 +/- 0.01	0.61 +/- 0.09	0.00 +/- 0.00	0.71 +/- 0.05
Turbidez	0.72 +/- 0.09	1.00 +/- 0.06	0.05 +/- 0.02	0.10 +/- 0.03	0.03 +/- 0.01	0.00 +/- 0.00	0.05 +/- 0.00
STD (mg/L)	2.08 +/- 0.05	0.18 +/- 0.06	1.05 +/- 0.03	0.15 +/- 0.01	0.57 +/- 0.03	0.05 +/- 0.01	1.07 +/- 0.59
pH	7.88 +/- 0.04	8.54 +/- 0.12	6.88 +/- 0.44	7.78 +/- 0.02	7.12 +/- 0.00	7.58 +/- 0.00	7.58 +/- 0.02
Polifenoles (mg/L)	3.32 +/- 0.13	0.37 +/- 0.02	1.80 +/- 0.23	0.18 +/- 0.05	0.72 +/- 0.04	0.02 +/- 0.00	0.71 +/- 0.14
Rebaudiósido A (mg/ml)	3.41 +/- 0.21	0.09 +/- 0.00	1.59 +/- 0.00	0.07 +/- 0.00	0.81 +/- 0.02	0.00 +/- 0.00	1.72 +/- 0.02
Steviósido (mg/ml)	1.48 +/- 0.03	0.00 +/- 0.00	0.63 +/- 0.04	0.01 +/- 0.01	0.34 +/- 0.03	0.00 +/- 0.00	0.72 +/- 0.03
Proteína	0.25 +/- 0.00	0.07 +/- 0.00	0.15 +/- 0.01	0.00 +/- 0.00	0.02 +/- 0.00	0.00 +/- 0.00	0.05 +/- 0.01
Clorofila (mg/L)	1.12 +/- 0.09	0.71 +/- 0.19	0.82 +/- 0.05	0.09 +/- 0.09	0.18 +/- 0.02	0.07 +/- 0.06	0.36 +/- 0.11
Volumen	14.00	7.00	28.00	14.00	49.00	26.00	23.00



6. CONCLUSIONES

- Se establecieron condiciones de operación para mantener flux sostenible durante la clarificación con membranas de microfiltración de 0.2 μm
- Los diagramas Y-t permiten predecir el número de diavolumenes (ND) necesarios para obtener rendimientos superiores al 90% en la etapa de microfiltración operando en modo diafiltración.
- En la etapa de purificación con membranas de ultrafiltración operada en modo diafiltración los diagramas Y-t predicen un rendimiento inferior al obtenido experimentalmente.
- La nanofiltración (NF) es un proceso adecuado para concentrar los extractos, e incluso es posible reducir el tiempo de operación en el proceso.
- Existe una notable diferencia en las características de los extractos cuando la materia prima tiene breña lo que afecta el desempeño de las membranas, principalmente en la etapa de purificación con membranas de ultrafiltración donde el pH de los extractos afecta el flux sostenible y la retención de los compuestos.
- Las condiciones establecidas en este trabajo permitieron aumentar el rendimiento global del proceso para la purificación y concentración de glucósidos de Stevia de 41% a 85.5%.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Andrés González-Moralejo, Silvia. 2011. "Aproximación a La Comprensión De Un Endulzante Natural Alternativo, La Stevia Rebaudiana Bertoni: Producción, Consumo Y Demanda Potencial." *Agroalimentaria*. 17(32):57–69. Retrieved (http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/33312/1/art4_andresg-m_r32.pdf).
- Arellano Arriaga, Adriana. 2013. "Evaluación Del Proceso de Obtención Y Separación de Suero Lácteo Mediante Tecnología de Membrana."
- Arend, Giordana Demaman et al. 2017. "Concentration of Phenolic Compounds from Strawberry (*Fragaria X Ananassa Duch*) Juice by Nanofiltration Membrane." *Journal of Food Engineering* 201:36–41.
- Beier, Søren Prip and Gunnar Jonsson. 2009. "Critical Flux Determination by Flux-Stepping." *AIChE Journal* 56(7):1739–47. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/aic.12099>).
- Benedetti, Silvia, Elane Schwinden Prudêncio, José Marcos Gontijo Mandarino, Katia Rezzadori, and José Carlos Cunha Petrus. 2013. "Concentration of Soybean Isoflavones by Nanofiltration and the Effects of Thermal Treatments on the Concentrate." *Food Research International* 50(2):625–32.
- Carakostas, M. C., L. L. Curry, A. C. Boileau, and D. J. Brusick. 2008. "Overview: The History, Technical Function and Safety of Rebaudioside A, a Naturally Occurring Steviol Glycoside, for Use in Food and Beverages." *Food and Chemical Toxicology* 46(7 SUPPL.):1–10.
- Chaparro, Luis et al. 2016. "Concentration and Purification of Lycopene from Watermelon Juice by Integrated Micro Filtration-Based Processes." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 37:153–60.
- Chevreaux, E. et al. 2010. "Surface Properties of Ceramic Ultrafiltration TiO₂ Membranes: Effects of Surface Equilibria on Salt Retention." *Desalination* 255(1–3):1–8. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2009.12.007>).
- Chhaya, Sourav Mondal, G. C. Majumdar, and Sirshendu De. 2012. "Clarification of Stevia Extract Using Cross Flow Ultrafiltration and Concentration by Nanofiltration." *Separation and Purification Technology* 89:125–34. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2012.01.016>).
- Cho, Chang-won, Do-youn Lee, and Chan-wa Kim. 2003. "Concentration and

- Purification of Soluble Pectin from Mandarin Peels Using Crossflow Microfiltration System." *Carbohydrate Polymers* 54:21–26.
- Constenla, Diana T. and Jorge E. Lozano. 1997. "Hollow Fibre Ultrafiltration of Apple Juice : Macroscopic Approach." *Academic Press Limited* 378:373–78.
- D'Oliveira Sant'Ana, Luiza, Aurelio Baird Buarque Ferreira, Maria Cristina Affonso Lorenzon, Ricardo Luis Louro Berbara, and Rosane Nora Castro. 2011. "Correlation of Total Phenolic and Flavonoid Contents of Brazilian Honeys with Colour and Antioxidant Capacity." (March 2013):37–41.
- Espinasse, Benjamin, Patrice Bacchin, and Pierre Aimar. 2002. "On an Experimental Method to Measure Critical Flux in ultrafiltration1." *Desalination* 146(October):91–96. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011916402004952>).
- FAO and P. M. Kuznesov. 2007. "Steviol Glycosides. Chemical and Technical Assessment." *Cta-Jecfa* 1:1–8.
- Field, R. W., D. Wu, J. A. Howell, and B. B. Gupta. 1995. "Critical Flux Concept for Microfiltration Fouling." *Journal of Membrane Science* 100:259–72.
- Field, Robert W. and Graeme K. Pearce. 2011. "Critical , Sustainable and Threshold Fluxes for Membrane Filtration with Water Industry Applications." 164:38–44.
- Fikar, M., Z. Kovács, and P. Czermak. 2010. "Dynamic Optimization of Batch Diafiltration Processes." *Journal of Membrane Science* 355(1–2):168–74.
- Foley, Greg and José Garcia. 2000. "Ultrafiltration Flux Theory Based on Viscosity and Osmotic Effects: Application to Diafiltration Optimisation." *Journal of Membrane Science* 176(1):55–61.
- Gajendragadkar, Chinmay N. and Parag R. Gogate. 2016. "Intensified Recovery of Valuable Products from Whey by Use of Ultrasound in Processing Steps - A Review." *Ultrasonics Sonochemistry* 32:102–18.
- González, Cesar, María Soledad Tapia, Elevina Pérez, Manuel Dornier, and Gilles Morel. 2014. "Caracterización de Cultivares de Stevia de Diferentes Procedencias." 26(2):79–88.
- Guizard, Christian. 1999. *TECNICAS MEMBRANARIAS de FILTRACION de LIQUIDOS Microfiltracion – Ultrafiltracion – Nanofiltracion – Osmosis Inversa*. 2nd ed. Mérida-Venezuela.
- Hearn, L. K. and P. P. Subedi. 2009. "Determining Levels of Steviol Glycosides in the Leaves of Stevia Rebaudiana by near Infrared Reflectance Spectroscopy." *Journal of Food Composition and Analysis* 22(2):165–68.

- Jelemenský, Martin, Radoslav Paulen, Miroslav Fikar, and Zoltán Kovács. 2015. "Time-Optimal Operation of Multi-Component Batch Diafiltration." *Computers & Chemical Engineering* 83:131–38. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098135415002100>).
- Julián-ricardo, Dra C.María Caridad and C.Luís Beltrán Ramos-sánchez. 2014. "Optimización Del Proceso de Enriquecimiento Proteico Del Bagazo de Caña de Azúcar Process Optimization of Protein Enrichment of Sugar Cane Bagasse." *Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Camagüey* 98–109.
- Kaushik, Ramakrishnan, Pradeep Narayanan, Vamshi Vasudevan, Geetha Muthukumar, and Usha Antony. 2010. "Nutrient Composition of Cultivated Stevia Leaves and the Influence of Polyphenols and Plant Pigments on Sensory and Antioxidant Properties of Leaf Extracts." *Journal of Food Science and Technology* 47(1):27–33.
- Lemus-Mondaca, Roberto, Antonio Vega-Gálvez, Liliana Zura-Bravo, and Ah Hen Kong. 2012. "Stevia Rebaudiana Bertoni, Source of a High-Potency Natural Sweetener: A Comprehensive Review on the Biochemical, Nutritional and Functional Aspects." *Food Chemistry* 132(3):1121–32. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.140>).
- Lorenzo, Cándida, Jéssica Serrano-Díaz, Miguel Plaza, Carmen Quintanilla, and Gonzalo L. Alonso. 2014. "Fast Methodology of Analysing Major Steviol Glycosides from Stevia Rebaudiana Leaves." *Food Chemistry* 157:518–23.
- Madan, Swati et al. 2010. "Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni - A Review." *Indian Journal of Natural Products and Resources* 1(3):267–86.
- Martínez-Alvarado, Javier Camilo, Beatriz Torrestiana-Sánchez, and María Guadalupe Aguilar-uscanga. 2016. "Food and Bioproducts Processing Isolation of Steviol Glycosides by a Two-Step Membrane Process Operating under Sustainable Flux." *Food and Bioproducts Processing* 1:223–30.
- Moulijn, Jacob A., Andrzej Stankiewicz, Johan Grievink, and Andrzej Górak. 2008. "Process Intensification and Process Systems Engineering: A Friendly Symbiosis." *Computers and Chemical Engineering* 32(1–2):3–11.
- Pal, Parimal, Ramesh Kumar, and Subhamay Banerjee. 2016. "Chemical Engineering and Processing: Process Intensi Fi Cation Manufacture of Gluconic Acid: A Review towards Process Intensi Fi Cation for Green Production." *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification* 104:160–71. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2016.03.009>).
- Paulen, R., G. Foley, M. Fikar, Z. Kovács, and P. Czermak. 2011. "Minimizing the Process Time for Ultrafiltration/diafiltration under Gel Polarization Conditions."

- Journal of Membrane Science* 380(1–2):148–54. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2011.06.044>).
- Paulen, R., M. Jelemenský, Z. Kovács, and M. Fikar. 2012. “Optimal Feeding Strategy of Diafiltration Buffer in Batch Membrane Processes.” *Journal of Process Control* 28:73–82.
- Van Reis, Robert and Skand Saksena. 1997. “Optimization Diagram for Membrane Separations.” *Journal of Membrane Science* 129(1):19–29.
- Rodríguez Pérez, Wilson, Diana Cristina Perdomo Giraldo, Israel Sánchez Ortiz, Gelber Rosas Patiño, and Carmen Dolores Bedoya de Muñoz. 2010. “Caracterización Física, Química Y Sensorial de La Hoja de.” (1):57–65.
- Roy, Anirban and Sirshendu De. 2014. “Extraction of Steviol Glycosides Using Novel Cellulose Acetate Pthalate (CAP) - Polyacrylonitrile Blend Membranes.” *Journal of Food Engineering* 126:7–16. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.035>).
- Sant’Anna, Voltaire, Ligia Damasceno, Ferreira Marczak, and Isabel Cristina Tessaro. 2012. “Membrane Concentration of Liquid Foods by Forward Osmosis : Process and Quality View.” *Journal of Food Engineering* 111:483–89.
- Stoller, Marco, Marco Bravi, and Angelo Chianese. 2013. “Threshold Flux Measurements of a Nano Filtration Membrane Module by Critical Flux Data Conversion.” *Desalination* 315:142–48.
- Valencia, Sergio H., Juan M. Marín, and Gloria M. Restrepo. 2011. “Efecto Del pH En La Degradación Fotocatalítica de Materia Orgánica Natural.” *Informacion Tecnologica* 22(5):57–66.
- Vanneste, J. et al. 2011. “Application of Tailor-Made Membranes in a Multi-Stage Process for the Purification of Sweeteners from Stevia Rebaudiana.” *Journal of Food Engineering* 103(3):285–93. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.026>).
- Venkiteshwaran, Adith and Georges Belfort. 2010. “Process Optimization Diagrams for Membrane Microfiltration.” *Journal of Membrane Science* 357(1–2):105–8. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2010.04.007>).
- Zhang, Shi Qiu, Ashwani Kumar, and Oleh Kutowy. 2000. “Membrane-Based Separation Scheme for Processing Sweeteners from Stevia Leaves.” *Food Research International* 33(7):617–20.