(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 661 539**

(51) Int. CI.:

C07H 1/08 (2006.01)
A21D 2/36 (2006.01)
A23G 1/42 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2010 E 13196410 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2708548**

(54) Título: **Rebaudiósido D de pureza elevada y aplicaciones**

(30) Prioridad:

15.10.2009 US 580233 24.05.2010 US 785501
24.05.2010 US 785504 24.05.2010 US 785506
24.05.2010 US 785507 24.05.2010 US 785508
24.05.2010 US 786392 24.05.2010 US 786402
24.05.2010 US 786413 24.05.2010 US 786416
24.05.2010 US 786427 24.05.2010 US 786430
24.05.2010 US 786419

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

(73) Titular/es:

PURECIRCLE SDN BHD (100.0%)
PT 23419 Lengkuk Teknologi Techpark Enstek
71760 Bandar Enstek, Negeri Sembilan, MY

(72) Inventor/es:

ABELYAN, VARUZHAN;
MARKOSYAN, AVETIK y
ABELYAN, LIDIA

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Rebaudiósido D de pureza elevada y aplicaciones.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a rebaudiósido D a partir de un extracto de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni **y** además a productos edulcorados con un edulcorante de intensidad elevada.

Descripción de la técnica relacionada

Los edulcorantes son ingredientes básicos en el suministro de alimentos. La demanda de bebidas y productos alimenticios saludables y bajos en calorías está provocando un aumento del consumo de edulcorantes; por consiguiente, existe la necesidad de reducir las calorías que aportan dichos edulcorantes. Este objetivo se puede alcanzar mediante la utilización de edulcorantes de alta intensidad.

Los edulcorantes de alta intensidad poseen un grado de dulzura muchas veces superior al de la sacarosa. Son esencialmente acalóricos y se utilizan ampliamente en la fabricación de alimentos de dieta y bajos en calorías. Los edulcorantes calóricos naturales, como la sacarosa, la fructosa y la glucosa, proporcionan un sabor más agradable para los consumidores, pero son calóricos. Los edulcorantes de alta intensidad no alteran el nivel de glucosa en la sangre y proporcionan un valor nutritivo reducido o nulo.

Sin embargo, los edulcorantes de alta intensidad que se utilizan habitualmente como sustitutos de la sacarosa poseen unas características de sabor diferentes de las del azúcar, tales como un sabor dulce con un perfil temporal, una respuesta máxima, un perfil de sabor, una sensación en boca y/o un comportamiento de adaptación distintos a los del azúcar. Por ejemplo, el sabor dulce de algunos edulcorantes de alta intensidad tiene un inicio más lento y una mayor duración que los del azúcar, por lo que alteran el equilibrio de sabor de la composición alimenticia. Debido a estas diferencias, la utilización de edulcorantes de alta intensidad para sustituir un edulcorante de uso tan masivo como el azúcar en un alimento o bebida provoca un desequilibrio en su perfil temporal y/o de sabor. Si el perfil de sabor de los edulcorantes de alta intensidad se pudiera modificar de tal modo que proporcionaran las características de sabor deseadas, se podrían obtener bebidas y productos alimenticios bajos en calorías con características de sabor más agradables para los consumidores.

Por otro lado, los edulcorantes de alta intensidad pueden tener algunas ventajas funcionales y de costes con respecto al azúcar. Existe una dura competencia entre el azúcar y los edulcorantes de alta intensidad que no son azúcar dentro de la industria de los refrescos en aquellos países donde están permitidas su utilización y producción, y también en aquellos donde el azúcar tiene un precio excesivamente elevado.

En la actualidad, los edulcorantes de alta intensidad se utilizan en todo el mundo. Pueden ser de origen sintético o natural.

Entre los ejemplos no limitativos de edulcorantes sintéticos se incluyen sucralosa, acesulfamo potásico, aspartamo, alitamo, sacarina, derivados sintéticos de neohesperidina dihidrochalcona, ciclamato, neotamo, dulcina, suosán, éster 1-metílico de N-[N-[3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)propil]-L-α-aspartil]-L-fenilalanina, éster 1-metílico de N-[N-[3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-3-metilbutil]-L-α-aspartil]-L-fenilalanina, éster 1-metílico de [N-[3-(3-metoxi-4-hidroxifenil)propil]-L-α-aspartil]-L-fenilalanina, sales de los mismos y similares, y combinaciones de los mismos.

Entre los ejemplos no limitativos de edulcorantes naturales de alta intensidad se incluyen el esteviósido, el rebaudiósido A, el rebaudiósido B, el rebaudiósido C, el rebaudiósido E, el rebaudiósido F, el esteviolbiósido, el dulcósido A, el rubusósido, los mogrósidos, la brazzeína, la neohesperidina dihidrochalcona (NHDC), el ácido glicirrícico y sus sales, la taumatina, la perillartina, la pernandulcina, los mucurociósidos, los baiyunósidos, el flomisósido I, el ácido dimetil-hexahidrofluoren-dicarboxílico, los abrusósidos, la periandrina, los carnosiflósidos, los ciclocariósidos, los pterocariósidos, el polipodósido A, la brasilina, la hernandulcina, la filodulcina, la glicifilina, la floricina, la trilobatina, el dihidroflavonol, el 3-acetato de dihidroquercetina, la neoastilibina, el trans-cinamaldehído, la monatina y sus sales, el selligueain A, la hematoxilina, la monelina, la osladina, el pterocariósido A, el pterocariósido B, la mabinlina, la pentadina, la miraculina, la curculina, la neoculina, el ácido clorogénico, la cinarina, el siamenósido y otros.

Los edulcorantes de alta intensidad se pueden obtener mediante la modificación de edulcorantes naturales de alta intensidad, por ejemplo por fermentación, tratamiento enzimático o derivatización.

Actualmente, se utilizan en todo el mundo aproximadamente once edulcorantes de alta intensidad. Son el acesulfamo K, el alitamo, el aspartamo, el ciclamato, la glicirricina, la NHDC, la sacarina, el esteviósido, la sucralosa, la taumatina, el neotamo y el rebaudiósido A.

Los edulcorantes de alta intensidad se pueden agrupar en tres generaciones. La primera generación, representada

por el ciclamato, la glicirricina y la sacarina, tiene una larga tradición de utilización en alimentos. La segunda generación incluye el acesulfamo K, el aspartamo, la NHDC y la taumatina. El alitamo, el neotamo, la sucralosa, el estevió sido y el rebaudiósido A pertenecen a la tercera generación.

En la tabla 1 se indica el poder edulcorante estándar asociado a cada edulcorante de alta intensidad. Sin embargo, cuando se utilizan en mezclas, dicho poder edulcorante puede variar significativamente.

Tabla 1:

Edulcorante	Poder edulcorante
Sacarosa	1
Acesulfamo K	200
Alitamo	2.000
Aspartamo	200
Ciclamato	30
Glicirricina	50
NHDC	1.000
Sacarina	300
Estevió sido	200
Rebaudiósido A	450
Taumatina	3.000
Sucralosa	600

Por otra parte, los alimentos y bebidas “naturales” y “orgánicos” se han convertido en la “zona caliente” de la industria alimentaria. La combinación de los deseos de los consumidores, los avances en las tecnologías de los alimentos y los nuevos estudios que relacionan la dieta con la prevención de enfermedades han generado una oportunidad sin precedentes para enfocar la salud pública a través de la dieta y el estilo de vida.

Un número cada vez mayor de consumidores valora su capacidad de controlar la salud mediante la mejora de su salud actual y/o la protección contra enfermedades futuras. Esto genera una demanda de productos alimenticios con características mejoradas y asociados a beneficios para la salud, y más concretamente marca una tendencia en el mercado de los alimentos y el consumo hacia un estilo de vida con “soluciones integrales en salud”. El término “natural” presenta una gran emotividad en el mundo de los edulcorantes y se ha identificado como un término de confianza clave, junto con “integral”, “saludable para el corazón” y “bajo en sodio”. El término “natural” se relaciona estrechamente con “más saludable”.

En este sentido, los edulcorantes de alta intensidad naturales pueden tener un mayor potencial comercial.

Los azúcares calóricos naturales, tales como la sacarosa, la fructosa y la glucosa, se utilizan profusamente en la industria de las bebidas, los alimentos, los productos dentales y de la higiene/cosmética bucal por su sabor agradable. La sacarosa, en particular, imparte un sabor apetecible para los consumidores. La sacarosa proporciona excelentes características de dulzor, pero es calórica. Si bien las calorías son necesarias para el organismo, en el mercado ha surgido la necesidad de ofrecer edulcorantes alternativos acalóricos o bajos en calorías, con un sabor similar al azúcar, para los consumidores con un estilo de vida sedentario o para aquellos que quieren controlar las calorías que ingieren. Son deseables nuevas formulaciones para bebidas, alimentos y aderezos con un contenido bajo o nulo de azúcar. Sin embargo, en general, los edulcorantes acalóricos o bajos en calorías tienen asociado un sabor desagradable para los consumidores, por ejemplo en forma de dulzor de aparición retardada; de regusto dulce persistente; de sabor amargo; de sabor metálico; de sabor astringente; de sabor refrescante; de sabor a regaliz; y/o similares. Si se pudiera modificar el perfil de sabor de los edulcorantes de alta intensidad naturales y sintéticos para impartirles determinadas características de sabor deseables a fin de que sean más similares al azúcar, el tipo y la variedad de composiciones que se podrían preparar con esos edulcorantes aumentaría significativamente. Por consiguiente, sería deseable modificar selectivamente las características de sabor de los edulcorantes de alta intensidad naturales y sintéticos. También es muy importante que los productos para diabéticos (sin azúcar) o bajos en calorías presenten cuantas menos diferencias mejor con respecto a los productos convencionales.

El desarrollo de nuevas formulaciones, por ejemplo, con edulcorantes, aromatizantes, potenciadores del sabor, incrementadores del volumen y similares, supone un reto a la hora de combatir el sabor amargo y/u otros malos sabores y texturas asociados. Además, estos retos se presentan habitualmente en formulaciones desarrolladas para mejorar sus características y/o perfiles de sabor manteniendo las mismas características de textura. Además, existe la necesidad de nuevas formulaciones que puedan cumplir satisfactoriamente una combinación de objetivos, incluidos objetivos nutricionales, de sabor, de período de conservación y otros.

Un objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer un producto con un sabor y unas características físicas excelentes. Dicho producto comprende por lo menos un edulcorante natural no nutritivo en una cantidad

suficiente para proporcionar una edulcoración perceptible. La composición proporciona un perfil de dulzor más parecido al del azúcar debido a la utilización de un nuevo edulcorante natural de alta intensidad rebaudiósido D.

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es un arbusto perenne de la familia Asteraceae (compositae), autóctono de algunas regiones de Sudamérica. Las hojas de la planta contienen entre un 10% y un 20% de glucósidos de diterpeno, que son aproximadamente entre 150 y 450 veces más dulces que el azúcar. Tradicionalmente, las hojas se han utilizado durante siglos en Paraguay y Brasil para endulzar las infusiones y medicamentos locales.

En la actualidad existen más de 230 especies de *Stevia* con notables propiedades edulcorantes. La planta se ha cultivado con éxito en una amplia variedad de condiciones, desde las subtropicales de su hábitat originario hasta las de las latitudes frías septentrionales.

Los glucósidos de esteviol tienen cero calorías y se pueden utilizar en todos los casos en los que se utiliza el azúcar. Son ideales para dietas para diabéticos y bajas en calorías. Además, los glucósidos de esteviol dulces poseen propiedades funcionales y organolépticas superiores a las de muchos edulcorantes de alta intensidad.

El extracto de *Stevia rebaudiana* contiene una mezcla de diferentes glucósidos de diterpeno dulces, que tienen una sola base, el esteviol, y difieren por la presencia de residuos de hidrato de carbono en las posiciones C13 y C 19. Habitualmente, con respecto al peso de sustancia seca, los cuatro glucósidos principales que se encuentran en las hojas de *Stevia* son el dulcósido A (0,3%), el rebaudiósido C (0,6%), el rebaudiósido A (3,8%) y el estevióside (9,1%). Otros glucósidos que se han identificado en el extracto de *Stevia* incluyen los rebaudiósidos B, C, D, E y F, el esteviolbiósido y el rubusósido (figura 1). Entre los glucósidos de esteviol, únicamente el estevióside y el rebaudiósido A se encuentran comercializados.

En la figura 2 se muestra la estructura química de los glucósidos de diterpeno de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Las propiedades físicas y organolépticas sólo se han estudiado bien para el estevióside y el rebaudiósido A. El poder edulcorante del estevióside es aproximadamente 210 veces mayor que el de la sacarosa, el del rebaudiósido A entre 200 y 400 veces mayor, y el del rebaudiósido C y el dulcósido A es aproximadamente 30 veces mayor. Se considera que el rebaudiósido A es, de entre los cuatro principales glucósidos de esteviol, el que tiene las mejores características organolépticas (tabla 2).

Los glucósidos de las hojas se pueden extraer por extracción con agua o con un disolvente orgánico. También se han descrito la extracción con fluidos supercríticos y la destilación por arrastre con vapor. También se han descrito métodos para la recuperación de los glucósidos dulces de diterpeno de la *Stevia rebaudiana* mediante tecnología de membrana y agua o disolventes orgánicos, tales como metanol o etanol.

Tabla 2

Nombre	Fórmula	$T_{fusión}$, ºC	Peso molecular	Rotación óptica $[\alpha]^{25}_{D}$ (H_2O, 1%, p/v)	Solubilidad en agua, %	Dulzor relativo	Tipo de sabor
Esteviol	$C_{20}H_{30}O_3$	212-213	318,45	ND	ND	ND	Muy amargo
Esteviolmonósido	$C_{26}H_{40}O_8$	ND	480,58	ND	ND	ND	ND
Estevióside	$C_{38}H_{60}O_{18}$	196-198	804,88	-39,3	0,13	210	Amargo
Rebaudiósido A	$C_{44}H_{70}O_{23}$	242-244	967,01	-20,8	0,80	200-400	Menos amargo
Rebaudiósido B	$C_{38}H_{60}O_{18}$	193-195	804,88	-45,4	0,10	150	Amargo
Rebaudiósido C	$C_{44}H_{70}O_{22}$	215-217	951,01	-29,9	0,21	30	Amargo
Rebaudiósido D	$C_{50}H_{80}O_{28}$	248-249	1129,15	-29,5 (etanol)	1,00	220	Parecido a la sacarosa
Rebaudiósido E	$C_{44}H_{70}O_{23}$	205-207	967,01	-34,2	1,70	170	Parecido a la sacarosa
Rebaudiósido F	$C_{43}H_{68}O_{22}$	ND	936,99	-25,5 (metanol)	ND		
Dulcósido A	$C_{38}H_{60}O_{17}$	193-195	788,87	-50,2	0,58	30	Muy amargo
Esteviolbiósido	$C_{32}H_{50}O_{13}$	188-192	642,73	-34,5	0,03	90	Desagradable
Rubusósido	$C_{32}H_{50}O_{13}$	ND	642,73	642,73	ND	110	Muy amargo

ES 2 661 539 T3

Existen varias publicaciones sobre la purificación de algunos glucósidos de esteviol individuales.

Generalmente, la producción de extracto incluye la extracción de material vegetal con agua o una mezcla de agua y disolvente orgánico, la precipitación de sustancias con un peso molecular elevado, la desionización y decoloración, la purificación en adsorbentes poliméricos macroporosos específicos, la concentración y el secado.

La patente US nº 3.723.410 da a conocer una extracción de esteviósidos de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. El método incluía el desgrasado de las hojas de *Stevia* mediante tratamiento con cloroformo durante más de 150 horas a temperatura de ebullición y el tratamiento por triplicado con dioxano en presencia de carbonato de calcio durante dos horas a la temperatura de ebullición. Tras la filtración, los filtrados de dioxano se combinaron y concentraron hasta el estado de jarabe a presión reducida y a 50ºC. A continuación se añadió un volumen idéntico de metanol al jarabe y la solución resultante se reservó hasta el día siguiente para permitir que tuviera lugar la cristalización. Los cristales se recogieron por filtración y se lavaron a fondo con metanol enfriado en hielo. La solución residual se concentró, se añadió un volumen idéntico de metanol y la mezcla se reservó hasta el día siguiente para que cristalizara. Los cristales se extrajeron por filtración y se secaron al vacío a 100ºC. El rendimiento de esteviósido fue del 6,5% a partir de las hojas secadas al aire. El método es muy complejo y utiliza disolventes orgánicos tóxicos. No existe información acerca de la pureza del esteviósido, aunque, en las condiciones descritas, junto con el esteviósido precipitan también rebaudiósidos. Este procedimiento es difícil de aplicar a escala comercial.

En la patente US nº 4.082.858 se da a conocer un método para la producción de extracto de *Stevia* con un aislamiento adicional del rebaudiósido A. Las hojas de *Stevia* secadas al aire se extrajeron con agua caliente y el extracto se secó al vacío. La mezcla resultante se extrajo con metanol y, en los extractos combinados, se eliminó el metanol por destilación a presión reducida. El jarabe obtenido se sometió a separación cromatográfica en una columna de gel de sílice, utilizando una mezcla de n-propanol, agua y acetato de etilo como fase móvil. El método resulta útil sólo a escala de laboratorio y presenta diversas desventajas a escala comercial.

La patente US nº 4.171.430 da a conocer una purificación del esteviósido a partir de un extracto de *Stevia*. El método incluía la extracción de las hojas de *Stevia* con agua, la concentración de la solución y su extracción con metanol. El esteviósido se cristalizó en una solución de metanol y se purificó en gel de tipo estireno con tetrahidrofurano como fase móvil. El método resulta útil sólo a escala de laboratorio. Este procedimiento es difícil de aplicar a escala comercial.

La patente US nº 4.361.697 da a conocer una extracción, separación y recuperación de glucósidos de diterpeno a partir de *Stevia rebaudiana*. El procedimiento incluía las etapas de extracción secuencial del material vegetal, en primer lugar, con un disolvente de polaridad intermedia (tal como el cloroformo), y a continuación con un segundo disolvente de polaridad elevada (tal como el metanol). El extracto resultante se sometió a separación por cromatografía líquida. Los glucósidos de esteviol estaban presentes en la fracción de metanol. Los principales inconvenientes eran la utilización de diversos disolventes tóxicos para extraer y procesar los glucósidos dulces. La purificación final de los glucósidos se alcanzó por cromatografía en columna utilizando sorbentes, como gel de sílice, como fase estacionaria y eluyendo la columna con dos disolventes que se hicieron pasar consecutivamente a través de la misma. Este procedimiento no es respetuoso con el medio ambiente y resulta difícil de llevar a cabo a gran escala.

En la patente US nº 4.599.403 se da a conocer un método mejorado para la recuperación de glucósidos de esteviol a partir de *Stevia rebaudiana* Bertoni, que no requiere la utilización de equipos especiales de separación, tales como columnas de intercambio iónico y/o cromatográficas. La extracción se llevó a cabo con agua. El extracto acuoso resultante se trató con ácido cítrico a fin de eliminar impurezas metálicas y de otro tipo, así como para reducir el pH a aproximadamente 3,0. La mezcla se filtró a través de celite y el pH del filtrado se ajustó a 10,5 con óxido de calcio. El precipitado que se formó se extrajo por filtración. El filtrado se concentró y se extrajo con n-butanol. A continuación se recuperaron los cristales purificados de esteviósido por enfriamiento de la capa acuosa obtenida en la etapa de extracción con disolvente. Los principales inconvenientes de este método son las pérdidas de glucósidos que se producen durante la extracción con n-butanol y el bajo rendimiento de cristales de esteviósido en la solución acuosa. El contenido salino en el producto final puede ser elevado. No existen datos sobre la pureza final del esteviósido. Este procedimiento es difícil de aplicar a escala comercial.

La patente US nº 4.892.938 y el documento JP 01-131191 dan a conocer un procedimiento de purificación en el que el extracto de la planta se obtuvo mediante el tratamiento en agua a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y aproximadamente 65ºC con agitación, seguido de filtración y centrifugación. Este extracto se trató con hidróxido de calcio y el precipitado se extrajo por filtración o centrifugación. El filtrado se trató con una resina de intercambio iónico de ácido fuerte y a continuación con una resina de intercambio iónico de base débil. Los glucósidos dulces permanecieron en el agua y se recuperaron por evaporación de la misma. La desventaja es que el producto final tiene una pureza bastante baja. El contenido de glucósidos dulces en el producto final fue de sólo el 70%.

La patente US nº 5.112.610 da a conocer un procedimiento de preparación de un edulcorante natural a base de *Stevia rebaudiana*. El método incluye la extracción del material vegetal de *Stevia rebaudiana* con un disolvente

orgánico y la extracción con gas supercrítico (CO_2) de la solución a fin de obtener un residuo sin componentes no deseados ni que afecten al sabor. En términos generales, el método se centra en la eliminación de las hojas o el extracto de *Stevia* de las ceras cuticulares, la clorofila y otros pigmentos, y sobre todo de los componentes que alteran el sabor. Sin embargo, el tratamiento directo de las hojas requiere una gran cantidad de material de partida, por lo que la utilización de las mismas no resultó económica ni siquiera aumentando la densidad aparente de las hojas secas o trituradas mediante su compresión en gránulos antes de la extracción. El tratamiento del extracto en polvo, que se obtuvo a partir de las hojas por el método convencional, permitió la eliminación de los componentes que afectan al sabor sólo en un pequeño grado, y, si no se utilizaban agentes de arrastre (alcoholes de peso molecular bajo, un hidrocarburo adecuado o una mezcla de disolventes), no se alcanzaban resultados plenamente satisfactorios. Por otra parte, no existen datos cuantificados sobre la pureza real del extracto. Este procedimiento es difícil de aplicar a escala comercial.

La patente US nº 5.962.678 da a conocer un procedimiento de extracción y purificación en diversas etapas de rebaudiósido A a partir de *Stevia rebaudiana*. El extracto de la planta se obtuvo mediante el tratamiento en agua a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y aproximadamente 65ºC con agitación, seguido de filtración y centrifugación. Este extracto se trató con hidróxido de calcio y el precipitado se extrajo por filtración o centrifugación. El filtrado se trató con una resina de intercambio iónico de ácido fuerte y a continuación con una resina de intercambio iónico de base débil. Los glucósidos dulces permanecieron en el agua y se recuperaron por evaporación de la misma. El contenido de glucósidos de esteviol en el extracto en esta etapa era sólo del 70%. Para una purificación adicional, el producto se hizo pasar a través de una columna con resina Amberlite XAD-7, que fue capaz de adsorber los glucósidos de esteviol. Tras el lavado con agua, los glucósidos se desorbieron con metanol. La pureza del extracto fue aproximadamente del 95%, con presencia de una cantidad significativa del llamado aceite amarillo. Para aislar el estevióside y el rebaudiósido A individuales, el sólido seco se sometió a reflujo en una solución de metanol anhidro y a continuación se enfrió para que precipitara el estevióside con un 91,6% de pureza. Sin embargo, el rendimiento de estevióside fue sólo del 15% a partir del extracto de *Stevia*, que contiene un 60% de estevióside. El estevióside se puede purificar adicionalmente sometiéndolo a reflujo en una solución de metanol y agua. La pureza del producto fue aproximadamente del 99%.

En la patente US nº 5.972.120 se da a conocer el hecho de que se puede obtener un producto más purificado mediante la utilización combinada de microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración. La extracción se llevó a cabo de forma ininterrumpida en columnas de flujo continuo. El tamaño medio de partícula óptimo de las hojas tenía que ser de unos 20 mm. Con partículas más pequeñas, la velocidad de filtración disminuía significativamente por culpa del bloqueo de la columna. Inicialmente, se añadió agua en una cantidad de 0,05 partes por parte (en peso) de hojas secas. La temperatura de la columna se ajustó a no más de 4ºC, y la extracción se llevó a cabo con agua a un pH comprendido entre 2,0 y 4,0 (ajustado con ácido fosfórico). A una temperatura y un pH bajos, tuvo lugar una extracción más selectiva y se obtuvo una solución casi incolora. A continuación, el extracto se filtró a través de membranas tubulares de cerámica y posteriormente a través de membranas de ultrafiltración. El filtrado obtenido se separó de las impurezas de peso molecular bajo mediante nanomembranas a temperatura elevada.

En las patentes US nº 6.031.157 y nº 6.080.561 se da a conocer un método de preparación de extracto de *Stevia*. Las hojas secas se extrajeron varias veces con entre 10 y 20 partes de agua. Los extractos resultantes se combinaron y se hicieron pasar lentamente a través de una columna rellena con una resina de intercambio catiónico, y a continuación a través de una columna rellena de resina de intercambio aniónico. A continuación, la solución tratada se hizo pasar a través de una columna rellena con una resina (Amberlite XAD-2) a fin de que se adsorbieran los componentes edulcorantes, y seguidamente se lavó con agua. Tras evacuar el agua de la columna, ésta se eluyó con tres volúmenes de metanol para aislar los componentes edulcorantes. El efluente se concentró y se secó adicionalmente a presión reducida a fin de obtener un polvo de color amarillo pálido. El principal inconveniente de este método es la baja calidad del extracto. El tratamiento únicamente con intercambiadores iónicos y adsorbentes específicos no puede dar lugar a un extracto de *Stevia* de alta calidad, de color blanco y con un alto contenido de glucósidos de esteviol.

La solicitud de patente publicada US nº 2006/0142555 da a conocer un procedimiento para la producción de esteviósidos a partir de *Stevia rebaudiana*. El método incluye la extracción del polvo de la planta por inyección directa de vapor en el extractor, seguida de una filtración para obtener el extracto acuoso y un tratamiento con hidróxido de calcio para eliminar las impurezas en forma de precipitado. El filtrado se trató con una resina de intercambio catiónico fuerte y, a continuación, con una resina de intercambio aniónico de base débil. El eluido acuoso que contenía esteviósidos se concentró a fin de obtener esteviósidos purificados con un 45,47-65,5% de contenido de esteviósidos en el producto final. El método que se da a conocer es adecuado para la producción de extracto de *Stevia* con contenidos diversos de estevióside, pero no para la obtención de glucósidos de esteviol muy purificados.

La publicación de solicitud de patente US nº 2006/0083838 da a conocer un método de aislamiento y purificación de rebaudiósido A a partir de *Stevia rebaudiana* disponible en el mercado como material de partida. Dicho método comprende: (1) una etapa de formulación de EtOH para formular un disolvente de EtOH seleccionado, (2) una primera etapa de reflujo del material de partida de *Stevia* y, opcionalmente, etapas de reflujo adicionales utilizando el retenido aislado a partir de una mezcla sometida a reflujo o una mezcla de lavado con agitación, (3)

opcionalmente, una o más etapas de lavado con agitación, y (4) una etapa de purga de etanol y de secado. En las formas de realización que utilizaban un material de partida de *Stevia* de menor calidad, habitualmente se añadió una segunda etapa de reflujo antes de la etapa de lavado con agitación a fin de maximizar la pureza del producto final de rebaudiósido A. En el método descrito, se llevó a cabo una etapa de formulación de EtOH con el fin de formular un disolvente de reflujo adecuado para su utilización en la etapa o etapas de reflujo. Habitualmente, el disolvente de reflujo era una mezcla de etanol y agua con entre aproximadamente un 5% y un 15% en volumen de agua. El procedimiento incluía además una o más etapas de reflujo de alto consumo energético que generalmente se llevaban a cabo a una temperatura comprendida aproximadamente entre 89ºC y 90ºC durante aproximadamente 1 hora. Según se afirma, el método produjo rebaudiósido A soluble en agua 100% puro.

La solicitud de patente US nº 2006/0134292 da a conocer un procedimiento para la recuperación de glucósidos dulces de material vegetal de *Stevia rebaudiana*. Las hojas secas y pulverizadas se trataron con agua en presencia de pectinasa, celulasa y alfa-amilasa. Se afirma que la utilización de dichas enzimas aumenta considerablemente el índice de extracción y facilita las siguientes etapas de purificación. El extracto resultante se purificó mediante tratamiento con hidróxido de calcio y ultrafiltración. El permeado se hizo pasar a través de la columna rellena con bentonita y se concentró al vacío hasta el estado de jarabe. El tratamiento con etanol permitió la separación del rebaudiósido A prácticamente puro de la mezcla. El rebaudiósido A de pureza elevada se obtuvo tras lavar los cristales con etanol al 88-95%.

La solicitud de patente US nº 2007/0082103 da a conocer un procedimiento para preparar extracto de *Stevia* y obtener esteviósido y rebaudiósido A altamente purificados. Las hojas secas y pulverizadas se sometieron a extracción con agua y el extracto resultante se purificó mediante tratamiento con una base, como el hidróxido de calcio, seguida de cloruro de hierro. El filtrado se desionizó con resinas de intercambio iónico, se concentró al vacío y se secó por pulverización. Se obtuvieron rebaudiósido A y esteviósido de pureza elevada disolviendo el extracto en metanol a fin de precipitar el esteviósido. La solución restante tras el aislamiento del esteviósido se secó y el rebaudiósido A se aisló mediante tratamiento con etanol. La purificación final del rebaudiósido A se llevó a cabo mediante tratamiento con solución de etanol y agua. La pureza fue de por lo menos 98%.

La solicitud de patente publicada US nº 20070292582 da a conocer una purificación del rebaudiósido A. El método comprendía las etapas de combinación del rebaudiósido A crudo y un disolvente orgánico acuoso para formar una solución de rebaudiósido A, comprendiendo dicha solución acuosa orgánica agua en una cantidad comprendida aproximadamente entre el 10% y aproximadamente el 25% en peso, y la cristalización a partir del rebaudiósido A crudo, en una sola etapa, obteniéndose rebaudiósido A sustancialmente puro con una pureza superior al 95%. Cuando se utilizó una mezcla de metanol, etanol y agua, el rendimiento de rebaudiósido A con una pureza mayor del 97% fue del 32,5% a partir del material de partida, que contenía un 77,4% de rebaudiósido A. El rendimiento a partir de material de partida con un 80,37% de rebaudiósido A estaba comprendido entre el 54,6% y el 72,0%. Otros codisolventes utilizados junto con el etanol, tales como el acetato de etilo, el 1-butanol, el 2-butanol, el terc-butanol, el sec-butanol, el acetonitrilo, el isopropanol y el 1-propanol no eran adecuados para la producción de rebaudiósido A con una pureza mayor del 97%. Cuando se utilizó etanol con diversas cantidades de agua como disolvente de cristalización, el rendimiento de rebaudiósido A resultó comprendido dentro del intervalo 39,6%-76,4% a partir de material de partida con un 80,37% de rebaudiósido A. El procedimiento utilizaba una mezcla de dos disolventes orgánicos, cuya recuperación y purificación a gran escala resultaba muy compleja. Por otra parte, a escala comercial, si la centrifugación tiene una duración relativamente larga, se puede producir la coprecipitación de esteviósido, rebaudiósido C y rebaudiósido D.

La solicitud de patente US nº 2008/0300402 y la patente china 101200480 dan a conocer un método para producir rebaudiósido A purificado que comprende las siguientes etapas: separación del rebaudiósido A en columna cromatográfica rellena con gel de sílice utilizando una mezcla de acetato de etilo, etanol y agua como fase móvil. Las fracciones de rebaudiósido A se combinaron y se secaron. El sólido se trató con etanol con entre el 2% y el 10% de agua, y el rebaudiósido A se cristalizó enfriando la mezcla a -20ºC. La pureza del rebaudiósido A puede superar el 99%. Para la purificación del rebaudiósido A, el filtrado obtenido tras la separación del esteviósido se concentró y se enfrió a 0ºC hasta el día siguiente durante aproximadamente 16 horas. El precipitado resultante de rebaudiósido A se filtró, se lavó con un pequeño volumen de metanol frío y se secó para obtener rebaudiósido A con un 79,0% de pureza y un 3,3% de rendimiento con respecto al extracto inicial. Este rebaudiósido A crudo se purificó adicionalmente por reflujo en metanol anhidro o mezcla de metanol y agua. A partir del material de partida, que contenía un 90,2% de rebaudiósido A, el rendimiento del producto fue aproximadamente del 67% con un 98,6% de pureza. Sin embargo, el método de mejora de la pureza del rebaudiósido A del 79% al 90,2% no está disponible. El principal inconveniente del procedimiento es el bajo rendimiento de los productos finales, que hace que el procedimiento no sea adecuado para la producción a escala comercial de esteviósido y rebaudiósido A de pureza elevada.

Diversas patentes japonesas se centran también en la preparación de extracto de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

La patente JP 52-100500 describe la purificación y concentración de extracto de esteviósido acuoso por tratamiento del extracto con una resina de intercambio iónico específica con una elevada capacidad decolorante, seguido del tratamiento con un adsorbente específico de tipo Amberlite XAD. El tratamiento únicamente con intercambiadores

de iones y adsorción/desorción no es capaz de proporcionar un extracto de alta calidad.

La patente JP 52-136200 da a conocer la preparación de una solución de esteviósido por extracción con agua caliente o alcohol hidratado, seguida de separación por membrana. El peso molecular de los glucósidos dulces y el de las esterebinas son muy parecidos, y los sistemas de membrana no pueden dar una resolución satisfactoria de estos compuestos, lo que afecta a la pureza del extracto. El contenido salino en el producto final es elevado.

La patente JP 52-005800 da a conocer un método de preparación de esteviósido purificado a partir de hojas de *Stevia rebaudiana* por extracción y tratamiento con una resina de intercambio catiónico. Dicho tratamiento produce un polvo amarillo, aparentemente con un contenido bajo de glucósidos dulces.

La patente japonesa JP54030199 da a conocer un procedimiento para la preparación de un agente edulcorante de *Stevia* sin su olor y sabor amargo característicos mediante la extracción de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni con agua, el tratamiento del extracto con una resina adsorbente sintética apolar, seguido de desorción, y el tratamiento adicional con una resina de intercambio iónico. Dicho procedimiento es muy similar a la tecnología tradicional china, que permite la producción de extracto de *Stevia* con un contenido de glucósidos de esteviol no superior a 85-86%.

La patente JP 54-132599 da a conocer una separación y purificación de esteviósido mediante la extracción de las hojas de *Stevia* con agua caliente, el tratamiento del extracto con un adsorbente sintético apolar, el lavado de la resina con una solución acuosa de cal apagada y la elución del esteviósido de la resina con un disolvente orgánico hidrófilo o un disolvente orgánico hidrófilo hidratado. El tratamiento únicamente con un adsorbente sintético apolar no es capaz de proporcionar un extracto de alta calidad; no se toma ninguna medida para evitar las sales residuales y la coloración del producto.

La patente JP 55-159770 da a conocer una extracción y purificación de esteviósido mediante la extracción de las hojas de *Stevia* con agua o alcohol hidratado. El extracto se concentró hasta un contenido de sólidos comprendido entre el 10% y el 50% y se añadió un 0,1-5,0% de cloruro de calcio para coagular y precipitar las impurezas coloidales presentes en el extracto. La mayor parte de las impurezas no se pueden eliminar a partir de la solución concentrada utilizando $CaCl_2$. No existe ninguna etapa de desalinización ni de decoloración.

La patente JP 55-162953 se refiere a la preparación de esteviósido mediante la extracción de hojas de *Stevia* con 10-15 volúmenes de agua a 60-80ºC. El extracto se trató con cal apagada con aireación, y el pH de la suspensión se ajustó aproximadamente a 8,0 mediante la adición de ácido sulfúrico o ácido cítrico. La sal ligeramente soluble resultante se separó por filtración y el filtrado se puso en contacto con una resina de poliamida para eliminar las impurezas. El filtrado se extrajo adicionalmente con n-butanol y la fase orgánica se destiló al vacío para recuperar el esteviósido en forma de cristales blancos. El contenido salino de dicho producto es alto. El procedimiento de purificación mediante la extracción de n-butanol es difícil de aplicar a escala comercial.

La patente JP 55-081567 describe la extracción y purificación de esteviósido. El extracto de hojas de *Stevia* preparado por extracción con agua o alcohol hidratado se concentró, y se añadieron al concentrado uno o más tipos de sales solubles en agua de Ca, Fe y Al, y un disolvente orgánico soluble en agua, por ejemplo etanol o acetona. El líquido resultante, con un pH de 3 a 7, se hizo pasar a través de una resina de intercambio catiónico fuerte y una resina de intercambio aniónico débil. La solución que se obtuvo se hizo pasar a través del adsorbente específico. Se combinaron las fracciones de esteviósido. Este procedimiento es parecido a los de la tecnología tradicional china, que puede proporcionar un polvo amarillo con un contenido de glucósidos de esteviol únicamente del 85-86%.

La patente JP 55-120770 se refiere a la purificación de una solución de esteviósido. Se extrajeron hojas y tallos de *Stevia rebaudiana* Bertoni con agua o una solución alcohólica, en la que se incorporó y se disolvió una sal de estaño soluble en agua, por ejemplo, cloruro de estaño (II), sulfato de estaño (II), sulfato de estaño (IV), etc. Se añadió a la solución resultante una sustancia alcalina, por ejemplo, hidróxido de sodio o cal, a fin de ajustar el valor de pH a aproximadamente 5-10. El precipitado que se formó se separó. Este procedimiento no es capaz de proporcionar un extracto sin sales ni otras impurezas de peso molecular bajo.

La patente JP 55-138372 describe la purificación de una solución de esteviósido. El esteviósido se extrajo de las hojas y tallos de *Stevia rebaudiana* con agua, agua caliente o un alcohol hidratado, y el extracto o su concentrado se mezcló con cal apagada o lechada de cal. A continuación, la mezcla se filtró y se mezcló con una cantidad equimolar de compuesto de hierro soluble en agua, por ejemplo sulfato ferroso, y se agitó para precipitar los iones de hierro en forma de hidróxido muy poco soluble, que se eliminó junto con las sustancias colorantes adsorbidas sobre él. Este procedimiento no es capaz de proporcionar un extracto sin sales ni otras impurezas de peso molecular bajo.

La patente JP 55-039731 se refiere a la extracción de esteviósido. Se extrajo 1 kg de hojas secas de *Stevia rebaudiana* con entre 3 y 10 volúmenes de agua o alcohol hidratado. El extracto se concentró hasta un contenido de sólidos del 10-50% y se añadió un 0,1-5% de un cloruro metálico, por ejemplo cloruro de calcio, aluminio o hierro. El precipitado de impurezas se eliminó por filtración. Se pueden llevar a cabo, además, procedimientos de purificación

posteriores con resinas de intercambio iónico, adsorbente y membranas de ultrafiltración. La mayor parte de las impurezas no se pueden eliminar a partir de la solución concentrada utilizando sales. El contenido de impurezas de peso molecular bajo puede ser alto.

El documento JP 56-160962 describe la purificación de una solución que contiene esteviósido mediante la extracción de hojas de *Stevia* con agua, la concentración del extracto obtenido hasta un contenido de sólidos del 25-50%, el mezclado del concentrado con un alcohol alifático de peso molecular bajo y la eliminación de las impurezas precipitadas de la mezcla. La cantidad de alcohol fue por lo menos 5 veces el volumen de extracto acuoso, o de 3 a 6 veces el volumen del concentrado. Este tratamiento no es adecuado para eliminar las impurezas de peso molecular bajo. No se lleva a cabo ninguna etapa de decoloración. Este procedimiento es difícil de aplicar a escala comercial.

La patente JP 56-109568 da a conocer una purificación de sustancias edulcorantes de *Stevia* por extracción de hojas de *Stevia* con agua o un disolvente orgánico hidrófilo. El extracto se trató con un disolvente orgánico seleccionado dentro del grupo formado por éteres 4-8C, ésteres 4-7C y compuestos orgánicos 1-4C clorados, y se separó el ingrediente soluble en el disolvente. Como disolvente de purificación, se pueden mencionar el éter dietílico, el éter diisopropílico, el acetato de etilo, el cloruro de metilo, el tetracloruro de carbono, etc. El sabor amargo se puede eliminar eficazmente con una decoloración simultánea. Sin embargo, los peligrosos disolventes que se utilizan pueden permanecer en el producto final. Este procedimiento es difícil de aplicar a escala comercial.

La patente JP 56-099768 se refiere a la preparación de glucósidos de esteviol. Una solución que contenía glucósidos de esteviol, por ejemplo un extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni, se trató con aluminato y silicato de magnesio para adsorber impurezas, por ejemplo, pigmentos o proteínas. Sin embargo, el contenido salino en el producto final es elevado. No se lleva a cabo ninguna etapa de decoloración ni de purificación adicional. El contenido de glucósidos de esteviol en el producto final puede ser bajo.

La patente JP 57-002656 se refiere a la decoloración y purificación de extracto de *Stevia*. Se trató extracto de *Stevia* con una solución acuosa de un compuesto de bario fácilmente soluble en agua, y se neutralizó con ácido sulfúrico. Se añadió hidróxido de bario hasta alcanzar un pH de 7-9 y la suspensión se volvió a tratar con ácido sulfúrico hasta un pH de 3-4. El precipitado se separó. Los principales inconvenientes son que el contenido salino del producto final puede ser alto, que no se lleva a cabo ninguna etapa de decoloración ni de purificación adicional y, en consecuencia, que el contenido de glucósidos de esteviol en el producto final puede ser bajo.

La patente JP 57-005663 se refiere a la purificación de esteviósido por extracción. Una solución extraída de hojas de *Stevia* con agua o alcohol que contenía agua se concentró hasta un 10-50% de contenido de sólidos. Se añadió una sal o una base de calcio, hierro o aluminio y el precipitado se eliminó por filtración. El pH del filtrado se ajustó a 5-7, y se separó el precipitado que se formó. El filtrado se trató con resinas de intercambio catiónico y de intercambio aniónico y se evaporó a sequedad. El principal inconveniente de este método es la baja calidad del extracto. El tratamiento con una base e intercambiadores de iones por sí solo no es suficiente para producir el extracto de *Stevia* con color blanco y un contenido elevado de glucósidos de esteviol.

La patente JP 57-046998 se refiere a la preparación de esteviósido. Se extrajeron hojas crudas de *Stevia rebaudiana* con 10-20 volúmenes de agua y el filtrado se trató con hidróxido de calcio en una cantidad correspondiente al 10-30% del peso de las hojas crudas. El pH de la suspensión se ajustó a 4-6 con ácido sulfúrico o ácido cítrico. Tras la filtración, el extracto se hizo pasar a través de una columna de poliamida para absorber los glucósidos y eliminar las impurezas. A continuación, el extracto purificado se concentró a presión reducida, se ajustó su pH a 8-9 con amoniaco acuoso y se extrajo con n-butanol, obteniéndose esteviósido crudo, que luego se recristalizó en metanol. Sin embargo, el contenido de sales residuales puede ser elevado; no se lleva a cabo ninguna etapa de decoloración; la extracción con n-butanol y la recristalización en metanol no constituyen un procedimiento comercialmente viable.

La patente JP 57-075992 se refiere a la purificación de esteviósido. El extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni se mezcló con un floculante (por ejemplo, cloruro de aluminio o hidroxicloruro de aluminio) a fin de flocular y eliminar las impurezas coloidales, y a continuación se trató con una resina apolar (por ejemplo, Duolite ES-861) para adsorber la sustancia edulcorante. Las sustancias adsorbidas se eluyeron con un disolvente orgánico (por ejemplo, metanol, acetona, etc.), y la solución se decoloró y se purificó con carbón activado y arcilla activada. El carbón activado puede absorber el esteviósido firmemente desde la solución acuosa, y los efectos decolorantes y de purificación del carbón activado se pueden potenciar mediante la utilización combinada con arcilla activada. Sin embargo, se utilizan disolventes peligrosos que pueden permanecer en el producto final. Este procedimiento es difícil de aplicar a escala comercial.

La patente JP 57-086264 se refiere al aislamiento del componente edulcorante principal de *Stevia*. Se extrajeron los tallos y hojas secos con agua fría, agua caliente, alcohol hidratado, etc. El extracto se coaguló o precipitó con un adsorbente y el precipitado se eliminó por filtración o centrifugación, hasta obtener un líquido transparente que contenía los componentes edulcorantes. Los componentes se adsorbieron sobre un adsorbente polimérico sintético, se purificaron hasta un 80-90% de pureza, se concentraron, se secaron y se disolvieron en 3-8 volúmenes de

metanol caliente o etanol caliente. El esteviósido y el rebaudiósido A se cristalizaron simultáneamente en la solución. Tras eliminar completamente el disolvente, los cristales mezclados se calentaron juntos con 3-6 volúmenes de alcohol y se separaron en la parte de solución y la parte sólida por filtración en caliente. El esteviósido se puede obtener a partir de la solución y el rebaudiósido A se puede preparar lavando y secando la parte sólida. Este método puede proporcionar el esteviósido y el rebaudiósido A purificados; sin embargo, la calidad del extracto puede ser baja debido a la ausencia de etapas de desionización y decoloración. El contenido de impurezas de peso molecular bajo puede ser alto.

Las patentes JP 58-212759 y 58-212760 describen la purificación de la sustancia edulcorante de *Stevia*. Se extrajeron hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni con agua o un alcohol a un pH de 4. El extracto se trató con hidróxido de calcio y el precipitado que se formó se separó por filtración. Se añadió al filtrado un disolvente orgánico soluble en agua, tal como el metanol, y se eliminó el precipitado. La cantidad de disolvente orgánico soluble en agua fue de entre el 5% y el 50% con respecto al filtrado. El filtrado obtenido se purificó mediante resinas de intercambio iónico o una resina de adsorción. El principal inconveniente es que se utiliza un disolvente peligroso, que puede estar presente en el producto final. Este procedimiento es difícil de aplicar a escala comercial.

La patente JP 58-028246 se refiere a la preparación de esteviósido. Se extrajo hoja cruda de *Stevia* con agua, agua caliente o una mezcla de agua y alcohol, y a continuación, si era necesario, se concentró el extracto. Se añadió al extracto o el extracto concentrado una mezcla de hidróxido de calcio y cloruro de calcio en una cantidad correspondiente a 0,5-2,0 veces la del contenido de sólidos, preferentemente burbujeando simultáneamente dióxido de carbono gaseoso. Las impurezas se precipitaron en forma de material coloidal, que se separó por filtración. Sin embargo, la calidad del extracto puede ser baja debido al elevado contenido de sales y compuestos de peso molecular bajo.

La patente JP 58-028247 se refiere a un método de purificación de una solución de esteviósido. Se extrajeron hojas crudas de *Stevia* con agua, agua caliente o una mezcla de agua y alcohol, y se concentró el extracto. Se añadieron al extracto o extracto concentrado hidróxido de calcio y un floculante polimérico de peso molecular elevado soluble en agua, por ejemplo un alto polímero de poliacrilamida, en una cantidad de entre 1 y 2,5 veces la del contenido de sólidos del extracto, a fin de provocar la precipitación de las impurezas, que luego se eliminaron por filtración. Se obtuvo una solución de esteviósido transparente y prácticamente incolora. Sin embargo, la calidad del extracto puede ser baja debido al elevado contenido de sales y compuestos de peso molecular bajo.

La patente JP 59-045848 se refiere a la preparación de un edulcorante de *Stevia* con un contenido elevado de rebaudiósido A. Las hojas secas de la variedad de *Stevia* que contiene 1,57 veces más rebaudiósido A que esteviósido se extrajeron con agua o un disolvente que contenía agua. La solución extraída se trató con una resina de intercambio catiónico y una resina de intercambio aniónico. La solución se adsorbió sobre una resina de absorción, se eluyó con un disolvente hidrófilo y la solución se concentró a fin de obtener un edulcorante natural. Este procedimiento es parecido a los de la tecnología tradicional china, que puede proporcionar un polvo amarillo con un contenido de glucósidos de esteviol únicamente de hasta el 85-86%.

La patente JP 62-166861 se refiere a la extracción y purificación del componente edulcorante de las hojas secas de *Stevia*. Se extrajeron hojas secas de *Stevia rebaudiana* Bertoni con 7-14 volúmenes de agua a 50-70ºC durante 3-6 horas con agitación, a fin de obtener un extracto líquido de color marrón con un contenido total de sólidos del 2-3% y con un 0,7-0,8% de esteviósido. El extracto se concentró 7-8 veces a aproximadamente 60ºC a presión reducida. El líquido concentrado se trató con un 0,5-2% de $CaCl_2$ para separar las impurezas en forma de precipitado floculento. La solución se trató con un óxido de Al, Mg en una cantidad correspondiente al 15-20% del contenido de sólidos a 40-55ºC con agitación vigorosa. A continuación, el precipitado se eliminó por filtración. El esteviósido se puede purificar adicionalmente en adsorbentes específicos. Sin embargo, este procedimiento es difícil de comercializar; la cantidad de sales utilizadas para la purificación del extracto es elevada y no se lleva a cabo ninguna etapa de desionización ni de decoloración. El contenido de compuestos de peso molecular bajo puede ser alto.

La patente JP 06-007108 se refiere al método para extraer y separar las sustancias dulces de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. Se extrajeron hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni con un alcohol miscible en agua, tal como el metanol. La solución extraída se mezcló con agua y se hizo pasar a través de membranas de ultrafiltración con una capacidad de corte de 20-150 kDa, y seguidamente a través de membranas de ultrafiltración con una capacidad de corte de 1-10 kDa. Sin embargo, se utilizan disolventes peligrosos que pueden permanecer en el producto final. Este procedimiento es difícil de aplicar a escala comercial.

La patente JP 52083731 se refiere al aislamiento y purificación de rebaudiósido A y rebaudiósido B mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice. Se lleva a cabo una purificación adicional por cristalización en disolventes orgánicos, tales como metanol o etanol.

La patente JP 55-092400 se refiere a la preparación de esteviósido. Se extrajo una solución acuosa que contiene esteviósido con 1H,1H,5H-octafluoro-1-pentanol. Tras la separación, el disolvente se eliminó por destilación y el residuo se secó. El precipitado se recristalizó en metanol. La pureza del esteviósido fue de más del 95%.

Las patentes JP 56-121453, JP 56-121454 y JP 56-121455 se refieren a la separación de esteviósido y rebaudiósido A. Una mezcla de esteviósido y rebaudiósido A extraída de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni se mezcló con una solución acuosa de metanol al 75% y se mantuvo a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. Los cristales resultantes, con un contenido del 65% de esteviósido y del 25,2% de rebaudiósido A, se separaron por filtración y se secaron. Cuando se aplicó una solución acuosa de etanol al 90%, la mezcla final contenía un 57,4% de esteviósido y un 31,9% de rebaudiósido A. La recristalización adicional en una solución acuosa de etanol al 90% dio lugar a un producto con un mayor contenido de rebaudiósido A. La pureza del producto fue aproximadamente del 80%. El esteviósido se puede llegar a purificar hasta el 86,1% mediante el lavado adicional con agua. Se obtuvieron cristales de esteviósido de tipo β y cristales de rebaudiósido A de tipo α.

La patente JP 57-046998 se refiere a la preparación de esteviósido. Se extrajeron hojas crudas de *Stevia rebaudiana* con 10-20 volúmenes de agua y el filtrado se trató con hidróxido de calcio en una cantidad correspondiente al 10-30% del peso de las hojas crudas. El pH de la suspensión se ajustó a 4-6 con ácido sulfúrico o ácido cítrico. Tras la filtración, el extracto se hizo pasar a través de una columna de poliamida para adsorber los glucósidos y eliminar las impurezas. A continuación, el extracto purificado se concentró a presión reducida, se ajustó su pH a 8-9 con amoniaco acuoso y se extrajo con n-butanol para obtener esteviósido crudo, que luego se recristalizó en metanol.

La patente JP 57-086264 se refiere al aislamiento del componente edulcorante principal de *Stevia*. Se extrajeron los tallos y hojas secos con agua fría, agua caliente, alcohol hidratado, etc. El extracto se coaguló o precipitó con un adsorbente, y el precipitado se eliminó por filtración o centrifugación, hasta obtener un líquido transparente que contenía los componentes edulcorantes. Los componentes se adsorbieron sobre un adsorbente polimérico sintético, se purificaron hasta un 80-90% de pureza, se concentraron, se secaron y se disolvieron en 3-8 volúmenes de metanol caliente o etanol caliente. El esteviósido y el rebaudiósido A se cristalizaron simultáneamente en la solución. Tras eliminar completamente el disolvente, los cristales mezclados se calentaron juntos con 3-6 volúmenes de alcohol y se separaron los sólidos de la solución por filtración en caliente. El esteviósido se puede obtener a partir de la solución y el rebaudiósido A se puede preparar lavando y secando la parte sólida.

Las patentes JP 06-192283 y JP 08-000214 dan a conocer la purificación de rebaudiósido A por filtración en gel en Toyo Perl HW-40. Se obtuvieron rebaudiósido C y dulcósido por HPLC. Este método es útil únicamente a escala de laboratorio.

La patente JP 63173531 da a conocer un método de extracción de glucósidos dulces a partir de *Stevia rebaudiana*. La primera etapa del procedimiento consistió en extraer una solución líquida de glucósidos dulces de la planta *Stevia rebaudiana*. En segundo lugar, la solución líquida de glucósidos dulces se hizo pasar a través de una resina porosa apolar y se eluyó con un disolvente orgánico soluble en agua, preferentemente metanol. En tercer lugar, la solución eluida se concentró y se secó, obteniéndose un material pulverulento. Este procedimiento aísla una mezcla de glucósidos dulces, pero no aísla un único glucósido dulce puro, como por ejemplo el rebaudiósido A.

La patente JP 07-143860 da a conocer la purificación de rebaudiósido A por cristalización y recristalización a partir de una solución acuosa de metanol al 10-20%. La pureza del rebaudiósido A fue aproximadamente del 90%.

La patente JP 07-177862 da a conocer una purificación de rebaudiósido A y esteviósido. Se trató el extracto de *Stevia* purificado con concentraciones bajas de alcohol a fin de obtener cristales con un contenido de aproximadamente el 75% de esteviósido y rebaudiósido A. Los cristales se recristalizaron adicionalmente en agua para obtener el edulcorante ligeramente soluble en agua con una relación de esteviósido con respecto a rebaudiósido A de aproximadamente 1:2 p/p.

La patente JP 2002 262.822 da a conocer un edulcorante extraído de las hojas secas de *Stevia* y un método de extracción del mismo. Este procedimiento utilizó agua o un disolvente acuoso para extraer los glucósidos de *Stevia* a partir de las hojas secas. En el producto obtenido, el contenido de rebaudiósido A fue de 2,56 veces la cantidad de esteviósido.

En Kohda y otros, 1976, se llevó a cabo el aislamiento de esteviolbiósido, rebaudiósido A y rebaudiósido B. Se extrajeron las hojas secas con metanol caliente y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se extrajo con n-butanol y, tras secarse, se recristalizó en metanol. El licor madre se sometió a separación cromatográfica sobre gel de sílice utilizando una mezcla de metanol-cloroformo-agua como fase móvil. Se llevó a cabo una purificación adicional por cromatografía en capa fina. Este procedimiento se puede aplicar únicamente a escala de laboratorio para la producción de pequeñas cantidades de los glucósidos dulces mencionados anteriormente.

Los dulcósidos A y B se aislaron e identificaron mediante cristalización en mezcla de metanol y etanol, y se purificaron adicionalmente por cromatografía sobre gel de sílice (Kobayashi y otros, 1977).

Se utilizó una combinación de ultrafiltración, diafiltración, ósmosis inversa y tratamiento de intercambio iónico para la purificación del extracto de *Stevia* (Fuh y Chiang, 1990). La capacidad de corte de las membranas de ultrafiltración

era de 25.000 y 100.000 Daltons. Se utilizaron mezclas de resinas de intercambio catiónico y de intercambio aniónico fuertes y débiles como intercambiadores de iones. La recuperación de los glucósidos totales de esteviol fue aproximadamente del 90%; sin embargo, la pureza final del producto fue únicamente del 46%.

En Liu y otros (1991) y Zhang y otros (2000) se describe un método para la purificación de los glucósidos de esteviol por tecnología de membrana. Las hojas secas se colocaron en una columna de vidrio estándar y la extracción se llevó a cabo con agua de ósmosis inversa. El extracto se pretrató con una membrana tubular de cerámica y a continuación con una membrana de ultrafiltración en modo de diafiltración. El permeado se lavó de las impurezas de peso molecular inferior mediante una membrana de nanofiltración en modo de diafiltración y a temperatura elevada. La adición de cal y/u otro agente de floculación a la alimentación de la ultrafiltración mejoró significativamente el flujo. El procedimiento fue capaz de proporcionar un concentrado de edulcorante con una pureza relativamente alta. Sin embargo, no se facilita ningún dato sobre la pureza del extracto y la recuperación de los glucósidos de esteviol. Los valores bajos de pH aplicados para la extracción hizo necesaria la utilización de reactores especiales resistentes a los ácidos. Las bajas temperaturas durante la extracción hicieron aumentar el coste operativo de la producción. Estos dos factores (temperatura y pH bajos) dieron lugar a una gran cantidad de extracto inicial diluido. La dilución del extracto también se produjo durante la microfiltración y la ultrafiltración. Para la purificación final, es necesario un tratamiento de intercambio iónico. Estos factores aumentan sustancialmente el coste de producción y disminuyen el rendimiento del producto final por unidad de tiempo. La inversión inicial también es elevada.

Se utilizó una serie de resinas polares a base de poliestireno con grupos carbonilo para la adsorción de los glucósidos de esteviol y la separación parcial del esteviósido y el rebaudiósido A (Chen y otros, 1998; 1999). La relación de rebaudiósido A con respecto a esteviósido puede aumentar del 0,72 al 2,24.

Se estudió la capacidad de adsorción y la selectividad de un nuevo adsorbente con un grupo piridilo con respecto a los glucósidos de esteviol (Chen y otros, 1999). Se estudiaron con detalle el efecto de la polaridad y la estructura física del sorbente sobre la selectividad. Se aplicaron dos métodos de separación en el enriquecimiento del rebaudiósido A. Dichos métodos fueron la elución selectiva utilizando solución de metanol o etanol como disolvente y la separación cromatográfica dinámica con resina de piridilo de alta selectividad. Los resultados muestran que el método de separación cromatográfica puede enriquecer eficazmente el rebaudiósido A a partir del extracto de *Stevia* con un contenido elevado de esteviósido. La relación de rebaudiósido con respecto a esteviósido puede aumentar del 0,75 al 3,94. Fue posible llevar a cabo una purificación adicional del rebaudiósido A por cristalización en metanol.

En Moraes y otros (2001) y Montovaneli y otros (2004) se describe un método para la clarificación del extracto de *Stevia* con zeolitas modificadas. Se modificaron zeolitas sintéticas o naturales por tratamiento con iones de calcio o bario y se puso en contacto un extracto de *Stevia* sin ningún tratamiento previo con la zeolita modificada. Se alcanzó una clarificación del 70-80% en régimen por lotes y únicamente del 55-60% en régimen continuo. Con el procedimiento de clarificación se pretendía adsorber los pigmentos que hacen que el extracto sea marronoso, no los glucósidos, que son los responsables del sabor dulce. Sin embargo, no se facilita ningún dato sobre el contenido de glucósidos de esteviol en el producto final. Naturalmente, este tipo de tratamiento no puede proporcionar por sí solo un extracto altamente purificado, especialmente debido a los polisacáridos, los metales pesados y las esterebinas, que permanecen en el extracto clarificado. Además, tampoco se facilitan datos sobre la semivida y la capacidad de adsorción del portador, que son muy importantes cuando el procedimiento se lleva a cabo en régimen continuo.

Se diseñaron adsorbentes poliméricos con grupos $-N^{+}(CH_3)_3$ y se aplicaron a la purificación de los glucósidos de esteviol y al enriquecimiento del rebaudiósido A (Shi y otros, 2002). En una serie de cinco columnas, el contenido de rebaudiósido A aumentó desde el producto de la primera columna al producto de la quinta columna. Al mismo tiempo, el adsorbente mostró capacidad de decoloración.

En Starratt y otros, 2002, se aisló rebaudiósido F por cromatografía líquida en gel de sílice funcionalizado con un grupo 3-aminopropilo. Las fracciones ricas en rebaudiósido C y rebaudiósido F se combinaron y se separaron por HPLC en una columna de hidratos de carbono Waters con un gradiente lineal de acetonitrilo y agua.

En Yoda y otros, 2003, se describe la preparación de extracto de *Stevia* por extracción con fluido supercrítico. Se trata de un procedimiento de dos etapas: (i) la extracción en CO_2 a 200 bar y 30ºC, y (ii) la extracción con CO_2 + agua. Se recuperaron aproximadamente el 72% de los compuestos solubles en CO_2 y el compuesto principal fue la austroinulina. El sistema *Stevia* + CO_2 + agua fue capaz de eliminar aproximadamente el 50% del esteviósido original y aproximadamente el 72% del rebaudiósido A. Los principales inconvenientes de este método son la necesidad de presión elevada y un índice de extracción bajo de los compuestos dulces. Además, no se facilita ninguna información sobre el contenido de compuestos secundarios y de glucósidos de esteviol totales en el extracto final. Este procedimiento es difícil de aplicar a escala comercial.

Se utilizó la extracción de líquido a presión con agua o metanol para la extracción de esteviósido de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (Pol y otros, 2007). Se determinó como óptima una temperatura de 110ºC para la extracción del esteviósido de las hojas de *Stevia rebaudiana* utilizando agua o metanol. El aumento de la temperatura provocó una

degradación significativa del esteviósido en el medio de los dos disolventes, o una disminución del rendimiento de la extracción en agua. Los dos disolventes dieron lugar a una extracción de esteviósido con una reproducibilidad muy parecida, y los parámetros de extracción propuestos son los mismos para ambos métodos. La utilización de agua representa una alternativa al metanol más respetuosa con el medio ambiente y más económica.

En Kovylyaeva y otros, 2007, se describe un método de preparación y purificación de extracto de *Stevia*. Este método incluyó la extracción de hojas secas con 14 volúmenes de agua destilada durante 1 hora a temperatura de ebullición, la filtración y la concentración del filtrado hasta el estado de jarabe. Este jarabe se diluyó, se añadió $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ y se agitó hasta su disolución. La mezcla se agitó y se trató con una solución acuosa de NaOH. El precipitado se filtró y el filtrado se hizo pasar a través de una columna rellena con Al_2O_3. La columna se eluyó con agua destilada, obteniéndose una solución de color marrón claro. La purificación adicional de esteviósido, rebaudiósido A y rebaudiósido C se llevó a cabo por extracción con n-butanol y cromatografía en columna sobre Al_2O_3 y gel de sílice. Este método no es capaz de proporcionar un extracto de *Stevia* de pureza elevada. Se utiliza una gran cantidad de sales para el tratamiento previo. Este procedimiento de purificación es difícil de aplicar a escala comercial.

En Bandna y otros (2009) se describe un procedimiento eficiente de extracción de esteviósido y rebaudiósido A asistida por microondas. Se extrajeron hojas secas y reducidas a polvo de *Stevia rebaudiana* mediante técnicas de extracción convencionales, por ultrasonidos y asistidas por microondas, utilizando metanol, etanol y agua, solos o en mezclas binarias, como disolventes. Se llevó a cabo una extracción convencional en frío a 25ºC durante 12 h, mientras que la extracción con ultrasonidos se realizó a una temperatura de 35 ± 5ºC durante 30 min. La extracción asistida por microondas se llevó a cabo a una potencia de 80 W durante 1 min a 50ºC. La extracción asistida por microondas produjo un 8,64% y un 2,34% de esteviósido y de rebaudiósido A, respectivamente, mientras que las técnicas convencional y con ultrasonidos produjeron un 6,54% y un 1,20%, y un 4,20 y un 1,98% de esteviósido y rebaudiósido A, respectivamente.

También se alcanzó un aislamiento eficiente de los glucósidos de esteviol utilizando una extracción a presión con agua caliente (Teo y otros, 2009). Puede encontrarse asimismo una exposición de los glucósidos de esteviol en “Steviol-glycosides: New natural sweeteners”, TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1, nº 11, 1 de julio de 1982, páginas 246-248 (Tanaka et al.).

Todos los métodos existentes se refieren al aislamiento y la purificación de uno u otro glucósido de esteviol a partir del extracto inicial, y no indican ninguna vía para el tratamiento posterior de la solución residual o la purificación de los compuestos minoritarios. Por consiguiente, existe la necesidad de encontrar un método eficiente y económico para el retratamiento integral del extracto producido a partir de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Sin embargo, no existen datos publicados sobre el aislamiento y la purificación comerciales del rebaudiósido D, que posee unas excelentes propiedades organolépticas.

El contenido de rebaudiósido D en el extracto es muy bajo y, debido a ello, su purificación es muy compleja.

Por consiguiente, existe la necesidad de encontrar un método eficiente y económico para la preparación de rebaudiósido D con una pureza elevada, que se puede utilizar como edulcorante en las industrias alimenticia, de bebidas, farmacéutica, cosmética y otras.

Sumario de la invención

No de acuerdo con la presente invención existe un procedimiento para el aislamiento y la purificación de glucósidos dulces individuales de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni, y más particularmente para el aislamiento y la purificación del rebaudiósido D y su aplicación como edulcorante.

El principal problema técnico que se debe resolver es proporcionar un método muy eficiente de aislamiento y purificación de diferentes glucósidos de esteviol, particularmente el rebaudiósido D, a partir del extracto de *Stevia*.

Existe un procedimiento para el retratamiento del extracto de *Stevia rebaudiana* Bertoni mediante el aislamiento y la purificación de los glucósidos dulces individuales altamente purificados, particularmente el rebaudiósido D.

El rebaudiósido D altamente purificado, solo o en combinación con otros edulcorantes y/u otros ingredientes, es útil como edulcorante acalórico en composiciones comestibles y masticables, tales como bebidas, productos de confitería, repostería, galletas, gomas de mascar y similares.

Se han desarrollado el aislamiento y la purificación de rebaudiósido D a partir de extracto de *Stevia*. En una forma de realización, el método de aislamiento y purificación del rebaudiósido D comprende tratar el extracto de *Stevia* con un primer alcohol o solución de alcohol y agua a fin de formar una primera mezcla, obtener un primer precipitado, que contiene rebaudiósido A y rebaudiósido D, a partir de la primera mezcla, tratar el primer precipitado con un segundo alcohol o solución de alcohol y agua para formar una segunda mezcla, obtener un segundo

precipitado a partir de la segunda mezcla, que contiene rebaudiósido D altamente purificado y un filtrado con un contenido elevado de rebaudiósido A, tratar el segundo precipitado con un tercer alcohol o solución de alcohol y agua para formar una tercera mezcla, obtener un tercer precipitado a partir de la tercera mezcla, y secar el tercer precipitado para obtener rebaudiósido D de pureza elevada. Opcionalmente, este método comprende además el tratamiento del rebaudiósido D purificado con un tercer alcohol o solución de alcohol y agua a fin de refinar el rebaudiósido D de pureza elevada.

Según la presente invención, es proporcionado un producto con un sabor y unas características físicas excelentes. El producto comprende por lo menos 95% en peso en base seca de rebaudiósido D, en el que el producto es seleccionado de entre el grupo que consiste en alimento, bebida, composición farmacéutica, tabaco, producto nutricéutico, composición de higiene oral o producto cosmético.

Debe apreciarse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada que se proporciona a continuación son ejemplificativas y explicativas, y que únicamente pretenden proporcionar una explicación adicional de la presente invención, tal como ésta se expone en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

Los figuras adjuntas son proporcionadas para facilitar una mayor comprensión de la presente invención. Dichas figuras ilustran formas de realización de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de las formas de realización de la presente invención.

La figura 1 ilustra la estructura química del esteviol y los glucósidos de esteviol presentes en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

La figura 2 ilustra la estructura química de los glucósidos de esteviol presentes en la *Stevia rebaudiana* Bertoni.

La figura 3 ilustra un esquema de purificación en una sola etapa del rebaudiósido A utilizando sistemas de etanol y agua.

La figura 4 ilustra los gráficos de HPLC del rebaudiósido D en diversas etapas de purificación.

La figura 5 ilustra un esquema de purificación del rebaudiósido D.

La figura 6 ilustra el espectro de FTIR del rebaudiósido D.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona rebaudiósido D a partir del extracto de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y su aplicación en varios productos.

Las ventajas de la presente invención resultarán más evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada a continuación. Sin embargo, debe apreciarse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican formas de realización preferidas de la presente invención, son proporcionados únicamente a título ilustrativo, y que a partir de esta descripción detallada el experto en la materia podrá apreciar diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la presente invención.

Entre los glucósidos dulces presentes en la *Stevia*, sólo el esteviósido y el rebaudiósido A están disponibles a un precio moderado con una pureza menor del 80%, y a un precio elevado con una pureza mayor del 80%. Habitualmente, la pureza más alta del producto comercial es de más del 97%. En el mercado no existen cantidades comerciales de rebaudiósido B, rebaudiósido D ni rebaudiósido C. Se encuentran disponibles patrones analíticos de los rebaudiósidos E y F en cantidades menores.

El rebaudiósido D es un edulcorante de tipo glucósido diterpenoide de alta intensidad que presenta la estructura química ilustrada en la figura 2.

El rebaudiósido D se aísla y se extrae, junto con otros glucósidos de esteviol, de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni *("Stevia")*, que en la actualidad se cultiva comercialmente en Japón, Taiwán, Malasia, Corea del Sur, China, Israel, India, Brasil, Australia y Paraguay. Se trata de un edulcorante acalórico ideal, con propiedades funcionales y organolépticas superiores a las de muchos edulcorantes de alta intensidad. Las formas procesadas de la *Stevia* pueden ser entre 30 y 400 veces más potentes que el azúcar. Entre los glucósidos diterpenoides dulces de *Stevia*, el rebaudiósido D es el menos amargo y presenta el regusto menos persistente.

En la actualidad no existe ninguna tecnología comercial publicada que se refiera al aislamiento y la purificación del rebaudiósido D, y no hay duda de que existe la necesidad de encontrar un método eficiente y económico para el aislamiento y la purificación integrales de glucósidos dulces individuales a partir del extracto de *Stevia*.

La presente invención proporciona rebaudiósido D altamente purificado a partir del extracto de *Stevia* y su posterior utilización.

En adelante, el término “altamente purificado” se refiere a una composición de rebaudiósido D que incluye, como mínimo, aproximadamente 91% de rebaudiósido D con respecto al peso en seco.

A continuación se describen con detalle unas formas de realización ejemplificativas de la presente invención, que se ilustran en las figuras 3 a 6.

Sin embargo, en la descripción detallada, únicamente se muestran, a título ilustrativo, algunas formas de realización ejemplificativas. Como reconocerán los expertos en la materia, la presente invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las formas de realización que se exponen en la presente memoria.

Los glucósidos de diterpeno, incluidas las sustancias de sabor dulce, se encuentran en los tallos, las semillas y las hojas de la planta *S. rebaudiana* Bertoni, estando presentes en una concentración más elevada en las hojas. Por consiguiente, las hojas son el material de partida preferente para la recuperación de los glucósidos dulces.

La purificación del rebaudiósido D se lleva a cabo a partir de extracto comercial de *Stevia*. El contenido de rebaudiósido D en el extracto puede variar dependiendo de la variedad de *Stevia* o del procedimiento tecnológico de preparación del extracto.

Se utilizó un extracto de *Stevia* que contenía un 25,40% de esteviósido, un 59,14% de rebaudiósido A, un 9,71% de rebaudiósido C, un 2,03% de rebaudiósido D, un 0,56% de rebaudiósido B, un 0,68% de rebaudiósido E, un 1,02% de rebaudiósido F, un 0,11% de esteviolbiósido y un 1,35% de dulcósido como material de partida de ejemplo para ilustrar la purificación del rebaudiósido D.

Haciendo referencia a la figura 3, se da a conocer una purificación de una etapa de rebaudiósido A de pureza elevada con un contenido relativamente elevado de rebaudiósido D, según una forma de realización de la presente invención. Se disolvió extracto de *Stevia* en una primera solución de etanol y agua a 50-70ºC, preferentemente a 55-60ºC, durante aproximadamente 10-30 min, preferentemente 15-20 min, y a continuación a 15-40ºC, preferentemente a 20-22ºC durante aproximadamente 18-48 horas, preferentemente 20-24 horas, con agitación. Cuando la temperatura alcanzó los 22ºC, se añadió un 1-2% (p/v) de rebaudiósido A altamente purificado a la mezcla de reacción como iniciador de la cristalización. La proporción de extracto con respecto a primera solución de etanol y agua dependió del contenido de glucósidos menores y estuvo comprendida dentro del intervalo 1,0:2,5-1,0:10,0 p/v, preferentemente 1,0:3,0-5,0 p/v.

Durante este tiempo, se formó un primer precipitado, que se separó por filtración o centrifugación.

La concentración de etanol en la primera solución de etanol y agua está comprendida entre el 75% y el 99%, preferentemente entre el 82% y el 88%. El contenido de rebaudiósido A y rebaudiósido D en el primer precipitado está comprendida entre el 79% y el 99%, y entre el 0,8 y el 4,0%, respectivamente.

La pureza y el rendimiento de rebaudiósido A dependieron de la proporción de extracto con respecto a solución de etanol y agua, y de la concentración de etanol. Los datos para diversas concentraciones de etanol se indican en la tabla 3. La relación extracto:metanol fue de 1:3,0 p/v.

El grado de purificación y la producción de rebaudiósido A para diversos volúmenes de solución de etanol al 88% se indican en la tabla 4.

Tabla 3

Etanol, %	Glucósidos de esteviol, %									Rendimiento, %
	Est.	RebA	RebC	RebD	RebB	RebE	RebF	Esteb.	DulA	
75	0,1	98,9	0,2	0,8	0	0	0	0	0	19,2
78	0,1	98,6	0,2	1,0	0,1	0	0	0	0	21,3
80	0,1	98,2	0,2	1,4	0,1	0	0	0	0	23,4
82	0,1	97,8	0,2	1,8	0,1	0	0	0	0	23,7
85	0,1	97,6	0,2	2	0,1	0	0	0	0	24,1
87	0,3	96,7	0,4	2,5	0,1	0	0	0	0	25,6
88	0,4	95,6	0,3	3,5	0,1	0,1	0	0	0	33,0
89	0,8	94,2	0,7	3,5	0,2	0,1	0,2	0	0,3	35,4

90	1,4	93,4	1,2	3,0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,4	35,7
95	3,2	90,0	3,1	2,5	0,2	0,2	0,2	0,1	0,5	41,6
99	7,2	78,8	10,3	2,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,7	48,3

Tabla 4

Relación extracto/etanol, p/v	Glucósidos de esteviol, %									Rendimiento, %
	Est.	RebA	RebC	RebD	RebB	RebE	RebF	Esteb.	DulA	
1:5,0	0,2	98,0	0,2	1,5	0	0,1	0	0	0	26,5
1:4,0	0,2	97,5	0,2	2,0	0	0,1	0	0	0	31,3
1:3,5	0,3	96,9	0,1	2,6	0	0,1	0	0	0	32,4
1:3,0	0,4	95,6	0,3	3,5	0,1	0,1	0	0	0	33,0
1:2,5	2,5	91,7	1,7	3,3	0,2	0,2	0,1	0	0,3	35,6
1:2,0	3,3	89,8	2,5	3,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,5	41,4

El contenido de rebaudiósido D aumenta con el aumento de la concentración de etanol hasta un valor comprendido entre el 88% y el 90% y con la disminución de la proporción de solución de etanol y agua con respecto a extracto. A la vez, la pureza del rebaudiósido A aumentó con soluciones de etanol más diluidas y una mayor proporción de solución de etanol y agua con respecto a extracto.

El rendimiento del producto en esta etapa para los extractos de *Stevia* con diversos contenidos de rebaudiósido A, tras el tratamiento con relaciones de 1:3 (p/v) de etanol al 88%, se indica en la tabla 5. Tal como era previsible, el rendimiento del producto aumenta con el aumento del contenido de rebaudiósido A en el extracto inicial.

Tabla 5

Contenido de rebaudiósido A en el extracto inicial, %	Rendimiento de rebaudiósido A en la etapa de precipitación a partir del extracto inicial, %
42,0-43,0	22,0-25,0
45,0-46,0	22,0-25,0
50,0-53,0	24,0-27,0
55,0-59,0	28,0-31,0
60,0-62,0	32,0-36,0

El precipitado se separó por filtración o centrifugación, se lavó con aproximadamente dos volúmenes de etanol absoluto y se secó. En esta etapa puede utilizarse cualquier tipo de equipo que permita la separación del precipitado del líquido, tal como diversos tipos de centrífugas o sistemas de filtración. Diferentes tipos de secador, tales como un secador rotatorio de vacío, un secador de lecho fluido, un secador de túnel giratorio o un secador de placa, son adecuados para obtener glucósidos de esteviol purificados en forma de polvo.

Si el extracto inicial contiene una cantidad elevada de rebaudiósido B y rebaudiósido D, para la purificación del rebaudiósido A y más tarde el rebaudiósido D es preferente utilizar concentraciones menores de etanol y una mayor proporción de solución de etanol y agua con respecto a extracto (tabla 6; tabla 7). En esta serie de experimentos, el contenido de rebaudiósido A en el extracto inicial fue del 48,7%.

El rendimiento del producto con un contenido elevado de rebaudiósido A y rebaudiósido D se puede aumentar utilizando etanol para la precipitación posterior. Para ello, al final de la cristalización, se añadió a la mezcla un 0,5-1,0 v/p, preferentemente un 0,5-0,8 v/p de etanol absoluto con respecto al sólido inicial y se prosiguió el procedimiento durante otras 2-3 horas. El rendimiento y la pureza del producto a partir del extracto con un 48,7% de contenido de rebaudiósido A se indican en la tabla 8.

Tabla 6

Etanol, %	Relación etanol/sólido, v/p	Pureza del producto para diferentes contenidos de rebaudiósido B, % (el contenido de rebaudiósido D fue del 0,4%)			
		0%	0,4%	0,8%	1,1%
81,0	2,5	98,7	98,5	98,2	97,9
	3,0	98,9	98,7	98,4	98,1
	3,5	99,2	98,9	98,6	98,4
83,0	2,5	98,1	98,2	98,0	97,7
	3,0	98,5	98,4	98,2	97,9
	3,5	98,8	98,6	98,4	98,2
85,0	2,5	97,7	97,6	97,4	97,2

Etanol, %	Relación etanol/sólido, v/p	Pureza del producto para diferentes contenidos de rebaudiósido B, % (el contenido de rebaudiósido D fue del 0,4%)			
		0%	0,4%	0,8%	1,1%
	3,0	98,2	97,9	97,6	97,4
	3,5	98,5	98,2	97,8	97,6
87,0	2,5	96,3	97,2	96,6	96,4
	3,0	97,5	97,6	97,4	97,0
	3,5	97,9	97,9	97,6	97,2
88,0	2,5	96,1	95,9	95,5	95,1
	3,0	97,3	97,1	96,4	95,8
	3,5	97,7	97,5	97,2	96,8
90,0	2,5	94,6	94,1	92,3	90,5
	3,0	96,3	95,8	92,8	91,2
	3,5	97,3	96,8	93,7	91,9

Tabla 7

Etanol, %	Relación etanol/sólido, v/p	Pureza del producto para diferentes contenidos de rebaudiósido D, % (el contenido de rebaudiósido B fue del 0,1%)			
		0,5%	1,2%	1,7%	2,6%
81,0	2,5	98,7	98,0	97,5	97,1
	3,0	98,9	98,3	98,0	97,4
	3,5	99,2	98,5	98,2	97,7
83,0	2,5	98,1	97,7	97,3	97,0
	3,0	98,5	98,1	97,8	97,4
	3,5	98,8	98,4	98,0	97,6
85,0	2,5	97,7	97,5	97,1	96,8
	3,0	98,2	97,8	97,6	97,1
	3,5	98,5	98,1	97,8	97,2
87,0	2,5	96,3	96,2	95,8	94,2
	3,0	97,5	97,3	96,7	96,1
	3,5	97,9	97,6	97,4	96,9
88,0	2,5	96,1	95,7	95,2	93,7
	3,0	97,3	97,1	96,5	95,6
	3,5	97,7	97,4	97,0	96,6
90,0	2,5	94,6	94,2	93,5	93,0
	3,0	94,8	94,8	93,9	93,3
	3,5	95,7	95,4	94,4	93,5

Tabla 8

Volumen adicional de etanol, p/v con respecto a los sólidos	Rendimiento y pureza de RebA para diferentes concentraciones de etanol (relación etanol/extracto = 1:3,5, p/v)							
	85%		86%		87%		88%	
	Rendimiento, %	RebA, %	Rendimiento, %	RebA, %	Rendimiento, %	RebA, %	Rendimiento, %	RebA, %
0	29,5	98,5	30,6	98,3	32,7	97,9	33,3	97,8
0,5	31,4	98,5	31,6	98,2	33,4	97,9	33,8	97,6
0,6	32,3	98,2	32,7	98,2	34,3	97,8	34,7	97,6
0,7	33,5	97,9	33,9	97,7	35,4	97,6	35,9	97,5
0,8	34,1	97,9	35,2	97,7	36,3	97,6	36,7	97,4
0,9	34,3	97,8	35,4	97,6	36,7	97,5	37,4	97,4
1,0	34,5	97,8	35,7	97,5	36,9	97,4	37,7	97,2

Para producir rebaudiósido A de pureza elevada, el procedimiento se puede llevar a cabo a 30-50ºC y sin etapa de enfriamiento. Aunque la pureza del rebaudiósido A fue mayor, se obtuvo un menor rendimiento del producto. La calidad del producto aumentó para temperaturas de lavado más altas. Los resultados obtenidos utilizando 3,5 volúmenes de etanol al 85% para una parte de extracto tras 24 horas, y con y sin etapa de precipitación posterior, se indican en la tabla 9.

Tabla 9

Temperatura, ºC	Rendimiento, %		Contenido de rebaudiósido A	
	Sin precipitación posterior	Con precipitación posterior (0,8 vol. de EtOH)	Sin precipitación posterior	Con precipitación posterior (0,8 vol. de EtOH)
22,0	29,6	33,5	98,2	98,5
30,0	28,7	32,8	98,4	98,6
35,0	27,5	32,2	98,7	98,9
40,0	27,0	31,4	98,8	99,2
45,0	25,4	28,9	99,0	99,4
50,0	24,3	25,6	99,2	99,5
El contenido de rebaudiósido A, rebaudiósido B y rebaudiósido D fue del 51,3%, el 0,2% y el 0,7%, respectivamente.				

Cuando el contenido de rebaudiósido A en el producto final fue menor del 97%, principalmente debido al elevado contenido de rebaudiósido B y/o rebaudiósido D, el producto se lavó adicionalmente con una solución acuosa de etanol. Para ello, el rebaudiósido A obtenido tras la precipitación se suspendió en la mezcla de etanol y agua a temperatura ambiente durante 30-40 min. Tras obtenerse una suspensión homogénea, la temperatura se aumentó hasta 35-50ºC, preferentemente hasta 38-42ºC, y se agitó durante aproximadamente 10-20 horas, preferentemente 12-15 horas, y posteriormente a 10-25ºC, preferentemente a 20-22ºC, durante aproximadamente 3-20 horas, preferentemente 5-10 horas. La proporción de rebaudiósido A con respecto a etanol fue de 1,0:2,0-1,0:5,0 p/v, preferentemente de 1,0:2,5-4,0 p/v. La concentración de etanol fue del 85-93%, preferentemente del 88-90%.

Si la pureza del rebaudiósido A era inferior al 97% debido al elevado contenido de esteviósido, el producto se lavó con etanol absoluto del mismo modo descrito anteriormente para el producto contaminado de rebaudiósido B y rebaudiósido D. La proporción de rebaudiósido A con respecto a etanol fue de 1,0:2,0-1,0:5,0 p/v, preferentemente de 1,0:2,5-4,0 p/v.

Haciendo referencia a la figura 5, se muestra un diagrama de flujo funcional para la purificación de rebaudiósido A y rebaudiósido D según una forma de realización de la presente invención.

La purificación del rebaudiósido D a partir de los cristales/precipitados con un contenido de rebaudiósido A y de rebaudiósido D del 75-80% y el 2,0-3,5%, respectivamente, se llevó a cabo del siguiente modo. Debe apreciarse que los cristales con rebaudiósido A y rebaudiósido D se pueden obtener a partir del procedimiento descrito en relación con la figura 3.

El precipitado con un contenido elevado de rebaudiósido A y rebaudiósido D se mezcló con una segunda solución de agua y etanol y se incubó a 45-65ºC, preferentemente a 50-55ºC durante 2-6 horas, preferentemente durante 3-4 horas, con agitación. A continuación, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente durante 1-3 horas, preferentemente durante 0,5-1,0 horas. El precipitado se separó por filtración.

Preferentemente, la proporción de sólidos con respecto a solución acuosa de etanol fue de 1 a 5 p/v, y la concentración óptima de etanol fue del 78%. Sin embargo, la concentración de etanol puede estar dentro del intervalo 70-80%, y la proporción dentro del intervalo 1:2,5-1,7 p/v

Para facilitar la filtración del precipitado con un contenido elevado de rebaudiósido D, se añadió a la mezcla, antes de la filtración, carbón activado en una cantidad del 0,5-3,0% en volumen, preferentemente del 1,0-1,5% en volumen. A continuación, el precipitado se mezcló con 3-5 volúmenes de metanol al 30-50%. La suspensión se mantuvo con agitación a 45-65ºC, preferentemente a 57-62ºC, durante 1-5 horas, preferentemente durante 2-3 horas, y se sometió a filtración. La elución de los glucósidos adsorbidos sobre el carbón activado se llevó a cabo con metanol.

Los dos precipitados obtenidos con y sin aplicación de carbono contenían un 19-22,1% de rebaudiósido D en las condiciones óptimas (tabla 10).

Tabla 10

Etanol, %	Relación etanol/sólido, v/p	Pureza de RebA, %	Pureza de RebD, %
75,0	4,0	98,5	18,4
	5,0	99,2	18,6
	6,0	99,4	18,6
77,0	4,0	98,4	18,7
	5,0	99,1	20,1
	6,0	99,2	20,3

Etanol, %	Relación etanol/sólido, v/p	Pureza de RebA, %	Pureza de RebD, %
78,0	4,0	98,4	19,2
	5,0	99,2	22,0
	6,0	99,4	22,1
79,0	4,0	98,1	19,0
	5,0	98,8	19,7
	6,0	99,0	19,8
80,0	4,0	98,0	17,3
	5,0	98,4	17,9
	6,0	98,9	18,2
82,0	4,0	97,7	15,2
	5,0	98,1	15,8
	6,0	98,7	16,4

En principio, cuanto mayor es el volumen de metanol que se aplica, más rápido puede ser el procedimiento de elución. El procedimiento se puede completar en un período más corto si se utiliza una solución acuosa de metanol.

La fracción de metanol se evaporó hasta sequedad.

Cuando el material inicial, que contenía un 95,6% de rebaudiósido A y un 3,5% de rebaudiósido D (figura 4A), se mezcló con 3,5 volúmenes de etanol al 78,0%, la mezcla se hirvió durante 10-15 min y el material no disuelto se separó por filtración en caliente, la producción de precipitado se encontraba dentro del intervalo 6-7,0%, con un contenido de rebaudiósido A y rebaudiósido D del 52-53,0% y el 43-45,0% (figura 4B), respectivamente.

Para la purificación adicional, el precipitado se suspendió en etanol al 50% en una proporción de 1:2 p/v y a 30-40ºC, preferentemente 33-37ºC, y se mantuvo con agitación durante 2-15 horas, preferentemente 10-12 horas. La suspensión se filtró y se secó. El rendimiento de precipitado con un contenido de aproximadamente el 15-17,0% de rebaudiósido A y el 80-82% de rebaudiósido D estuvo comprendido dentro del intervalo 42-46,0%. En principio, en esta etapa se pueden aplicar hasta cinco volúmenes de etanol acuoso. La concentración de etanol puede estar comprendida dentro del intervalo 10-80%, preferentemente dentro del intervalo 45-52%.

El precipitado se sometió a un tratamiento parecido. El precipitado se separó por filtración, se lavó con aproximadamente dos volúmenes de metanol anhidro y se secó. En esta etapa puede utilizarse cualquier tipo de equipo que permita la separación del precipitado del líquido, tal como diversos tipos de centrífugas o sistemas de filtración. Diferentes tipos de secador, tales como un secador rotatorio de vacío, un secador de lecho fluido, un secador de túnel giratorio o un secador de placa, son adecuados para obtener rebaudiósido D purificado en forma de polvo.

La pureza del rebaudiósido D fue aproximadamente del 95-99% de contenido (figura 4C). El rendimiento del producto fue aproximadamente del 58-60%.

La solución combinada que queda tras el aislamiento del rebaudiósido D se mezcló con una pequeña cantidad de rebaudiósido A como iniciador de cristalización y se dejó cristalizar a 20-22ºC durante 20-24 horas. El contenido de rebaudiósido A en los cristales estaba comprendido dentro del intervalo 97,7-99,4%.

La solución restante de la primera precipitación se puede utilizar para el aislamiento del rebaudiósido A o para obtener una mezcla altamente purificada de glucósidos de esteviol.

El rebaudiósido D de pureza elevada obtenido en la presente invención tiene un peso molecular de 1.129,15, una fórmula molecular $C_{50}H_{80}O_{28}$ y la estructura que se muestra en la figura 2, y se presenta en forma de polvo blanco e inodoro. El compuesto es aproximadamente 180-200 veces más dulce que el azúcar si se compara con una solución de sacarosa al 10%. En la figura 6 se muestra el espectro de absorción de infrarrojos. El rebaudiósido D presenta un máximo de absorción característico a aproximadamente 1.730 cm^{-1}. Otras propiedades del rebaudiósido D puro son las siguientes:

Punto de fusión: 248-249ºC

Rotación específica: $[\alpha]_D^{25}$: -29,5º en etanol al 50% (C = 1,0).

La solubilidad en agua es aproximadamente del 0,2% y aumenta con el aumento de la temperatura. Vuelve a precipitar al enfriarse la solución. Muy soluble durante la etapa de separación cromatográfica y antes de la cristalización.

Soluble en soluciones diluidas de metanol, etanol, n-propanol e isopropanol.

Insoluble en acetona, benceno, cloroformo y éter.

El rebaudiósido D obtenido en la presente invención es estable térmicamente y en cuanto al pH.

El rebaudiósido D obtenido según la presente invención se puede incorporar como edulcorante natural de alta intensidad en productos alimenticios, bebidas, composiciones farmacéuticas, cosméticos, gomas de mascar, productos de mesa, cereales, productos lácteos, pastas de dientes y otras composiciones para la cavidad bucal, etc. Los ejemplos siguientes muestran proporciones representativas que pueden aplicarse.

Además, el rebaudiósido D se puede utilizar como edulcorante no sólo para bebidas, productos alimenticios y otros productos destinados al consumo humano, sino también en alimentos para animales y forraje con características mejoradas.

Durante la elaboración de productos alimenticios, bebidas, productos farmacéuticos, cosméticos, productos de mesa, gomas de mascar, etc., se pueden aplicar métodos convencionales, como mezclado, amasado, disolución, decapado, permeación, percolación, aspersión, atomización, infusión y otros.

El edulcorante obtenido en la presente invención se puede utilizar en forma seca o líquida. Se puede añadir antes o después del tratamiento térmico de los productos alimenticios. La cantidad de edulcorante depende de la aplicación final. Se puede añadir solo o combinado con otros compuestos.

En una forma de realización particular de la presente invención el rebaudiósido D se puede utilizar, como compuesto edulcorante, como único edulcorante, o bien se puede utilizar junto con otros edulcorantes naturales de alta intensidad.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “edulcorantes naturales de alta intensidad” se refiere a cualquier composición que se encuentre en la naturaleza y tenga un poder edulcorante superior a la sacarosa, la fructosa o la glucosa.

Entre los ejemplos no limitativos de edulcorantes naturales de alta intensidad se incluyen esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido E, rebaudiósido F, esteviolbiósido, dulcósido A, rubusósido, mogrósidos, brazzeína, ácido glicirrícico y sus sales, taumatina, perillartina, pernandulcina, mucuroci ósidos, baiyunósido, flomisósido I, ácido dimetil-hexahidrofluoren-dicarboxílico, abrusósidos, periandrina, carnosiflósidos, ciclocariósidos, pterocariósidos, polipodósido A, brasilina, hernandulcina, filodulcina, glicifilina, floricina, trilobatina, dihidroflavonol, 3-acetato de dihidroquercetina, neoastilibina, trans-cinamaldehído, monatina y sus sales, selligueain A, hematoxilina, monelina, osladina, pterocariósido A, pterocariósido B, mabinlina, pentadina, miraculina, curculina, neoculina, ácido clorogénico, cinarina, edulcorante Luo Han Guo, siamenósido y similares, así como combinaciones de los mismos.

En otra forma de realización particular, el rebaudiósido D, como compuesto edulcorante, se puede utilizar junto con edulcorantes de alta intensidad sintéticos o artificiales.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “edulcorantes de alta intensidad sintéticos” o “artificiales” se refiere a cualquier composición que no se encuentre en la naturaleza y que presente un poder edulcorante mayor que el de la sacarosa, la fructosa o la glucosa.

Entre los ejemplos no limitativos de edulcorantes sintéticos o artificiales se incluyen sucralosa, acesulfamo potásico, aspartamo, alitamo, sacarina, derivados sintéticos de neohesperidina dihidrochalcona, ciclamato, neotamo, dulcina, suosán, éster 1-metílico de N-[N-[3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)propil]-L-α-aspartil]-L-fenilalanina, éster 1-metílico de N-[N-[3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-3-metilbutil]-L-α-aspartil]-L-fenilalanina, éster 1-metílico de N-[N-[3-(3-metoxi-4-hidroxifenil)propil]-L-α-aspartil]-L-fenilalanina, sales de los mismos y similares, así como combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el rebaudiósido D se puede utilizar en combinación con inhibidores naturales del dulzor, tales como ácido gimnémico, hodulcina, zizifina, lactisol y similares.

En otra forma de realización, el rebaudiósido D se puede combinar con diversos potenciadores del sabor umami.

En una forma de realización particular, el rebaudiósido D se puede formular con aminoácidos, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, ácido aspártico, arginina, glicina, ácido glutámico, prolina, treonina, teanina, cisteína, cistina, alanina, valina, tirosina, leucina, isoleucina, asparagina, serina, lisina, histidina, ornitina, metionina, carnitina, ácido aminobutírico (isómeros alfa, beta o gamma), glutamina, hidroxiprolina, taurina, norvalina, sarcosina y sus sales, tales como sales de sodio o de potasio, o sales de ácido. Los aditivos aminoácidos también pueden presentarse en la configuración D o L, y en forma de monómero, dímero o trímero del mismo aminoácido o de aminoácidos diferentes. Además, los aminoácidos pueden ser isómeros α, β, γ, δ y ε, si resulta apropiado. También son aditivos adecuados las combinaciones de los aminoácidos anteriores y sus correspondientes sales (por ejemplo, las sales

de sodio, potasio, calcio o magnesio, u otras sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de los mismos, o sales de ácido). Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos. Los aminoácidos también pueden ser modificados. El término aminoácido modificado se refiere a cualquier aminoácido en el que se ha añadido, eliminado o sustituido, como mínimo, un átomo, o combinaciones de estas modificaciones (por ejemplo, un N-alquil-aminoácido, un N-acil-aminoácido o un N-metil-aminoácido). Entre los ejemplos no limitativos de aminoácidos modificados se incluyen derivados de aminoácidos tales como trimetilglicina, N-metilglicina y N-metilalanina. Tal como se utiliza en el presente documento, el término aminoácido comprende aminoácidos tanto modificados como no modificados. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término aminoácido modificado también puede comprender péptidos y polipéptidos (por ejemplo, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y pentapéptidos), tales como el glutatión y la L-alanil-L-glutamina.

En una forma de realización particular, el rebaudiósido D se puede formular con aditivos poliaminoácidos, incluidos el ácido poli-L-aspártico, la poli-L-lisina (por ejemplo, la poli-L-α-lisina o la poli-L-ε-lisina), la poli-L-ornitina (por ejemplo, la poli-L-α-ornitina o la poli-L-ε-ornitina), la poli-L-arginina, otras formas poliméricas de aminoácidos y sales de los mismos (por ejemplo, sales de magnesio, calcio, potasio o sodio, tal como la sal monosódica del ácido L-glutámico). Los aditivos poliaminoácidos también pueden presentarse en la configuración D o L. Además, los poliaminoácidos pueden ser isómeros α, β, γ, δ y ε, si resulta apropiado. También son aditivos mejoradores del dulzor adecuados en las formas de realización de la presente invención las combinaciones de los poliaminoácidos anteriores y sus correspondientes sales (por ejemplo, las sales de sodio, potasio, calcio o magnesio, u otras sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de los mismos, o sales de ácido). Los poliaminoácidos que se describen en el presente documento también pueden comprender copolímeros de diferentes aminoácidos. Los poliaminoácidos pueden ser naturales o sintéticos. Los poliaminoácidos también pueden ser modificados, de tal manera que en los mismos se ha añadido, eliminado o sustituido, como mínimo, un átomo, o combinaciones de estas modificaciones (por ejemplo, un N-alquil-poliaminoácido o un N-acil-poliaminoácido). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término poliaminoácido comprende poliaminoácidos tanto modificados como no modificados. Según formas de realización particulares, entre los poliaminoácidos modificados se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, poliaminoácidos de varios pesos moleculares (PM), tales como poli-L-α-lisina con un PM de 1.500, un PM de 6.000, un PM de 25.200, un PM de 63.000, un PM de 83.000 o un PM de 300.000.

En otra forma de realización particular, el rebaudiósido D se puede combinar con polioles o alcoholes de azúcar. El término “poliol” se refiere a una molécula que contiene más de un grupo hidroxilo. Un poliol puede ser un diol, un triol o un tetraol, que contienen respectivamente 2, 3 y 4 grupos hidroxilo. Un poliol también puede contener más de cuatro grupos hidroxilo, tales como un pentaol, un hexaol, un heptaol o similares, que contienen respectivamente 5, 6 o 7 grupos hidroxilo. Además, un poliol también puede ser un alcohol de azúcar, un alcohol polihídrico o un polialcohol, que es una forma reducida de hidrato de carbono, en el que el grupo carbonilo (aldehído o cetona, azúcar reductor) se ha reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario.

Entre los ejemplos no limitativos de polioles se incluyen eritritol, maltitol, manitol, sorbitol, lactitol, xilitol, inositol, isomalta, propilenglicol, glicerol, treitol, galactitol, isomaltulosa hidrogenada, isomaltooligosacáridos reducidos, xilooligosacáridos reducidos, gentiooligosacáridos reducidos, jarabe de maltosa reducida, jarabe de glucosa reducida, hidrolizados de almidón hidrogenado, poliglicitoles y alcoholes de azúcar, o cualquier otro hidrato de carbono capaz de reducirse y que no afecte negativamente al sabor de la composición edulcorante, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización particular, el rebaudiósido D se puede combinar con edulcorantes bajos en calorías, tales como D-tagatosa, azúcares L, L-sorbosa, L-arabinosa y otros, y combinaciones de los mismos.

En otra forma de realización particular, el rebaudiósido D se puede combinar con diversos hidratos de carbono. Generalmente, el término “hidrato de carbono” se refiere a compuestos de aldehído o cetona sustituidos con múltiples grupos hidroxilo, de fórmula general $(CH_2O)_n$, donde “n” es un número comprendido entre 3 y 30, así como sus oligómeros y polímeros. Los hidratos de carbono de la presente invención pueden, además, estar sustituidos o desoxigenados en una o más posiciones. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término hidrato de carbono comprende hidratos de carbono no modificados, derivados de hidratos de carbono, hidratos de carbono sustituidos e hidratos de carbono modificados. Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “derivados de hidratos de carbono”, “hidratos de carbono sustituidos” e “hidratos de carbono modificados” son sinónimos. Hidrato de carbono modificado se refiere a cualquier hidrato de carbono en el que se ha añadido, eliminado o sustituido, como mínimo, un átomo, o combinaciones de estas modificaciones. Así, entre los derivados de los hidratos de carbono o los hidratos de carbono sustituidos se incluyen monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos sustituidos y no sustituidos. Los derivados de hidratos de carbono o hidratos de carbono sustituidos pueden estar desoxigenados, opcionalmente, en cualquier posición de C correspondiente, y/o sustituirse con uno o más restos, tales como hidrógeno, halógeno, haloalquilo, carboxilo, acilo, aciloxi, amino, amido, derivados de carboxilo, alquilamino, dialquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, sulfo, mercapto, imino, sulfonilo, sulfenilo, sulfinilo, sulfamoílo, carboalcoxi, carboxamido, fosfonilo, fosfinilo, fosforilo, fosfino, tioéster, tioéter, oximino, hidrazino, carbamilo, fosfato, fosfonato o cualquier otro grupo funcional viable, siempre que el derivado de hidrato de carbono o hidrato de carbono sustituido mejore el sabor dulce de la composición edulcorante.

Entre los ejemplos no limitativos de hidratos de carbono en las formas de realización de la presente invención se incluyen tagatosa, trehalosa, galactosa, ramnosa, diversas ciclodextrinas, oligosacáridos cíclicos, diversos tipos de maltodextrinas, dextrano, sacarosa, glucosa, ribulosa, fructosa, treosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, manosa, idosa, lactosa, maltosa, azúcar invertido, isotrehalosa, neotrehalosa, isomaltulosa, eritrosa, desoxirribosa, gulosa, idosa, talosa, eritrulosa, xilulosa, psicosa, turanosa, celobiosa, amilopectina, glucosamina, manosamina, fucosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, gluconolactona, abecuosa, galactosamina, oligosacáridos de remolacha, isomaltooligosacáridos (isomaltosa, isomaltotriosa, panosa y similares), xilooligosacáridos (xilotriosa, xilobiosa y similares), oligosacáridos terminados en xilosa, gentiooligosacáridos (gentiobiosa, gentiotriosa, gentiotetraosa y similares), sorbosa, nigerooligosacáridos, oligosacáridos de palatinosa, fructooligosacáridos (kestosa, nistosa y similares), maltotetraol, maltotriol, maltooligosacáridos (maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa y similares), almidón, inulina, inulooligosacáridos, lactulosa, melibiosa, rafinosa, ribosa, azúcares líquidos isomerizados, tal como jarabes de maíz con alto contenido de fructosa, azúcares de acoplamiento y oligosacáridos de soja. Además, en la presente invención, los hidratos de carbono pueden presentarse en su configuración D o L. En las formulaciones, se puede utilizar cualquier combinación de los compuestos.

En una forma de realización particular, el rebaudiósido D se puede formular con azúcares ácidos, entre los que se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, ácido aldónico, urónico, aldárico, algínico, glucónico, glucurónico, glucárico, galactárico, galacturónico y sus sales (por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio u otras sales fisiológicamente aceptables), y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización particular, el rebaudiósido D se puede utilizar en combinación con diferentes sustancias fisiológicamente activas o ingredientes funcionales. En general, los ingredientes funcionales se clasifican en categorías tales como carotenoides, fibra dietética, ácidos grasos, saponinas, antioxidantes, alimentos funcionales, flavonoides, isotiocianatos, fenoles, esteroles y estanoles vegetales (fitoesteroles y fitoestanoles); polioles; prebióticos, probióticos; fitoestrógenos; proteína de soja; sulfuros/tioles; aminoácidos; proteínas; vitaminas; y minerales. Los ingredientes funcionales también se pueden clasificar en función de los beneficios que aportan a la salud, tales como beneficios cardiovasculares, reducción del colesterol o propiedades antiinflamatorias.

La composición con rebaudiósido D puede incluir un agente aromatizante, que puede ser de origen natural o artificial. Tal como se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, el término “aromatizante” se refiere a cualquier material apto para la alimentación que puede añadirse a las presentes composiciones a fin de proporcionar un sabor deseado a un producto alimenticio. Entre los aromatizantes útiles en la presente invención se incluyen, por ejemplo, un aceite esencial, tal como un aceite derivado de una planta o un fruto, aceite de menta piperita, aceite de hierbabuena, otros aceites de menta, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de gaulteria, laurel, tomillo, hojas de cedro, nuez moscada, pimienta de Jamaica, salvia, macis y almendras. El agente aromatizante puede ser un extracto vegetal o una esencia de fruta, tal como manzana, plátano, sandía, pera, melocotón, uva, fresa, frambuesa, cereza, ciruela, piña, albaricoque y mezclas de los mismos. El agente aromatizante puede ser un aromatizante cítrico, tal como extracto, esencia o aceite de limón, lima, naranja, mandarina, pomelo, cidro o kumquat. Entre los aromatizantes útiles en la presente invención también se pueden incluir la crema de leche, la avellana, la vainilla, el chocolate, la canela, la nuez de pacana, el limón, la lima, la frambuesa, el melocotón, el mango, la vainillina; la mantequilla, el *butterscotch*, el té, la naranja, la mandarina, el caramelo, la fresa, el plátano, la uva, la ciruela, la cereza, el arándano, la piña, las bayas de saúco, la sandía, el chicle, el melón francés, la guayaba, el kiwi, la papaya, el coco, la menta, la hierbabuena y derivados y combinaciones de los mismos.

La composición que presenta rebaudiósido D puede incluir un componente aromático. Tal como se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, el término “componente aromático” se refiere a cualquier sustancia volátil apta para la alimentación que se puede utilizar para producir un perfume deseado, por ejemplo, cuando se mezcla con un producto alimenticio. Entre los aromas útiles en la presente invención se incluyen, por ejemplo, los aceites esenciales (aceite de cítricos), los aceites exprimidos (aceite de naranja), los aceites destilados (aceite de rosa), los extractos (frutas), el anetol (regaliz, semillas de anís, ouzo, hinojo), el anisol (semillas de anís), el benzaldehído (mazapán, almendra), el alcohol bencílico (mazapán, almendra), el alcanfor (*Cinnamomum camphora*), el cinamaldehído (canela), el citral (aceite de citronela, aceite de limón), el d-limoneno (naranja), el butanoato de etilo (piña), el eugenol (aceite de clavo), el furaneol (fresa), el furfural (caramelo), el linalol (cilantro, palo de rosa), el mentol (menta), el butanoato de metilo (manzana, piña), el salicilato de metilo (aceite de gaulteria), el neral (flores de azahar), la nerolina (flores de azahar), el butanoato de pentilo (pera, albaricoque), el pentanoato de pentilo (manzana, piña), el sotolon (jarabe de arce, curry, alholva), la cetona de fresa (fresa), las pirazinas sustituidas, por ejemplo, la 2-etoxi-3-isopropilpirazina; la 2-metoxi-3-sec-butilpirazina; y la 2-metoxi-3-metilpirazina (semillas tostadas de alholva, comino y cilantro), la tuyona (enebro, salvia común, ciprés Nootka y ajenjo), el timol (alcanforado), la trimetilamina (pescado), la vainilla (vainilla) y combinaciones de los mismos. Entre los componentes aromáticos preferentes según la presente invención se incluyen aceites esenciales (aceites de cítricos), aceites exprimidos (aceite de naranja), aceites destilados (aceite de rosa), extractos (frutas), benzaldehído, d-limoneno, furfural, mentol, butanoato de metilo, butanoato de pentilo, así como sales, derivados y combinaciones de los mismos.

Las composiciones con rebaudiósido D pueden comprender un aditivo de tipo nucleótido para su utilización en formas de realización según la presente invención. Entre estos aditivos se incluyen, aunque no se limitan a los

mismos, monofosfato de inosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de adenosina, monofosfato de citosina, monofosfato de uracilo, difosfato de inosina, difosfato de guanosina, difosfato de adenosina, difosfato de citosina, difosfato de uracilo, trifosfato de inosina, trifosfato de guanosina, trifosfato de adenosina, trifosfato de citosina, trifosfato de uracilo, y sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de los mismos, y combinaciones de los mismos. Los nucleótidos descritos en el presente documento también pueden comprender aditivos relacionados con los nucleótidos, tales como nucleósidos o bases de ácidos nucleicos (por ejemplo, guanina, citosina, adenina, timina, uracilo).

Las composiciones con rebaudiósido D pueden comprender un aditivo de tipo ácido orgánico. Los ácidos orgánicos son compuestos que comprenden un resto -COOH. Entre los aditivos de tipo ácido orgánico adecuados para su utilización en formas de realización según la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, ácidos carboxílicos C2-C30, ácidos hidroxicarboxílicos C1-C30 sustituidos, ácido benzoico, ácidos benzoicos sustituidos (por ejemplo, ácido 2,4-dihidroxibenzoico), ácidos cinámicos sustituidos, hidroxiácidos, ácidos hidroxibenzoicos sustituidos, ácidos ciclohexilcarboxílicos sustituidos, ácido tánico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido glucoheptónico, ácido adípico, ácido hidroxicítrico, ácido málico, ácido frutárico (una mezcla de ácido málico, fumárico y tartárico), ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido clorogénico, ácido salicílico, creatina, clorhidrato de glucosamina, delta-gluconolactona, ácido cafeico, ácidos biliares, ácido acético, ácido ascórbico, ácido algínico, ácido eritórbico, ácido poliglutámico y derivados de sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de los mismos. Además, los aditivos de tipo ácido orgánico también se pueden presentar en su configuración D o L.

Las composiciones con rebaudiósido D pueden comprender un aditivo de tipo sal de ácido orgánico. Entre estos aditivos se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, sales de sodio, calcio, potasio y magnesio de todos los ácidos orgánicos, tales como sales de ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido láctico (por ejemplo, lactato de sodio), ácido algínico (por ejemplo, alginato de sodio), ácido ascórbico (por ejemplo, ascorbato de sodio), ácido benzoico (por ejemplo, benzoato de sodio o benzoato de potasio) y ácido adípico. Los ejemplos de aditivos de tipo sal de ácido orgánico mejoradores del sabor dulce que se han descrito pueden estar sustituidos, opcionalmente, con uno o más de los restos siguientes, que se seleccionan dentro del grupo que comprende hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, halo, haloalquilo, carboxilo, acilo, aciloxi, amino, amido, derivados carboxílicos, alquilamino, dialquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, sulfo, tiol, imina, sulfonilo, sulfenilo, sulfinilo, sulfamilo, carboxialcoxi, carboxiamido, fosfonilo, fosfinilo, fosforilo, fosfino, tioéster, tioéter, anhídrido, oximino, hidrazino, carbamilo, fosfo, fosfonato y cualquier otro grupo funcional viable, siempre y cuando el aditivo de tipo sal de ácido orgánico sustituido mejore el sabor dulce de la composición edulcorante.

Las composiciones con rebaudiósido D pueden comprender un aditivo de tipo ácido inorgánico para su utilización en formas de realización de la presente invención. Entre dichos aditivos se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, ácido fosfórico, ácido fosforoso, ácido polifosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido carbónico, dihidrogenofosfato de sodio y sus correspondientes sales de metales alcalinos o alcalinotérreos (por ejemplo, sal de calcio y magnesio de hexafosfato de inositol).

Las composiciones con rebaudiósido D pueden comprender un aditivo de tipo compuesto amargo para su utilización en formas de realización de la presente invención; entre estos aditivos se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, cafeína, quinina, urea, aceite de naranja amarga, naringina, cuasia y sales de los mismos.

Las composiciones con rebaudiósido D pueden comprender un potenciador natural o artificial del dulzor y combinaciones de dichos potenciadores.

La formulación de rebaudiósido D puede incluir aditivos de tipo polímero para su utilización en formas de realización de la presente invención; entre estos aditivos se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, quitosano, pectina, ácido péctico, pectínico, poliurónico o poligalacturónico, almidón, hidrocoloide alimenticio o extractos crudos del mismo (por ejemplo, goma de acacia Senegal (Fibergum™), goma de acacia seyal, carragenina), poli-L-lisina (por ejemplo, poli-L-α-lisina o poli-L-ε-lisina), poli-L-ornitina (por ejemplo, poli-L-α-ornitina o poli-L-ε-ornitina), poliarginina, polipropilenglicol, polietilenglicol, poli(éter metílico de etilenglicol), ácido poliaspártico, ácido poliglutámico, polietilenimina, ácido algínico, alginato de sodio, alginato de propilenglicol, hexametafosfato de sodio (SHMP) y sus sales, y polietilenglicolalginato de sodio y otros polímeros catiónicos y aniónicos.

La formulación de rebaudiósido D puede incluir aditivos de tipo proteína o hidrolizado de proteína para su utilización en formas de realización de la presente invención; entre estos aditivos se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, seroalbúmina bovina, proteínas de suero lácteo (incluidas fracciones o concentrados de las mismas, tales como aislado de proteínas de suero lácteo instantáneo al 90%, proteínas de suero lácteo al 34%, proteínas de suero lácteo hidrolizado al 50%, y concentrado de proteínas de suero lácteo al 80%), proteína de arroz soluble, proteína de soja, aislados de proteínas, hidrolizados de proteínas, productos de reacción de hidrolizados de proteínas, glucoproteínas y/o proteoglicanos que contienen aminoácidos (por ejemplo, glicina, alanina, serina, treonina, asparagina, glutamina, arginina, valina, isoleucina, leucina, norvalina, metionina, prolina, tirosina, hidroxiprolina y similares), colágeno (por ejemplo, gelatina), colágeno parcialmente hidrolizado (por ejemplo, colágeno de pescado hidrolizado) e hidrolizados de colágeno (por ejemplo, hidrolizados de colágeno porcino).

La formulación de rebaudiósido D puede incluir aditivos de tipo tensioactivo para su utilización en formas de realización de la presente invención; entre estos aditivos se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, polisorbatos (por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietilenado (polisorbato 80), polisorbato 20, polisorbato 60), dodecilbencenosulfonato de sodio, sulfosuccinato de dioctilo o dioctilsulfosuccinato de sodio, dodecilsulfato de sodio, cloruro de cetilpiridinio (cloruro de hexadecilpiridinio), bromuro de hexadeciltrimetilamonio, colato de sodio, carbamoílo, cloruro de colina, glicocolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio, arginato láurico, estearoil lactilato de sodio, taurocolato de sodio, lecitinas, ésteres de oleato de sacarosa, ésteres de estearato de sacarosa, ésteres de palmitato de sacarosa, ésteres de laurato de sacarosa y otros emulsionantes, y similares.

La formulación de rebaudiósido D puede incluir aditivos de tipo flavonoide para su utilización en formas de realización de la presente invención; generalmente, se clasifican como flavonoles, flavonas, flavanonas, flavan-3-oles, isoflavonas o antocianidinas. Entre los ejemplos no limitativos de aditivos de tipo flavonoide se incluyen catequinas (por ejemplo, extractos de té verde), polifenoles, rutinas, neohesperidina, naringina, neohesperidina dihidrochalcona y similares.

La formulación puede incluir un aditivo de tipo alcohol para su utilización en formas de realización de la presente invención; entre estos aditivos se incluye el etanol, aunque no se limitan al mismo.

La formulación puede incluir aditivos de tipo compuesto astringente; entre estos aditivos se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, ácido tánico, cloruro de europio ($EuCl_3$), cloruro de gadolinio ($GdCl_3$), cloruro de terbio ($TbCl_3$), alumbre, ácido tánico y polifenoles (por ejemplo, polifenoles del té).

La formulación puede incluir una vitamina. Las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios en pequeñas cantidades para el funcionamiento normal del organismo humano. El organismo utiliza las vitaminas sin descomponerlas, a diferencia de lo que hace con otros nutrientes, como los hidratos de carbono y las proteínas. Entre las vitaminas para su utilización en formas de realización se incluyen, aunque no se limitan a las mismas, la vitamina A (retinol, retinaldehído, ácido retinoico, retinoides, retinal, ácido retinoico), la vitamina D (vitaminas D1-D5; colecalciferol, lumisterol, ergocalciferol, dihidrotaquisterol, 7-deshidrocolesterol), la vitamina E (eocoferol, tocotrienol), la vitamina K (filoquinona, naftoquinona), la vitamina B1 (tiamina), la vitamina B2 (riboflavina, vitamina G), la vitamina B3 (niacina, ácido nicotínico, vitamina PP), la vitamina B5 (ácido pantoténico), la vitamina B6 (piridoxina, piridoxal, piridoxamina), la vitamina B7 (biotina, vitamina H), la vitamina B9 (ácido fólico, folato, folacina, vitamina M, ácido pteroil-L-glutámico), la vitamina B12 (cobalamina, cianocobalamina) y la vitamina C (ácido ascórbico).

Algunas autoridades han clasificado diversos otros compuestos como vitaminas. Estos compuestos se pueden denominar pseudovitaminas, y entre los mismos se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, compuestos tales como ubiquinona (coenzima Q10), ácido pangámico, dimetilglicina, laetril, amigdalina, flavonoides, ácido para-aminobenzoico, adenina, ácido adenílico y S-metilmetionina. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término vitamina incluye las pseudovitaminas.

La formulación con rebaudiósido D puede incluir una fibra dietética. La fibra dietética, también conocida como alimento voluminoso o forraje basto, es la parte de los alimentos resistente a la hidrólisis por parte de las enzimas digestivas humanas, y generalmente comprende la parte no digerible del material vegetal, que atraviesa el sistema digestivo y estimula el peristaltismo intestinal.

Numerosos hidratos de carbono poliméricos, con estructuras significativamente diferentes tanto en su composición como en sus enlaces, entran dentro de la definición de fibra dietética. Estos compuestos son bien conocidos por los expertos en la materia, y entre los ejemplos no limitativos de los mismos se incluyen polisacáridos no amiláceos, lignina, celulosa, metilcelulosa, hemicelulosas, β-glucanos, pectinas, gomas, mucílago, ceras, inulina, oligosacáridos, fructooligosacáridos, ciclodextrinas, quitinas y combinaciones de los mismos.

Entre las fuentes alimenticias de la fibra dietética se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, granos, legumbres, frutas y verduras. Entre los granos que proporcionan fibra dietética se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, la avena, el centeno, la cebada y el trigo. Entre las legumbres que proporcionan fibra se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, los guisantes y las vainas como la soja. Entre las frutas y verduras que proporcionan una fuente de fibra se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, manzanas, naranjas, peras, plátanos, bayas, tomates, judías verdes, brócoli, coliflor, zanahorias, patatas o apio. Los alimentos vegetales, como el salvado, los frutos secos y las semillas (como las semillas de lino) también son fuentes de fibra dietética. Entre las partes de plantas que proporcionan fibra dietética se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, los tallos, las raíces, las hojas, las semillas, la pulpa y la piel.

Aunque por regla general la fibra dietética procede de fuentes vegetales, algunos productos no digeribles de origen animal, tales como las quitinas, también se clasifican como fibra dietética. La quitina es un polisacárido compuesto por unidades de acetilglucosamina unidas por enlaces β(1-4) parecidos a los enlaces de la celulosa.

La formulación que contiene rebaudiósido D puede comprender un antioxidante. Entre los ejemplos de antioxidantes adecuados para formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, vitaminas, cofactores vitamínicos, minerales, hormonas, carotenoides, terpenoides carotenoides, terpenoides no carotenoides, flavonoides, polifenoles flavonoides (por ejemplo, bioflavonoides), flavonoles, flavonas, fenoles, polifenoles, ésteres de fenoles, ésteres de polifenoles, compuestos fenólicos no flavonoides, isotiocianatos y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, entre los antioxidantes se pueden incluir vitamina A, vitamina C, vitamina E, ubiquinona, selenio mineral, manganeso, melatonina, α-caroteno, β-caroteno, licopeno, luteína, zeantina, cripoxantina, reservatol, eugenol, quercetina, catequina, gosipol, hesperetina, curcumina, ácido ferúlico, timol, hidroxitirosol, cúrcuma, tomillo, aceite de oliva, ácido lipoico, glutatinona, gulamina, ácido oxálico, compuestos derivados de tocoferol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido etilendiaminotetraacético, terc-butilhidroquinona, ácido acético, pectina, tocotrienol, tocoferol, coenzima Q10, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, saponinas, limonoides, kaempfedrol, miricetina, isorramnetina, proantocianidinas, quercetina, rutina, luteolina, apigenina, tangeritina, hesperetina, naringenina, erodictiol, flavan-3-oles (por ejemplo, antocianidinas), galocatequinas, epicatequina y sus formas de galato, epigalocatequina y sus formas de galato, teaflavina y sus formas de galato, terubiginas, isoflavonas, fitoestrógenos, genisteína, daidzeína, gliciteína, antocianinas, cianidinas, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina, ácido elágico, ácido gálico, ácido salicílico, ácido rosmarínico, ácido cinámico y sus derivados (por ejemplo, ácido ferúlico), ácido clorogénico, ácido chicórico, galotaninos, elagitaninos, antoxantinas, betacianinas y otros pigmentos vegetales, silimarina, ácido cítrico, lignanos, antinutrientes, bilirrubina, ácido úrico, ácido R-α-lipoico, N-acetilcisteína, emblicanina, extracto de manzana, extracto de piel de manzana (Applephenon), extracto de rooibos rojo, extracto de rooibos, extracto de baya de espino verde, extracto de frambuesa roja, antioxidante del café verde, extracto de aronia 20%, extracto de pepita de uva, extracto de cacao, extracto de lúpulo, extracto de mangostán, extracto de cáscara de mangostán, extracto de arándano rojo, extracto de granada, extracto de cáscara de granada, extracto de semilla de granada, extracto de baya de espino, extracto de granada Pomella, extracto de corteza de canela, extracto de piel de uva, extracto de arándano, extracto de corteza de pino, picnogenol, extracto de baya de saúco, extracto de raíz de morera, extracto de goji (gogi), extracto de mora, extracto de mirtillo, extracto de hojas de mirtillo, extracto de frambuesa, extracto de cúrcuma, bioflavonoides cítricos, grosella negra, jengibre, polvo de azaí, extracto de grano de café verde, extracto de té verde y ácido fítico, o combinaciones de los mismos. En formas de realización alternativas, el antioxidante puede comprender un antioxidante sintético, tal como hidroxitolueno butilado o hidroxianisol butilado, por ejemplo. Entre otras fuentes de antioxidantes adecuados para formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, frutas, verduras, té, cacao, chocolate, especias, hierbas, arroz, menudos del ganado, levadura, granos integrales o granos de cereales.

Algunos antioxidantes pertenecen a la clase de los fitonutrientes llamados polifenoles (también conocidos como “polifenoles”), que son un grupo de sustancias químicas que se encuentra en las plantas y caracterizado por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Los polifenoles pueden aportar diversos beneficios para la salud, incluidos la prevención del cáncer, las enfermedades cardíacas y la enfermedad inflamatoria crónica, así como la mejora de las fuerzas mental y física, por ejemplo. Entre los polifenoles adecuados para las formas de realización de la presente invención se incluyen catequinas, proantocianidinas, procianidinas, antocianinas, quercetina, rutina, reservatrol, isoflavonas, curcumina, punicalagina, elagitanino, hesperidina, naringina, flavonoides cítricos, ácido clorogénico, otros materiales parecidos y combinaciones de los mismos.

Entre las fuentes adecuadas de catequinas para las formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, té verde, té blanco, té negro, té oolong, chocolate, cacao, vino tinto, pepita de uva, piel de uva roja, piel de uva morada, jugo de uva roja, jugo de uva morada, bayas, picnogenol y piel de manzana roja. Entre las fuentes adecuadas de antioxidantes como las proantocianidinas y las procianidinas para formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, uvas rojas, uvas moradas, cacao, chocolate, pepitas de uva, vino tinto, granos de cacao, arándano rojo, piel de manzana, ciruela, mirtillo, grosellas negras, *Aronia melanocarpa*, té verde, sorgo, canela, cebada, habichuela roja, judía pinta, lúpulo, almendras, avellanas, nueces de pacana, pistacho, picnogenol y bayas de colores. Entre las fuentes adecuadas de antocianinas para las formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, bayas rojas, mirtillo, arándano, arándano rojo, frambuesa, cereza, granada, fresa, saúco, *Aronia melanocarpa*, piel de uva roja, piel de uva morada, pepita de uva, vino tinto, grosella negra, grosella roja, cacao, ciruela, piel de manzana, melocotón, pera roja, col lombarda, cebolla roja, naranja roja y mora. Entre las fuentes adecuadas de quercetina y rutina para las formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, manzanas rojas, cebollas, berza, arándano de los pantanos, arándano rojo, *Aronia melanocarpa*, arándano, mora, mirtillo, fresa, frambuesa, grosella negra, té verde, té negro, ciruela, albaricoque, perejil, puerro, brócoli, guindilla, vino de bayas y ginkgo. Entre las fuentes adecuadas de resveratrol para las formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, uva roja, cacahuete, arándano rojo, mirtillo, arándano, morera, té Itadori japonés y vino tinto. Entre las fuentes adecuadas de isoflavonas para las formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, granos de soja, productos de soja, legumbres, brotes de alfalfa, garbanzos, cacahuetes y trébol común. Entre las fuentes adecuadas de curcumina para las formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, cúrcuma y mostaza. Entre las fuentes adecuadas de punicalagina y elagitanino para las formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, granada, frambuesa, fresa, nuez, vino tinto envejecido en roble. Entre las fuentes adecuadas de flavonoides cítricos, tales como la hesperidina

o la naringina, para las formas de realización de la presente invención, se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, naranjas, pomelos y zumos de cítricos. Entre las fuentes adecuadas de ácido clorogénico para las formas de realización de la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, café verde, hierba mate, vino tinto, pepita de uva, piel de uva roja, piel de uva morada, jugo de uva roja, jugo de uva morada, jugo de manzana, arándano rojo, granada, mirtillo, fresa, girasol, *Echinacea*, picnogenol y piel de manzana.

La composición de rebaudiósido D puede incluir ácidos grasos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ácido graso" se refiere a cualquier ácido monocarboxílico de cadena lineal e incluye ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos de cadena media, ácidos grasos de cadena corta, precursores de ácidos grasos (incluidos los precursores de ácidos grasos omega 9) y ácidos grasos esterificados. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ácido graso poliinsaturado de cadena larga" se refiere a cualquier ácido carboxílico poliinsaturado o ácido orgánico con una cola alifática larga. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ácido graso omega 3" se refiere a cualquier ácido graso poliinsaturado con un primer doble enlace como tercer enlace carbono-carbono desde el extremo metilo terminal de su cadena de carbono. En las formas de realización particulares, el ácido graso omega 3 puede comprender un ácido graso omega 3 de cadena larga. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ácido graso omega 6" se refiere a cualquier ácido graso poliinsaturado con un primer doble enlace como sexto enlace carbono-carbono desde el extremo metilo terminal de su cadena de carbono.

La composición con rebaudiósido D puede incluir una sal. El término "sal" se refiere también a complejos que conservan la actividad química deseada para las composiciones mejoradoras del sabor dulce según la presente invención y son seguras para el consumo humano o animal en un margen generalmente aceptable. También se pueden preparar sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio o potasio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio o magnesio). Las sales también pueden incluir combinaciones de metales alcalinos y alcalinotérreos. Son ejemplos no limitativos de dichas sales: (a) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos y sales formadas con ácidos orgánicos; (b) sales de adición de base formadas con cationes metálicos, tales como calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio y similares, o con un catión formado a partir del amoniaco, N,N-dibenciletilendiamina, D-glucosamina, tetraetilamonio o etilendiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b). Así, cualquier forma de sal, que puede derivarse de las composiciones mejoradoras del sabor dulce, se puede utilizar en las formas de realización de la presente invención, siempre que las sales de los aditivos mejoradores del sabor dulce no afecten negativamente al sabor de las composiciones edulcorantes, que comprenden, como mínimo, un edulcorante de alta intensidad natural y/o sintético. Las formas de sal de los aditivos se pueden añadir a la composición edulcorante natural y/o sintética en las mismas cantidades que su forma ácida o básica.

En las formas de realización particulares, entre las sales inorgánicas adecuadas útiles en las formas de realización se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, citrato de potasio, cloruro de europio ($EuCl_3$), cloruro de gadolinio ($GdCl_3$), cloruro de terbio ($TbCl_3$), sulfato de magnesio, alumbre, cloruro de magnesio, sales mono, di o tribásicas de sodio o potasio del ácido fosfórico (por ejemplo, fosfatos inorgánicos), sales de ácido clorhídrico (por ejemplo, cloruros inorgánicos), carbonato de sodio, bisulfato de sodio y bicarbonato de sodio. Además, en las formas de realización particulares, entre las sales orgánicas adecuadas útiles como aditivos mejoradores del sabor dulce se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, cloruro de colina, sal sódica del ácido algínico (alginato sódico), sal sódica del ácido glucoheptónico, sal sódica del ácido glucónico (gluconato de sodio), sal de potasio del ácido glucónico (gluconato de potasio), clorhidrato de guanidina, clorhidrato de glucosamina, clorhidrato de amilorida, glutamato monosódico, sal de monofosfato de adenosina, gluconato de magnesio, tartrato de potasio (monohidrato) y tartrato de sodio (dihidrato).

La composición de rebaudiósido D que se obtiene según la presente invención se puede aplicar como edulcorante de alta intensidad para producir bebidas y productos alimenticios sin calorías, bajos en calorías o para diabéticos, con características de sabor mejoradas. También se puede utilizar en bebidas, productos alimenticios, productos farmacéuticos y otros productos en los que no se puede utilizar el azúcar.

Además, la composición de rebaudiósido D se puede utilizar como edulcorante no sólo para bebidas, productos alimenticios y otros productos destinados al consumo humano, sino también en alimentos y forraje para animales con características mejoradas.

Los ejemplos de productos en los que las composiciones de rebaudiósido D se pueden utilizar como compuesto edulcorante pueden ser bebidas alcohólicas como el vodka, el vino, la cerveza, el licor, el sake, etc., zumos naturales, bebidas refrescantes, refrescos carbonatados, bebidas light, bebidas sin calorías, bebidas y alimentos bajos en calorías, yogur para beber, zumos instantáneos, café instantáneo, bebidas instantáneas en polvo, productos enlatados, jarabes, pasta de soja fermentada, salsa de soja, vinagre, aliños, mayonesas, ketchups, curry, sopa, caldo instantáneo, salsa de soja en polvo, vinagre en polvo, algunos tipos de galletas, galletas de arroz, galletas saladas, pan, chocolatinas, caramelo, caramelos, chicles, gelatinas, postres dulces tipo flan, frutas y verduras en conserva, crema de leche, confitura, mermelada, glaseados, leche en polvo, helados, sorbetes, verduras y frutas embotelladas, judías cocidas y enlatadas, carne y alimentos cocidos en salsa edulcorada, productos alimenticios vegetales agrícolas, marisco, jamón, salchichas, jamón de pescado, salchichas de pescado,

pasta de pescado, productos de pescado fritos, marisco seco, alimentos congelados, algas marinas en conserva, carne en conserva, tabaco, productos medicinales y muchos otros. En principio, puede tener aplicaciones ilimitadas.

Entre las composiciones edulcoradas se incluyen bebidas, entre cuyos ejemplos se incluyen bebidas no carbonatadas y carbonatadas, tales como refrescos de cola, *ginger ale*, zarzaparrillas, sidras, refrescos con sabor a fruta (por ejemplo, refrescos con sabor a cítricos, tales como lima-limón o naranja), refrescos en polvo y similares; zumos de frutas procedentes de frutas u hortalizas, zumos de frutas que incluyen zumos exprimidos o similares, zumos de frutas que contienen partículas de fruta, bebidas de fruta, bebidas de zumos de fruta, bebidas que contienen zumos de fruta, bebidas con sabores de frutas, zumos de hortalizas, zumos que contienen hortalizas y zumos mixtos que contienen frutas y hortalizas; bebidas deportivas, bebidas energéticas, aguas aromatizadas y bebidas similares (por ejemplo, agua con aromatizantes naturales o sintéticos); bebidas de tipo té o bebidas de entretenimiento como café, cacao, té negro, té verde, té oolong y similares; bebidas que contienen componentes lácteos, tales como bebidas de leche, café con componentes lácteos, café con leche, té con leche, batidos de leche con fruta, yogur para beber, bebidas de bacterias lácticas o similares; y productos lácteos.

Habitualmente, la cantidad de edulcorante presente en una composición edulcorada varía ampliamente en función del tipo concreto de composición edulcorada y del dulzor que se desea darle. Los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente la cantidad adecuada de edulcorante que debe incorporarse en la composición edulcorada.

En la descripción detallada, sólo se muestran y describen a título ilustrativo algunas formas de realización a título de ejemplo de la presente invención. Como apreciarán los expertos en la materia, la presente invención se puede realizar de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las formas de realización expuestas en la presente memoria.

El edulcorante obtenido en la presente invención se puede utilizar en forma seca o líquida. Se puede añadir antes o después del tratamiento térmico de los productos alimenticios. La cantidad de edulcorante depende de la aplicación final. Se puede añadir solo o en combinación con otros compuestos.

Durante la elaboración de productos alimenticios, bebidas, productos farmacéuticos, cosméticos, productos de mesa, gomas de mascar, etc., se pueden aplicar métodos convencionales, como mezclado, amasado, disolución, decapado, permeación, percolación, aspersión, atomización, infusión y otros.

Así, las composiciones según la presente invención se pueden preparar por cualquier método conocido por los expertos en la materia que proporcione mezclas uniformes u homogéneas de los ingredientes. Estos métodos incluyen el mezclado en seco, el secado por pulverización, la aglomeración, la granulación en húmedo, la compactación, la cocristalización y similares.

En forma sólida, la composición edulcorante según la presente invención se puede proporcionar a los consumidores en cualquier forma adecuada para su incorporación al producto comestible que se desee endulzar, incluidos sobres, paquetes, sacos o cajas a granel, cubos, comprimidos, nebulizadores o tiras solubles. La composición se puede suministrar como dosis unitaria o a granel.

Para los sistemas y composiciones edulcorantes líquidos, se puede inventar la gama conveniente de formas líquidas, semilíquidas, pastosas o cremosas, el embalaje apropiado con el material de embalaje apropiado, en cualquier forma o modalidad, de modo que resulte conveniente para trasladar o distribuir o almacenar o transportar cualquier combinación que contenga cualquiera de los productos edulcorantes anteriores o combinación de productos producidos anteriormente.

Los estudios llevados a cabo han puesto de manifiesto que la combinación de rebaudiósido D con otros glucósidos de esteviol, edulcorantes de alta intensidad naturales y edulcorantes artificiales de alta intensidad produce una composición edulcorante con un perfil de sabor mejorado.

Se combinaron rebaudiósido D y otros edulcorantes de alta intensidad en diversas mezclas en las que la contribución del rebaudiósido D en el dulzor de la composición estaba comprendido entre el 10% y el 90%.

Cuanto mayor era el contenido de rebaudiósido D en la mezcla, más considerable era el efecto de la mejora.

La composición puede incluir diversos incrementadores del volumen, ingredientes funcionales, colorantes o aromas.

Los siguientes ejemplos ilustran las formas de realización preferidas de la presente invención para el aislamiento y la purificación del rebaudiósido D y compuestos relacionados, y la utilización de los mismos en productos alimenticios y farmacéuticos. Debe apreciarse que la invención no se limita a los materiales, proporciones, condiciones y procedimientos descritos en los ejemplos, que son únicamente ilustrativos.

Ejemplo 1

Purificación del rebaudiósido D

Se disolvió 1 kg de extracto de *Stevia*, que contenía extracto de *Stevia* que contenía esteviósido (25,40%), rebaudiósido A (59,14%), rebaudiósido C (9,71%),Rebaudiósido D (2,03%), rebaudiósido B (0,56%), rebaudiósido E (0,68%), rebaudiósido F (1,02%), esteviolbiósido (0,11%) y dulcósido (1,35%) en 3.000 ml de alcohol etílico al 95% y se mantuvo a 80ºC durante 35 min, y a continuación a 15ºC durante 12 horas con agitación. Cuando la temperatura alcanzó los 22ºC, se añadió un 1,0% de rebaudiósido A altamente purificado a la mezcla de reacción como iniciador de la cristalización.

El precipitado se separó por filtración y se lavó con aproximadamente dos volúmenes de etanol al 99,5%.

El rendimiento de material cristalino fue del 47,1%, con contenido de esteviósido (8,8%), rebaudiósido A (81,7%), rebaudiósido C (5,1%), rebaudiósido D (3,3%), rebaudiósido B (0,1%), rebaudiósido E (0,3%), rebaudiósido F (0,4%) y dulcósido A (0,3%).

La solución restante contiene esteviósido (40,2%), rebaudiósido A (39,1%), rebaudiósido C (13,8%), rebaudiósido D (0,9%), rebaudiósido B (1,0%), rebaudiósido E (1,0%), rebaudiósido F (1,6%), esteviolbiósido (0,2%) y dulcósido A (2,3%), y se puede utilizar para el aislamiento del rebaudiósido A o de una mezcla altamente purificada de glucósidos de esteviol.

El precipitado se mezcló con 3,5 volúmenes de etanol al 77,7% y se incubó a 50ºC durante 3 horas con agitación. A continuación, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado se separó por filtración. La producción de cristales fue aproximadamente del 14% y se obtuvieron 65,9 g de producto con contenido de esteviósido (1,4%), rebaudiósido A (72,8%), rebaudiósido C (1,5%), rebaudiósido D (21,4%), rebaudiósido B (0,1%), rebaudiósido E (2,1%) y rebaudiósido F (0,7%).

El contenido de los diversos glucósidos en el filtrado fue el siguiente: esteviósido (10,0%), rebaudiósido A (83,15%), rebaudiósido C (5,69%), rebaudiósido D (0,35%), rebaudiósido B (0,1%), rebaudiósido E (0,01%), rebaudiósido F (0,35%) y dulcósido A (0,35%).

Para la purificación adicional del rebaudiósido D, el precipitado se suspendió en etanol al 50% en una relación 1:2 p/v y se mantuvo durante 12 horas a 35ºC con agitación. La suspensión se filtró y el precipitado se secó. El rendimiento de precipitado fue aproximadamente del 23%, y dicho precipitado contenía: esteviósido (0,8%), rebaudiósido A (16,2%), rebaudiósido C (0,7%), rebaudiósido D (81,6%), rebaudiósido E (0,5%), y rebaudiósido F (0,2%). En esta etapa se obtuvieron aproximadamente 15,2 g de material seco.

El contenido de los diversos glucósidos en el filtrado obtenido fue el siguiente: esteviósido (1,6%), rebaudiósido A (89,7%), rebaudiósido C (1,7%), rebaudiósido D (3,4%), rebaudiósido B (0,1%), rebaudiósido E (2,6%) y rebaudiósido F (0,8%). Se combinó con el filtrado de la etapa anterior.

El precipitado se sometió a un tratamiento similar con solución de etanol al 50% a fin de obtener un producto con un contenido del 3,8% de rebaudiósido A y del 95,7% de rebaudiósido D. El producto también contenía esteviósido, rebaudiósido C y rebaudiósido F al 0,1% en cada caso, así como un 0,2% de rebaudiósido E. El rendimiento de este producto fue aproximadamente del 75% y se obtuvieron aproximadamente 11,4 g de cristales.

La cantidad de filtrado en esta etapa fue aproximadamente de 3,8 g, con un 39,3% y un 53,4% de rebaudiósido D y rebaudiósido A, respectivamente.

El rebaudiósido D obtenido se disolvió en 2 volúmenes de metanol al 30% y se trató con un 0,3% de carbón activado a 60ºC durante 30 min, y a continuación se sometió a filtración en caliente. El rebaudiósido D precipitó espontáneamente tras la filtración.

Los cristales se separaron por filtración y se secaron a 80ºC durante 12 horas. El rendimiento de precipitado fue aproximadamente de 8,8 g, y el mismo contenía un 98,4% de rebaudiósido D sobre sustancia seca.

Los filtrados de la segunda y la tercera etapas de precipitación combinados sumaron 455,8 g, y contenían: esteviósido (9,1%), rebaudiósido A (83,9%), rebaudiósido C (5,2%), rebaudiósido D (0,7%), rebaudiósido B (0,1%), rebaudiósido E (0,3%), rebaudiósido F (0,4%) y dulcósido A (0,3%). El precipitado se mezcló con un 1% de rebaudiósido A como iniciador y se dejó cristalizar a 22ºC durante 12 horas. Los cristales se separaron por filtración y se lavaron con aproximadamente dos volúmenes de etanol. El contenido de rebaudiósido A en los cristales fue del 98,8% sobre sustancia seca. Tras el secado, la cantidad fue de 273,5 g.

La pureza del rebaudiósido D se determinó mediante HPLC, que se llevó a cabo en una columna Zorbax NH_2 (150 x 4,6 mm, 5 µm) a una temperatura de 30ºC. La fase móvil comprendía una solución con el 20% de tampón (ácido

acético al 0,0125% y acetato de amonio al 0,0125%) y el 80% de acetonitrilo con un caudal de 1,0 ml/min. Se inyectaron 12 ml de cada muestra por duplicado y la muestra se analizó con un detector de UV a 210 nm (ancho de banda de 4 nm), con una referencia de 260 nm (ancho de banda de 100 nm). El análisis requirió un tiempo de ciclo de entre 40 y 60 min.

Se preparó una solución tampón de ácido acético al 0,0125% y acetato de amonio al 0,0125% disolviendo 0,125 g de acetato de amonio y 125 ml de ácido acético glacial en un litro de agua. El tiempo de retención del rebaudiósido B se ajustó variando la proporción de acetato de amonio con respecto a ácido acético, siempre manteniendo la proporción total de ambos combinados en el 0,025%. Al aumentar la cantidad de ácido acético disminuyó el tiempo de retención del rebaudiósido B.

Se preparó una solución de diluyente mezclando 500 ml de alcohol etílico y 500 ml de la solución tampón. Se prepararon patrones de rebaudiósido D diluyendo 10,0 ± 0,5 mg (redondeados al 0,1 mg más cercano) del patrón de rebaudiósido D con 4 ml de la solución de diluyente a fin de obtener una solución patrón de aproximadamente 2.500 mg/l. La solución patrón de rebaudiósido D se inyectó a razón de 10,8 µl, 11,4 µl, 12,6 µl y 13,2 µl. El contenido de humedad se midió mediante análisis de Karl Fischer cada vez que se preparó un patrón, y se realizaron las correcciones pertinentes sobre la base de la pureza del disolvente según el certificado de análisis.

Se prepararon patrones de esteviósido diluyendo 12,5 ± 0,5 mg (redondeados al 0,1 mg más cercano) del patrón de esteviósido con 5 ml de la solución de diluyente a fin de obtener una solución patrón de aproximadamente 2.500 mg/l de patrón (solución madre A) (con correcciones para la humedad y la pureza). A continuación, el patrón de esteviósido se diluyó con 1 ml de solución madre A frente a 10 ml de diluyente a fin de obtener un patrón de 250 mg/l (solución madre B), y los patrones madre se diluyeron hasta concentraciones finales comprendidas entre 2,5 mg/l y 50 mg/l.

Se prepararon muestras de las composiciones de rebaudiósido D diluyendo 125 ± 2 mg (redondeados al 0,1 mg más cercano) de la composición de rebaudiósido D con 50 ml de la solución de diluyente a fin de obtener una solución de muestra de aproximadamente 2.500 mg/l (con corrección para la humedad). Se inyectaron muestras por duplicado preparadas individualmente a razón de 12 ml. Si las muestras no se analizaron inmediatamente, se almacenaron sin espacio de cabeza, en atmósfera de nitrógeno y desecadas.

La tabla 11 presenta los tiempos de retención del rebaudiósido D y otros glucósidos de esteviol. Sin embargo, el experto en la materia apreciará que los tiempos de retención se pueden modificar según sea necesario.

Tabla 11

Compuesto	Tiempo de retención de HPLC, min
Esteviósido	5,4
Rebaudiósido A	7,8
Rebaudiósido B	28,6
Rebaudiósido C	6,0
Rebaudiósido D	15,7
Rebaudiósido E	10,7
Rebaudiósido F	6,4
Esteviolbiósido	17,7
Dulcósido A	4,5
Rubusósido	3,0

Ejemplo 2

Bebida de zumo de naranja baja en calorías

Se mezclaron 60 g de zumo de naranja concentrado con 1,1 g de ácido cítrico, 0,24 g de vitamina C, 1,0 g de esencia de naranja, 0,76 g de rebaudiósido D y agua a fin de obtener una mezcla homogéneamente disuelta en una cantidad total de 1.000 ml. A continuación la mezcla se pasteurizó durante 20 segundos a aproximadamente 95ºC a fin de preparar un zumo de naranja parecido al preparado por el método convencional. El producto tenía un perfil de sabor excelente.

Se pueden preparar zumos de otras frutas, como manzana, limón, albaricoque, cereza, piña, etc., con este mismo sistema.

Ejemplo 3

Helado

Se calentaron 1,50 kg de leche entera a 45ºC y se le añadieron 300 gramos de crema de leche, 100 gramos de tagatosa, 90 gramos de sorbitol, 6 gramos de carragenano como estabilizador, 3 gramos de polisorbato 80 como emulsionante y 1,0 gramo de rebaudiósido D, como en el ejemplo 10, tras lo cual se agitó hasta que los ingredientes se disolvieron completamente. A continuación, la mezcla se pasteurizó a una temperatura de 80ºC durante 25 segundos. Tras la homogeneización, las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4ºC durante 24 horas para completar el procedimiento de maduración. Se añadieron aroma de vainilla (1,0% del peso de la mezcla) y colorante (0,025% del peso de la mezcla) a la mezcla tras la maduración. A continuación, la mezcla se transfirió a una máquina de hacer helados para prepararlos automáticamente. Las muestras de los helados producidos se transfirieron a recipientes herméticos y se guardaron en el congelador a una temperatura de -18ºC.

La incorporación de edulcorantes no afecta a las propiedades fisicoquímicas del helado, ni tampoco a las características generales de color, suavidad, textura de superficie, cámara de aire, intensidad de aroma de vainilla, sabor de vainilla, textura de yeso, gelidez y velocidad de fusión.

Ejemplo 4

Yogur

Se disolvieron 0,8 gramos de rebaudiósido D de pureza elevada, preparado según la presente invención, en 1 kg de leche desgrasada. Tras llevar a cabo una pasteurización a 82ºC durante 20 minutos, la leche se enfrió a 40ºC. Se añadió un iniciador en una cantidad de 30 gramos y la mezcla se incubó a 37ºC durante 6 horas. A continuación, la masa fermentada se mantuvo a 10-15ºC durante 12 horas.

El producto es un yogur bajo en calorías y poco cariógeno, sin sabores ni olores extraños.

Ejemplo 5

Té helado con limón

La fórmula de esta bebida era la siguiente:

Ingredientes	Cantidad, %
Rebaudiósido D de pureza elevada	0,08
Benzoato de sodio	0,02
Ácido cítrico	0,27
Ácido ascórbico	0,01
Extracto de té	0,03
Aroma de limón	0,10
Agua	hasta 100

Se mezclaron todos los ingredientes, se disolvieron en el agua y se pasteurizaron. El producto posee un sabor y un aroma excelentes.

Ejemplo 6

Pan

Se introdujeron en el mezclador 1 kg de harina, 37,38 gramos de jarabe de fructooligosacáridos, 80 gramos de margarina, 20 gramos de sal, 20 gramos de levaduras y 0,25 gramos de rebaudiósido D de pureza elevada, obtenido según la presente invención, y se mezcló bien. Se incorporaron 600 ml de agua a la mezcla y la misma se amasó suficientemente. Tras el procedimiento de amasado, se dio forma a la masa y se dejó fermentar de 30 a 45 minutos. La masa preparada se introdujo en el horno y se coció durante 45 minutos. Las muestras de pan tenían un color blanco cremoso y una textura suave.

Ejemplo 7

Galleta de dieta

Se amasaron bien: harina, 50,0%; margarina, 30,0%; fructosa, 10,0%; maltitol, 8,0%; leche entera, 1,0%; sal, 0,2%; levadura en polvo, 0,15%; vainillina, 0,1%; rebaudiósido D, 0,55%, obtenido según la presente invención, en una amasadora. Tras colocar la masa en moldes, las galletas se hornearon a 200ºC durante 15 minutos.

El producto es una galleta de dieta baja en calorías, con un sabor excelente y un dulzor adecuado.

Ejemplo 8

Salsa de soja

Se añadieron 0,8 g de rebaudiósido D a 1.000 ml de salsa de soja y se mezcló hasta homogeneidad. El producto tenía un sabor y una textura excelentes.

Ejemplo 9

Pasta de dientes

Se preparó una pasta de dientes amasando una composición que comprendía: fosfato de calcio, 45,0%; carboximetilcelulosa, 1,5%; carragenano, 0,5%; glicerol, 18,0%; monoéster de polioxietileno sorbitán, 2,0%; beta-ciclodextrina, 1,5%; laurilsarcosinato de sodio, 0,2%; aromatizante, 1,0%; conservante, 0,1%; rebaudiósido D, obtenido según la presente invención, 0,2%; y agua hasta el 100%, del modo habitual. El producto posee una buena capacidad de formación de espuma y de limpieza, con un dulzor apropiado.

Ejemplo 10

Pastel

Se mezclaron 123 g de huevos de gallina, 45 g de azúcar, 345 g de sorbitol líquido, 2,0 g de éster de ácido graso de sacarosa y 0,35 g de rebaudiósido D con un 95% de pureza, con 100 g de harina de trigo y 200 g de agua, a fin de preparar un pastel según el método convencional. El producto tenía un sabor excelente y un dulzor óptimo.

Ejemplo 11

Bebida carbonatada baja en calorías

La fórmula de la bebida era la siguiente:

Ingredientes	Cantidad, %
Aroma de cola	0,340
Ácido fosfórico (85%)	0,100
Citrato de sodio	0,310
Benzoato de sodio	0,018
Ácido cítrico	0,018
Edulcorante	0,030
Agua carbonatada	hasta 100

Se dieron a probar las bebidas preparadas con diferentes edulcorantes a 10 jueces con el fin de que llevaran a cabo una comparación.

En la tabla 3 se indican los resultados.

Tabla 3

Aspecto comparado	Rebaudiósido D, 80,0%	Rebaudiósido D, 98,9%
Sabor amargo	3	0
Sabor astringente	3	0
Regusto	3	0
Calidad del dulzor	Dulce, cierto regusto amargo (5 de los 10 jueces)	Limpio (10 de los 10 jueces)
Evaluación global	Satisfactoria (8 de los 10 jueces)	Satisfactoria (10 de los 10 jueces)

Los resultados anteriores ponen de manifiesto que las bebidas preparadas con rebaudiósido D de pureza elevada poseen buenas características organolépticas.

Ejemplo 12

Chocolatina

Se amasó suficientemente una composición que contenía 30 kg de licor de cacao, 11,5 kg de manteca de cacao, 14

kg de leche en polvo, 44 kg de sorbitol, 0,1 kg de sal y 0,1 kg de rebaudiósido D de pureza elevada, y a continuación la mezcla se introdujo en un refinador durante 24 horas a fin de reducir el tamaño de partícula. Posteriormente, el contenido se transfirió a un conche, se añadieron 300 gramos de lecitina y la composición se amasó a 50ºC durante 48 horas. A continuación, el contenido se introdujo en un aparato de conformación y se solidificó.

Los productos obtenidos son chocolatinas poco cariógenas y bajas en calorías con una textura excelente. Además, el análisis organoléptico llevado a cabo por 20 evaluadores no reveló ningún regusto persistente. Los productos más deseables fueron los que contenían rebaudiósido D con una pureza, como mínimo, del 95%.

Ejemplo 13

Comprimidos de mesa

Se amasó suficientemente una mezcla que comprendía un 58,5% de lactosa, un 10% de silicato de calcio, un 5% de croscarmelosa, un 5% de L-leucina, un 1% de aerosol 200, un 0,5% de estearato de magnesio y un 20% de rebaudiósido D. A continuación, mediante una máquina de formación de comprimidos equipada con punzones de 6,2 mm de diámetro, se dio a la mezcla forma de comprimidos de 70 mg, 3,0 mm de espesor y 10 ± 1 kg de dureza

Estos comprimidos se pudieron administrar fácilmente gracias a su dulzor apropiado. Sin embargo, las formulaciones que comprendían rebaudiósido D de pureza baja eran algo pegajosas, con una solubilidad de aproximadamente 3-4 minutos en agua a 25ºC. Los comprimidos preparados con rebaudiósido D de pureza elevada mostraron las mejores características, con una solubilidad de aproximadamente 20-30 segundos.

Debe apreciarse que las descripciones anteriores y las formas de realización específicas expuestas en la presente memoria son únicamente ilustrativas del mejor modo de poner en práctica la presente invención y de los principios de la misma, y que los expertos en la materia pueden introducir fácilmente modificaciones y adiciones sin apartarse del espíritu y del alcance de la presente invención, que, de este modo, se entiende limitada únicamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

Kovylyaeva, G.I., Bakaleinik, G.A., Strobykina, I.Y., Gubskaya, V.I., Sharipova, R.R., Alfonsov, V.A., Kataev, V.E., y Tolstikov, A.G., 2007. Glycosides from *Stevia rebaudiana*. Chemistry of Natural Compounds, vol. 43, n.º 1, 81-85.

Kohda, H., Kasai, R., Yamazaki, K., Murakami, K., y Tanaka, O. 1976. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry, vol. 15, 981-983.

Starratt, A.N., Kirbi, C.W., Pocs, R., y Brandle J.E. 2002. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry, vol. 59, 367-370.

Kobayashi, M., Horikawa, S., Dergandi, I.H., Ueno, J., y Mitsuhashi, H. 1977. Dulcoside A and B, New diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry, vol. 16, 1405-1408.

Shi, R., Xu, M., Shi, Z., Fan, Y., Guo, X., Liu, Y., Wang, C., y He, B. 2002. Synthesis of bifunctional polymeric adsorbent and its application in purification of *Stevia* glycosides. Reactive & Functional Polymers, vol. 50, 107-116.

Chen, T., Zhang, Y., Liu, X., Shi, Z., Sun, J. y He, B. 1998. Science in China., vol. 41. n.º 4, 436-441.

Chen, T., Zhang, Y., Liu, X., Shi, Z., Sun, J. y He, B. 1999. Science in China., vol. 42. n.º 3, 277-282.

Fuh, W-S., Chiang, B-H. 1990. Purification of steviosides by membrane and ion exchange process. Journal of Food Science., vol. 55, n.º 5, 1454-1457.

Zhang, S.Q., Kumar, A., Kutowy, O. 2000. Membrane-based separation scheme for processing sweetener from *Stevia* leaves. Food Research International., vol. 33, 617-620.

Liu, Y., Yiming, C., Lining, W., y J.Jianhua. 1991. Study of stevioside preparation by membrane separation process. Desalination, vol. 83, 375-382.

Chen, T., Zhang, Y., Liu, X., y He, B. 1999. Studies on the adsorptive selectivity of the polar resin with carbonyl group on rebaudioside A. Acta Polymeric Scnica., n.º 4, 398-403.

Moraes, E., Machado., N.R. 2001. Clarification of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni extract by adsorption in modified zeolites. Acta Scientiarum, vol. 23, n.º 6, 1375-1380.

Montovaneli, I.C.C., Ferretti, E.C., Simxes, M.R., y C. Silva. 2004. The effect of temperature and flow rate on the clarification of the aqueous *Stevia*-extract in fixed-bed column with zeolites. Brazilian Journal of Chemical Engineering, vol. 21, n.º 3, 449-458.

Pol, J., Ostra, E.V., Karasek, P., Roth, M., Benesova, K., Kotlarikova, P., y J.Caslavsky. 2007, vol. 388, 1847-1857.

Bandna, V. J., Singh, B., y V. K.Kaul. 2009. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Phytochemical Analysis, vol. 20, 240-245.

Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S., y E.S.Ong. 2009. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. J.Sep.Sci, vol. 32, 613-622.

Yoda, S.K., Marques, M.O.M., Ademir J. Petenate, A.J., y M. A. Meireles. 2003. Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO_2 and CO_2+ water: extraction kinetics and identification of extracted components. Journal of Food Engineering, vol. 57, 125-134.

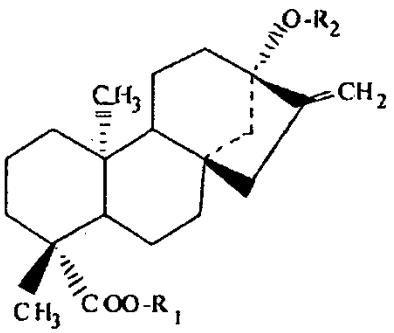
REIVINDICACIONES

1. Producto que comprende:

una composición edulcorante que comprende por lo menos 95% en peso en base seca de rebaudiósido D, en el que el producto es seleccionado de entre el grupo que consiste en alimento, bebida, composición farmacéutica, tabaco, producto nutricéutico, composición higiénica oral, o cosméticos.

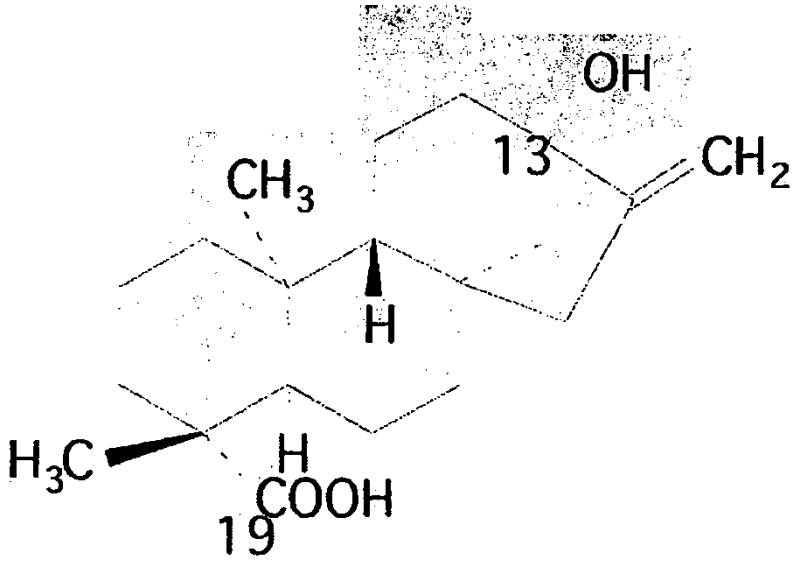
2. Producto según la reivindicación 1, en el que la composición edulcorante comprende además un ingrediente seleccionado de entre el grupo que consiste en:

un edulcorante de intensidad elevada natural, un edulcorante de intensidad elevada sintético o artificial, un supresor de dulzor natural, un potenciador de sabor umami, un aminoácido, un aditivo poliaminoácido, un poliol o alcohol de azúcar, un edulcorante de calorías reducidas, un hidrato de carbono, un azúcar ácido, un agente aromatizante, un componente de aroma, un aditivo nucleótido, un aditivo ácido orgánico, un aditivo sal de ácido orgánico, un aditivo sal de ácido inorgánico, un aditivo componente amargo, un potenciador de dulzor artificial o natural, un aditivo polímero, un aditivo proteína o hidrolizado de proteína, un aditivo tensioactivo, un aditivo flavonoide, un aditivo alcohol, un aditivo compuesto astringente, una vitamina, una fibra dietética, un antioxidante, un ácido graso, o una sal.

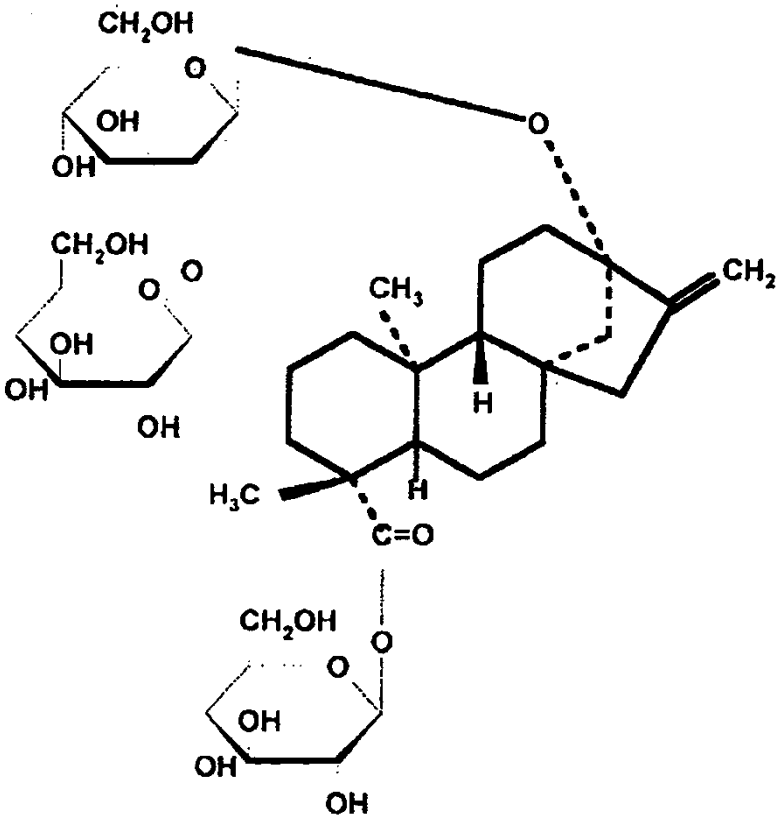


Nombre del compuesto	R_1 (C-19)	R_2 (C-13)
1. Esteviol	H	H
2. Steviolmonósido	H	β-Glc
3. Rubusósido	β-Glc	β-Glc
4. Steviolbiósido	H	β-Glc-β-Glc(2⇨1)
5. Estevíosido	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2⇨1)
6. Rebaudiósido A	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2⇨1) β-Glc(3⇨1)
7. Rebaudiósido B	H	β-Glc-β-Glc(2⇨1) β-Glc(3⇨1)
8. Rebaudiósido C (Dulcósido B)	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2⇨1) β-Glc(3⇨1)
9. Rebaudiósido D	β-Glc-β-Glc(2⇨1)	β-Glc-β-Glc(2⇨1) β-Glc(3⇨1)
10. Rebaudiósido E	β-Glc-β-Glc(2⇨1)	β-Glc-β-Glc(2⇨1)
11. Rebaudiósido F	β-Glc	β-Glc-β-Xyl(2⇨1) β-Glc(3⇨1)
12. Dulcósido A	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2⇨1)

FIG 1

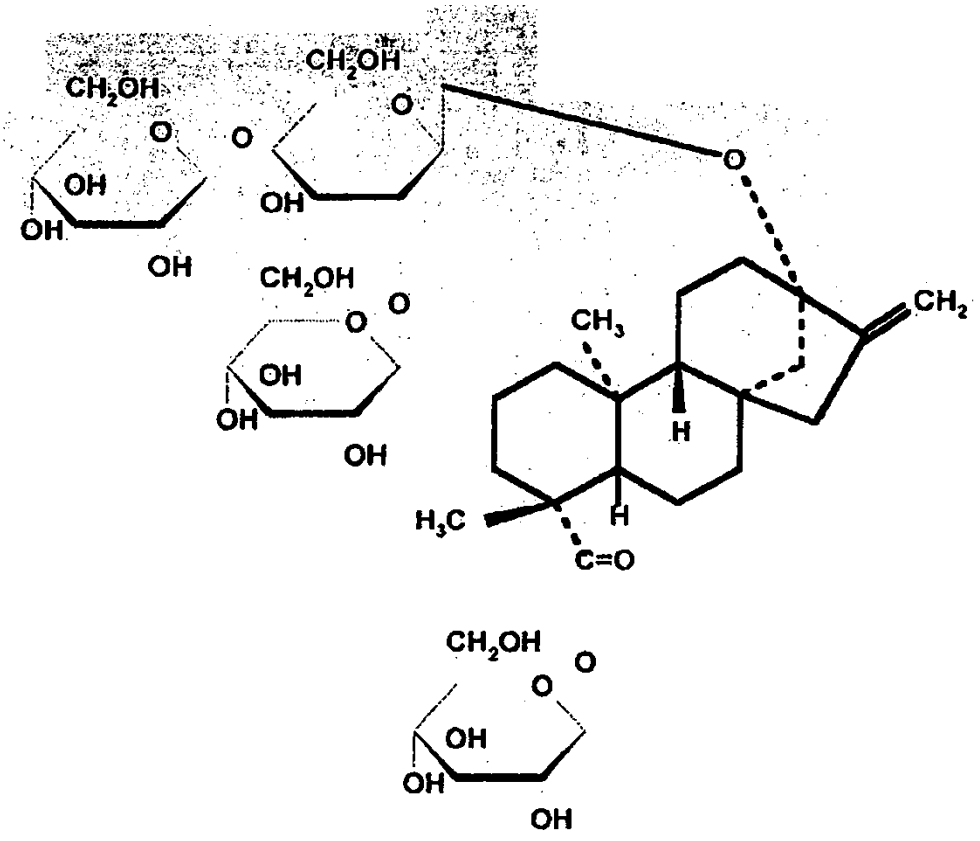


Esteviol

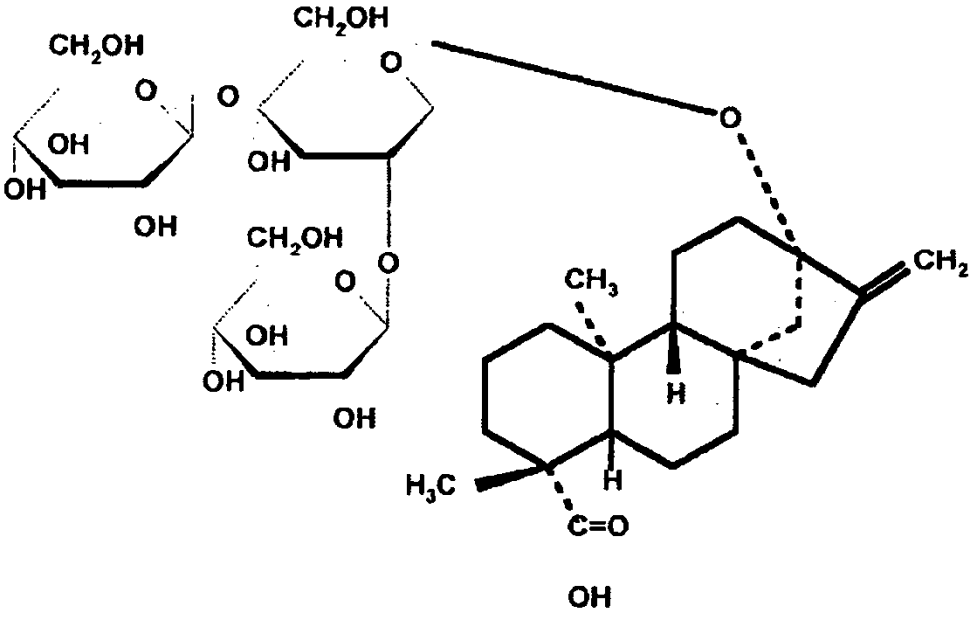


Estevi ósido

FIG 2

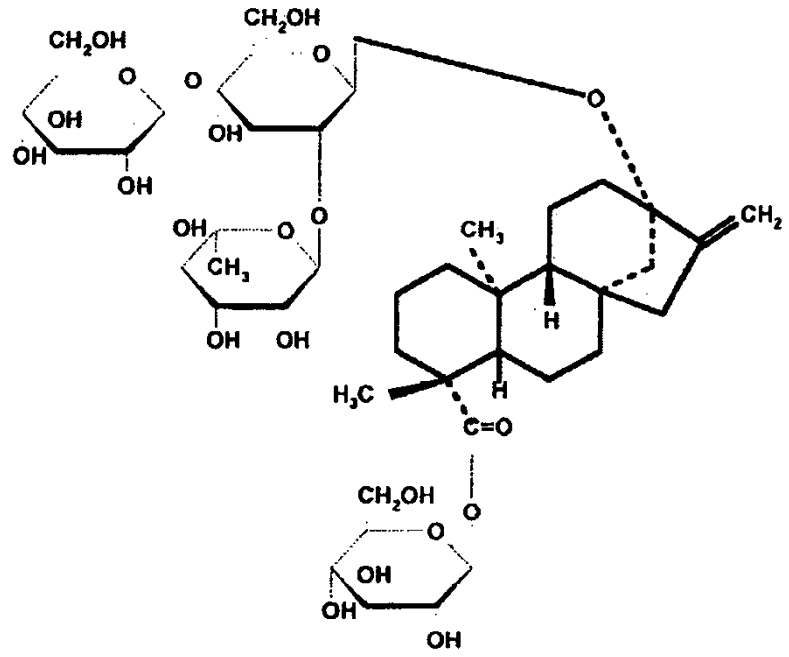


Rebaudiósido A

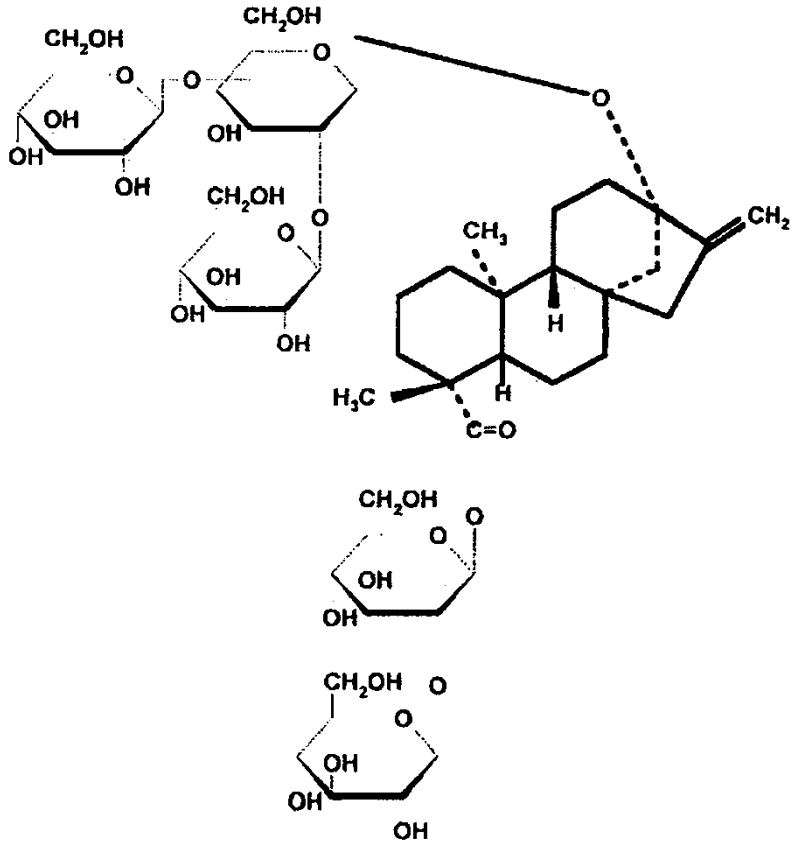


Rebaudiósido B

FIG 2(Continuación)

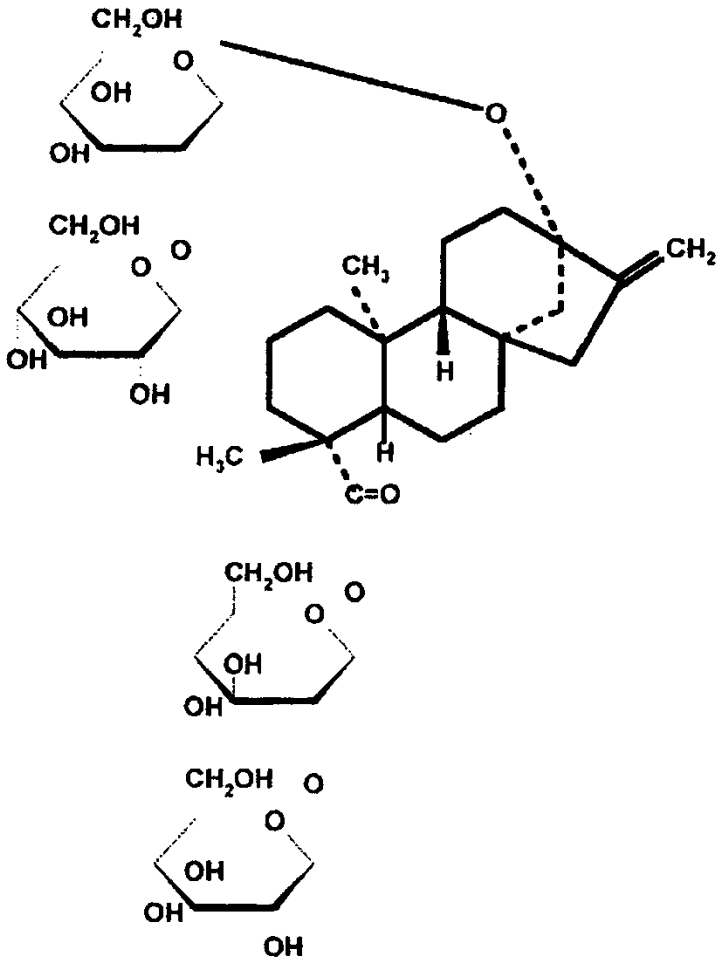


Rebaudiósido C



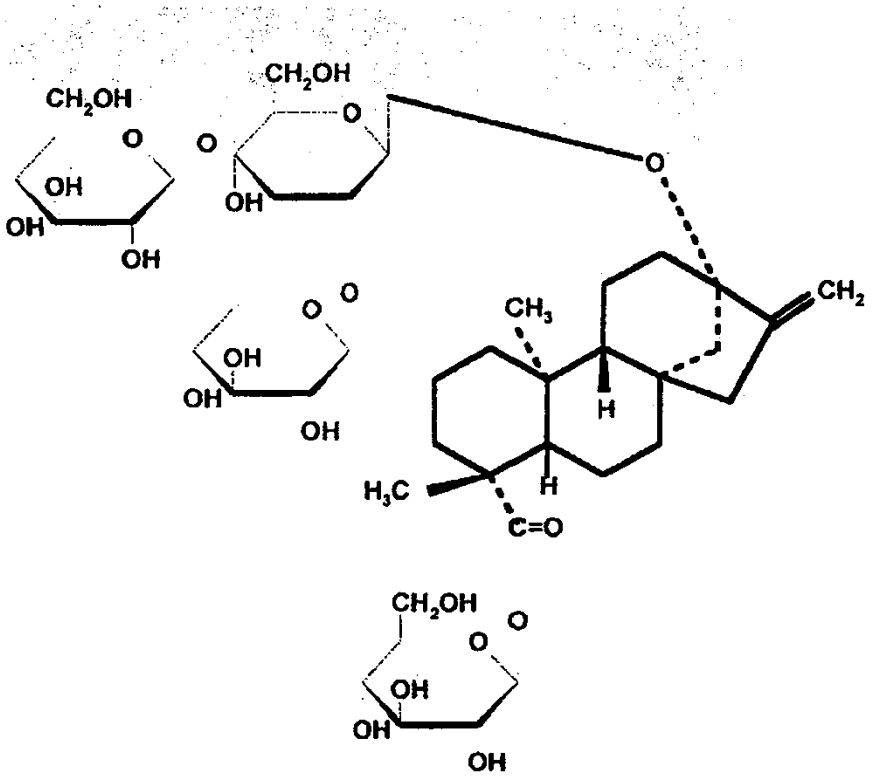
Rebaudiósido D

FIG 2 (Continuación)

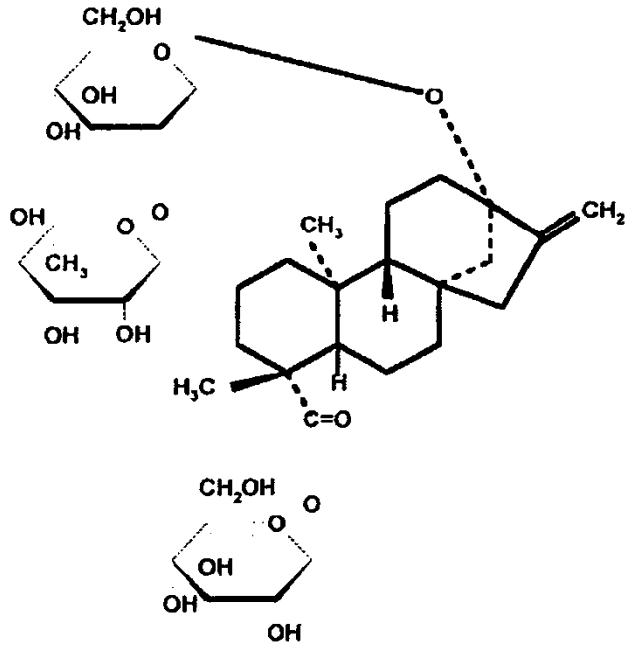


Rebaudiósido E

FIG 2 (Continuación)

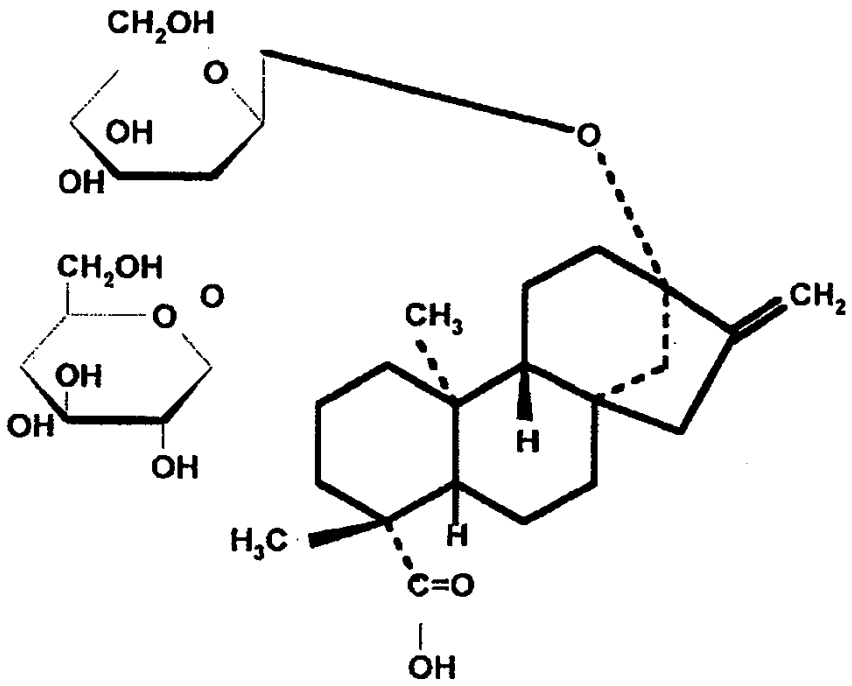


Rebaudiósido F

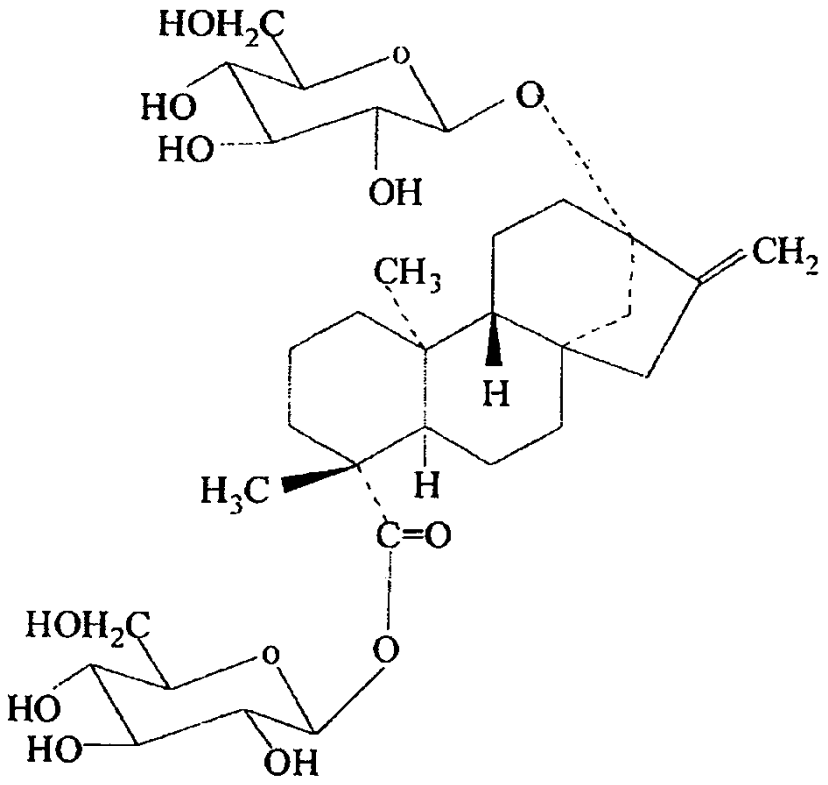


Dulcósido A

FIG 2 (Continuación)



Esteviolbiósido



Rubusósido

FIG 2 (Continuación)

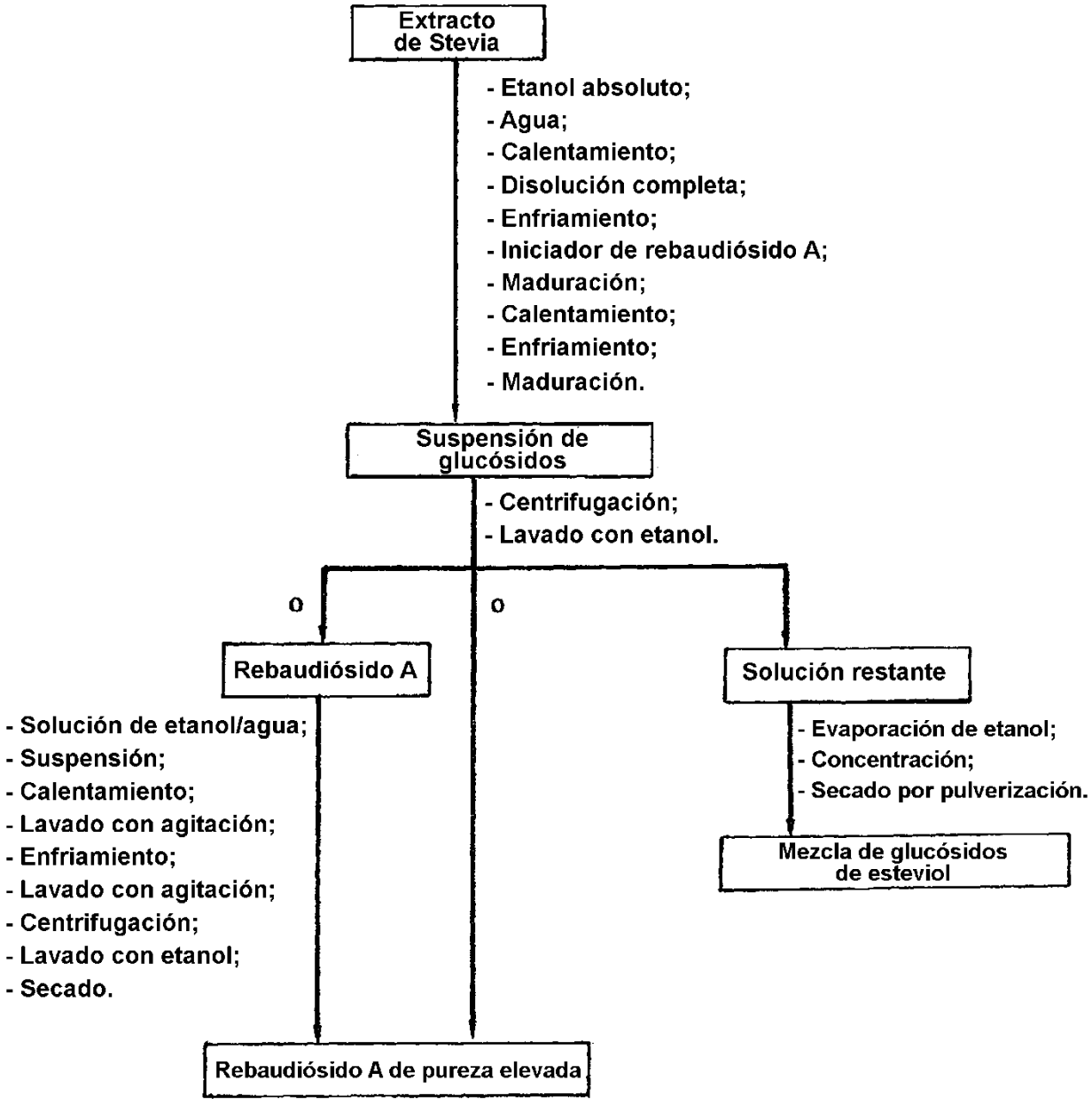

Extracto de Stevia
- Etanol absoluto;
- Agua;
- Calentamiento;
- Disolución completa;
- Enfriamiento;
- Iniciador de rebaudiósido A;
- Maduración;
- Calentamiento;
- Enfriamiento;
- Maduración.
Suspensión de glucósidos
- Centrifugación;
- Lavado con etanol.
o
o
Rebaudiósido A
- Solución de etanol/agua;
- Suspensión;
- Calentamiento;
- Lavado con agitación;
- Enfriamiento;
- Lavado con agitación;
- Centrifugación;
- Lavado con etanol;
- Secado.
Solución restante
- Evaporación de etanol;
- Concentración;
- Secado por pulverización.
Mezcla de glucósidos de esteviol
Rebaudiósido A de pureza elevada

FIG 3

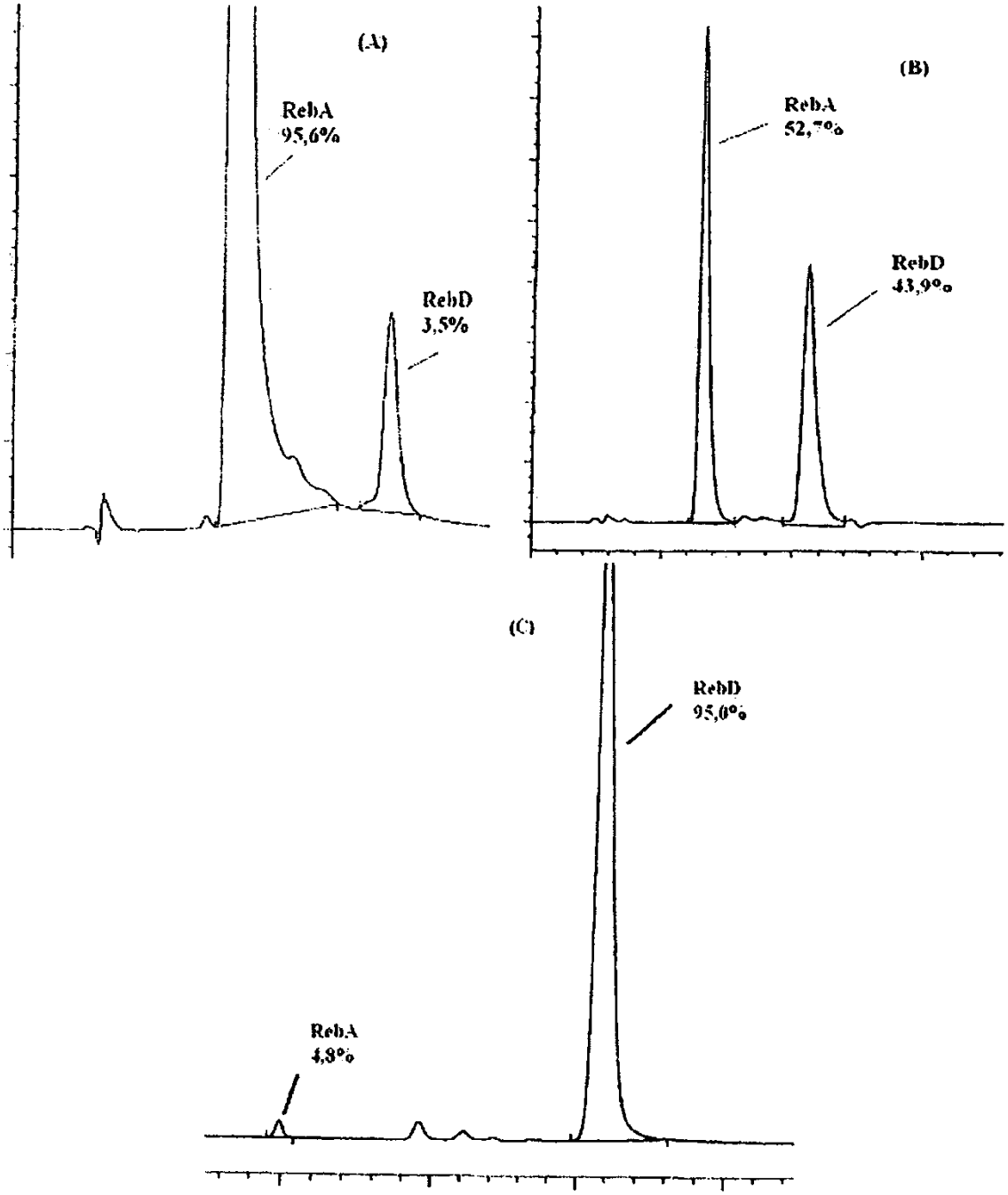


FIG 4

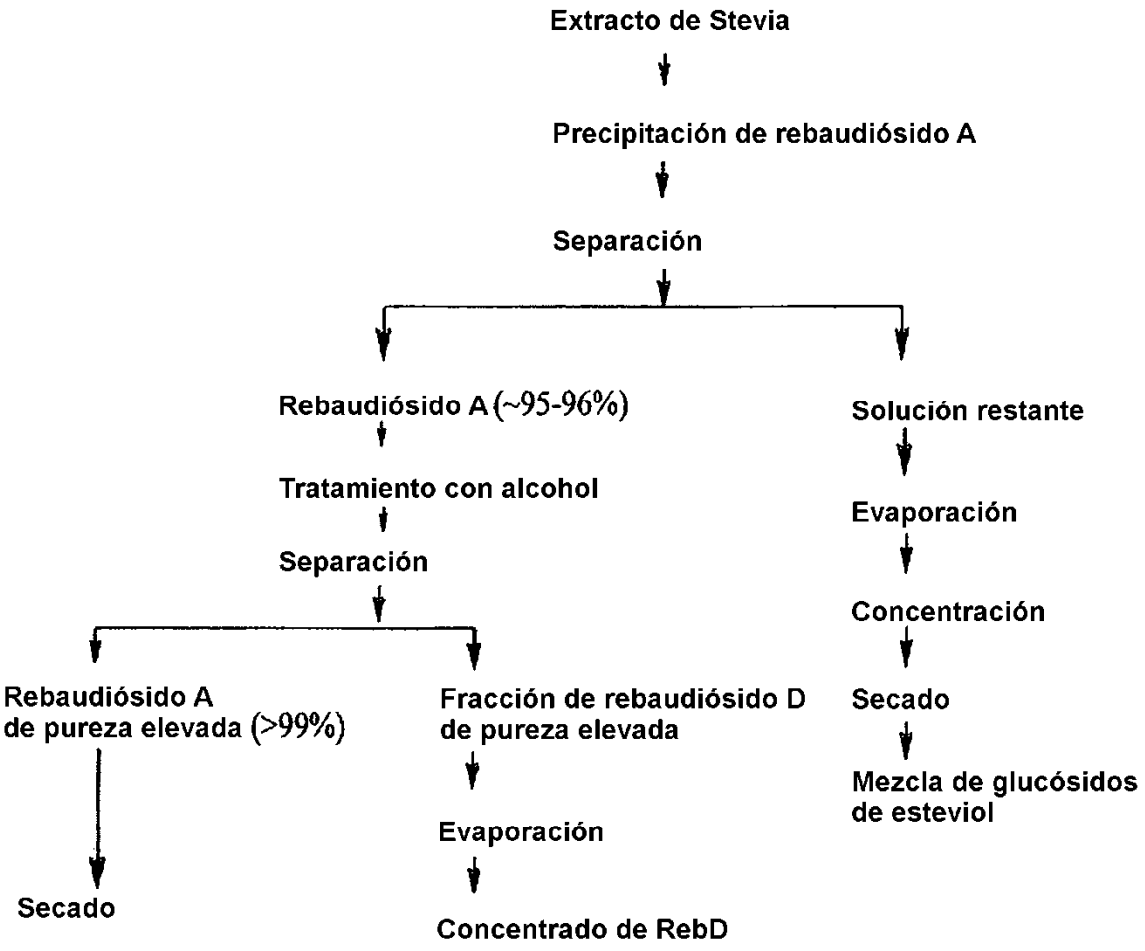

Extracto de Stevia
Precipitación de rebaudiósido A
Separación
Rebaudiósido A (~95-96%)
Tratamiento con alcohol
Separación
Rebaudiósido A de pureza elevada (>99%)
Secado
Fracción de rebaudiósido D de pureza elevada
Evaporación
Concentrado de RebD
Solución restante
Evaporación
Concentración
Secado
Mezcla de glucósidos de esteviol

FIG 5

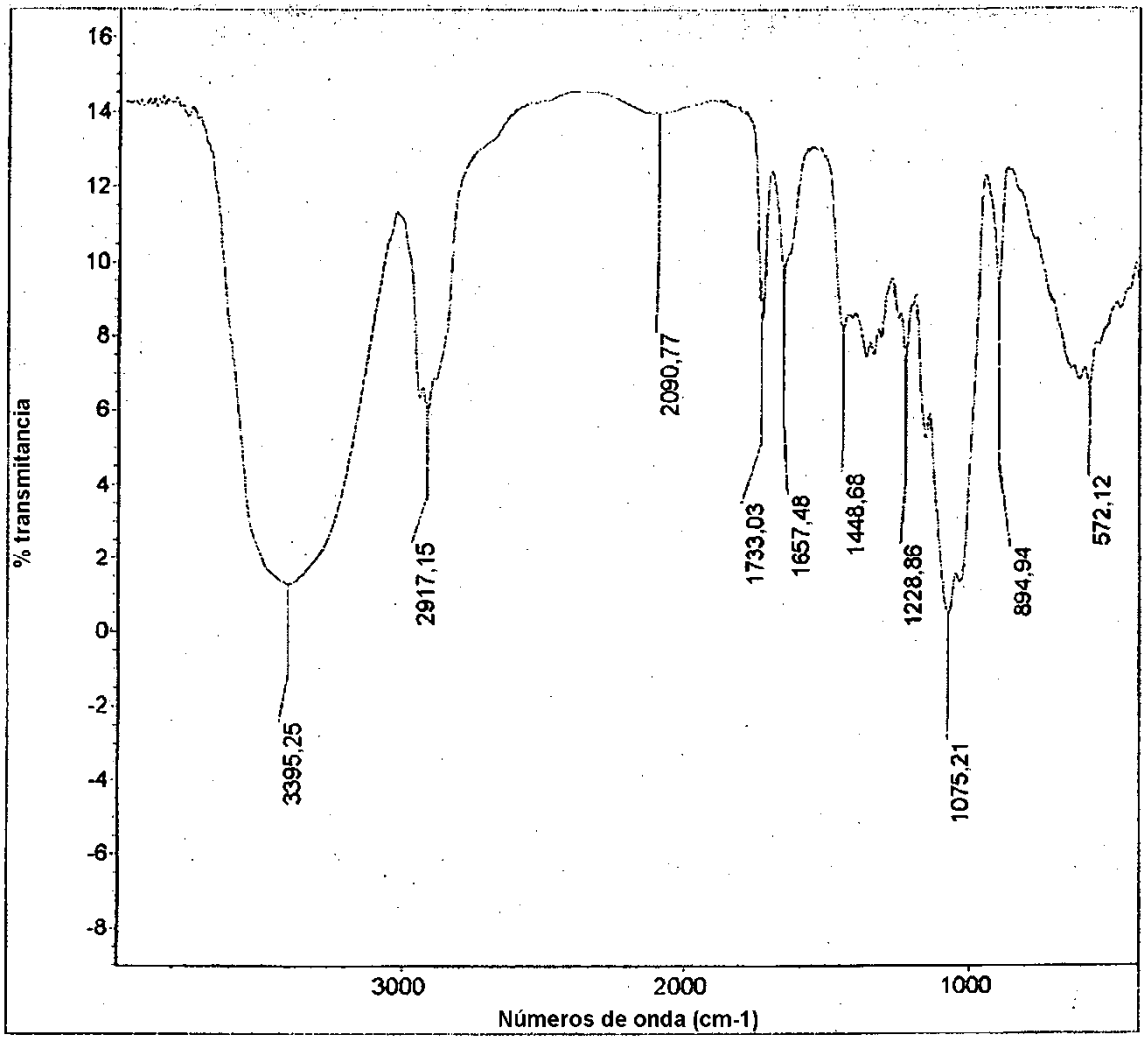

% transmitancia
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
3000
2000
1000
Números de onda (cm-1)
3395,25
2917,15
2090,77
1733,03
1657,48
1448,68
1228,86
1075,21
894,94
572,12

FIG 6