

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL**

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**ESTUDIO INICIAL DE LA INCORPORACIÓN DE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE ESTEVIA EN GOMINOLAS**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Alumna:

D^a. Mar Marzal Sarrión

Director académico:

Dra. Salut Botella Grau

Dra. Eva Doménech Antich

VALENCIA, Julio de 2015

Alumna: **D^a. Mar Marzal Sarrión**

Directoras académicas: Dra. Salut Botella Grau y Dra. Eva Doménech Antich

Valencia, julio 2015

ESTUDIO INICIAL DE LA INCORPORACIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ESTEVIA EN GOMINOLAS

En este trabajo se ha evaluado la incorporación de diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana* (estevia) en gominolas. Para ello se ha estudiado la contaminación inicial de las hojas de estevia y de un extracto líquido comercial de estevia utilizado como edulcorante, y su capacidad antimicrobiana frente al crecimiento de *Escherichia coli* 101 a 20 y 37 °C durante 6 días. La incorporación en gominolas de diferentes concentraciones (1 %, 2,5 % y 5 %) de la infusión de estevia se valoró organolépticamente. Los resultados muestran que existe un efecto antimicrobiano del extracto de la hoja desecada de la estevia sobre el crecimiento de *E. coli* en relación con el control (sin estevia). Sin embargo no se observó reducción del crecimiento con el extracto líquido comercial bajo las condiciones estudiadas, sino un leve aumento. Este hallazgo puede ser debido al proceso de purificación para obtener el rebaudiósido, que podría eliminar los compuestos químicos de la estevia que aportan su capacidad antimicrobiana y, por el contrario, los compuestos presentes en el extracto líquido comercial podrían producir un enriquecimiento del medio que podría justificar el ligero crecimiento observado. El estudio sensorial desveló que únicamente la muestra con una concentración del 1 % de estevia es aceptada por el consumidor, siendo las gominolas con las dos concentraciones más altas las que obtuvieron peor puntuación. En conclusión, parece que las cualidades organolépticas del extracto de hoja de estevia limitan su uso en las gominolas y por lo tanto, no es aconsejable incorporar las concentraciones a las que observamos capacidad antimicrobiana.

Estevia, *Escherichia coli* 101, gominolas

EFFECTE INICIAL DE LA INCORPORACIÓ DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE ESTEVIA EN LLEPOLIES

En aquest treball s'ha avaluat la possible incorporació de diferents concentracions de *Stevia rebaudiana* (estèvia) en llepolies. Per açò s'ha estudiat la contaminació inicial de les fulles d'estèvia i d'un preparat comercial de estèvia utilitzat com edulcorant y la seva capacitat antimicrobiana front al creixement de *Escherichia coli* 101 a 20 y 37 °C durant 6 dies. La incorporació en llepolies de diferents concentracions (1 %, 2,5 % y 5 %) de la infusió de estèvia es valora organolèpticament. Els resultats mostren que existeix efecte antimicrobià de

l'extracte de la fulla dessecada de estèvia sobre el creixement de *E. coli* en relació amb el control. No es va observar reducció del creixement amb el extracte líquid comercial baix les mateixes condicions estudiades, sinó un lleu augment. Aquests resultats poden ser deguts al procés de purificació per obtenir el rebaudiósid, que podria eliminar els compostos químics de la estèvia que aporten la seva capacitat antimicrobiana i, pel contrari, els compostos presents en el extracte líquid comercial podrien produir un enriquiment del medi que podria justificar el lleuger creixement observat. L'estudi sensorial revetlla que únicament la mostra amb la concentració del 1 % de estèvia és acceptada pel consumidor, sent les llepolies amb les dues concentracions més altes les que van obtenir pitjor puntuació. En conclusió, pareix que les qualitats organolèptiques de l'extracte de la fulla de estèvia limiten el seu ús en les llepolies i per tant, no es aconsellable introduir-la a les concentracions a les quals s'observa capacitat antimicrobiana.

Estèvia, *Escherichia coli* 101, llepolies

INITIAL STUDY OF THE INCORPORATION OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF STEVIA IN JELLIES

In this project the incorporation of different concentrations of *Stevia rebaudiana* (stevia) in jellies has been evaluated. The initial contamination of the leaves of stevia, a commercial preparation of used stevia as a sweetener, and its antimicrobial capacity versus the growth of *Escherichia coli* 101 at 20 and 37 °C during 6 days has been studied. The introduction of different concentrations (1 %, 2.5 % and 5 %) of the infusion of stevia in jellies was organoleptically assessed. The results show that there was an antimicrobial effect of the extract of the dried leaf of the stevia on the growth of *E. coli* in relation to the control (without stevia). However, non reduction of the growth with the commercial liquid extract, under the conditions studied; on the contrary a slight increase was observed. This finding may be due to the purification process for rebaudioside, which could eliminate the chemical compounds of stevia contributing its antimicrobial capacity. On the other hand, the compounds present in the commercial liquid extract could produce an enrichment of the medium which could justify the light observed growth. The sensory study revealed that consumers only accept the sample with a concentration of 1% of stevia. The jellies with the highest two concentrations reached the worst score. In conclusion, it seems that the organoleptic qualities of the stevia leaf extract limit its use in the jellies and therefore it is not advisable to incorporate these concentrations, which show antimicrobial properties.

Stevia, *Escherichia coli* 101, jellies

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Gominolas	1
1.1. Componentes.....	1
1.1.1. Azúcares.....	1
1.1.2. Aditivos.....	2
1.2. Consumo.....	3
1.3. Principales problemas de salud por consumo excesivo de azúcar.....	3
1.4. Alternativas al consumo de azúcar: Edulcorantes no calóricos.....	4
1.4.1. Edulcorantes no calóricos sintéticos.....	4
1.4.2. Edulcorantes no calóricos naturales.....	5
2. Estevia	6
II. OBJETIVOS	8
III. MATERIAL Y MÉTODOS	9
1. Caracterización de la contaminación inicial	9
2. Cepa bacteriana utilizada	9
3. Estudio de la influencia de los extractos en el crecimiento de <i>E. coli</i>	10
4. Preparación de gominolas con diferentes concentraciones de extracto de estevia	10
4.1. Planificación de los análisis de las gominolas.....	11
5. Cata de gominolas	11
6. Análisis estadístico	12
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
1. Valoración e identificación de la contaminación inicial	13

1.1. Recuento e identificación de mohos y levaduras en hojas desecadas de estevia.....	13
1.2. Recuento e identificación de mohos y levaduras en el extracto líquido comercial y en el extracto de hojas desecadas de estevia.....	16
1.3. Recuento e identificación de mohos y levaduras en gominolas.....	18
2. Resultados del estudio de la influencia de los extractos en el crecimiento de <i>E. coli</i>.....	20
3. Resultado del análisis de gominolas con diferentes concentraciones de extracto de estevia.....	22
4. Cata de gominolas.....	24
V. CONCLUSIÓN.....	28
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	29
VII. ANEXOS	a
Anexo 1. Composición de los medios de cultivo	b

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni (SLOW FOOD SEVILLAYSUR, 2015)	6
Figura 2. Productos analizados: a) hojas desecadas de estevia y b) extracto líquido comercial...	9
Figura 3. Mohos aislados de la muestra del extracto de la hoja seca	13
Figura 4. <i>Alternaria</i> sp. aislado de hojas desecadas de estevia.....	13
Figura 5. <i>Alternaria</i> sp. aislado de hojas desecadas de estevia.....	14
Figura 6. <i>Alternaria</i> sp. aislado de hojas desecadas de estevia.....	14
Figura 7. <i>Cladosporium</i> sp. aislado de hojas desecadas de estevia.....	14
Figura 8. <i>Cladosporium</i> sp. aislado de hojas desecadas de estevia.....	15
Figura 9. <i>Cladosporium</i> sp. aislado de hojas desecadas de estevia.....	15
Figura 10. <i>Scopulariopsis</i> sp. aislado de hojas desecadas de estevia.....	15
Figura 11. <i>Acremonium</i> sp. aislado de hojas desecadas de estevia	16
Figura 12. Levadura aislada de hojas desecadas de estevia	16
Figura 13. Mohos aislados de la muestra del extracto líquido comercial	17
Figura 14. <i>Penicillium</i> sp. aislado del extracto líquido comercial	17
Figura 15. <i>Penicillium</i> sp. aislado del extracto líquido comercial	17
Figura 16. <i>Penicillium</i> sp. aislado del extracto líquido comercial	18
Figura 17. <i>Aspergillus</i> sp. aislado del extracto líquido comercial.....	18
Figura 18. <i>Penicillium</i> sp. aislado de las gominolas del 1 % de estevia	19
Figura 19. <i>Aspergillus</i> sp. aislado de las gominolas del 2.5 % de estevia.....	20
Figura 20. <i>Aspergillus</i> sp. aislado de las gominolas del 5 % de estevia.....	20
Figura 21. Recuento de <i>E. coli</i> en función del tiempo y de la presencia de extractos a 20 °C ...	21
Figura 22. Recuento de <i>E. coli</i> en función del tiempo y de la presencia de extractos a 37 °C ...	21
Figura 23. Gominolas elaboradas en este estudio y contaminación observada.....	22
Figura 24. Recuento de aerobios mesófilos en función de la concentración de extracto de estevia en gominolas	23

Figura 25. Recuento de mohos en función de la concentración de extracto estevia en gominolas.....	23
Figura 26. Gráfico de caja y bigotes de la aceptación general de las gominolas con diferentes concentraciones de extracto de estevia	25
Figura 27. Comparación de las gominolas y la valoración de los atributos de color, olor, dulzor y regusto.....	26
Figura 28. Gráficos de caja y bigotes sobre la valoración de los distintos atributos y las concentraciones de extracto de estevia en las gominolas.....	27

1. GOMINOLAS

Las gominolas son concebidas como alimentos industriales, nutricionalmente desbalanceados y con un alto contenido de hidratos de carbono (principalmente glucosa, fructosa y sacarosa), grasas y/o sal (Castillo y Romo, 2006). Contienen altas proporciones de sacarosa y jarabe de glucosa, combinado con agentes gelificantes, como almidón, gelatina o pectina, junto con acidulantes, aromatizantes y colorantes (Marfil y col., 2012).

El contenido en hidratos de carbono varía entre el 70-80 % del peso, las proteínas suponen del 5-6 %, principalmente en forma de gelatina, mientras que el agua solo se encuentra en cantidades inferiores al 14 %. Estos alimentos suponen un aporte energético de entre 320 a 360 calorías cada cien gramos, con un valor nutritivo prácticamente nulo (CONSUM, 2002).

1.1. Componentes

Las gominolas son alimentos compuestos en su mayoría por azúcares (sacarosa y jarabe de glucosa) y en menores cantidades se encuentran agua y aditivos como agentes gelificantes, acidulantes, colorantes y aromatizantes.

1.1.1. Azúcares

La sacarosa (azúcar común o azúcar de mesa), es un disacárido formado por alfa-D-Glucopiranosil - (1→2) - beta-D-Fructofuranósido, cuya fórmula es $C_{12}H_{22}O_{11}$. Se trata de un disacárido no reductor, debido a que los carbonos anoméricos de la glucosa y fructosa están formando parte del enlace O - glucosídico entre ambas.

Este disacárido proviene principalmente de la caña de azúcar y de la remolacha azucarera. Para la obtención de este azúcar la caña de azúcar y la remolacha azucarera son sometidas a un proceso de extracción industrial que consta de las siguientes etapas: molienda, clarificación, filtración, evaporación, cocción, centrifugación, secado y empaquetado (Corrales-Correa y Garzón-García, 2014).

El jarabe de glucosa es una solución acuosa concentrada y purificada de sacáridos nutritivos obtenidos del almidón y/o la inulina. Su contenido equivalente de dextrosa es superior al 20 % m/m (expresado como D-glucosa sobre peso seco), y el contenido total de sólidos es superior al 70 % m/m (CODEX ALIMENTARIUS, 2015). Se obtiene a partir de la hidrólisis del almidón procedente de cereales como el maíz o el trigo. Esta hidrólisis se lleva a cabo mediante las amilasas, enzimas responsable de hidrolizar los enlaces glucosídicos del almidón produciendo oligosacáridos, maltosa y glucosa.

1.1.2. Aditivos

Se trata de sustancias con un propósito tecnológico que se añaden a los alimentos. Como resultado de su adición el aditivo y sus subproductos se convierten en componentes de los alimentos. Por si mismos no se consumen como alimentos, ni se usan como ingredientes característicos en la alimentación, tengan o no valor nutritivo (AECOSAN, 2015).

Agentes gelificantes

Los agentes gelificantes son aditivos alimentarios cuya función es aportar textura al alimento mediante la formación de un gel (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2008). Para ello al disolverse en alimentos líquidos, forman una red tridimensional dentro. Entre los más comunes encontramos la pectina, almidón, gelatina, agar-agar... (EUFIC, 2009).

Pectina: es un polisacárido que se encuentra principalmente en frutas, se trata de un coloide con gran capacidad de absorber agua. Se deposita en la pared primaria y en la lámina media, siendo los tejidos mesenquimáticos y parenquimatosos ricos en esta sustancia, teniendo la función de cemento intercelular (Addosio y col., 2005).

Gelatina: es un biopolímero obtenido por la degradación hidrolítica del colágeno, la proteína más abundante en mamíferos. Se extrae principalmente de huesos, tendones, pezuñas, piel, órganos y vísceras de ganado vacuno y porcino (Marfil y col., 2012).

Acidulantes

Los acidulantes son sustancias que confieren o mejoran el sabor ácido de los alimentos. En la industria alimentaria contribuye aportando palatabilidad y en la conservación de alimentos, debido a que la adición de dicho aditivo produce una reducción del pH, reduciendo el crecimiento de microorganismos en los alimentos, con lo que se puede reducir el tratamiento térmico aplicado. Entre los más usados se encuentran el ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico y ácido tartárico (Ávila, 2006).

Aromatizantes

Los aromatizantes son sustancias que se incorporan a los alimentos para proporcionarles, modificar o marcar el aroma de los alimentos, pero no deben proporcionar únicamente un sabor dulce, salado o amargo como el azúcar o el vinagre (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2008). No están destinados al consumo como tal. Se clasifican como naturales los que se producen por reacciones químicas, microbiológicas o enzimáticas y artificiales.

Colorantes

Los colorantes son aditivos alimentarios que confieren o restituyen el color de los alimentos (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2008). Son considerados aditivos de dudosa utilidad, ya

que no mejoran la calidad del producto respecto a la conservación o calidad higiénica, es decir no tienen un papel tecnológico. Se utilizan en alimentos como las gominolas, “snacks”, bebidas que no tienen color para hacerlos más aceptables por parte del consumidor (Blazquez, 2011).

Entre los colorantes más usados en gominolas encontramos la tartracina (E-102), amarillo de quinoleína (E-104), amarillo anaranjado (E-110), azorrubina (E-122), rojo cochinita (E-124), rojo altura (E-129) y azul patente (E-131) (CONSUM, 2002).

1.2. Consumo

En la actualidad las gominolas son consumidas por un elevado porcentaje de la población tanto adulta como niños, más del 25 % de los niños de 9 a 18 años ingieren habitualmente una elevada cantidad de azúcares y edulcorantes calóricos, que aportan más del 25 % del total de energía de la alimentación, favoreciendo el desarrollo de sobrepeso hasta producir obesidad, además este elevado consumo de azúcares también puede llevar al desarrollo de caries y diabetes (Calzada-León y col., 2013).

En España, la industria de los caramelos y gomas tuvo un volumen de producción de 239.876 toneladas en 2013 (PRODULCE, 2014). La Unión Europea, tuvo un volumen total de producción de 1.708.255 toneladas, mientras que el volumen total de consumo fue de 1.637.480 toneladas (CAOBISCO, 2014).

1.3. Principales problemas de salud por consumo excesivo de azúcar

En la actualidad el elevado consumo de gominolas en la población, principalmente infantil, junto a otros productos dulces está aumentando el número de casos de obesidad, diabetes y caries.

Obesidad: Se define como un exceso de peso ajustado por la altura en el denominado índice de masa corporal (IMC), que corresponde al cociente entre el peso en kilogramos y el cuadrado de la altura en metros. En adultos se considera obesidad un valor de $IMC \geq 30$. Durante la infancia y la adolescencia puede ocasionar otros problemas de salud como el aumento del colesterol y triglicéridos, hipertensión arterial, la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2, el síndrome metabólico, el síndrome del ovario poliquístico, la hepatopatía no alcohólica y los cánceres de mama y colorrectal (Ariza y col., 2015).

Diabetes: Se trata de una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula el azúcar en la sangre. El efecto de la diabetes no controlada

es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos. En el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes (OMS, 2014).

Caries: Es una enfermedad infecciosa que consiste en la destrucción de los tejidos duros del diente, cuando el proceso de desmineralización y remineralización constante es alterado. Este proceso se altera principalmente por la producción de ácidos. Estos ácidos son producidos por las bacterias que se encuentran en la placa dental, las cuales transforman los azúcares y almidones en ácidos (Acosta y col., 2006).

1.4. Alternativas al consumo de azúcar: Edulcorantes no calóricos

Ante el aumento de la incidencia y prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños, la aparición de caries, y el elevado número de personas con diabetes, se han estudiado diversas alternativas para conservar el sabor dulce de los alimentos y las bebidas sin aportar calorías.

Una de las alternativas es el uso de edulcorantes no calóricos, que aun en cantidades bajas proporcionan un dulzor intenso (Calzada-León y col., 2013). Son aditivos alimentarios que aportan sabor dulce a los alimentos (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

1.4.1. Edulcorantes no calóricos sintéticos

Se trata de edulcorantes obtenidos a partir de procesos químicos y cuyo poder edulcorante es superior al de la sacarosa. Son el grupo de edulcorantes más utilizados desde que se descubrió la sacarina. Dentro de este grupo podemos encontrar entre otros la sacarina, el aspartamo y el ciclamato.

Sacarina: Fue el primer edulcorante no calórico sintetizado, en la actualidad es el más consumido. Se trata de una sulfoamida, con poder edulcorante 300 veces superior al de la sacarosa (Durán y col., 2013). Se obtiene de la síntesis química del tolueno o de derivados del petróleo. En estudios realizados en ratas se observó un aumento del número de casos de tumores de vejiga cuando fueron alimentadas con niveles de sacarina superiores al 5 %. Posteriormente se determinó que el tumor de vejiga se debía a problemas en el sistema urinario de las ratas, y no se consiguió determinar poder cancerígeno en humanos, pero no es metabolizada por el organismo (Durán y col., 2011). La ingesta diaria recomendada para la sacarina es de 5 mg/kg (Alonso, 2010).

Aspartamo: Está compuesto por un metil éster de un dipéptido formado por el ácido L-aspartico y L-fenilalanina. Tiene un poder edulcorante de 180 a 200 veces superior al de la sacarosa (Durán y col., 2013). El aspartamo es inestable al aumentar la temperatura por encima

de los 30 °C, convirtiéndose progresivamente en diketopiperazina, que se descompone en metanol, ácido aspártico y fenilalanina. Se le ha asociado con enfermedades como tumores de cerebro, epilepsia y efectos sobre el sistema nervioso (GREENFACTS, 2002). La ingesta diaria recomendada es de 40 mg/kg (Alonso, 2010).

Ciclamato: El N-ciclohexilsulfamato de sodio (ciclamato), es un edulcorante no calórico con un poder edulcorante de 30 a 50 veces superior al de la sacarosa (Durán y col., 2013). Se trata de un edulcorante químicamente estable, al que no le afecta la acidez ni el calentamiento (García-Almeida, 2013). Su uso principal es en las bebidas carbónicas. El ciclamato es menos soluble en agua que sus sales sódicas y cálcicas, por eso son estas las que se usan habitualmente. La ingesta diaria recomendada es de 11 mg/kg (Alonso, 2010).

1.4.2. Edulcorantes no calóricos naturales

Se trata de edulcorantes obtenidos a partir productos naturales, con alto poder edulcorante (péptidos edulcorantes). Dentro de este grupo se encuentra entre otros la taumatina, la miraculina, la monelina y la estevia.

Taumatina: Procede del fruto de una planta tropical del oeste de África *Thaumatococcus daniellii* Benth. Se trata de las proteínas extraídas de la pulpa que rodea las semillas de dicho fruto. Se conocen 5 tipos de taumatinas, y la mezcla de 2 de ellas es conocida con el nombre comercial de Talin. Tiene un poder edulcorante de 1600 veces superior al de la sacarosa (Alonso, 2010). Los estudios de toxicidad realizados han mostrado su inocuidad (Giannuzz y Molina- Ortiz, 1995). La ingesta diaria recomendada es de 2 mg/kg (Alonso, 2010).

Monelina: Es la proteína que se encuentra en la pulpa de la especie tropical *Dioscoreophyllum cumminsii* originaria de África donde es conocida por otros nombres como ‘Ekali-bonte’, ‘kaligbonde’, ‘ito-igbin’, ‘ayun-ita’ y ‘serendipity berries’. El poder edulcorante es 1000 veces superior al de la sacarosa. Está formada por dos cadenas polipeptídicas que deben mantener la estructura tridimensional para poder seguir manteniendo el sabor dulce (Alonso, 2010).

Miraculina: Conocida como la “fruta milagrosa”, es la glicoproteína procedente de la pulpa del fruto de *Synsepalum dulcificum*. Se trata de una planta perteneciente a la familia de las *Sapotáceas* y es originaria de África Occidental (Alonso, 2010). No presenta sabor dulce intenso por sí misma, pero al entrar en contacto con las papilas gustativas, modifica el sabor ácido en dulce, durante aproximadamente 30 minutos (Giannuzz y Molina- Ortiz, 1995). Actualmente no tiene aplicaciones industriales (Alonso, 2010).

2. ESTEVIA

La *Stevia rebaudiana* (estevia) es un arbusto perenne perteneciente a la familia de las *Asteraceae*. Originaria de las zonas tropicales y subtropicales de América del Sur, las hojas poseen un poder edulcorante natural (Barba y col., 2014). Es uno de los géneros de estevia que produce los glicósidos de esteviol dulce, que se pueden utilizar como sustituto de la sacarosa (Belda-Galbís y col., 2014).



Figura 1. *Stevia rebaudiana* Bertoni (SLOW FOOD SEVILLAYSUR, 2015)

Las hojas de la planta silvestre de estevia contienen 0.3 % Dulcósido, 0.6 % Rebaudiósido C, 3.8 % Rebaudiósido A y el 9.1 % de Esteviósido. Además contienen una gran cantidad de agua (80 a 85 %). También podemos encontrar en las hojas de estevia, ácido ascórbico, β -caroteno, cromo, cobalto, magnesio, hierro, potasio, fósforo, riboflavina, tiamina, estaño, zinc, etc. Entre los productos químicos encontrados están la apigenina, austroinilina, avicularin, β -sitoesterol, ácido caféico, campesterol, cariofileno, centaureidín, ácido clorogénico, clorofila, kaempferol, luteolina, quercetina, estigmasterol entre otros (Durán y col., 2013).

Distintos estudios han demostrado que los esteviósidos no suponen ningún riesgo de toxicidad, incluso utilizándose en grandes cantidades (Giannuzz y Molina- Ortiz, 1995). En la actualidad, la estevia es usada como edulcorante en diversos alimentos procesados como bebidas de frutas, galletas y panes, comercializándose en países como España, Francia y EEUU entre otros.

Las hojas de estevia no solo presentan poder edulcorante, sino que también contienen compuestos fenólicos, flavonoides, compuestos antioxidantes y antimicrobianos (Barba y col., 2014).

El esteviósido es uno de los glicósidos del esteviol, posee un poder edulcorante de 300 veces superior al de la estevia. Presenta un sabor amargo, dejando un resabio dulce en altas concentraciones. Al igual que el esteviósido, el rebaudiósido A es un glicósido del esteviol, con un poder edulcorante 250 veces superior al de la sacarosa (Giannuzz y Molina- Ortiz, 1995).

Diversos estudios de toxicidad realizados en humanos y animales demuestran que ambos glicósidos son seguros. Además presentan un efecto hipoglucemiante suave y mejoran la curva de tolerancia a la glucosa en ayunas (Alonso, 2011).

Actualmente, la estevia es utilizada en los países industrializados como edulcorante de mesa, además también se incorpora a distintos alimentos como bebidas, comidas precocinadas, zumos de fruta, confitería sin azúcar, mermeladas, yogures, chicles, té, entre otros productos. Se presenta en pequeñas cantidades debido a su potente sabor (Durán y col., 2012). El inconveniente para su utilización se debe a que no cristaliza, ni se puede hacer caramelo a diferencia del azúcar, por tanto no puede ser usada en platos que necesiten la caramelización (Martínez, 2002).

La estevia presenta diversos beneficios, entre ellos, al tratarse de un edulcorante no calórico, puede ser usado en dietas y personas que padecen diabetes (Martínez, 2002). Posee actividad antioxidante debido a la presencia de antocianinas en 3-glicósidos, además es rica en hierro, magnesio y cobalto, ácido fólico y pirogalol (Salvado-Reyes y col., 2014).

Las hojas sin refinar contienen determinados nutrientes que ayudan al cuerpo a regular la glucosa en sangre, por un efecto regulador sobre el páncreas. El esteviósido actúa de manera directa sobre el páncreas, estimulando las células beta, generando un aumento de la secreción de insulina. El uso de este edulcorante puede tener un poder anti-hiper-glucémico en personas con diabetes II (Martínez, 2002).

También posee acción antimicrobiana contra bacterias patogénicas como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, no afectando a bacterias útiles como bifidobacterias y bacterias acidolácticas (Pérez-Guevara, 2013). Inhibe el crecimiento y la reproducción de bacterias responsables de la caída de los dientes, posee efecto bactericida bucal ya que inhibe el crecimiento de bacterias que provocan caries y problemas en encías (Martínez, 2002).

Actualmente, la estevia es utilizada en los países industrializados como edulcorante de mesa, además también se incorpora a distintos alimentos como bebidas, comidas precocinadas, zumos de fruta, confitería sin azúcar, mermeladas, yogures, chicles, té, entre otros productos. Presenta diversos beneficios, entre ellos al tratarse de un edulcorante no calórico, puede ser usado en dietas y personas que padecen diabetes, además posee actividad antioxidante y antimicrobiana.

El **Objetivo principal** de este estudio es determinar la capacidad antimicrobiana de la estevia y su utilización como alternativa a edulcorantes calóricos que aportan una elevada cantidad de calorías al ingerir las gominolas, causando así diferentes enfermedades en los consumidores.

Para realizar este trabajo se han planteado los siguientes **Objetivos específicos**:

-Caracterizar la carga microbiana inicial del extracto de las hojas desecadas, el extracto líquido comercial y del extracto preparado con hojas desecadas (infusión).

-Estudiar la influencia de los extractos en el crecimiento de *Escherichia coli* a 20 y 37 °C a lo largo de un período de tiempo de 150 horas.

-Elaborar gominolas con diferentes concentraciones de extracto de las hojas desecadas de estevia para determinar la concentración a partir de la cual la estevia ejerce efecto antimicrobiano frente mohos y aerobios mesófilos a lo largo de su vida útil (2 meses).

-Realizar un estudio de la aceptación de los atributos de las gominolas (color, sabor, olor y regusto) por parte de los consumidores.

1. CARACTERIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN INICIAL

La carga microbiana de las hojas desecadas, del extracto líquido comercial (Fig. 2) y del extracto preparado con hojas desecadas (infusión) se determinó cualitativa y cuantitativamente mediante recuento y aislamiento en medios sólidos Plate Count Agar y Sabouraud Chloroamphenicol Agar (Scharlau).

El recuento microbiológico se realizó siguiendo la norma UNE-EN ISO 4833-2:2014 “Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 2: Recuento de colonias a 30 °C mediante la técnica de siembra en superficie”

La identificación de los mohos se realizó por observación al microscopio óptico utilizando diferentes claves de identificación (Hernández y col., 2005; De Hoog y col., 2000; Samson y col., 2004).

El extracto de estevia se obtuvo mediante la preparación de una infusión con 12.5 g de hojas desecadas de estevia (Bioartesa; España) maceradas durante 30 minutos con 50 mL de agua destilada a 100 °C. El líquido resultante se alicuotó en eppendorf estériles de 2 mL para su posterior utilización. Esta infusión contiene un 25 % de extracto de hojas desecadas de estevia por mL.

La carga microbiana inicial del extracto líquido comercial (Soria Natural S.A.; España) se determinó directamente de la muestra.



Figura 2. Productos analizados: a) hojas desecadas de estevia y b) extracto líquido comercial

2. CEPA BACTERIANA UTILIZADA

Para este estudio se utilizó una cepa de *Escherichia coli* 101 procedente de la colección del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Politécnica de Valencia de uso docente.

La cepa de *E. coli* se sembró para su mantenimiento en Plate Count Agar a (37 ± 2) °C durante 24 h. El inóculo se preparó en cultivo de noche realizando una emulsión de la bacteria en 10 mL de Caldo nutritivo (Difco 234000).

3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS EN EL CRECIMIENTO DE *E. coli*

La evolución en el tiempo del crecimiento de *E. coli*, se estudió a diferentes condiciones de incubación para valorar la influencia de la temperatura (20 y 37 °C) y de dos tipos de extractos: el extracto de las hojas desecadas y el extracto comercial, frente a un control sin extracto.

Para obtener la curva de crecimiento se realizaron recuentos a los tiempos de incubación de 0, 9, 50, 120 y 150 horas. Los recuentos microbiológicos se realizaron siguiendo la norma UNE-EN ISO 4833-2:2014.

4. PREPARACIÓN DE GOMINOLAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE ESTEVIA

Las gominolas se elaboraron con diferentes concentraciones del extracto de las hojas desecadas de estevia (1 %, 2.5 %, 5 %) para determinar el efecto antimicrobiano frente a aerobios mesófilos y mohos y la aceptación de sus atributos (color, olor, dulzor y regusto) por parte de los consumidores.

El extracto de hojas desecadas de estevia se obtuvo mediante la preparación de una infusión con 25 g de hojas de estevia y 250 mL de agua hirviendo, dejándolo durante 30 minutos en maceración. Esta infusión contenía un 10 % de extracto de hojas desecadas de estevia por mL.

Las gominolas se elaboraron con un 51.7 % de azúcares: 180.95 g de oligofruktosa (Sensus B.V.; Países Bajos) y 77.55 g de tagatosa comercial (40 % pureza; Damhert NV/S.A.; Bélgica), un 39.8 % de fracción acuosa (agua), 8 % de gelatina (Junca Gelatines S.L.; España) equivalente a 40 g, 0.5 % de ácido cítrico (Scharlab S.L. España) equivalente a 2.5 g, 200 µL de colorante natural rojo (Roha Europe S.L.U.; España), y 250 µL de aroma de fresa (Flavorix Aromáticos S.A.; España).

En primer lugar, se añadió en la Thermomix (Vorwerk) los azúcares, junto el 50 % de la fracción acuosa y el extracto de estevia, mezclándolo todo durante 10 minutos a 300 rpm para obtener un líquido uniforme. Se dejó enfriar hasta alcanzar 60 °C, y se añadió la gelatina previamente hidratada con el 50 % de la fracción acuosa, el colorante rojo, el aroma a fresa y el ácido cítrico agitando durante 5 minutos a 300 rpm en la Thermomix. La mezcla obtenida se distribuyó en moldes impregnados de aceite de girasol que facilitaron posteriormente el

desmoldado, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado el tiempo se almacenó en bolsas de Stomacher estériles a temperatura ambiente.

4.1. Planificación de los análisis de las gominolas

La realización de los análisis se planificó para empezar 15 días después de la elaboración de gominolas en Plate Count Agar, Endo Agar y Sabouraud Chloroamphenicol Agar. A partir del primer análisis se repetirán los análisis cada 15 días durante 45 días.

Se pesó una gominola en una bolsa de Stomacher en condiciones de asepsia y se añadió diez veces el peso de la gominola en agua de peptona tamponada (Difco 218105). Se introdujo la bolsa en el Stomacher para su homogeneización durante 1 minuto. Partimos de 1 mL de la solución homogeneizada para preparar diluciones decimales seriadas en tubos de 9 mL de agua destilada estéril, y se sembraron por duplicado 0.1 mL de las diluciones en placas de Endo Agar, Plate Count Agar y Sabouraud Chloroamphenicol Agar (Scharlau).

La lectura se realizó tras el periodo de incubación a (37 ± 2) °C durante (24 ± 2) h para el recuento de Enterobacterias en Endo Agar, a (28 ± 2) °C durante 6-7 días para el recuento de mohos en Sabouraud Chloroamphenicol Agar y a (28 ± 2) °C y durante 2-3 días para el recuento de aerobios mesófilos en Plate Count Agar.

5. CATA DE GOMINOLAS

La evaluación sensorial de las golosinas se realizó con un panel de catadores formado por 10 panelistas consumidores habituales de gominolas de edades comprendidas entre 20 y 60 años. Los panelistas evaluaron 3 formulaciones (S4, 1504, 1505) y una control en la que no se había añadido estevia. Para cada una de las formulaciones se realizó una prueba de aceptación global, mediante una escala hedónica de 9 puntos, siendo el valor 1: no me gusta nada y el valor 9: me gusta mucho (ISO 4121, 2003). La misma escala se utilizó para evaluar los siguientes atributos: color, olor, dulzor y regusto (ISO 5492, 2008).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio estadístico se ha realizado con el programa estadístico Statgrafics versión centurión XVI. Los estudios llevados a cabo han sido: 1) anova multifactor en la evolución del crecimiento de *E. coli* sin estevia (control), con extracto de hojas desecadas y con el extracto comercial; 2) anova simple para el estudio de la contaminación de las gominolas y la prueba de

aceptación en la cata y, finalmente 3) estudio descriptivo de caja de bigotes sobre los atributos estudiados en las gominolas.

1. VALORACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN INICIAL

1.1. Recuento e identificación de mohos y levaduras en hojas desecadas de estevia

El recuento de mohos y levaduras a partir de las hojas desecadas de estevia en Sabouraud fue de 4.5×10^2 ufc/g.

Cualitativamente se aislaron e identificaron los diferentes géneros de mohos obtenidos (Fig. 3) por observación al microscopio óptico, comparando con claves de identificación: *Alternaria* sp. (Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6), *Cladosporium* sp. (Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9), *Scopulariopsis* sp. (Fig.10), *Acremonium* sp (Fig. 11) y Levadura (Fig. 12).

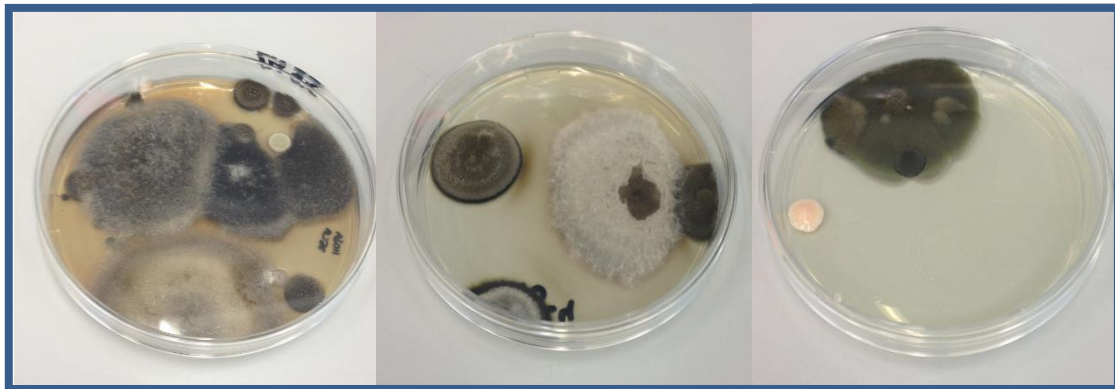


Figura 3. Mohos aislados de la muestra del extracto de la hoja seca

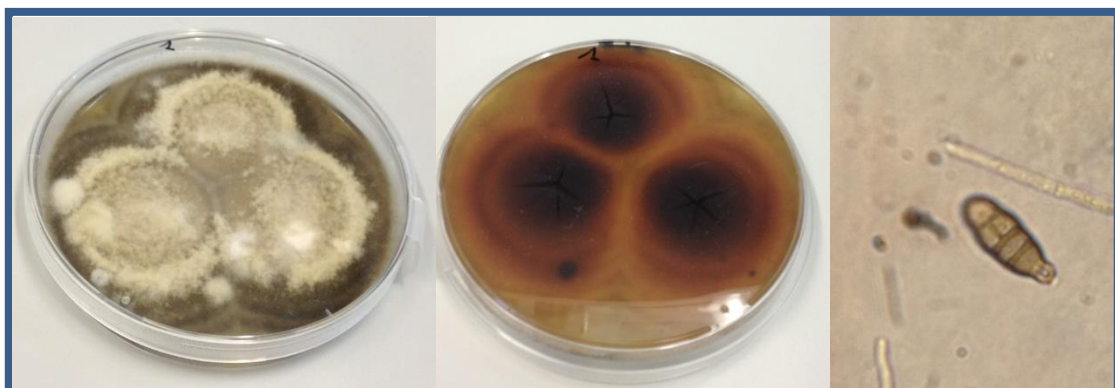


Figura 4. *Alternaria* sp. aislado de hojas desecadas de estevia

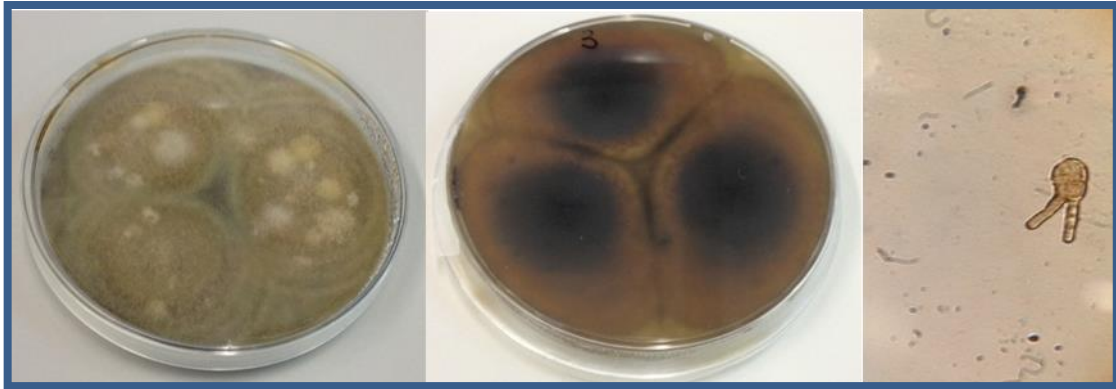


Figura 5. *Alternaria* sp. aislado de hojas desecadas de estevia

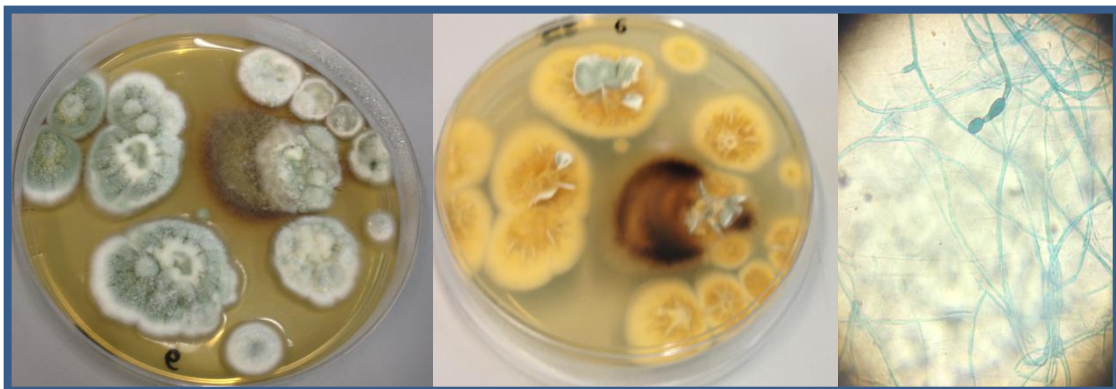


Figura 6. *Alternaria* sp. aislado de hojas desecadas de estevia

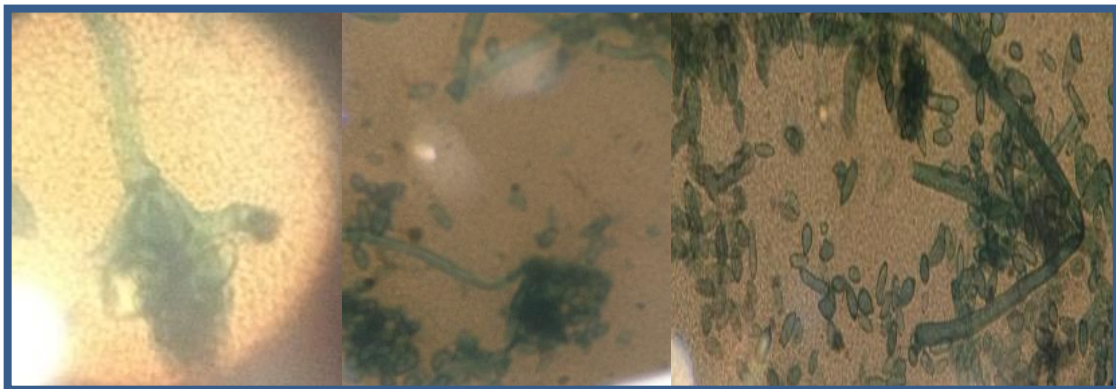


Figura 7. *Cladosporium* sp. aislado de hojas desecadas de estevia

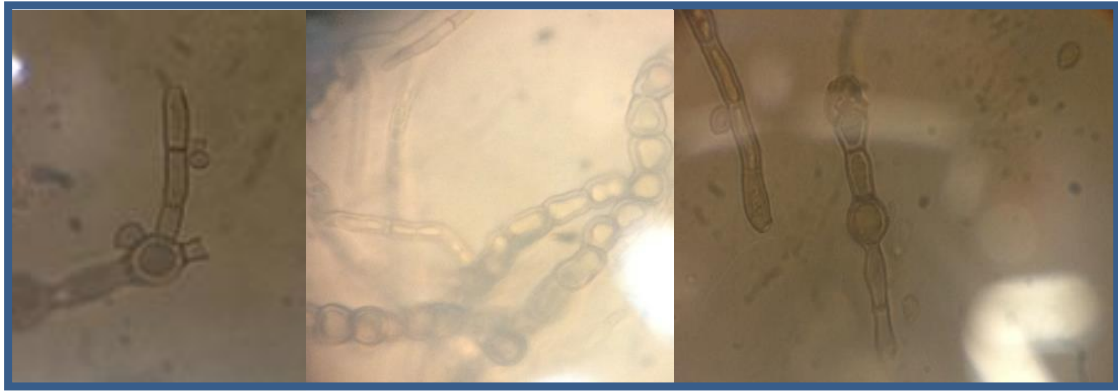


Figura 8. *Cladosporium* sp. aislado de hojas desecadas de estevia

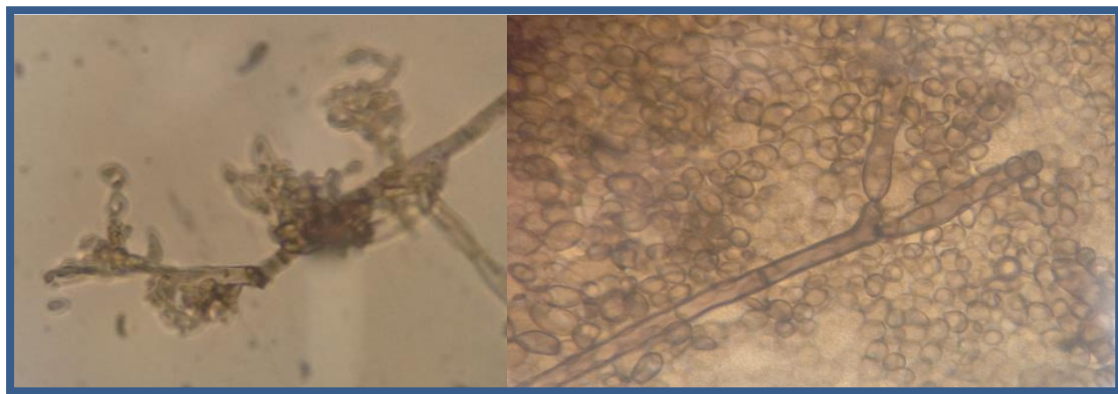


Figura 9. *Cladosporium* sp. aislado de hojas desecadas de estevia

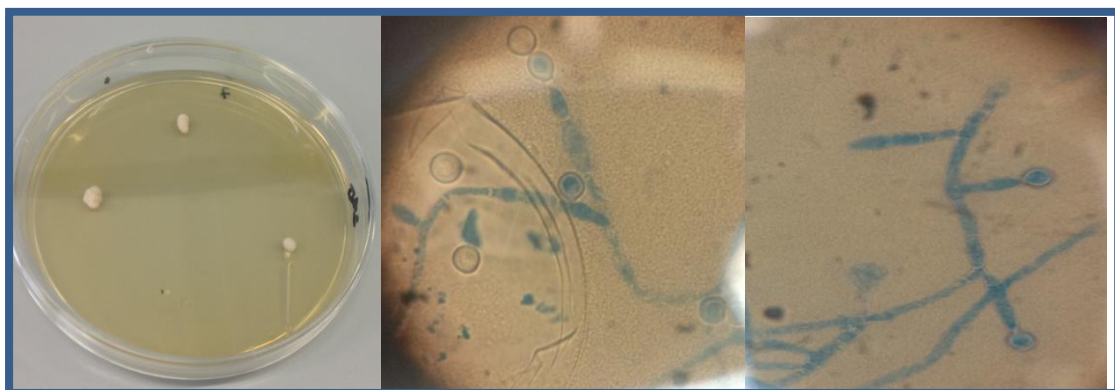


Figura 10. *Scopulariopsis* sp. aislado de hojas desecadas de estevia

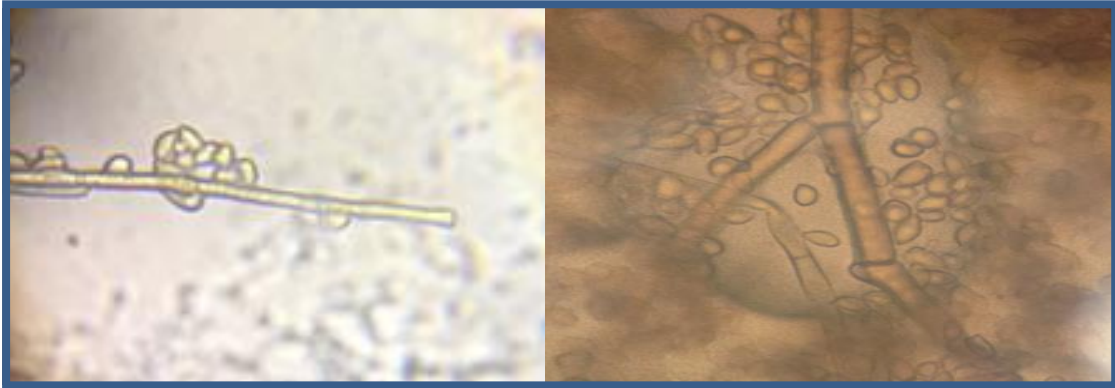


Figura 11. *Acremonium* sp. aislado de hojas desecadas de estevia

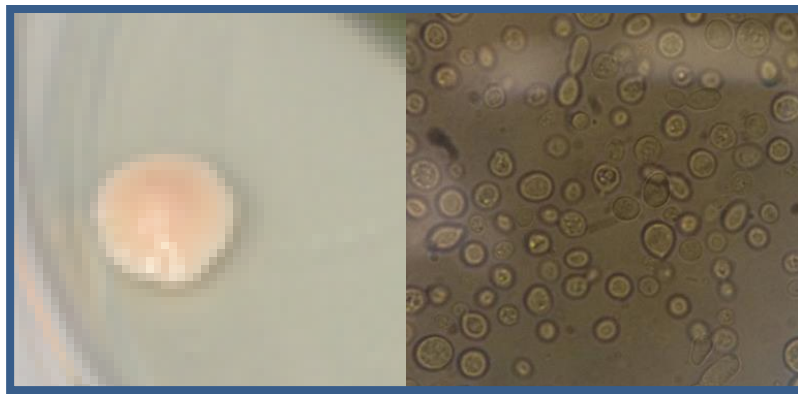


Figura 12. Levadura aislada de hojas desecadas de estevia

1.2. Recuento e identificación de mohos y levaduras en el extracto líquido comercial y en el extracto de hojas desecadas de estevia

El recuento de mohos y levaduras a partir del extracto líquido comercial en Sabouraud fue de 1.3×10^1 ufc/mL, mientras que para el extracto de hojas desecadas de estevia obtuvimos ausencia.

Se aislaron e identificaron dos géneros de mohos (Fig. 13) por observación al microscopio óptico, comparando con claves de identificación: *Penicillium* sp. (Fig. 14, Fig. 15, Fig. 16), *Aspergillus* sp. (Fig. 17).

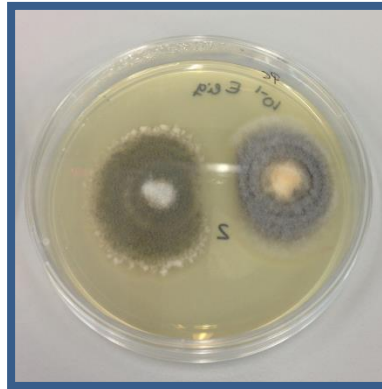


Figura 13. Mohos aislados de la muestra del extracto líquido comercial

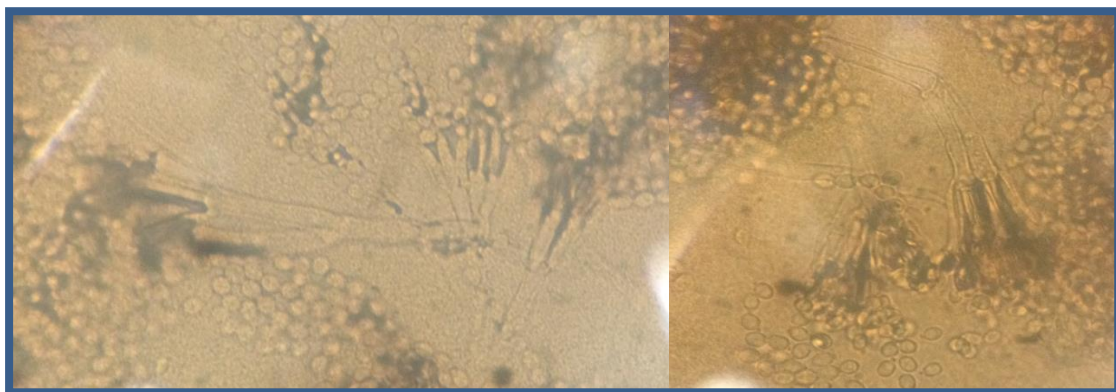


Figura 14. *Penicillium* sp. aislado del extracto líquido comercial

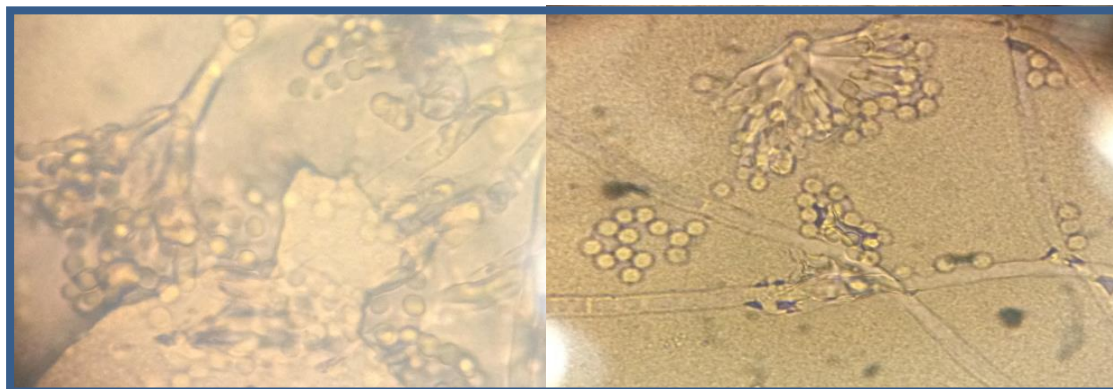


Figura 15. *Penicillium* sp. aislado del extracto líquido comercial

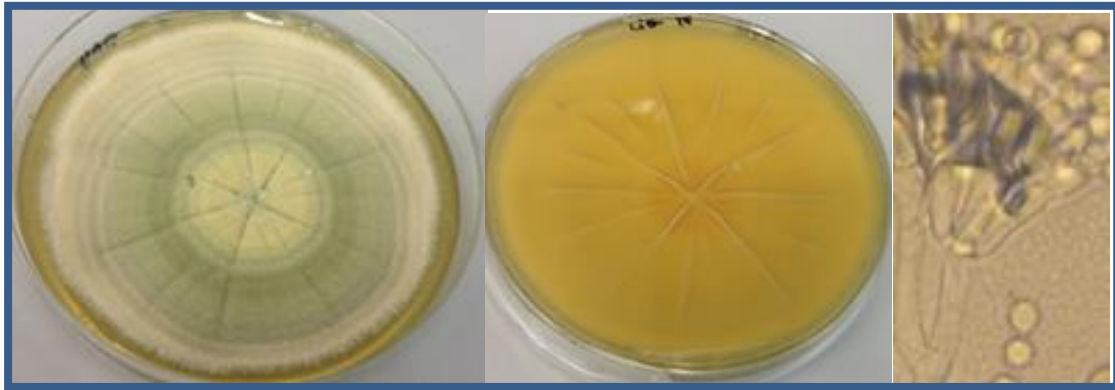


Figura 16. *Penicillium* sp. aislado del extracto líquido comercial

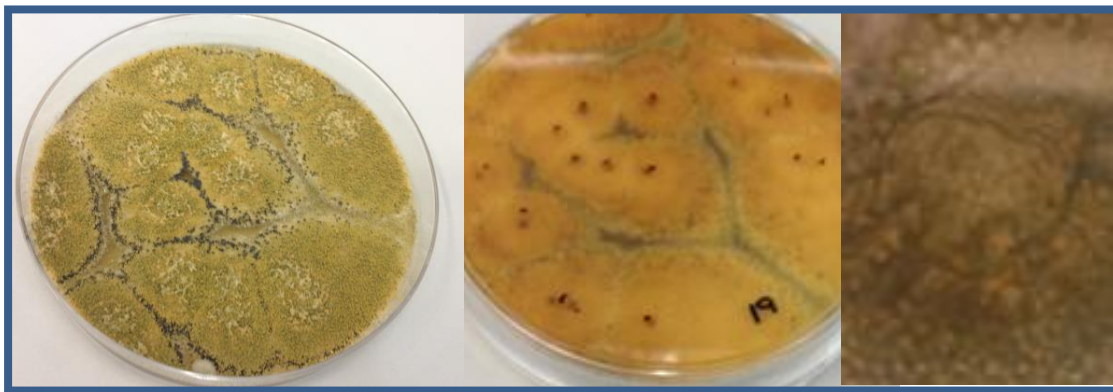


Figura 17. *Aspergillus* sp. aislado del extracto líquido comercial

1.3. Recuento e identificación de mohos y levaduras en gominolas

Gominolas con 1 % de extracto de estevia

El recuento de mohos y levaduras a partir de las gominolas con 1% de extracto de estevia en Sabouraud fue de 1.5×10^2 ufc/g.

Cualitativamente se aisló e identificó una colonia del género *Penicillium* sp. como se puede observar en la figura 18.

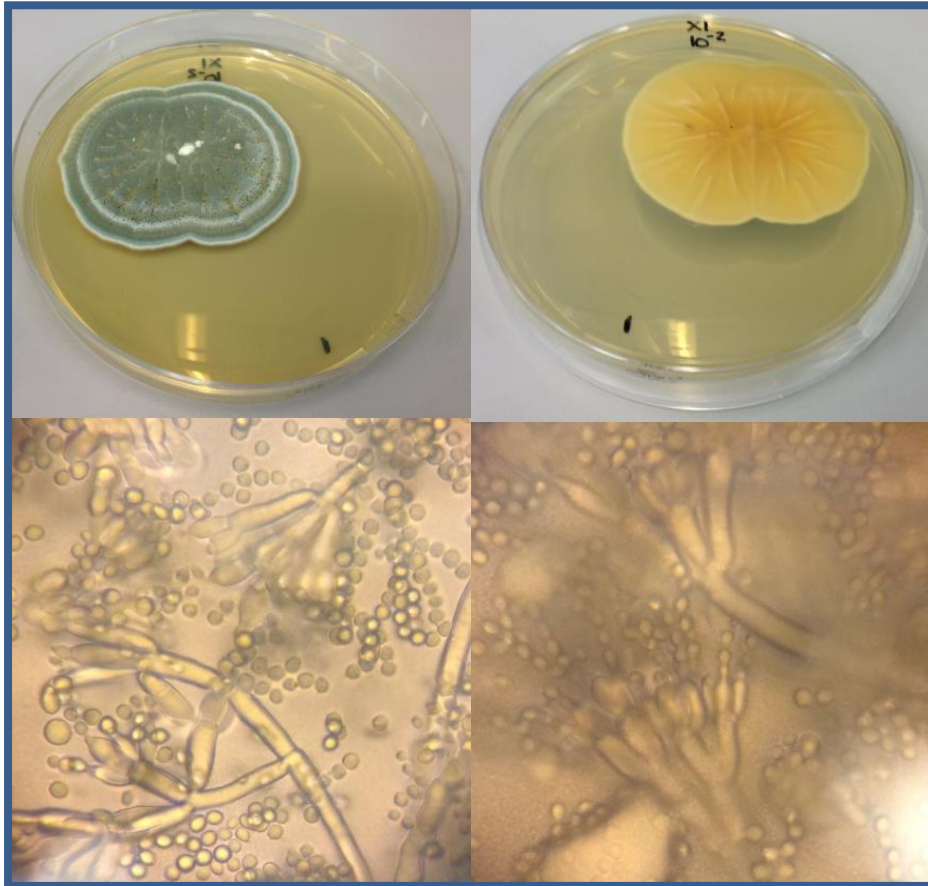


Figura 18. *Penicillium* sp. aislado de las gominolas con el 1 % de extracto de estevia

Gominolas con 2.5 % de extracto de estevia

El recuento de mohos y levaduras a partir de las gominolas con 2.5% de extracto de estevia en Sabouraud fue de 3.15×10^3 ufc/g.

Se aisló e identificó el género *Aspergillus* sp., como se puede observar en la figura 19.

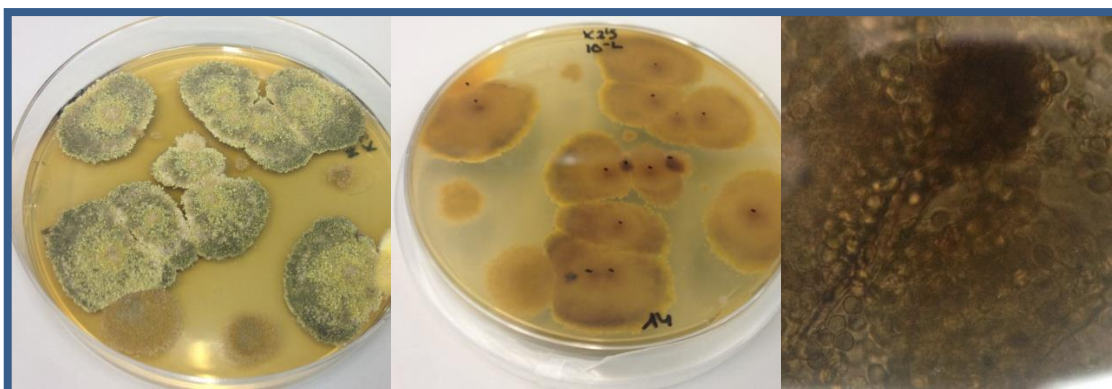


Figura 19. *Aspergillus* sp. aislado de las gominolas con el 2.5 % de extracto de estevia

Gominolas con 5 % de extracto de estevia

El recuento de mohos y levaduras a partir de las gominolas con 5 % de extracto de estevia en Sabouraud fue de 5.5×10^2 ufc/g.

Se aisló e identificó el género *Aspergillus* sp., como puede observarse en la figura 20.

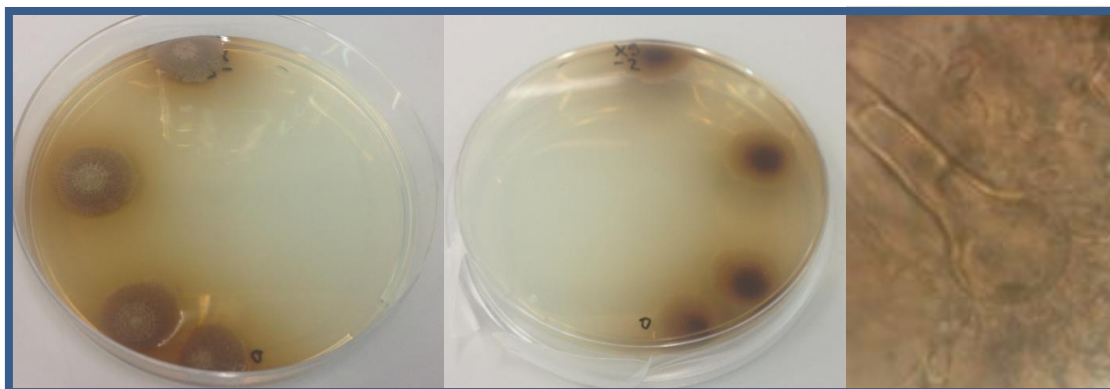


Figura 20. *Aspergillus* sp. aislado de las gominolas con el 5 % de extracto de estevia

2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS EN EL CRECIMIENTO DE *E. coli*

Para este estudio se partió de un inóculo de 5 unidades logarítmicas de un cultivo de noche de *E. coli* 101.

En la figura 21 se observa el recuento de la población de *E. coli* 101 a 20 °C en función del tiempo y de la presencia de extracto de estevia de hojas desecadas o del extracto líquido comercial. A la vista de los resultados, el recuento de *E. coli* con extracto de hojas de estevia disminuye a medida que aumenta el tiempo (a partir del tiempo 50 h), no apreciándose esa disminución con el control (sin estevia) ni con el extracto líquido comercial. El anova multifactor realizado indica que estas diferencias son significativas tanto en el tiempo (p-valor 0.0000) como por adición de extracto (p-valor 0.0404), al igual que lo son la interacción tiempo/extracto (p-valor 0.0000).

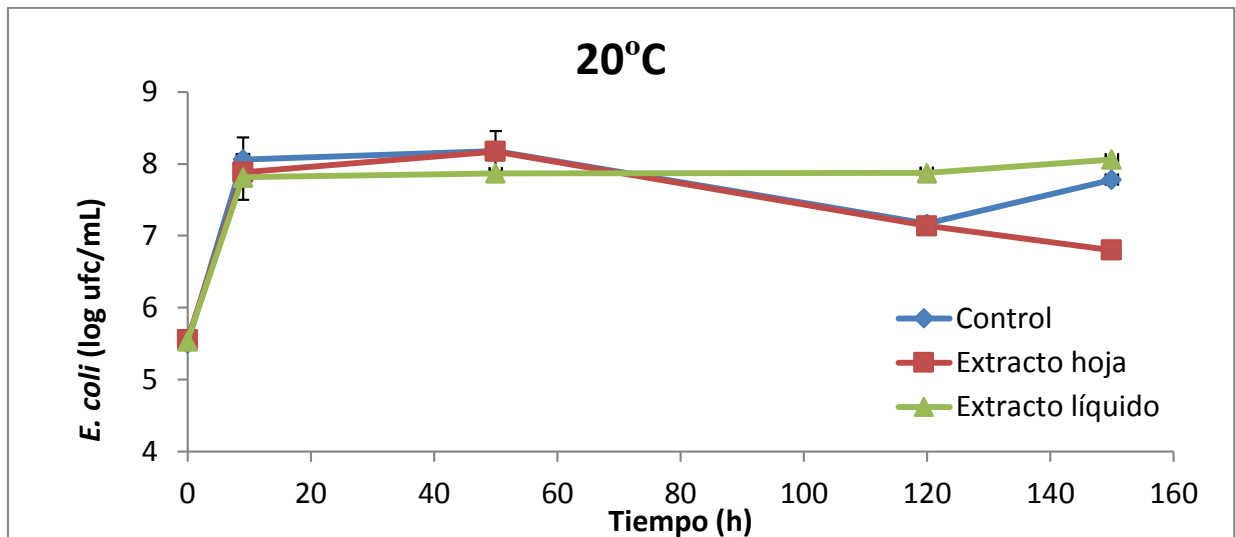


Figura 21. Recuento de *E. coli* en función del tiempo y de la presencia de extractos a 20 °C

En la figura 22 se observa el recuento de la población de *E. coli* 101 a 37 °C en función del tiempo y de la presencia de extracto de estevia de hojas desecadas o del extracto líquido comercial. A esta temperatura, las diferencias en el recuento de *E. coli* entre los distintos extractos de estevia y el control (sin estevia) son más evidentes en función del tiempo. En este caso se aprecia que con el extracto líquido comercial y el control, se mantienen estables mientras que con extracto de la hoja desecada se observa una progresiva disminución del recuento de *E. coli* a medida que aumenta el tiempo de incubación. El estudio estadístico indica que estas diferencias observadas en la figura entre extractos y control en función del tiempo son significativas (p valor 0.0001 y 0.0000), respectivamente. Así como la interacción entre ambos parámetros (p valor 0.0000).

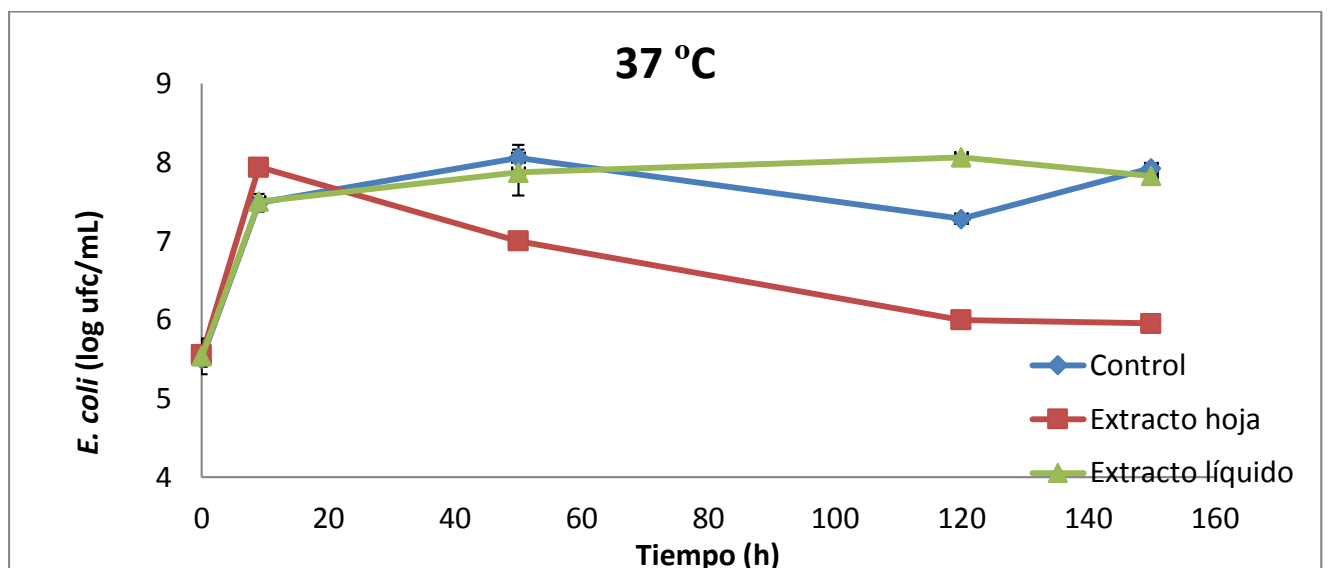


Figura 22. Recuento de *E. coli* en función del tiempo y de la presencia de extractos a 37 °C

Por último, el estudio estadístico indica que existe diferencia significativa en relación a la temperatura (p valor 0,0084).

3. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE GOMINOLAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE ESTEVIA

Los resultados obtenidos en el recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras y enterobacterias a los 15 días de la elaboración de las gominolas se detallan a continuación.

Se obtuvo ausencia de crecimiento de enterobacterias y los recuentos de los otros parámetros se muestran en las figuras 24 y 25. Tras realizar el primer análisis, las gominolas presentaban contaminación por mohos (Fig. 23), por lo que no se pudo realizar otro análisis a los tiempos planificados. A continuación se valoran los resultados del único recuento.



Figura 23. Gominolas elaboradas en este estudio y contaminación observada

En la figura 24 se muestra el recuento de aerobios mesófilos en función de la concentración de extracto de estevia en las gominolas. Se observa un mayor recuento en la gominola de concentración 1 % y cada vez menor a medida que aumenta la concentración de extracto. Sin embargo las diferencias de los recuentos en relación a las distintas concentraciones no son significativas (p valor 0,1010).

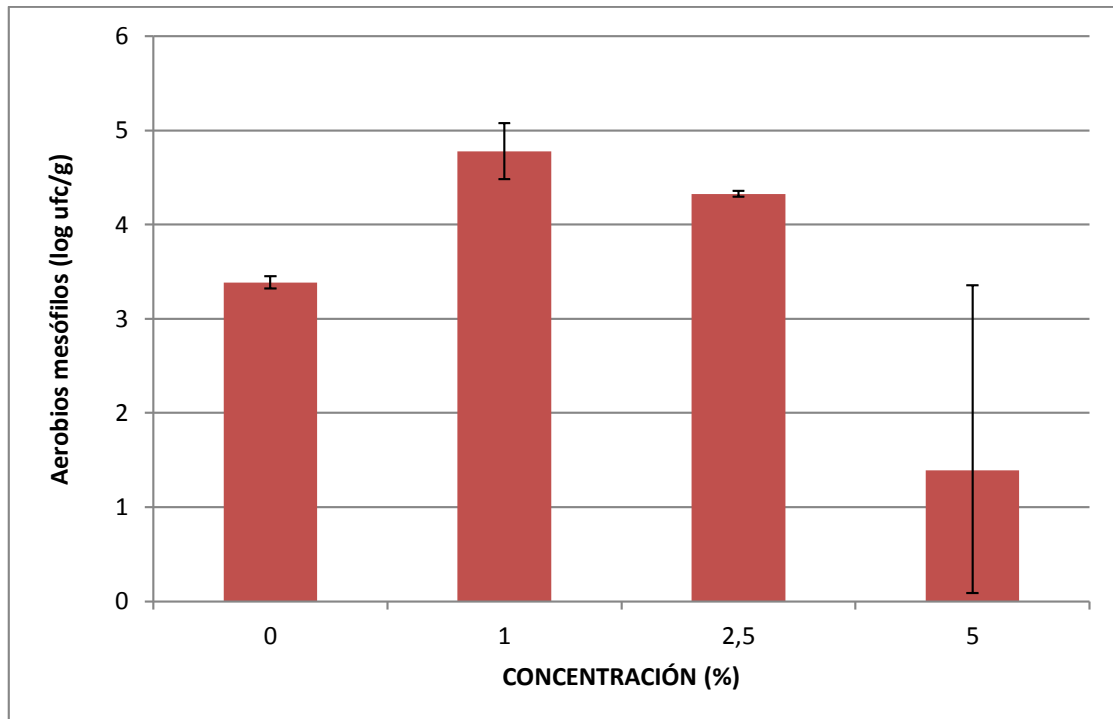


Figura 24. Recuento de aerobios mesófilos en función de la concentración de extracto de estevia en gominolas

En la figura 25 se representa el recuento de mohos y levaduras en las gominolas con diferente concentración de extracto de estevia. En este caso, se observa un recuento similar entre las gominolas sin extracto y las que contienen un 2.5 % de estevia. El recuento para las concentraciones del 1% y 5% es menor que en las anteriores, siendo menor en el 1%. Sin embargo, las diferencias observadas no son significativa (p valor 0,0746).

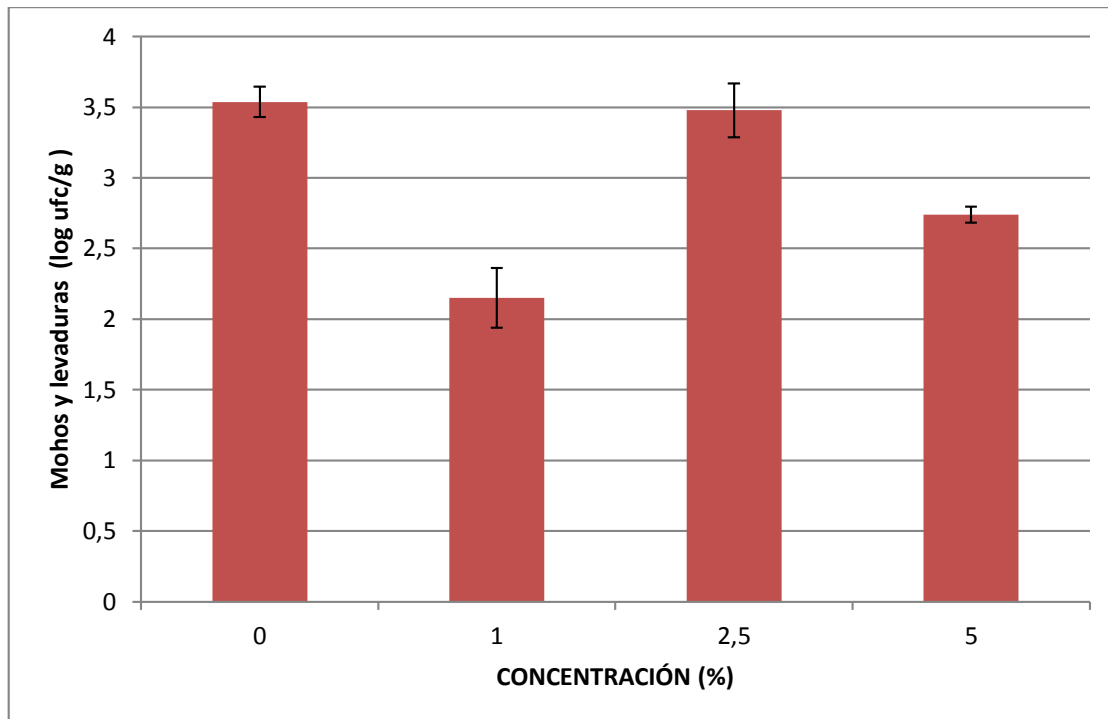


Figura 25. Recuento de mohos y levaduras en función de la concentración de extracto de estevia en gominolas

4. CATA DE GOMINOLAS

La figura 26 muestra los valores obtenidos de la prueba hedónica sobre la aceptación general de la gominola. A la vista de los resultados, la gominola sin estevia (1) es la mejor valorada con una puntuación media de 5.5, llegando a obtener un valor mínimo de 3 y máximo de 8. La gominola de concentración más baja (1%) es la que obtuvo una mayor valoración, con puntuaciones que van de 3 a 6 en la aceptación general. Por último, las dos concentraciones más altas, no alcanzan el umbral del 4.5 que sería el valor medio. El estudio estadístico muestra que existe una diferencia significativa (p-valor 0.0000) entre las muestras, siendo la muestra control, sin estevia, y la muestra con menor concentración de estevia (1%) grupos homogéneos, al igual que lo son las concentraciones 2.5 y 5% de extracto.

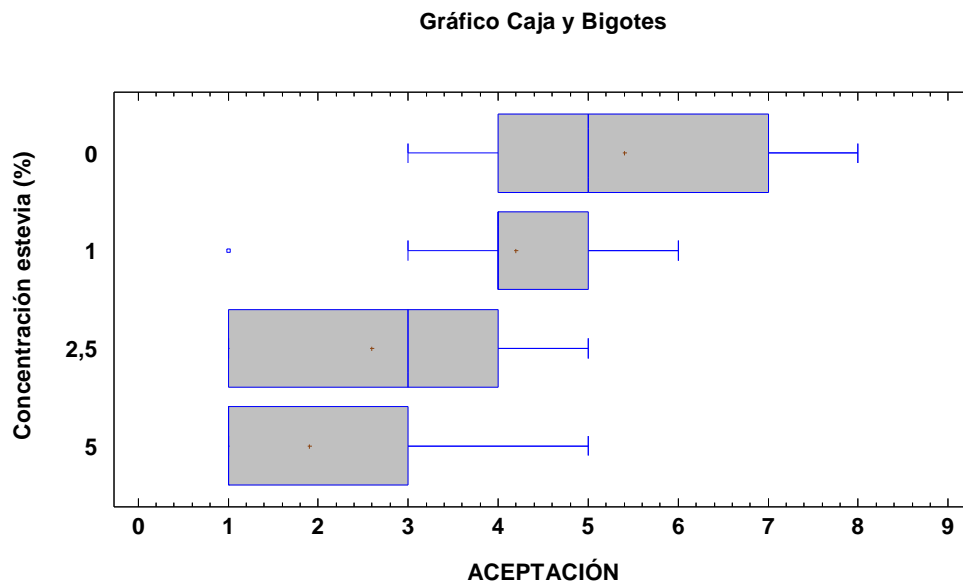


Figura 26. Gráfico de caja y bigotes de la aceptación general de las gominolas con diferentes concentraciones de extracto de estevia

La prueba de valoración de los distintos atributos estudiados: color, olor, dulzor y regusto (Fig. 27), muestra como resultados que el color ha sido claramente el atributo mejor valorado en todas las gominolas, no observando diferencias en relación a la gominola con 1% y con 2,5%. Tan solo en la gominola que contiene la mayor concentración de estevia (5%) se observa una valoración menor. Este hecho puede deberse a que en esta concentración ya se alcanza un color con tonos muy marrones. No obstante, éste no sería un problema insalvable, ya que el consumidor está acostumbrado a ver gominolas de todos los colores.

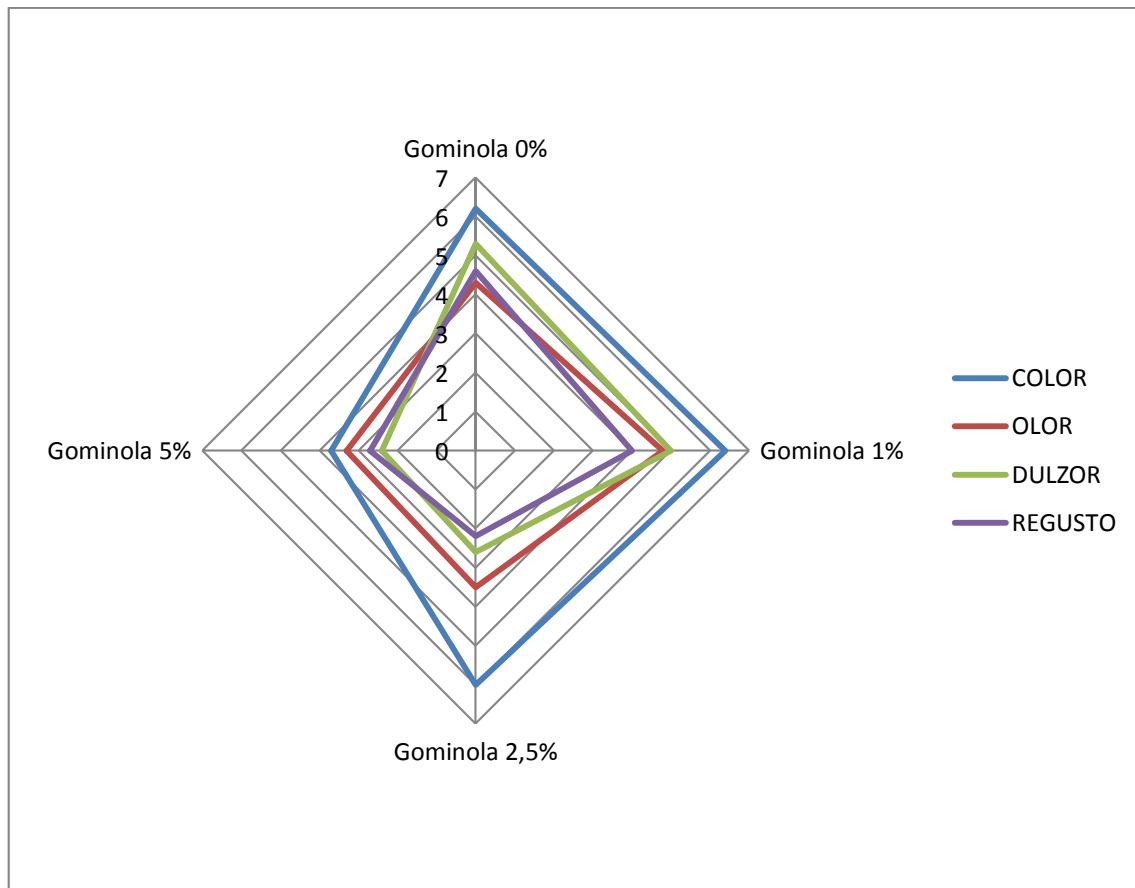


Figura 27. Comparación de las gominolas y la valoración de los atributos de color, olor, dulzor y regusto

En la figura 28 se muestran los gráficos de caja y bigotes obtenidos para cada uno de los atributos. El estudio estadístico muestra que estas diferencias no son significativas (p valor 0.0085). Por otra parte, el olor y regusto tampoco no se ven muy afectados (p- valor 0.1799 y 0.0717) respectivamente. Por último, el atributo del dulzor es el más afectado por la presencia de estevia, mostrando que existen diferencias significativas entre las muestras (p-valor 0.0031).

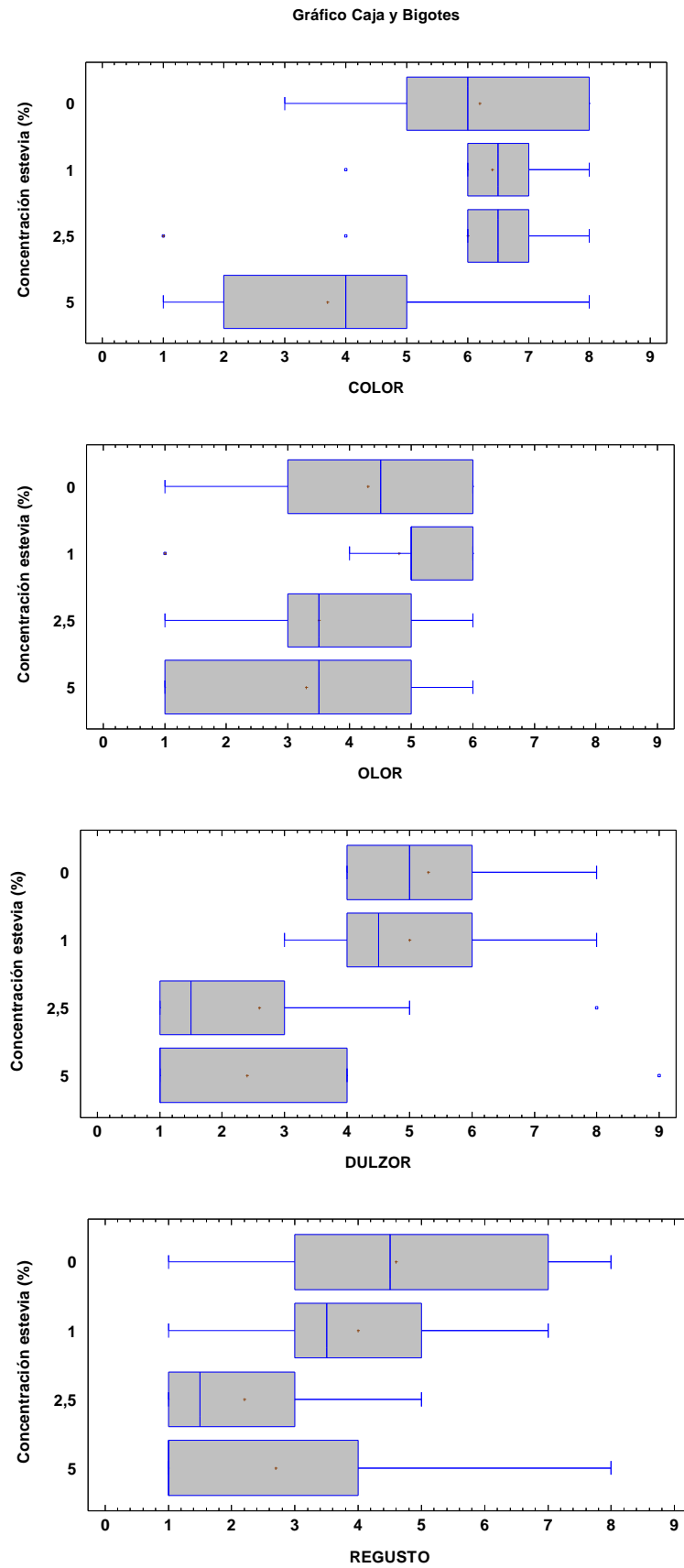


Figura 28. Gráficos de caja y bigotes sobre la valoración de los distintos atributos y las concentraciones de extracto de estevia en las gominolas

La contaminación microbiológica inicial por mohos y levaduras ha sido de 1.3×10^1 ufc/mL en el extracto líquido comercial, mientras que a partir de las hojas desecadas de estevia fue de 4.5×10^2 ufc/g, carga que se elimina completamente en la preparación de la infusión.

A partir de las hojas de estevia se identificaron una amplia variedad de géneros de mohos: *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Acremonium* sp., mientras que del extracto líquido comercial se aislaron *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.

El recuento de mohos y levaduras a partir de las gominolas fue de 2-3 unidades logarítmicas aislándose *Penicillium* sp. en las de 1% de extracto de estevia y *Aspergillus* sp., en las de 2.5 y 5 %. Deberíamos realizar más estudios para asegurar que existe una selección de géneros que pueden desarrollarse en estos productos por el contenido de extracto de estevia.

En el estudio del efecto antimicrobiano de los diferentes extractos sobre una población de *E. coli* 101 observamos que el recuento de *E. coli* con extracto de hojas de estevia disminuye significativamente con respecto del control (sin estevia), a medida que aumenta el tiempo, tanto a 20 °C como a 37 °C. Sin embargo no se observó reducción del crecimiento con el extracto líquido comercial bajo las condiciones estudiadas.

El estudio sensorial de las gominolas mostró que en la prueba de aceptación la gominola sin estevia fue la mejor valorada, seguida de cerca con la de 1% del extracto de estevia. En relación a los atributos estudiados, el dulzor es el más afectado por la presencia de estevia y, consecuentemente, induce a que las peor valoradas sean las gominolas de concentración máxima (5 %). Por el contrario, dado que el consumidor, en este tipo de productos, tiene una visión más amplia en cuanto al color, olor y regusto, la valoración de estas características en las gominolas no se ha visto influenciada estadísticamente por la concentración de estevia aunque si se observan puntuaciones menores en la máxima concentración.

Este trabajo ha permitido comprobar que la mayor capacidad antimicrobiana se da en las mayores concentraciones, sin embargo, el estudio organoléptico indica que el sabor es un factor limitante. Concluimos que su adición en los alimentos tendrá que venir respaldada por otras ventajas, ya que su capacidad antimicrobiana queda limitada por su aceptación organoléptica.

ACOSTA GÓMEZ, A.; MARIO AGUELDO, C.; BARRIENTOS SÁNCHEZ, S.; CHÁVEZ CLAVIJO, M.; CUELLAR ÁVILA, A.; DURÁN CORREA, C.; GAMBOA JAIMES, F.O.; GAMBOA MARTÍNEZ, L.F.; LUCÍA GÓMEZ, O.; GÓMEZ RAMÍREZ, M.; SOLEDAD, I.;(2006). Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Editorial pontifica universidad javeriana (Bogotá). 381pp

ADDOSIO, R.D.; PÁEX, G.; MARÍN, M.; MÁRMOL, Z.; FERRER, J.; (2005). Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis f.flavicarpa Degener*). *Revista facultad agrónoma (luz)*.22:240-249

AECOSAN (2015); Agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición. Dirección URL: < http://aesan.mssi.gob.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/detalle/aditivos.shtml > (Consulta: Junio 2015)

ALONSO, J.R.; 2010. Edulcorantes Naturales. La Granja.Vol.12 (2). Pp. 3-12. ISSN: 13903799 La Granja 12(2): 3-12. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. 12 pp

ARIZA, C.; ORTEGA RODRÍGUEZ, E.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, F.; VALMAYOR, S.; JYÁREZ, O.; PASARÍN, M.I.; (2015). La prevención de la obesidad infantil desde una perspectiva comunitaria. *Atención primaria*. Volumen 47, Issue 4, Pages 246–255

ÁVILA RODRIGUES, A.; (2006). Efeito de acidulantes, espessantes e cultivares nas características físico-químicas e estruturais de topping de mirtilo. Universidad federal de pelotas. 92 pp

BARBA, F.J.; CRIADO, M.N.; BELDA-GALBIS, C.M.; ESTEVE, M.J.; RODRIGO, D. (2014). *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for highpressure processed fruit extract: Processing parameter optimization. *Food chemistry.*, 148; 261–267

BELDA-GALBIS, C.M.; PINA-PÉREZ, M.C.; ESPINOSA, J.; MARCO-CELDRÁN, A.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGO, D. ;(2014). Use of the modified Gompertz equation to

assess the *Stevia rebaudiana* Bertoni antilisterial kinetics. *Food microbiology*. 38 (2014) 56-61

BLÁZQUES SOLANA, J.; (2011). Uso y abuso de colorantes alimentarios de naturaleza sintética, algunos aspectos de interés para el consumidor. *Año internacional de la química*. 4 pp

CALZADA-LEÓN, R.; RUIZ-REYES, M.L.; ALTAMIRANO-BUSTAMANTE, N.; PADRÓN-MARTÍNEZ, M.M.; (2013). Uso de edulcorantes no calóricos en niños. *Acta Pediatría México*. 2013; 34:205-211

CASTILLO, C.; ROMO, M.; (2006). Las golosinas en la alimentación infantil. *Revista chilena de pediatría*. 77 (2); 189-193

CAOBISCO (2014). Annual Report 2014. The Association of the Chocolate, Biscuit & Confectionery Industries of Europe. Dirección URL: <
<http://caobisco.eu/public/images/page/caobisco-05062015091404-2014-CAOBISCO-Annual-Report-Web-GOODVERSION.pdf>> [Consulta: Junio 2015]

CODEX ALIMENTARIUS (2015). International Food Standard. Dirección URL: <
<http://www.codexalimentarius.org/>> [Consulta: Junio 2015]

CONSUM (2002). Gominolas: básicamente azúcar y aditivos. Dirección URL: <
<http://revista.consumer.es/web/es/20020901/actualidad/analisis1/49940.php>> [Consulta Junio 2015]

CORRALES-CORREAL, E.; GARCÓN-GARCÍA, G.; (2014). Identificación y cuantificación de pérdidas de sacarosa en el efluente final del proceso de elaboración de azúcar en el ingenio azucarero Riopaila Castilla (planta Castilla). *Ingeniería Solidaria*, vol. 10, n.º 17, pp. 83-91

- DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; GIGUERAS, M.J.; (2000). *Atlas of clinical fungi*. 2ªEd. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Universita Rovira i Virgili. ISBN 90-70351-43-9
- DURÁN, S.; CORDÓN, K.; RODRÍGUEZ, M.P.; (2013). Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso. *Revista chilena de nutrición*. Vol.40 nº.3
- DURÁN, S.; QUIJADA, M.; SILVA, L.; ALMONACID, N.; BERLANGA, M.; RODRÍGUEZ, M.; (2011) Niveles de ingesta diaria de edulcorantes no nutritivos en escolares de la región de Valparaíso. *Revista chilena de nutrición*. Vol.38, nº.4
- DURÁN, S.; RODRÍGUEZ, M.P.; CORDÓN, K.; RECORD, J.; (2012). Estevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. *Revista chilena de nutrición*. Vol.39 nº4
- EUFIC (2009). European Food Information Council. Dirección URL: <<http://www.eufic.org/article/es/artid/Informacion-aditivos-alimentarios/>> [Consulta Junio 2015]
- GARCÍA ALMEIDA, J.M.; CASADO FERNÁNDEZ, G.M.; GARCÍA ALEMÁN, J.; (2013). Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutrición hospitalaria*. 28 (Supl. 4):17-31
- GIANNUZZI, L.; MOLINA-ORTÍZ, S.E.; (1995). Edulcorantes Naturales y Sintéticos: Aplicaciones y Aspectos Toxicológicos. *Acta Farnz. Botlaeretise 14 (2): 119-31 (1995)*
- GREENFACTS (2002). Facts on health and the environment. Dirección URL: <<http://www.greenfacts.org/es/reevaluacion-aspartame/index.htm> > [Consulta Junio 2015]
- HERNÁNDEZ Y COL., (2005). Curso de análisis e identificación de hongos en alimentos. Ed. UPV

ISO 4121. (2003). Sensory analysis. Guidelines for the use of quantitative response scales. International Organization for Standardization

ISO 5492. (2008). Sensory analysis. Vocabulary. International Organization for Standardization

MARFIL, P.H.M.; ANHÊ, A.C.B.M.; TELIS, V.R.N.; (2012). Texture and Microstructure of Gelatin/Corn Starch-Based Gummy Confections. *Food biophysycs*. Volume 7, Issue 3, pp 236-243

MARTÍNEZ PÉREZ, T.; (2002) La hierba dulce. Historia, usos y cultivos de la *Stevia rebaudiana* Bertoni [Consulta Junio 2015]

Norma UNE-EN ISO 4833-2:2014 Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 2: Recuento de colonias a 30 °C mediante la técnica de siembra en superficie

OMS (2014). Organización mundial de la salud. Dirección URL: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/> > [Consulta Junio 2015]

PÉREZ GUEVARA, S.P.; (2013). Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Universidad de Trujillo. 70 pp

PRODULCE (2014). Asociación Española del Dulce. Caramelos y chicles, chocolate y derivados del cacao, galletas, panificación y pastelería, turrone y mazapanes. Informe anual. Dirección URL: <
<http://produlce.com/filemanager/source/Informes/INFORME%20PRODULCE%202014.pdf> > [Consulta: Junio 2015]

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; (2004). *Introduction to food and airborne fungi*. 7ª ed. Centraalbureau voor schimmelcultures-Utrecht. ISBN 90-70351-52-8

SALVADOR-REYES, R.; SOTELO-HERRERA, M.; PAUCAR-MENACHO, L.; (2014).
Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria* 5(2014) 157-163. Facultad de ciencias agropecuarias. Universidad nacional de Trujillo.

SLOW FOOD SEVILLAYSUR (2015). Dirección URL:
<<http://www.slowfoodsevillaysur.es/?p=747> > [Consulta: Junio 2015]

Anexo 1. Composición de los medios de cultivoPlate Count Agar (Scharlau)

Caseína peptona	5.0 g/L
Extracto de levadura.....	2.5 g/L
Dextrosa.....	1.0 g/L
Agar	15.0 g/L

Final: pH=7.0±0.2 a 25°C

Endo Agar Base (Scharlau)

Peptona.....	10.0 g/L
Lactosa.....	10.0 g/L
Sulfito de sodio	2.5 g/L
Di-potasio hidrogeno fosfato.....	3.5 g/L
Agar	15 g/L

Final: pH=7.2±0.2 a 25°C

Sabouraud- Chloramphenicol Agar (Scharlau)

Caseína peptona	5.0 g/L
Peptona de carne	5.0 g/L
D (+)-glucosa	4.0 g/L
Chloramphenicol.....	0.5 g/L
Agar	15.0 g/L

Final: pH=5.6±0.2 a 25°C

Caldo nutritivo (Difco 234000)

Extracto de res..... 3.0 g/L

Peptona..... 5.0 g/L

Final: pH: 6.8±0.2

Agua de peptona tamponada (Difco 218105)

Peptona..... 10.0 g/L

Cloruro de sodio..... 5.0 g/L

Fosfato disódico 3.5 g/L

Fosfato monopotásico 1.5 g/L

Final: pH: 7.2±0.2