

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

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



***APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS O ENERGÍA DE
MICROONDAS A LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS
ANTIOXIDANTES EN INFUSIONES DE HOJA DE
ESTEVA***

ALUMNO/A:

MARÍA ESPERT MUÑOZ

DIRECTORAS ACADÉMICAS:

DRA. MARISA CASTELLÓ GOMEZ

DRA. ANA BELÉN HEREDIA GUTIÉRREZ

DIRECTORA EXPERIMENTAL:

ÁNGELA PERICHE SANTAMARÍA

APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS O ENERGÍA DE MICROONDAS A LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN INFUSIONES DE HOJA DE ESTEVIA

Espert, M., Periche, A., Heredia, A., Castelló, M.L.

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo.
Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, 46022. Valencia, España.

RESUMEN

La planta de estevia presenta un elevado poder edulcorante debido a la acumulación de glucósidos de esteviol en sus hojas. El consumo de estos compuestos, una vez extraídos y purificados, se está extendiendo como edulcorante acalórico natural. Sin embargo, los extractos acuosos de la hoja deshidratada presentan numerosas propiedades funcionales. Por ello, se podrían incluir en la formulación de diferentes alimentos así como ser consumidos directamente en forma de infusión, aportando no solo dulzor sino también otras ventajas adicionales. En este sentido, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de las variables temperatura, tiempo y método de extracción (convencional, con ultrasonidos y por microondas) sobre algunos de los compuestos bioactivos responsable de las propiedades presentadas por estos extractos. Concretamente, se analizó la actividad antioxidante total, contenido en fenoles totales y flavonoides de extractos acuosos de hoja deshidratada de estevia. La extracción convencional resultó ser el método más efectivo para preservar, al máximo, la capacidad antioxidante de hojas deshidratadas de estevia, lográndose valores de actividad antioxidante (131 mg trolox eq./g estevia a 90 °C 20 min), de fenoles totales (98 mg AG eq./g estevia a 70 °C 20 min) y de flavonoides (67 mg catequina eq./g estevia a 100 °C 20 min) superiores a los presentados por los extractos obtenidos por otras técnicas más novedosas como los ultrasonidos (91 mg trolox eq./g estevia a 70 °C 5 min; 79 mg AG eq./g estevia a 70 °C 20 min; 36 mg catequina eq./g estevia a 90 °C 20 min) y microondas (108 mg trolox eq./g estevia; 87 mg AG eq./g estevia; 48 mg catequina eq./g estevia a 1,98 W/g de infusión 5 min).

Palabras clave: estevia, antioxidantes, ultrasonidos, microondas, temperatura y tiempo de extracción

RESUM

La planta d'estèvia presenta un elevat poder edulcorant degut a l'acumulació de glucòsids d'esteviol en els seus fulls. El consum d'aquests compostos, una vegada extrets i purificats, s'està estenent com edulcorant acalòric natural. No obstant això, els extractes aquosos del full deshidratat presenten nombroses propietats funcionals. Per això, es podrien incloure en la formulació de diferents

aliments així com ser consumits directament en forma d'infusió, aportant no només dolçor sinó també altres avantatges addicionals. En aquest sentit, l'objectiu d'aquest treball ha sigut avaluar l'efecte de les variables temperatura, temps i mètode d'extracció (convencional, amb ultrasons i per microones) sobre alguns dels compostos bioactius responsables de les propietats presentades per aquests extractes. Concretament, es va analitzar l'activitat antioxidant total, contingut en fenols totals i flavonoides d'extractes aquosos de fulla deshidratada d'estèvia. L'extracció convencional va resultar ser el mètode més efectiu per preservar, al màxim, la capacitat antioxidant de fulles deshidratades d'estèvia, aconseguint valors d'activitat antioxidant (131 mg trolox eq./g estèvia a 90 °C 20 min), de fenols totals (98 mg AG eq./g estèvia a 70 °C 20 min) i de flavonoides (67 mg catequina eq./g estèvia a 100 °C 20 min) superiors als presentats pels extractes obtinguts per altres tècniques més noves com els ultrasons (91 mg trolox eq./g estèvia a 70 °C 5 minuts; 79 mg AG eq./g estèvia a 70 °C 20 min, 36 mg catequina eq./g estèvia a 90 °C 20 min) i microones (108 mg trolox eq./g estèvia ; 87 mg AG eq./g estèvia; 48 mg catequina eq./g estèvia a 1,98 W/g d'infusió 5 minuts).

Paraules clau: estèvia, antioxidants, ultrasons, microones, temperatura y temps d'extracció.

ABSTRACT

The stevia plant has high sweetening power due to the accumulation of steviol glycosides in their leaves. Consumption of these compounds, once extracted and purified, is being spreaded as naturally calorie-free sweeteners. However, aqueous extracts of dried leaf have numerous functional properties. Therefore, they could be incorporated into the formulation of different foods or directly be consumed as infusion, providing not only sweetness but also other additional advantages. In this regard, the objective of this study was to evaluate the effect of temperature, time of process and method of extraction (conventional, by ultrasounds or by microwaves) on some bioactive compounds responsible for the properties presented by these extracts. Concretely, total antioxidant activity, total phenolic content and flavonoids of aqueous extracts of dried stevia leaves were analyzed. The conventional extraction was the most effective method to better preserve the antioxidant capacity of dried leaves of stevia, achieving greater values of antioxidant activity (131 mg trolox eq./g stevia at 90 °C 20 min), total phenol (98 mg AG eq./g stevia at 70 °C 20 min) and flavonoid (67 mg catechin eq./g stevia at 100 °C 20 min) than those presented by the extracts obtained by other newer techniques such as ultrasounds (91 mg trolox eq./g stevia at 70 °C 5 min, 79 mg AG eq./g stevia at 70 °C 20 min, 36 mg catechin eq./g stevia at 90 °C 20 min) microwave (108 mg trolox eq./g stevia ; AG 87 mg eq./g stevia; 48 mg catechin eq./g stevia to 1.98 W/g for 5 min infusion).

Keywords: stevia, antioxidants, ultrasounds, microwave, temperature and extraction time

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la sociedad ha ido cambiando sus hábitos alimenticios, reemplazando algunos alimentos ricos en grasas y carbohidratos por otros con menor contenido de los mismos. Debido a esta tendencia por parte de los consumidores, la industria alimentaria ha realizado un esfuerzo notable por ofrecer un amplio conjunto de edulcorantes, naturales o artificiales, de características organolépticas similares a las de los azúcares pero con un aporte calórico inferior. En este contexto aparecen los glucósidos procedentes de *Stevia rebaudiana* como una interesante alternativa al uso de azúcares de mesa y de edulcorantes artificiales, debido a que además de ser acalóricos son también naturales.

La estevia (*Stevia rebaudiana*) es una planta perenne originaria de Paraguay perteneciente a la familia Asteraceae (Goyal et al., 2010). La principal característica de la hoja de estevia es su elevado sabor dulce, entre 250-300 veces superior al de la sacarosa, consecuencia de la presencia de glucósidos de esteviol (Ghanta et al., 2007). El uso más común de la hoja de estevia está dirigido a la extracción y purificación de los esteviosidos con el fin de obtener un edulcorante natural acalórico, aunque la hoja de la planta posee otras propiedades terapéuticas. De ahí el creciente interés en el uso no solo de los esteviosidos aislados sino de extractos acuosos de hoja deshidratada de estevia. Estos extractos podrían consumirse a modo de infusión o ser incorporados a diferentes formulaciones alimentarias como zumos, galletas, mermeladas, golosinas, etc. La EFSA (European Food Safety Authority) reconoció la seguridad de los extractos de hoja de estevia para uso alimentario en noviembre de 2011 (EFSA, 2011), a pesar de que su uso estaba autorizado en diferentes países de Asia y América desde hace años. En concreto, Japón fue el primer país en comercializar los esteviosidos como edulcorante en fármacos y alimentos en 1968 (Kroyer, 2010). Las hojas de estevia son ricas en compuestos con propiedades antiinflamatorias (Jayaraman et al., 2008), diuréticas (Kochikyan et al., 2006), antihipertensas (Chan et al., 2000) antihiperlipémicas, (Chen et al., 2006), antidiarreicas (Chatsudhipong y Muanprasat, 2009) y antitumorales (Chen et al., 2006), además de antioxidantes. Diversos autores han estudiado la capacidad antioxidante de extractos provenientes de hojas de plantas tales como el té (Yao et al., 2003), del mate (Dugo et al., 2009) o de la menta (Biswas et al., 2012). Los compuestos fenólicos y flavonoides, también presentes en las hojas de estevia, son los responsables de la elevada capacidad antioxidante de las plantas (Tadhani et al., 2007; Shukla et al., 2009; Muanda et al., 2011). La separación de los principios activos de la hoja deshidratada o fresca puede realizarse fácilmente por medio de una extracción acuosa. Sin embargo, en ciertos casos la aplicación de elevadas temperatura y tiempos prolongados de extracción pueden conducir a la pérdida de las propiedades antioxidantes, además de requerirse un pretratamiento de la materia prima con el fin de obtener rendimientos adecuados. La aplicación tanto de ultrasonidos como de energía de microondas podría aumentar la velocidad de transferencia de materia y por tanto el rendimiento de extracción de compuestos antioxidantes a partir de material vegetal, y por tanto de hojas de estevia. La aplicación de ultrasonidos

es una técnica basada en la incidencia de ondas acústicas inaudibles a una frecuencia superior a 20 kHz sobre un medio físico. Concretamente, los ultrasonidos de potencia, también llamado de baja frecuencia y elevada energía, se utilizan en la ingeniería de alimentos con el fin de acelerar los fenómenos de transferencia de materia y calor. En este sentido, también se han utilizado con el fin de aumentar la cinética de extracción de compuestos bioactivos a partir de material vegetal así como de aumentar su rendimiento. Mediante la aplicación de ultrasonidos se produce una mayor penetración del disolvente en la matriz celular, una alteración de la estructura y por tanto una mejora en la transferencia de materia. Este hecho es consecuencia del calentamiento producido por la absorción de energía acústica en las interfases, de los fenómenos de “efecto esponja” (ciclos de compresión-expansión rápidos y sucesivos) y de “cavitación” (por formación, crecimiento y colapso de pequeñas burbujas de aire como consecuencia de los cambios de presión) que se producen en el interior del producto, así como de la generación de un régimen turbulento en el medio líquido. Algunos procesos en los que se ha aplicado con éxito serían la extracción de compuestos antioxidantes a partir de cáscaras de cítricos (Ya-Qin Ma et al., 2009), de compuestos aromáticos en ajo (Jimenez et al., 2003) o de aceites y polifenoles en semillas de uva (Da Porto et al., 2012).

Por otro lado, las ondas electromagnéticas a la frecuencia de microondas provocan un movimiento interno de migración y rotación de las moléculas bipolares, principalmente el agua, al intentar orientarse en el campo electromagnético. El rozamiento derivado de este movimiento molecular contribuye al rápido calentamiento de la matriz vegetal. Una de las principales ventajas de este método es la notable reducción del tiempo de extracción con respecto al método convencional. Esta técnica está siendo ampliamente utilizada en la síntesis y extracción de compuestos orgánicos por sus ventajas, por lo que ha alcanzado un vertiginoso desarrollo en la última década (Balcinde et al., 2003). En este contexto, Jawad et al. (2012) lo han aplicado con éxito la energía de microondas en la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscaras de mandarina.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de la aplicación de ultrasonidos y de energía microondas en el proceso de extracción de compuestos antioxidantes a partir de hoja deshidratada de estevia. Concretamente, se evaluará el efecto de la temperatura y tiempo de extracción convencional, con ultrasonidos y microondas sobre la capacidad antioxidante total, contenido en fenoles totales y flavonoides totales.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Materia prima

El trabajo se ha llevado a cabo utilizando hojas de estevia (*Stevia rebaudiana*) deshidratada de producción ecológica de la marca Raab Vitalfood, adquiridas en el mercado local.

2.2 Tipo de extracción sólido-líquido

Se realizaron extracciones sólido-líquido de hojas deshidratadas de estevia en agua en una relación constante producto:disolvente de 1:100 (p/p) mediante tres técnicas diferentes:

- a) Extracción convencional a presión atmosférica y en baño termostático a 50, 70, 90 y 100 °C durante 1, 5, 20 y 40 minutos.
- b) Energía de microondas aplicando una potencia relativa de 1,98 W/g de infusión durante 1, 2, 3 y 5 minutos y a 3,30 W/g de infusión durante 1 y 2 minutos.
- c) Ultrasonidos a 50, 70 y 90 °C durante 1, 5 y 20 minutos.

Posteriormente, los extractos acuosos se filtraron con papel de filtro y se dejaron enfriar para la determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales y flavonoides totales. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Se utilizó un molinillo de la marca Severin con cuchilla de acero inoxidable para triturar la hoja de estevia para mejorar la superficie de contacto de la hoja con el agua. Para las extracciones sólido-líquido se usaron un baño de la marca PSelecta Precisdig con set de temperatura, un baño de ultrasonidos de la marca Ultrasounds-H selecta y un microondas de la marca Samsung con una potencia de 100-750 W. Para la determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales y flavonoides totales se usó un espectrofotómetro de la marca Jasco modelo V-360.

2.3 Determinación de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante (AA) del extracto de hoja se midió según el método descrito por Shahidi et al. (2006) con algunas modificaciones. En este método, la intensidad del color violáceo de la disolución 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) disminuye en presencia de antioxidantes y el cambio de su absorbancia se mide espectrofotométricamente a 515 nm. A 0,1 mL de la muestra diluida en metanol se le añadieron 3,9 mL de una disolución de DPPH de 0,024 g/L y después de 30 minutos se midió la absorbancia. La actividad antioxidante (%) de las muestras fue calculada en función de la siguiente expresión:

$$AA(\%) = \frac{A_{t=0} - A_{t=30}}{A_{t=0}}$$

Donde $A_{t=0}$ es la absorbancia inicial del DPPH (sin muestra) y $A_{t=30}$ es la absorbancia de la muestra después de 30 minutos.

La medición se comparó con una curva estándar preparada con disoluciones de Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) y expresada en mg equivalentes de trolox por gramo.

2.4 Determinación de fenoles totales

Las muestras fueron analizadas espectrofotométricamente para determinar el contenido total de fenoles por el método colorimétrico modificado de Folin-Ciocalteu (Sakanaka et al., 2004). Para ello, 0,125 mL de una dilución conocida del extracto fueron añadidos a una cubeta con 0,5 mL de agua destilada. A continuación se adicionaron 0,125 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. La mezcla se mantuvo en reposo durante 6 minutos y después se le añadieron 1,25 mL de una disolución de sodio carbonato al 7% y 1 mL de agua destilada. El color evolucionó durante 90 minutos y la absorbancia fue medida a 760 nm. La medición se comparó con una curva estándar preparada con disoluciones de ácido gálico (mg de ácido gálico equivalentes por gramo). Se preparó un blanco de la misma forma pero sin muestra.

2.5 Determinación del contenido total de flavonoides

El contenido de flavonoides fue determinado usando el método colorimétrico descrito por Bhatti et al. (2007). Un volumen de 0,25 mL de una dilución conocida de la muestra se mezcló con 1 mL de agua destilada en una cubeta. A continuación se le añadieron 0,075 mL de una disolución de nitrito sódico al 5%. Después de 6 minutos, se añadieron 0,150 mL de cloruro de aluminio al 10% y la mezcla se dejó reposar durante 5 minutos antes de añadirle 0,5 mL de hidróxido sódico 1M. Finalmente se adicionaron 2 mL de agua destilada y se midió la absorbancia inmediatamente a 510 nm. La medición se comparó con una curva estándar preparada con disoluciones de (+)-catequina y los resultados se expresaron como mg de catequina equivalentes por gramo. Se preparó un blanco de la misma forma pero sin muestra.

2.6. Análisis estadístico

La evaluación de la significación estadística de las diferencias encontradas de las variables se ha realizado con un Análisis de la Varianza (ANOVA). El estudio de las interacciones entre los factores temperatura y tiempo, se llevó a cabo mediante un test de comparación múltiple, LSD test con un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Influencia de las condiciones de extracción acuosa de hojas de estevia sobre el contenido de fenoles totales

En la figura 1 se presentan el contenido en fenoles totales, expresados como mg de ácido gálico eq./g estevia, en las muestras de extractos de hoja de estevia analizadas según el método de extracción y sus variables (tiempo, temperatura o potencia). Por otra parte, en la figura 2 se presenta el gráfico de interacción de los factores tiempo y temperatura de extracción, comparando el

método convencional y utilizando ultrasonidos, en el contenido de fenoles totales de los extractos de estevia analizados.

De acuerdo al método de extracción, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la extracción convencional consiguió un mayor rendimiento en la obtención de fenoles totales cuando se trabajó a temperaturas superiores a 70 °C. En este caso, la extracción de fenoles totales se incrementó conforme aumentó la temperatura hasta 90 °C. La subida de temperatura en el intervalo entre 90 y 100 °C no mejoró en ningún caso la extracción, probablemente debido al deterioro sufrido por los compuestos fenólicos al alcanzar temperaturas de ebullición del extracto. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Liazid et al. (2007) que observaron que a partir de 100 °C determinados compuestos fenólicos dejaban de ser estables. Por otra parte, siguiendo con el método convencional, en general, el aumento en el tiempo de proceso no mejoró la extracción de fenoles. Sólo en las muestras tratadas a 70 °C, sí que se registró un aumento significativo de la extracción de fenoles totales conforme aumentaba el tiempo de proceso, avalado por la distribución de los grupos homogéneos registrados en la figura 1. Sin embargo, para 90 °C, el contenido de fenoles totales extraído fue similar para todos los tiempos considerados. En este sentido, con este método se recomendarían unas condiciones de extracción de 90 °C durante 1 min para obtener la mayor cantidad de fenoles.

Respecto a la extracción de fenoles totales con ultrasonidos, el efecto del tiempo fue más significativo, dando lugar a mayores niveles de extracción conforme se aumentó el proceso. No obstante, el efecto de la temperatura fue menos acusado, sin presentarse unas diferencias tan marcadas entre 50 y 90 °C como en el método convencional (figura 2). En este caso, las condiciones recomendables para conseguir la máxima extracción de fenoles totales no se centrarían en el empleo de altas temperaturas, sino en tiempos de proceso más elevado (50 °C durante 20 min), con la consecuente ralentización del proceso total y sus posibles interacciones con otros componentes susceptibles de sufrir deterioro a prolongadas exposiciones de ultrasonidos. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por otros autores que observaron que a temperaturas mayores de 50 °C con extracción asistida por ultrasonidos no mejoraron el proceso de extracción de fenoles totales en cáscara de cítricos (Ya-Qin Ma et al., 2009; Muhammad et al., 2010) y en fresas ya que a temperaturas superiores a 50 °C se induce a la inestabilidad de los compuestos fenólicos (Herrera y Luque de Castro, 2005). Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, estudios previos ponen de manifiesto que los ultrasonidos mejoran la extracción de fenoles de otros productos (Mason et al., 1996; Vinatoru et al., 2001; Viroit et al., 2009).

En cuanto a la extracción por microondas, es importante comentar que potencias superiores a 3,30 W/g de infusión para tiempos superiores a 2 minutos implicaron la ebullición y el desbordamiento de la muestra. Puesto que el proceso de extracción en estas condiciones no sería operativo, no se realizaron las determinaciones a partir de estas condiciones de trabajo. Además, para los tiempos de proceso en los que se trabajó a las dos potencias, no se registraron diferencias significativas en la cantidad de fenoles extraídos. Considerando la potencia aplicada de 1,98 W/g de infusión, sí que se

evidenció un ligero efecto del tiempo en el aumento de la extracción de fenoles. En este sentido, la mayor extracción de fenoles obtenida por microondas sería utilizando una potencia de 1,98 W/g de infusión durante 5 minutos.

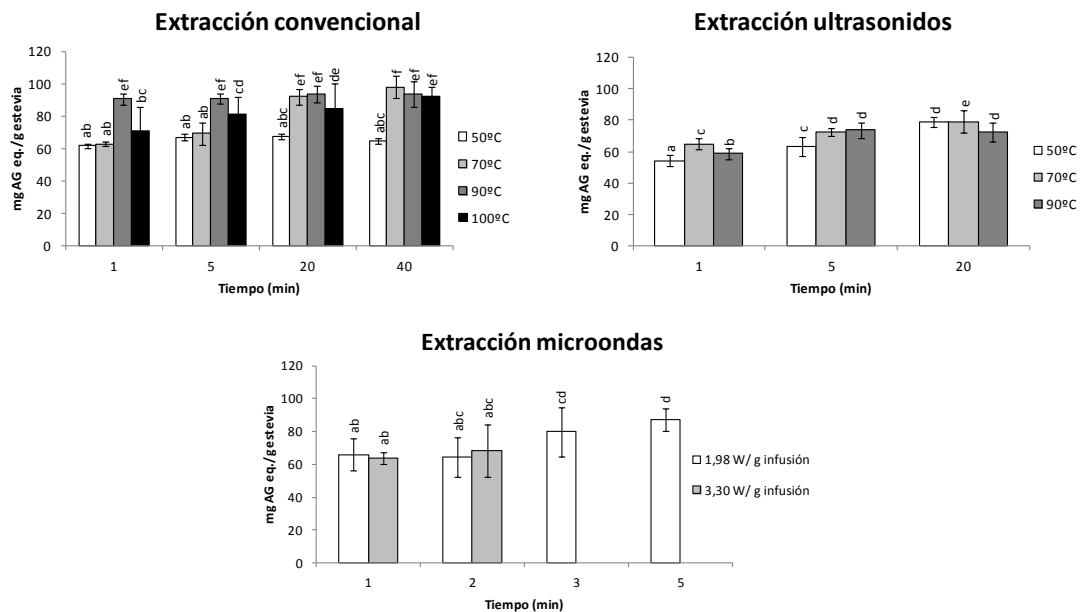


Figura 1. Contenido en fenoles totales (mg ácido gálico equivalentes/g hoja de estevia) en función de la temperatura y el tiempo de extracción.

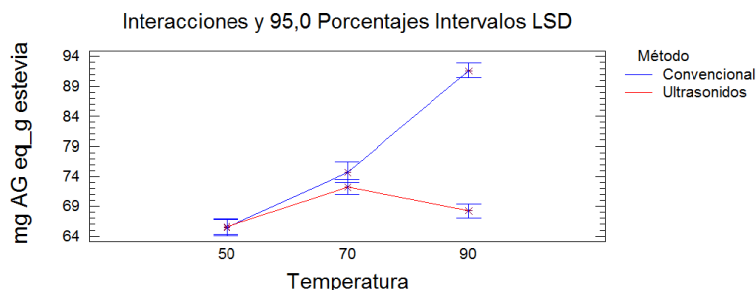


Figura 2. Gráfico de interacción Método (Convencional y Ultrasonidos)-Temperatura de extracción resultado del ANOVA multifactor aplicado a la variable respuesta: fenoles totales.

3.2 Influencia de las condiciones de extracción acuosa de hojas de estevia sobre el contenido de flavonoides totales

La figura 3 presenta los resultados de flavonoides, expresados como mg de catequina eq./g estevia, en las muestras de extractos de hoja de estevia analizadas según el método de extracción y sus variables (tiempo, temperatura o potencia). Por otra parte, en la figura 4 se muestra el gráfico de interacción de los factores tiempo y temperatura de extracción, comparando el método convencional y utilizando ultrasonidos, en el contenido de flavonoides de los extractos analizados.

Como en el caso de los fenoles totales, la mayor extracción de flavonoides tuvo lugar cuando se utilizó el método convencional y se trabajó a temperaturas superiores a 70 °C. Además, en este caso, el incremento en la temperatura aumentó la extracción de flavonoides, incluso a temperaturas de ebullición (100 °C), lo que pondría de manifiesto la mayor termorresistencia de estos compuestos en comparación con los fenoles. El tiempo de proceso, sólo mejoró la extracción de flavonoides cuando se trabajó a 100 °C, sin observarse diferencias significativas en los resultados entre 5 y 20 minutos.

En la extracción con ultrasonidos, tampoco el aumento en la temperatura contribuyó a mejorar la extracción de flavonoides, aunque el tiempo de proceso sí.

En el caso de la aplicación de microondas, la extracción de flavonoides siguió la misma tendencia que en la extracción de fenoles, obteniéndose la mayor extracción de flavonoides utilizando una potencia de 1,98 W/g de infusión durante 5 minutos.

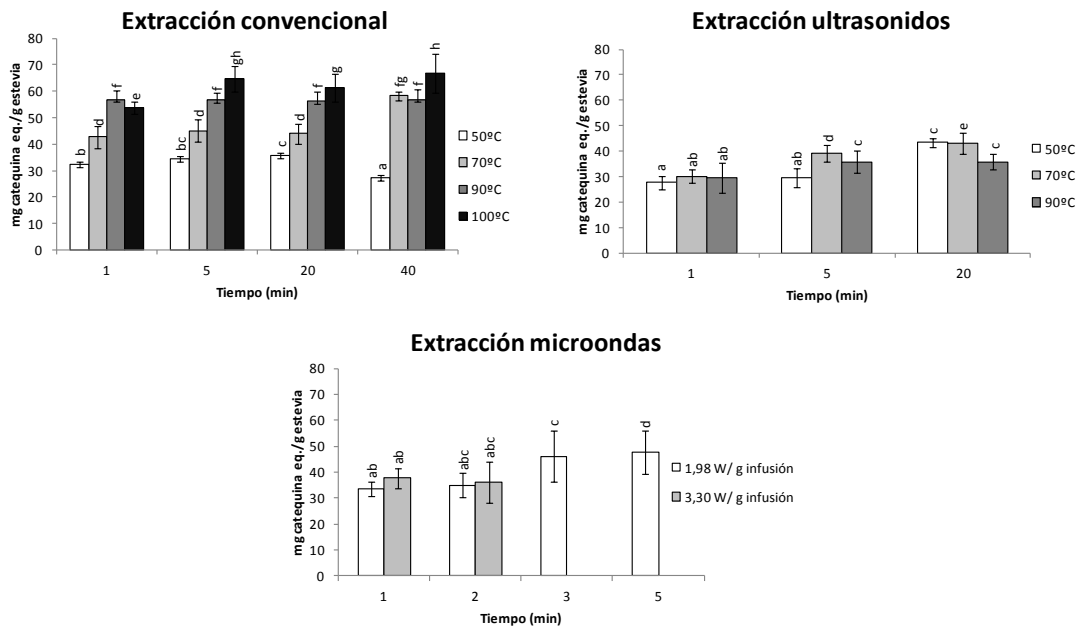


Figura 3. Contenido en flavonoides totales (mg catequina equivalentes/g hoja de estevia) en función de la temperatura y el tiempo de extracción.

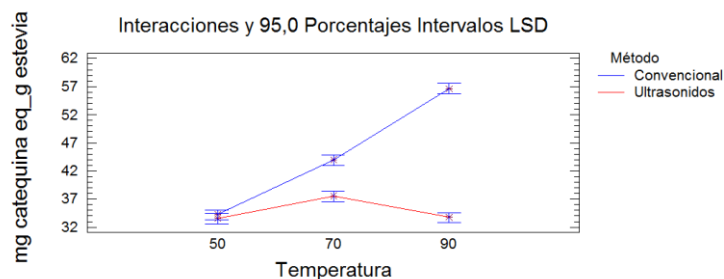


Figura 4. Gráfico de interacción Método (Convencional y Ultrasonidos)-Temperatura de extracción resultado del ANOVA multifactor aplicado a la variable respuesta: flavonoides totales.

3.3 Influencia de las condiciones de extracción acuosa de hojas de estevia sobre la actividad antioxidante

En la figura 5 se presentan los resultados de actividad antioxidante, expresados como mg trolox eq./g estevia, en las muestras de extractos de hoja de estevia analizadas según el método de extracción y sus variables (tiempo, temperatura o potencia). Por otra parte, en la figura 6 se presenta el gráfico de interacción de los factores tiempo y temperatura de extracción, comparando el método convencional y utilizando ultrasonidos, en la actividad antioxidante de los extractos de estevia analizados.

Coherentemente con los resultados obtenidos para el contenido en flavonoides y fenoles totales, la extracción convencional resultó ser el método más efectivo para preservar, al máximo, la capacidad antioxidante nativa de las hojas de estevia en sus extractos acuosos. Así, mientras la extracción convencional permite obtener valores de actividad antioxidante de hasta 131 mg trolox eq./g estevia a 90 °C y 20 minutos, tanto con ultrasonidos como con microondas la actividad antioxidante se sitúa entorno a un valor medio de 100 mg trolox eq./g estevia en las condiciones más favorables. Tal y como ya se ha explicado previamente, la extracción con ultrasonidos debería generar rendimientos más altos en tiempos más cortos. En contraposición, los resultados obtenidos en este estudio difieren de los de otros autores que consiguieron un incremento del rendimiento en la extracción asistida por ultrasonidos (Mason et al., 1996; Vinatoru et al., 2001; Virot et al., 2009).

Sin embargo los valores de capacidad antioxidante total por extracción con microondas son coherentes con los estudios realizados por Inglett et al. (2009). Estos autores obtuvieron una menor actividad antioxidante por extracción con microondas, argumentando que la energía aplicada por el microondas podría degradar determinados compuestos antioxidantes.

En cuanto al efecto del tiempo y la temperatura de extracción, en el caso del método convencional, el análisis estadístico reveló que no existieron prácticamente diferencias significativas entre los valores de actividad antioxidante de los extractos en función de la temperatura ni del tiempo de extracción por encima de 70 °C, si bien un aumento de temperatura por encima de los 90 °C resultó tener un efecto negativo, posiblemente debido a la inestabilidad de los compuestos antioxidantes a elevadas temperaturas (Inglett et al., 2009). Cabe destacar que los resultados muestran una ligera ventaja al realizar la extracción a 90 °C durante 20 minutos con respecto a 70 °C. Cuando

se aplicaron ultrasonidos, los extractos con mayor actividad antioxidante fueron aquellos obtenidos a 70 °C, no existiendo influencia del tiempo de extracción. Este hecho pone de manifiesto el desinterés de prolongar el tiempo de extracción más allá de 1 minuto bajo estas condiciones. En cuanto a la aplicación de energía de microondas, los resultados parecen indicar un incremento en la actividad antioxidante de los extractos de estevia conforme aumenta el tiempo de extracción. Respecto al efecto de la potencia aplicada, el hecho de que los extractos alcanzaran la temperatura de ebullición al aplicar potencias de 3,30 W/g de infusión a tiempos superiores a 2 minutos, permite deducir que un incremento de la potencia aplicada no implicaría una ventaja no sólo desde la perspectiva de las propiedades antioxidantes del extracto sino tampoco de sus propiedades físico-químicas y sensoriales. La elevada desviación estándar de los datos obtenidos bajo estas condiciones ponen de manifiesto, además, la dificultad para controlar adecuadamente las condiciones de trabajo.

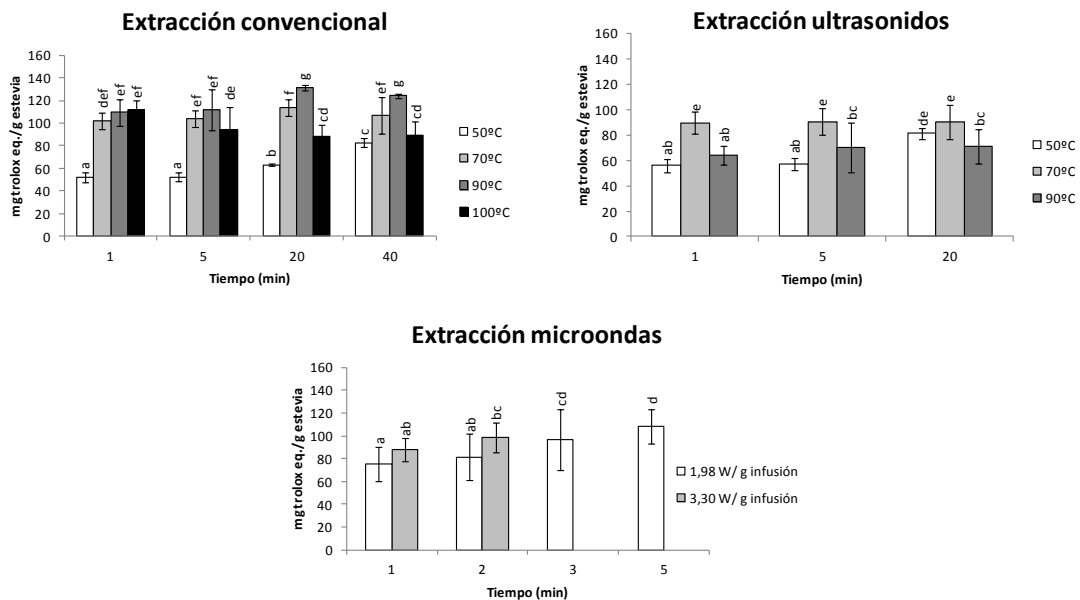


Figura 5. Contenido en antioxidantes totales (mg Trolox equivalentes/ g hoja de estevia) en función de la temperatura y el tiempo de extracción.

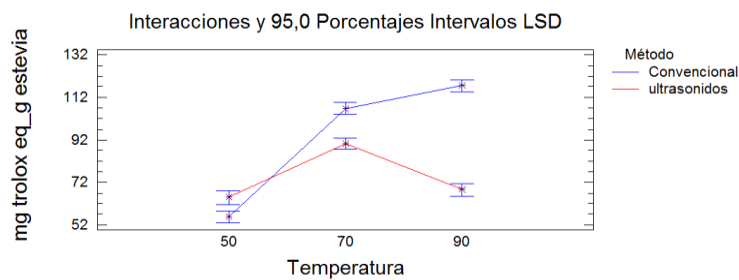


Figura 6. Gráfico de interacción Método (Convencional y Ultrasonidos)-Temperatura de extracción resultado del ANOVA multifactor aplicado a la variable respuesta: actividad antioxidante.

A modo de resumen en la tabla 1 se presentan los valores del cociente-F y el nivel de significación de las variables de extracción (factores) analizadas en este estudio resultado de los diferentes ANOVAs multifactor realizados para el contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante. Cabe destacar que, salvo en la actividad antioxidante, todos los factores (método, tiempo y temperatura o potencia en el caso de aplicación con microondas) así como sus interacciones, resultaron tener un efecto significativo a un nivel de significación superior al 99.9 %. En cuanto al peso de los diferentes factores (cociente-F) sobre las variables respuesta, la interacción método-temperatura o potencia en el caso de la extracción con microondas, resultó ser la más influyente (mayor valor de cociente-F de la interacción AB) así como los factores simples: método y temperatura. Aunque el tiempo resultó ser un factor con efecto estadísticamente significativo sobre las variables respuesta, tan sólo en el caso del contenido en fenoles totales presentó realmente relevancia (comparación entre valores cociente-F de fenoles y del resto de variables respuesta).

Tabla 1. Valores del coeficiente-F y nivel de significación de los factores: método, temperatura y tiempo de extracción resultado del ANOVA multifactor aplicado a la variables respuestas: contenido en fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante de los extractos acuosos de hojas de estevia.

Efectos principales	Cociente-F		
	Fenoles	Flavonoides	Act. Antioxidantes
A: Método	121,67**	355,40**	122,87**
B: Temperatura	130,01**	153,15**	186,16**
C: Tiempo	123,30**	49,82**	21,22**
Interacciones			
AB	102,68**	156,80**	96,05**
AC	6,20**	32,25**	0,79 NS
BC	11,70**	8,32**	1,99 NS
ABC	17,31**	3,96**	3,02*

NS: diferencias estadísticamente no significativas ($p \geq 0.05$); nivel de confianza: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

4. CONCLUSIONES

La extractabilidad de los compuestos antioxidantes en la infusión de hojas de estevia se vio afectada por el método de extracción, así como por la temperatura y en menor medida por el tiempo de extracción. La aplicación de ultrasonidos y la energía de microondas degradan los compuestos antioxidantes presentes en los extractos acuosos de estevia. La extracción convencional consiguió un mayor rendimiento en la obtención de actividad antioxidante, fenoles y flavonoides totales, siendo las condiciones óptimas, máxima extracción, diferentes para cada compuesto. Así, en el caso de fenoles y actividad antioxidante, éstas serían de 90 °C durante 1 y 20 minutos, respectivamente; mientras que para flavonoides serían 100 °C durante 5 minutos. En el caso de tener que elegir unas condiciones comunes de

extracción para todos los compuestos, éstas corresponderían a 90 °C durante 20 minutos, priorizando así el maximizar el valor de actividad antioxidante total puesto que ésta es el resultado de la presencia además, de otros compuestos bioactivos no analizados en este trabajo.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen la financiación recibida por el Proyecto ref. 2012 de la convocatoria de Primeros Proyectos 2011 de la Universidad Politécnica de Valencia.

6. REFERENCIAS

- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk L., Lorimer, J.P., Mason, T.J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry* 11 (2004) 261–265.
- Balcinde, Y., Hung, B., Marrero, A., Tirado, S., Pérez, C., Falero, A. (2003). Comparación de diferentes métodos de extracción para la obtención de una fracción rica en fitosteroles a partir de la cachaza de caña de azúcar. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, Vol. 36, No. 1, 2005.
- Bhatti, H., Iqbal, Z., Chatha, S., Bukhari I. (2007). Variations in oil potential and chemical composition of *Eucalyptus crebra* among different districts of Punjab-Pakistan. *International Journal of Agricultural and Biology*, 9, 136-138.
- Biswas, A.K., Chatli, M.K., Sahoo, J. (2012). Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. *Food Chemistry*. 133. 467-472.
- Chan, P., Linson, B., Chen, Y., Liu, J., Hsieh, M., Cheng, J. (2000). A double blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 50, 215–220.
- Chatsudthipong, V., Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, 121,41–54.
- Chen, J., Jeppesen, P., Abudula, R., Dyrskog, S., Colombo, M., Hermansen, K. (2006). Stevioside does not cause increased basal insulin secretion or b-cell desensitization as does the sulphonylurea, glibenclamide: Studies in vitro. *Life Science*, 78, 1748–1753.
- Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. (2012). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry* xxx (2013) xxx–xxx.
- Dugo P., Cacciola F., Donato P., Assis R., Bastos E., Mondello L. (2009) High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. *Journal of Chromatography A*. 43,7213-7221.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2011) Revised exposure assessment for steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *Journal* 2011; 9(1):1972
- Ghanta, S., Banerjee, A., Poddar, A., Chattopadhyay, S. (2007). Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55,10962–10967.
- Goyal., S., Samsher, K., Goyal., R.K. (2010). *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetner: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1), 1-10.
- Herrera, M.C. y Luque de Castro, M.D. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A* 1100, 2005, 1-7.
- Inglett, G.E., Rose, D.J., Chen, D., Stevenson, D.G., Biswas, A. (2009). Phenolic content and antioxidant activity of extracts from whole buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) with or without microwave irradiation. *Food Chemistry* 119 (2010) 1216–1219.

- Jawad A., T.A.G. Langrish (2011). Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering* 109 (2012) 162–174.
- Jayaraman, S., Manoharan, M., Illanchezian, S. (2008). In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1143–1149.
- Jiménez, J. y Luque de Castro, D. (2003). Forward-and-back dynamic ultrasound assisted extraction of fat from bakery products. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, university of Córdoba, Annex Marie Curie Building, Campus of Rabanales
- Kim, I., Yang, M., Lee, O., Kang, S. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *Food Science and Technology*, 44, 1328–1332.
- Kochikyan, V., Markosyan, A., Abelyan, L., Balayan, A., Abelyan, V. (2006). Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 31–37.
- Kroyer, J. (2010). Stevioside and Stevia-sweeter in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. doi:10.1007/s00003-010-0557-3.
- Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C.G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 1140 (1–2), 29–34.
- Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3 (1996) S253-S260.
- Michiels J.A., Kevers Cl., Pincemail J, Defraigne J.O., Dommès J. (2012) Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*. 130,986-993.
- Muanda, F., Soulimani, R., Diop, B., Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Science and Technology*. 44,1865-1872.
- Muhammad K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier, Dangles O., Chemat F. (2009). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* 119 (2010) 851–858.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Okada, Y. (2004). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 89, 569-575.
- Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C.M., Wall, D.S. (2006). Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99, 478-483.
- Shukla S., Mehta A., Menta P., Bajpai V. (2011) Antioxidant ability and phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*. doi:10.1016/j.etp.2011.02.002.
- Shukla S., Mehta A., Bajpai V. (2009). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food Chemistry Toxicology*. 47, 2338-2343.
- Tadhani, M., Patel, V., Subhash, R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 323–329.
- Vinatoru, F. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303–313.
- Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec. C., Renard, C.M., Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrason Sonochem*. 2010 Aug;17(6):1066-74.
- Yao, L., Jiang Y., Datta N., Singanusong R., Liu X., Duan J., Raymont K., Lisle A., Xu, Y. (2004). HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry*. 84, 253-263.
- Ya-Qin, M., Jian-Chu C., Dong-Hong L., Xing-Qian Y. (2008). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* 16 (2009) 57–62.