

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
DE ALIMENTOS



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CUANTIFICACIÓN
DE: POLIFENOLES TOTALES Y CATEQUINA EN HOJAS DE STEVIA
(*Stevia rebaudiana Bertoni*)**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

EVIL VARGAS PIÑAN

TINGO MARÍA
PERÚ
2011



F60

V28

Vargas Piñan, Evil

Evaluación de la Actividad Antioxidante, Cuantificación de: Polifenoles Totales y Catequina en Hojas de Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*). Tingo María, 2011

61 h.; 11 cuadros; 14 fgrs.; 18 anexo 62 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Industrias Alimentarias) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

1. STEVIA REBAUDIANA BERTONI 2. ANTIOXIDANTE 3. CATEQUINA
4. STEVIA 5. POLIFENOLES 6. DPPH - PEROXILO 7. PERU.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156
Apart. Postal 156 Tingo María E.mail: fia@unas.edu.pe

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 16 de Noviembre de 2011, a horas 6:30 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por el Bach. **VARGAS PIÑAN, Evil**, titulada:

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACIÓN DE:
POLIFENOLES TOTALES Y CATEQUINA EN HOJAS DE STEVIA
(*Stevia rebaudiana Bertoni*)”**

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de **MUY BUENO** en consecuencia el Bachiller, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51° y 52° del Estatuto Actualizado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 16 de Noviembre de 2011

Ing. Mg. Pedro A. Vejarano Jara
Presidente

Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez
Miembro

Ing. Lauriano Zavaleta De La Cruz
Miembro

DEDICATORIA

A Dios Todo poderoso, por darme la vida, la salud, por ser mi sostén y guía en cada momento de mi existencia.

A mi Madre, **Maximina**, con todo el amor del mundo, por su apoyo incondicional, esfuerzo, sacrificio y por sus sabios consejos para la culminación de mi carrera profesional.

A mis hermanos: Quiteria, Melek, Rubén, Esteban, Erika, Luis, Salome, Adino, Carlos, Evila y Manuel; por su cariño, sus consejos para superarme y que nuestra unidad nunca se rompa.

AGRADECIMIENTO

- Al Dr. Manuel Sandoval Chacón, Co-Asesor, por su valiosa colaboración en la investigación
- A la Dra. Elizabeth Susana Ordoñez Gómez, por su apoyo incondicional en la culminación de la tesis.
- Al Ing. Jhony W. Vargas Solórzano, por sus orientaciones, enseñanzas durante el desarrollo de la investigación.
- Al Ing. Davy W. Hidalgo Chávez, por su colaboración y participación en la investigación.
- A los Ing. Helmut Calvay, José Huanca y María de Guadalupe Díaz, por su ayuda durante el desarrollo de la investigación.
- A mis hermanos, sobrinos y sobrinas, por su amor, comprensión y apoyo, fueron la motivación para seguir adelante.
- A mis amigos, Gilmer, Jabin, Ronald, Melisa, Claudia, Pascual, Elizabeth, Yasmin, por compartir momentos alegres y apoyarnos en la vida cristiana.
- A todas aquellas personas que directa o indirectamente hicieron posible la culminación del presente trabajo.

INDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Aspectos generales de la stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni).....	3
2.1.1. Origen y distribución geográfica de la stevia.....	3
2.1.2. Clasificación taxonomía.....	4
2.1.3. Descripción botánica	4
2.1.4. Beneficios de la stevia	5
2.2. Generalidades de los antioxidantes	6
2.2.1. Tipos de antioxidantes.....	7
2.2.2. Polifenoles.....	9
2.2.3. Flavonoides	10
2.2.4. Catequina.....	11
2.3. Radicales libres	12
2.4. Cromatografía líquida de alta performance	14
III. MATERIALES Y METODOS	16
3.1. Lugar de ejecución.....	16
3.2. Materia prima.....	16
3.3. Equipos materiales y reactivos.....	17
3.3.1. Equipos de laboratorio.....	17
3.3.2. Materiales.....	18
3.3.3. Reactivos y solventes.....	18

3.4. Métodos de análisis	18
3.4.1. Cuantificación de polifenoles totales en hojas de Stevia.....	18
3.4.2. Cuantificación de catequinas en hojas de stevia	19
3.4.3. Evaluación de la actividad antioxidante en hojas de stevia.....	19
3.5. Metodología experimental.....	20
3.5.1. Preparación de la muestra.....	20
3.5.2. Preparación de extractos acuoso	22
3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales en hoja de Stevia.	24
3.5.4. Cuantificación de catequina en hojas de stevia.	25
3.5.5. Evaluación de la actividad antioxidante en hojas de stevia.....	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
4.1. Cuantificación de polifenoles totales en hojas de stevia.....	31
4.1.1. Determinación de la curva estándar de ácido gálico.....	31
4.1.2. Cuantificación de polifenoles totales.....	33
4.2. Cuantificación de catequina en hojas de stevia.....	36
4.2.1. Determinación de la curva estándar.	36
4.2.2. Cuantificación de catequina.....	38
4.3. Evaluación de la actividad antioxidante en hojas de stevia	42
4.3.1. Determinación del coeficiente de inhibición (IC ₅₀) radical 1,1- diphenyl-2-picrilhydrazil (DPPH).	42
4.3.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC ₅₀) radical peroxilo.	45
V. CONCLUSIONES	49
VI. RECOMENDACIONES	50
ABSTRACT	51

VII. BIBLIOGRAFIA.....	52
ANEXOS.....	62

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
01. Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación.....	13
02. Parámetros de secado para las hojas de stevia..	22
03. Preparación de soluciones de trabajo para la cuantificación de polifenoles totales.....	25
04. Preparación de las soluciones de trabajo para la prueba radical DPPH	27
05. Preparación de las soluciones de trabajo para la prueba radical peroxilo..	28
06. Determinación de la curva estándar de ácido gálico	32
07. Cuantificación de polifenoles totales en hojas de stevia stevia.....	34
08. Resultados de lectura de la curva estándar de catequina en HPLC.	37
09. Resultados de la cuantificación de catequina en hojas de stevia.....	40
10. Resultados de la determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical DPPH en hojas de stevia .	43
11. Resultados de la determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical peroxilo en hojas de stevia.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
01. Stevia (<i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>).....	3
02. Estructura química del alfa tocoferol y ácido ascórbico	8
03. Estructura química de compuestos fenólicos.....	9
04. Estructura química del flavanol y antiocianidina.....	11
05. Estructura química de la catequina.....	11
06. Flujograma de operaciones para la obtención de la muestra seca.....	21
07. Flujograma de operaciones para la obtención del extracto acuoso de hojas de stevia	23
08. Diseño experimental para la cuantificación de polifenoles, catequina y actividad antioxidante en hojas de stevia.	30
09. Curva estándar del ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totale	32
10. Representación del contenido de polifenoles totales en hoja de stevia	34
11. Grafica de la curva de calibración para catequina.....	37
12. Representación del contenido de catequina en hoja de stevia.....	40
13. Comportamiento del IC ₅₀ con el radical DPPH en hojas de stevia, blanqueada y sin blanquear	43
14. Comportamiento del IC ₅₀ con el radical peroxilo en hojas de stevia, blanqueada y sin blanquear	46

INDICE DE ANEXOS

Anexo	Pág.
A-I. Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g) en hojas de stevia sin blanquear y blanqueadas.....	63
A-II. Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g) en hojas de stevia sin blanquear.....	63
A-III. Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g) en hojas de stevia blanqueadas.....	63
A-IV. Análisis de varianza cuantificación de catequina (mg CAT/100 g), en hojas de stevia sin blanquear y blanqueadas.....	64
A-V. Análisis de varianza cuantificación de catequina (mg CAT/100 g), en hojas de stevia sin blanquear.....	64
A-VI. Análisis de varianza cuantificación de catequina, en hojas de stevia blanqueadas.....	64
A-VII. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical DPPH, en hojas de stevia sin blanquear y blanqueadas.....	65
A-VIII. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical DPPH, en hojas de stevia sin blanquear.....	65
A-IX. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical DPPH, en hojas de stevia blanqueadas.....	65
A-X. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical peroxilo, en hojas de stevia sin blanquear y blanqueadas.....	66

A-XI. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical peroxilo, en hojas de stevia sin blanquear.....	66
A-XII. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical peroxilo, en hojas de stevia blanqueadas	66
A-XIII. Cromatograma de catequina en hoja de stevia sin blanquear, secado a 45 °C (T1).....	67
A-XIV. Cromatograma de catequina en hoja de stevia sin blanquear, secado a 55 °C (T2).....	67
A-XV. Cromatograma de catequina en hoja de stevia sin blanquear, secado a 65 °C (T3).....	67
A-XVI. Cromatograma de catequina en hoja de stevia blanqueada, secado a 45 °C (T1).....	68
A-XVII. Cromatograma de catequina en hoja de stevia blanqueada, secado a 55 °C (T2).....	68
A-XVIII. Cromatograma de catequina en hoja de stevia blanqueada, secado a 65 °C (T3).....	68

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio del Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) y en el Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM), de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en Tingo María. Los objetivos fueron la cuantificación de polifenoles totales, catequina y la evaluación de la actividad antioxidante en hojas blanqueadas y sin blanquear de Stevia. El blanqueado fue a ebullición/5 seg., ambos tratamientos fueron secados (45°C/12 h (T1); 55 °C/8 h (T2); 65 °C/4 h (T3)) y molidos finamente para la cuantificación de polifenoles totales, catequina y actividad antioxidante. Se preparó un extracto acuoso (ebullición/15 min.) de 100 mg/mL (3 g /30 mL), las muestras fueron filtradas y centrifugadas (1000 rpm/10 min/4°C). El análisis estadístico se realizó mediante el DCA con arreglo factorial 2x3 y la prueba de Tukey ($p < 0,01$) y se utilizó el software SAS 6,0. El mayor contenido de polifenoles totales fue para las hojas sin blanquear y secado (T1) $5,322 \pm 0,12$ g EAG/100 g y el menor correspondió a (T3) $2,381 \pm 0,17$ g EAG/100 g. El mayor contenido de catequina se encontró en hojas sin blanquear secado (T2) $17,342 \pm 0,11$ mg CAT/100 g y el menor correspondió a (T1) $7,135 \pm 0,14$ mg CAT/100 g. La mayor eficiencia de inhibición frente al radical DPPH y peroxilo correspondió a hojas blanqueadas y secadas (T1) $IC_{50} 58,513 \pm 0,45$ μ g/mL y $IC_{50} 8,343 \pm 0,06$ μ g/mL respectivamente, la menor correspondió a las hojas blanqueadas y secadas (T3) $IC_{50} 75,961 \pm 0,44$ μ g/mL y $IC_{50} 10,203 \pm 0,12$ μ g/mL respectivamente.

I. INTRODUCCIÓN

La stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) es una planta oriunda de Paraguay, que fácilmente se adapta a las zonas tropicales de nuestra amazonia peruana, cabe mencionar que su cultivo de esta planta es muy escasa en provincia de Leoncio Prado. La producción de stevia en países como, Brasil, Japón, Paraguay es muy elevado ya que presentan una buena demanda mundial, sabiendo que dicha planta contiene componentes activos en las hojas, que son usados como sustituto de la sacarosa en la elaboración de productos alimenticios por contener baja calorías.

Las hojas de stevia presenta propiedades medicinales benéficos para la salud ya que se hicieron estudios que validan lo mencionado, además los recursos vegetales, son fuentes importantes de metabolitos primarios y secundarios con excelente propiedad de actividad antioxidante que pueden contribuir con los sistemas de defensa.

Esta propiedad se debe a la presencia de compuestos bioactivos tales como los polifenoles y catequinas, que se encuentran naturalmente en las hojas y todos alimentos de origen vegetal y en la planta actúa como defensa contra los agentes oxidantes. Actualmente, se ha centrado el interés en el estudio de plantas que contienen compuestos fenólicos que actúan contra los radicales libre, tal es el caso de la stevia referente a recursos fitoterapeuticos y

diversos usos deben ser evaluados, con la finalidad de conocer su actividad antioxidante cuyas propiedades deben ser validadas científicamente. En base al marco de referencia se planteó los siguientes objetivos:

- Cuantificación de polifenoles totales y catequinas.
- Evaluación de la actividad antioxidante por los métodos de radicales libres: DPPH y peroxilo.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos generales de la stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*).

2.1.1. Origen y distribución geográfica de la stevia.

Es una planta herbácea selvática subtropical originaria de la sierra Amambai del alto Paraná, nativa del sureste de Paraguay y noroeste de la provincia de Misiones. La Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) fue conocida por los indios guaraníes paraguayos con el nombre de *Kaá-hée*. Procede de las zonas subtropicales y tropicales de América del Sur y América Central, concretamente de Paraguay y Brasil.

Crece en regiones subtropicales, semihumedo, soporta precipitaciones fluviales regularmente y temperaturas extremas de -6 a 43 °C, la temperatura apropiada para la stevia es de 15 a 30 °C, no resiste periodos prolongados de sequía, se desarrolla donde la estación de crecimiento es larga y la intensidad de luz es alta, la planta crece y se puede adaptar a gran variedad de terrenos y climas (AGUIRRE, 2008).



Figura 1. Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*).

2.1.2. Clasificación taxonomía

La planta tiene el siguiente marco de la taxonomía :

Reino: Vegetal

Subreino: Tracheobionta (Plantas vasculares)

División: Magnoliophyta (Fanerógama angiosperma)

Subdivisión: Spermatophyta (Plantas de la semilla)

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledóneas)

Subclase: Asteridae

Serie: Multiaristae

Tribu: Eupatorieas

Orden: Campanulares (Asterales)

Familia: Compuestas (Asteráceas de Monochlamydeae, compositaseas)

Género: Stevia

Especie: Rebaudiana Bertoni

Nombre científico: *Stevia rebaudiana Bertoni* ó *Eupatorium rebaudianum Bertoni* ó *Rebaudianum de Eupatorium*. (BRUCHER, 1974).

2.1.3. Descripción botánica

Es un arbusto perenne de aproximadamente 80 cm de altura. Las hojas es utilizada en el proceso de extracción, son sésiles, es decir pegada al tallo, dentadas, tienen tricomas en la superficie y son trinervadas longitudinalmente, mostrando el nervio medio más desarrollados. Las flores son pequeñas y blancas (AUGUSTO, 2007).

Es un cultivo semiperenne que puede durar entre cinco y seis años, con dos o tres cortes anuales, el rendimiento de hoja seca varía entre 3000 y

3500 kg/Ha en el primer año, 4000 a 4500 kg/Ha en el segundo y 4000 a 6000 kg/Ha en el tercero, disminuyendo a 4000 kg/Ha en el cuarto (AGUIRRE, 2008).

2.1.4. Beneficios de la stevia

Los modernos científicos a finales de este siglo se han interesado por la *Stevia rebaudiana*, sus hojas contienen varios agentes químicos llamados glucósidos, son los que dan el sabor dulce pero no proporciona calorías. El mejor glucósido es el denominado esteviósido, su poder edulcorante es 200-300 veces superior al de la sacarosa, y es actualmente uno de los edulcorantes naturales más usados en Japón y Corea (ORIHUELA *et al.*, 1998).

Las sustancias edulcorantes que se encuentran en la stevia son: el esteviósido y rebaudiósido que están dentro del grupo de edulcorantes no nutritivos, ya que con su ingesta, se provee al organismo de poca energía o respuesta glucémica.

Los edulcorantes no nutritivos pueden contribuir al control del peso o de la glucosa en la sangre así como la prevención de caries dentales. La industria de la alimentación valora estos edulcorantes por sus cualidades sensoriales, entre las que se encuentra: sabor dulce, ausencia de sabor amargo u olor, seguridad, compatibilidad con otros ingredientes alimentarios y estabilidad en diferentes entornos alimentarios (CHAN *et al.*, 2000).

JARMA *et al.*, (2010) menciona que sus efectos positivos en la salud del hombre, en las que se reportan propiedades anti-rotavirus, mejoramiento de

la hipertensión, tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, al estimular la secreción de insulina actuando sobre las células del páncreas.

La diabetes es una enfermedad que tiene efectos perjudiciales sobre el páncreas, por lo que estudios recientes demuestran el efecto benéfico de consumir esta planta para controlar de manera importante los niveles de azúcar en la sangre, sin que esto quiera decir que se reemplace las prácticas normales de un diabético (AGUIRRE, 2008).

Se le ha dado diversos usos como: alimento para ganado, elaboración de té, abono orgánico, edulcorante de mesa, bebidas, pastelería, dulces, confituras, mermeladas, yogures, chicles, pasta dental, helados. Esta planta puede ser cultivada comercialmente y con el tiempo podría ser la fuente edulcorante más importante en el mundo (AGUIRRE, 2008).

2.2. Generalidades de los antioxidantes

RAMOS *et al.*, (2008) un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. El sistema de defensa antioxidante está constituido por compuestos de naturaleza enzimática como: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y compuestos de naturaleza no enzimática como: vitamina E, beta-caroteno, vitamina C, glutatión reducido, albúmina, flavonoides y metales de transición como Se, Cu, Zn, entre otros.

Los antioxidantes son sustancias químicas que inactivan los radicales libres o inhiben su producción, impidiendo así deterioro en las células. Los antioxidantes ceden un electrón al radical libre, oxidándose y transformándose en un radical libre débil que es inofensivo, en algunos casos

puede llegar a regenerarse como en el caso de la vitamina E. Se dividen en dos categorías: antioxidantes endógenos (enzimáticos) y antioxidantes exógenos (no enzimáticos) (PINEDA, 2005).

Todo antioxidante prolonga la vida útil de los alimentos protegiéndolo contra el deterioro causado por la oxidación (PSZCZOLA, 2001). El antioxidante al colisionar con el radical libre (RL) le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

2.2.1. Tipos de antioxidantes

2.2.1.1. Antioxidantes endógenos

Son los antioxidantes que se encuentran normalmente en el organismo se llaman endógenos y generalmente son sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa (mitocondrial, citoplasmática y extracelular), la catalasa y el complejo glutatión peroxidasa (PINEDA, 2005).

2.2.1.2. Antioxidantes exógenos

Los antioxidantes exógenos o no enzimáticos, transforman los radicales libres en menos agresivos. Entre ellos tenemos: Flavonoides, alfa tocoferol (vitamina E), beta caroteno, vitamina C, glutatión y urato reporta que las plantas producen una gran variedad de productos secundarios que contienen grupos de fenoles, flavonoides, lignina, y taninos condensados (POKORNY *et al.*, 2005).

Los antioxidantes exógenos son los que se ingieren con la dieta encontrándose en diversos alimentos como las frutas y verduras. Otro

antioxidante es el beta caroteno, precursor de la vitamina A y se halla presente sólo en los alimentos de origen vegetal como las frutas y verduras, amarillas y anaranjadas, como la naranja, el durazno, el melón, el pomelo, el mango, la zanahoria y la espinaca. Los carotenos son sensibles a la oxidación que se acelera por la presencia de luz y tienen un efecto favorable para el sistema inmunológico, protegen a la piel contra la radiación ultravioleta, poseen un efecto protector específico de los tejidos. Su función como antioxidante es detoxificar el oxígeno libre reactivo (PINEDA, 2005).

La vitamina E, conocido también como tocoferol es liposoluble, se encuentra en el interior de las membranas citoplasmáticas, actúa como bloqueador de las reacciones redox en cadena evitando la peroxidación lipídica; en la naturaleza existen cuatro isómeros de este compuesto: α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol. Se considera como factor de protección en la enfermedad cardiovascular, al evitar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Entre otras acciones la vitamina E también es capaz de neutralizar el oxígeno en singlete y peróxidos, capturar radicales hidroxilo y capturar el anión superóxido (PINEDA, 2005).

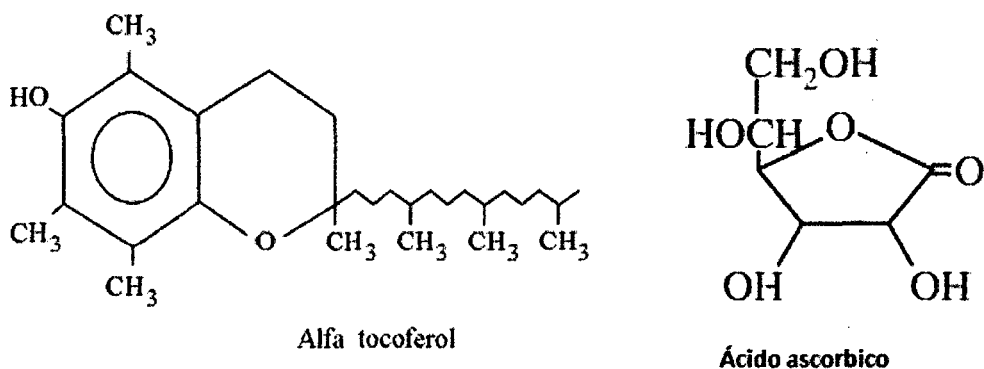


Figura 2. Estructura química del alfa tocoferol y ácido ascórbico.

2.2.2. Polifenoles

VON (2011), hace mención que los polifenoles son un amplio grupo de metabolitos secundarios que abundan en las plantas. Cumplen importantes funciones como agentes de defensa contra estrés bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (radiaciones ultravioletas y sequía). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, estos compuestos son importantes en el crecimiento y reproducción, proveen protección contra los patógenos y depredadores, también contribuyen en el color y las características sensoriales de las frutas y vegetales.

Los compuestos fenólicos exhiben un amplio rango de propiedades fisiológicas, tales como antialérgico, anti-arterogénico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, antitrombótico, protección cardiovascular y efectos vasodilatador, estos compuestos han sido asociados con la salud por los beneficios que aportan en el consumo de frutas y vegetales, esto es atribuido a su actividad antioxidante (BALASUNDRAM *et al.*, 2005).

El ácido gálico, catequina, rutina, ácido elágico y quercitina son compuestos fenólicos (SAMEE y VORARAT, 2007).

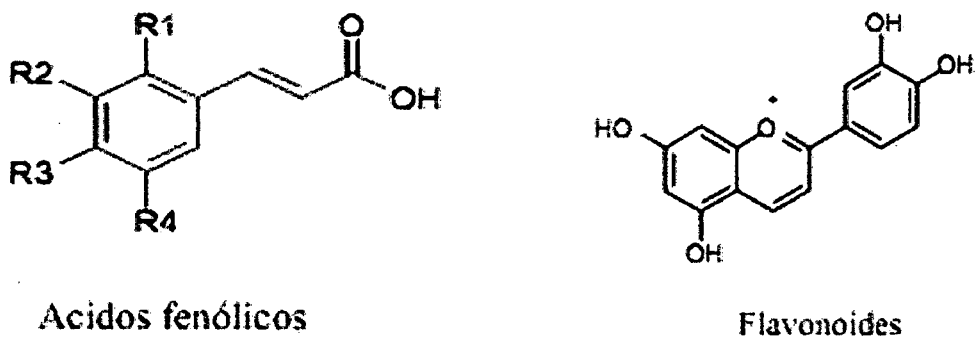


Figura 3. Estructura química de compuestos fenólicos.

2.2.3. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de sustancias fenólicas de origen vegetal que se caracterizan por poseer un esqueleto carbonado del tipo C₆-C₃-C₆, estas sustancias se encuentran en los tejidos de las plantas superiores e incluyen las flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavononas y las chalconas (POKORNY *et al.*, 2005).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo de pirano (heterocíclico). Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. (MARTINEZ *et al.*, 2002).

Los flavonoides también provienen de los colores de las flores de las plantas, frutas y hojas, también hace mención que los flavonoides y otros compuestos fenólicos ha sido sugerido como medida de prevención para el cáncer y enfermedad del corazón (KÄHKÖNEN *et al.*, 1999).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Los flavonoides se clasifican en varios grupos: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc. (MARTINEZ *et al.*, 2002).

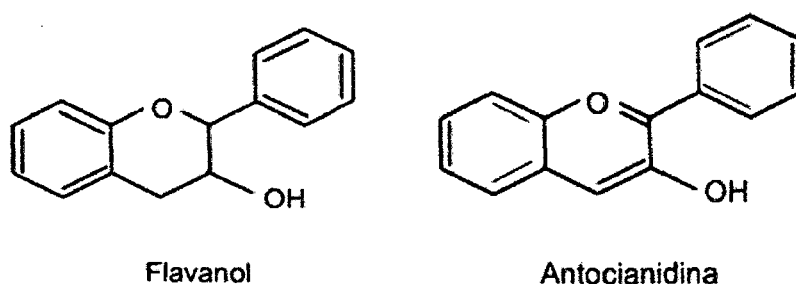


Figura 4. Estructura química del flavanol y antocianidina.

2.2.4. Catequina

Las catequinas son los principales constituyentes de varios tipos de té son mejores por su efecto antioxidativo, antimutación, anticarcinogénica, antibiótica e hipertensión. Las principales flavan 3 – oles presentes en el té constituyen una mezcla de catequinas (CAT) entre ellas: epigalocatequina galato (EGCG), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) y epicatequina (EC) (MELCHOR, 2002).

ZÚÑIGA (2005), manifiesta que los oligómeros o polímeros de la (+) catequina y (-) epicatequina abundan en las semillas y hollejos, aunque pueden encontrarse en las hojas y raíces.

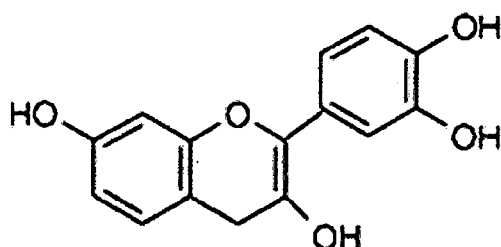


Figura 5. Estructura química de la catequina.

2.3. Radicales libres

Son átomos o moléculas orgánicas e inorgánicas que contienen uno o más electrones desapareados (RUSCUKLI, 2005; BIANCHI y ANTUNES, 1999). Enérgicamente, los electrones tienen la tendencia a ocurrir en pares, algunas veces uno de los pares pueden ser perdidos o un único electrón puede ser ganado por un no radical; tienden a reaccionar con otros componentes a fin de restablecer su normalidad de unión (RUSCUKLI, 2005).

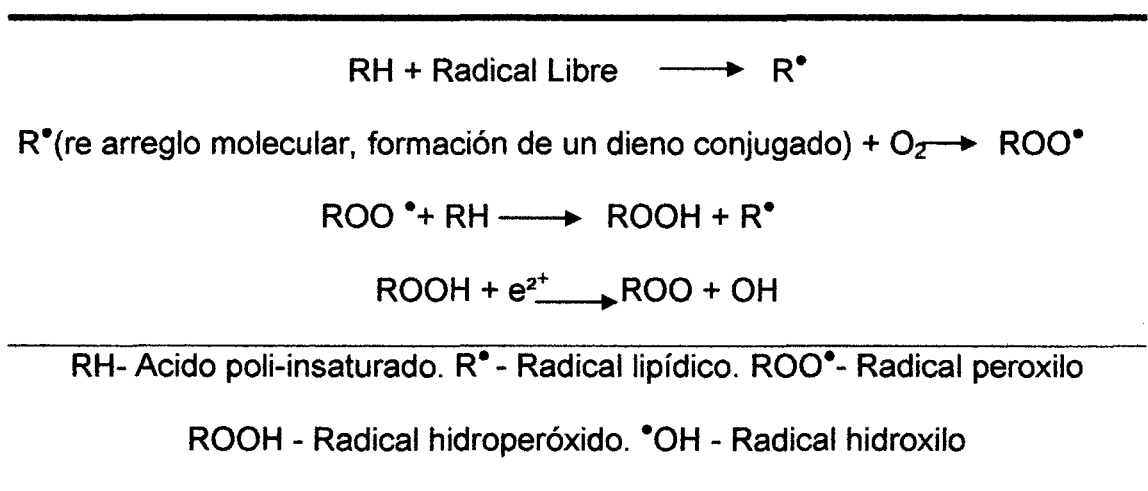
Son altamente reactivos que al contacto con sustancias orgánicas e inorgánicas, afectan las propiedades químicas y funcionales de las sustancias a su alrededor, en especial de moléculas que se encuentran en la membrana celular, los ácidos grasos insaturados, proteínas y ácidos nucleicos.

La principal fuente biológica o endógena de radicales libres lo constituye la mitocondria, ya que durante el proceso de fosforilación oxidativa se genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar ATP, el aceptor final de electrones es el oxígeno, en esta transferencia de electrones se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación, cediendo uno o dos electrones al oxígeno produciendo intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres. Otros lugares de formación de radicales libres lo constituyen algunas organelos, que poseen pequeñas vacuolas llamadas peroxisomas y los leucocitos polimorfonucleares (PINEDA, 2005). Las fuentes exógenas de radicales libres incluyen el humo de tabaco, las radiaciones ionizantes, solventes orgánicos y las pesticidas (MAVI *et al.*, 2004).

Los radicales libres son especies reactivas de oxígeno (ROS) (PINEDA, 2005; MAVI *et al.*, 2004) y especies de nitrógeno reactivo (RNS) (MAVI *et al.*, 2004), en la que participa el oxígeno y el nitrógeno para formar radicales libres como el radical hidroxilo (OH^\cdot), anión superóxido (O_2^-), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO^\cdot), ácido nitroso (HNO_2) el radical hipoclorito y varios peróxidos de lípidos (RUSCUKLI, 2005).

Los radicales peroxilos (ROO^\cdot) más abundantes en los sistemas biológicos. Se originan a partir de la adición de oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonatado. Se forman como intermediarios durante la ruptura de los lípidos peroxidados en las reacciones de la peroxidación lipídica. La formación de ROO^\cdot es el paso más importante de las reacciones de propagación en cadena durante la peroxidación lipídica; tal como se presenta en el Cuadro 01

Cuadro 1. Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación.



Fuente: GONZALES -TORRES *et al.*, (2000).

2.4. Cromatografía líquida de alta performance

La cromatografía es la ciencia de separar entre sí los compuestos de una sustancia (RUBINSON y RUBINSON, 2001). La cromatografía líquida de alta performance (HPLC, de sus siglas en inglés) es la técnica de separación más ampliamente utilizada en separaciones analíticas. Las razones de su popularidad de esta técnica es su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general (SKOOG y LEARY, 1994). En alimentos, es utilizado como un método confirmatorio para la determinación de aditivos, contaminantes y compuestos naturales (BOVANOVA y BRANDSTETEROVÁ, 2000) además para separar, aislar, identificar y cuantificar compuestos desconocidos tales como vitaminas, proteínas y compuestos activos como flavonoides, alcaloides y esteroides en una muestra (HORIE y KOHATA, 2000) también aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos y esteroides (SKOOG y LEARY, 1994). Para la cuantificación de estos compuestos se utiliza estándares específicos para cada uno de ellos (HORIE y KOHATA, 2000).

Según SKOOG y LEARY (1994) un cromatografía líquida de alta performance, consta de los siguientes componentes fundamentales. Una bomba cuyo sistema sea muy riguroso, la generación de presiones deben ser por encima de 6000 Psi, flujo libre de pulsaciones, un intervalo de caudales de

0,1 a 10 ml/min, el control y reproducibilidad del caudal mejor del 0,5% relativo y componentes resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o teflón).

Un sistema de inyección o bucles (manual o automático) con alta precisión, que normalmente está integrado en el equipo cromatográfico y sirve para introducir la muestra en la columna.

La columna cromatográfica, sirve para separar componentes diferentes de una sustancia, tienen una longitud entre 10 y 30 cm, diámetro interno de 4 a 10 mm y con partículas de rellenos que pueden ser de sílice, albúmina o una resina de intercambio iónico, con tamaños de 3, 5 y 10 μm , aunque en la actualidad están fabricando columnas de menor tamaño y mayor resolución.

Una precolumna para aumentar la vida de la columna analítica. Se coloca delante de la columna para eliminar la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. Un detector, que permite detectar las especies absorbentes que eluyen de la columna, debe tener una adecuada sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad, alta fiabilidad y manejo sencillo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se ejecutó en el laboratorio del Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) y en el Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM), de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en Tingo María, ubicado a 670 m.s.n.m, con una temperatura y humedad relativa promedio de 24 °C y 89% respectivamente, en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco.

3.2. Materia prima

La hoja de Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*), se obtuvo del vivero de la facultad de Recursos Naturales Renovables (UNAS), Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco.

Esta zona está ubicada a una altura de 670 m.s.n.m., con una precipitación pluvial mayor a los 1,000 mm y con una temperatura anual que varía entre 22 a 36 °C.

Las hojas fueron colectadas manualmente en horas de la mañana, cuidando que la radiación solar no sea intensa, para evitar que las hojas no se pardeen, fueron llenadas en bolsas de papel y luego fueron trasladados al laboratorio, donde se seleccionaron, blanquearon y secaron a diferentes

temperaturas las hojas para luego ser envasados en bolsas de polietileno (100 g) y posteriormente realizar la extracción para los análisis correspondientes.

3.3. Equipos materiales y reactivos

3.3.1. Equipos de laboratorio

- Equipo de HPLC (Shimadzu Scientific, MD, USA.) equipado con: Bomba modelo LC-10ATVP, columna PHENOMENEX GEMINI/C-18/110A/5µm/250X46.0mm N° Serie: 280488-2, un Inyector de muestra de capacidad de 20 µl, horno de columna modelo CTO-10ASVP, detector UV-VIS modelo SPD-10AVVP, controlador modelo SCL-10AVP, software de interfase CLASS-VP Release 6.13 SP1, computador compatible USB-52X.
- Balanza analítica digital, sensibilidad $\pm 0.0001g$. U.S.A. marca Sartorius.
- Espectro termo electrón corporation modelo genesys-6. (UV/Vis)
- Congelador modelo FFV-2065FW (Frigidaire, USA).
- Desionizador de agua modelo D-7035 (Barnstead, USA).
- Bomba de vacío modelo ME 2 (Vacuubrand).
- Estufa modelo ODHG-9240A (TOMOS).
- pH metro marca ATC.
- Vortex marca Genie 2 Scientific Industries.
- Centrifuga marca Hettich – modelo MIKRO 22R y velocidad 10,000 rpm.
- Baño maría modelo YCW-OLOE GEMMYCO.
- Termoplancha, Thermolyne, Type 1000 Stir Plate, U.S.A

3.3.2. Materiales

Se usó vasos de precipitado de 50, 100, 500, 1000 ml, fiolas de 10, 50, 100, 500 y 1000 ml, probetas 50, 100, 500 ml, pipetas de 10 ml, tubos de ensayo, gradillas, termómetro de -20 a 100 °C, cubetas de poliestireno de (1cm x 1cm x 4,5 cm), micro tubos de 1.5 – 2.0 ml, micro pipetas de 10 – 200 µl y de 100 – 1 000 µl, tips de 200 y 1000 µl, tubos de prueba de 15 y 50 ml, filtro de membrana de 0,2 µm, filtros de muestra de 0,2 µm.

3.3.3. Reactivos y solventes

2,2-Diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH; Sigma Aldrich, USA), 2,2-azinobis (3-etilenobenzotiazolino-6 ácido sulfónico) (ABTS; Sigma Aldrich, USA), 2,2-azobis-aminodinopropano (ABAP; Sigma Aldrich, USA), fosfato de potasio dihidrogenado (Scharlau, UE), etanol absoluto (Merck KGaA), metanol grado HPLC (Fisher ChemAlert Guide), (+) Catequin (Sigma Aldrich, USA), carbonato de sodio (Scharlau, UE), fenol de Folin – Ciocalteu (Sigma Aldrich, USA), cloruro de sodio (Scharlau, UE), fosfato de sodio heptahidratado (Scharlau, UE).

3.4. Métodos de análisis

3.4.1. Cuantificación de polifenoles totales en hojas de Stevia

Se realizó mediante el método de espectrofotometría desarrollado por Folin y Ciocalteu *et al.*, (1927), modificado por SANDOVAL *et al.*, (2001).

3.4.2. Cuantificación de catequinas en hojas de stevia

Se realizó mediante el método de Cromatografía Líquida de Alta Performancia (HPLC) reportado por DING *et al.*, (1999) la misma que fue detectada a 270 nm. La fase móvil utilizada consistió en una solución de agua, metanol y ácido acético a 70: 30: 0,1 (v/v). La separación por HPLC se efectuó con 100% de la fase móvil a (0 - 15 min), a una velocidad de separación (flujo) de 1mL/min; volumen de inyección para los estándares y la muestra fue de 20 μ L respectivamente.

3.4.3. Evaluación de la actividad antioxidante en hojas de stevia

3.4.3.1. Determinación del coeficiente inhibición (IC_{50}) radical

1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil (DPPH)

Se realizó por el método espectofotométrico de luz visible a 517 nm descrito por (BRAND *et al.*, 1995), que se fundamenta en usar el reactivo 1,1 – diphenyl–2 –picrylhidrazil (DPPH) como indicador para medir la capacidad de secuestro de compuestos con propiedades antioxidantes presentes en la muestra. El principio del método DPPH consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (compuestos fenólicos) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazine y una especie radical.

3.4.3.2. Determinación de coeficiente inhibición (IC_{50}) radical

peroxilo

Se usó el método de TRAP (poder total de actividad reductora) reportado por (SANDOVAL *et al.*, 2001).

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Preparación de la muestra

Las operaciones realizadas para la obtención de la muestra de hojas de stevia fueron siguiendo el flujograma de la Figura 6 y la descripción se realiza a continuación:

Recepción: Las hojas cosechadas fueron llenadas en bolsas de papel y llevados al laboratorio.

Selección: Se realizó con la finalidad de eliminar aquellas hojas que presentaban defectos.

Blanqueado y sin blanqueado: Las hojas fueron sometidas a dos tratamientos, el primero fue blanqueado con agua a ebullición/5 seg. con la finalidad de inactivar la enzima polifenoloxidasas. El otro tratamiento de hojas no fue sometido al blanqueado.

Oreado: Las hojas que fueron sometidos al blanqueado fueron oreados, colocándolos en mallas a temperatura ambiente por 2 h. Esta operación se realizó con la finalidad de eliminar el agua adherida a las hojas provenientes del blanqueado.

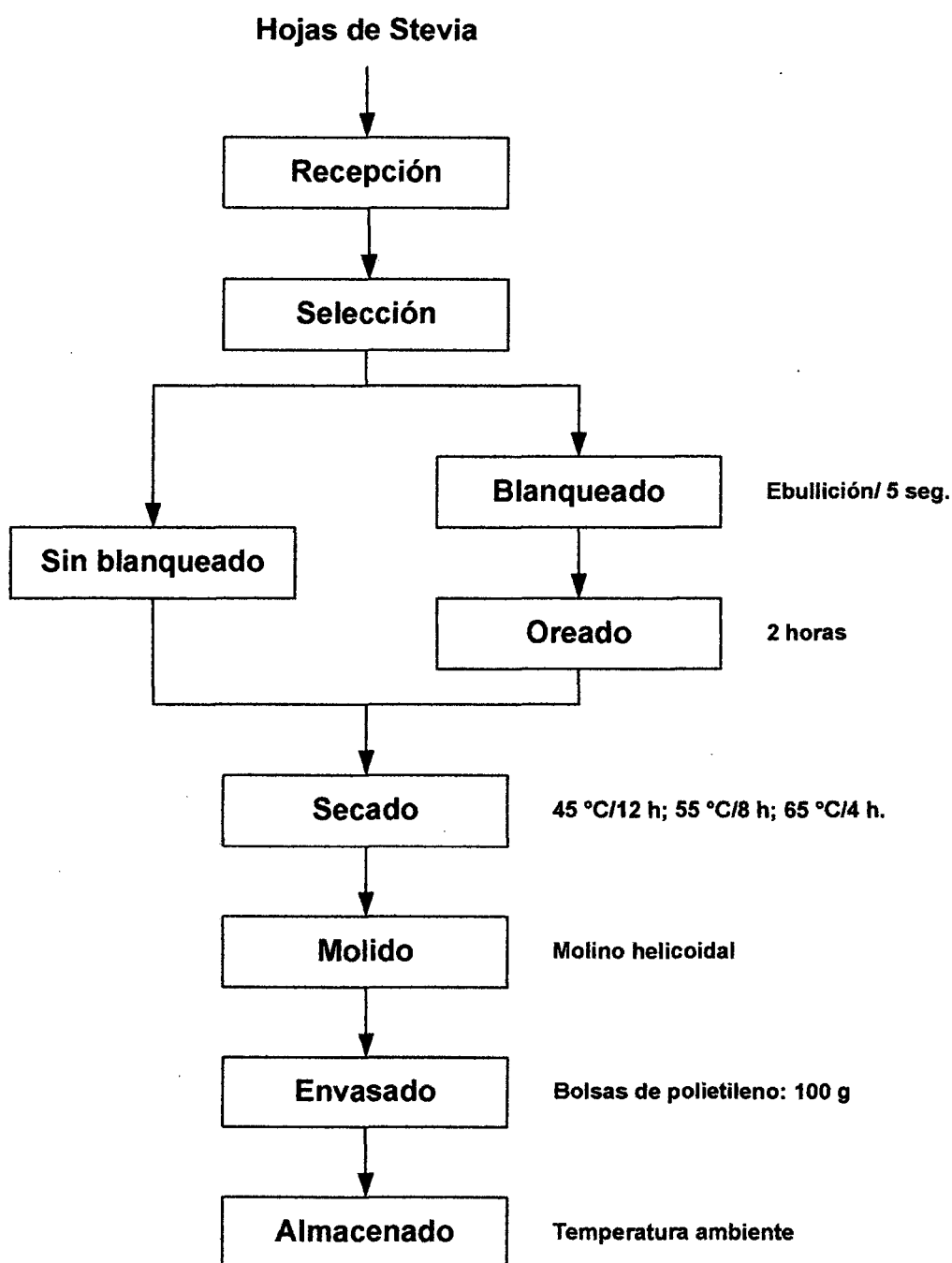


Figura 6. Flujograma de operaciones para la obtención de la muestra seca.

Secado: Las hojas blanqueadas y sin blanquear fueron secados a 45°C/12h, 55°C/8h y 65°C/4 h. en estufa, tal como se presenta en el cuadro siguiente:

Cuadro 2. Parámetros de secado para las hojas de stevia.

Tratamiento	Sin Blanquear (SB)	Blanqueado (B)
T1	45 °C/12 h	45 °C/12 h
T2	55 °C/8 h	55 °C/8 h
T3	65 °C/4 h	65 °C/4 h

Molido: Esta operación se realizó mediante un molino helicoidal, reduciendo de esta manera las hojas de stevia a fracciones pequeñas.

Envasado: Las muestras fueron envasadas en bolsas de polietileno con peso aproximado a 100 g, luego fueron selladas y recubiertas con papel aluminio.

Almacenado: Todos los tratamientos fueron almacenados a temperatura ambiente, hasta su análisis respectivo.

3.5.2. Preparación de extractos acuoso

Se preparó extractos acuosos para la cuantificación de polifenoles totales, catequina y actividad antioxidante, para ello se siguió las operaciones que se detallan en la Figura 7:

Extracción: Se pesó 3 g de muestra seca y se agregó 30 mL de agua desionizada (matraz Erlenmeyer de 50 ml) obteniéndose una solución stock de 100 mg/ml, se preparó un beacker con agua a ebullición y en ella se colocó el matraz que contenía en extracto y se controló 15 minutos a partir que el extracto hierva.

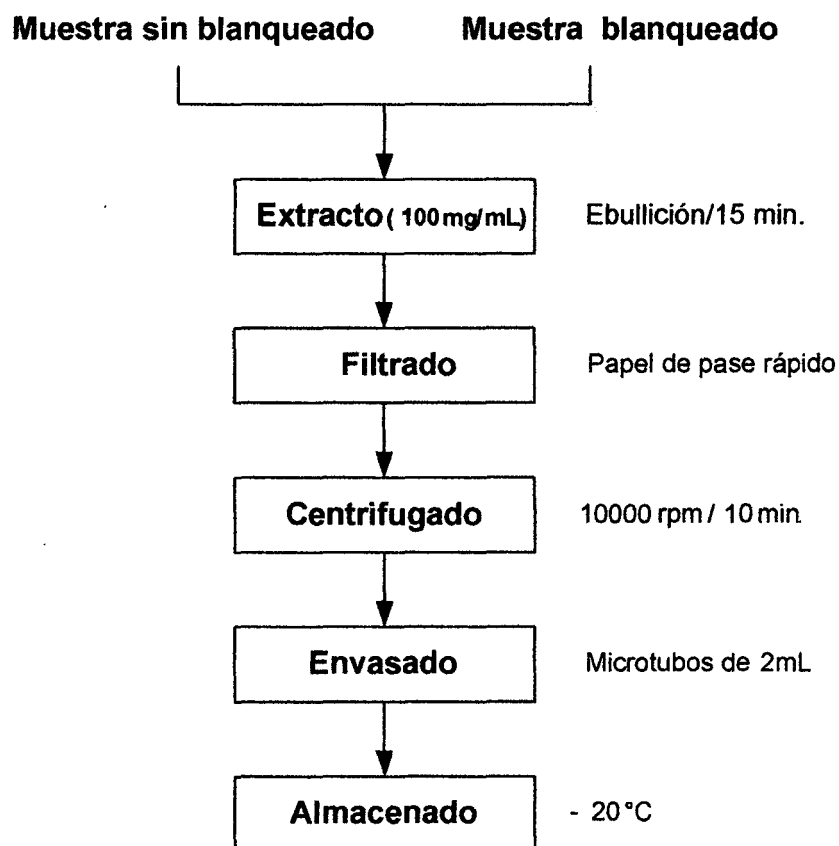


Figura 7. Flujograma de operaciones para la obtención del extracto acuoso de hojas de stevia.

Filtrado: Se realizó con papel whatman pasada rápida con la finalidad de separar las trazas de hojas y poder obtener un extracto limpio.

Envasado: Las muestras de los extractos obtenidos fueron envasadas en microtubos de 2 mL.

Centrifugado: Con la finalidad de obtener un extracto transparente y no tener interferencia al momento de realizar los análisis se sometió a centrifugación 10000 rpm / 10 min.

Almacenado: Las muestras centrifugadas fueron almacenados a -20°C , hasta su posterior análisis.

3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales en hoja de Stevia.

3.5.3.1. Preparación de la curva estándar de ácido gálico.

Para determinar la curva estándar se preparó una solución stock de 10 mL de ácido gálico a una concentración de 2 mg/mL, a partir de esta solución stock se prepararon concentraciones de 0,125; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 mg/mL, cada dilución se preparó por triplicado. En cada tubo de ensayo se adicionó 1580 μL agua destilada, 20 μL de las soluciones estándar diluida, 100 μL de solución del fenol follin-ciocalteu y finalmente 300 μL Na_2CO_3 al 20%. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y luego se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV/VIS, a una longitud de onda de 700 nm. Con los resultados obtenidos se graficó absorbancia Vs concentración y se procedió a determinar la ecuación y el coeficiente de correlación.

3.5.3.2. Cuantificación de polifenoles totales.

La cuantificación de polifenoles totales en hojas de stevia sin blanqueado y blanqueados, se realizó partiendo del extracto acuoso (100 mg/mL), a partir de ello se realizó diluciones de trabajo como se muestra en el Cuadro 2, con 5 repeticiones por tratamiento. Seguidamente se adicionó en los tubos para cada tratamiento 1580 μL de agua destilada, 20 μL de extracto diluido (soluciones de trabajo), 100 μL de fenol follin-ciocalteu y finalmente 300 μL Na_2CO_3 al 20% y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, luego se hizo la lectura en el espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 700

nm. Las absorbancias obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar y expresadas en equivalente de ácido gálico (g EAG/100g muestra). Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial 2*3 en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se procedió a determinar la prueba de Tukey $p < 0,01$.

Cuadro 03. Preparación de soluciones de trabajo para la cuantificación de polifenoles totales.

Tratamiento	Sin blanquear (SB)	Blanqueado (B)
	Soluciones de trabajo ($\mu\text{g/mL}$)	
T1 (45°C)	10	10
T2 (55°C)	15	10
T3 (65°C)	20	10

3.5.4. Cuantificación de catequina en hojas de stevia.

3.5.4.1. Preparación de la curva estándar de catequina.

La curva estándar se realizó con catequina, se preparó una solución stock de catequina a 1000 $\mu\text{g/mL}$, a partir de ello se prepararon las siguientes concentraciones 3, 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$, luego se inyectó 20 μL por cada concentración, la lectura se hizo en el HPLC a una longitud de onda de 270 nm. Se usó el software Class-VP del sistema HPLC para obtener la ecuación generada por la curva estándar de catequina.

3.5.4.2. Cuantificación de catequina.

Para la cuantificación de catequina en hoja de stevia blanqueadas y sin blanquear se utilizó el extracto acuoso (100 mg/mL) item 3.5.2, se separó el sobrenadante y se microfiltró (2 μ m), a esta se denominó concentración de trabajo, el análisis se realizó por triplicado para cada tratamiento. Luego se inyectó 20 μ L del extracto, la lectura se hizo por HPLC a 270 nm. Las absorbancias obtenidos fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar y expresadas en (mg CAT/100 g muestra seca).

Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2*3, en los tratamientos donde existió diferencia estadística se realizó la prueba de Tukey $p < 0,01$.

3.5.5. Evaluación de la actividad antioxidante en hojas de stevia.

3.5.5.1. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil (DPPH).

Se preparó una solución stock de DPPH a 1mM (0,004 g de DPPH en 10 ml de metanol (95%)) y se almacenó a 4 °C protegido de la luz. A partir de este stock se preparó 20 ml (100 μ M DPPH) en metanol 95 %, que sirvió para hacer reaccionar con las muestras. Para la inhibición del radical DPPH en hojas de stevia se partió del extracto acuoso de hojas blanqueadas y sin blanquear de 100 mg/mL (previamente filtrado y centrifugado), se prepararon soluciones de trabajo para cada tratamiento tal como se muestra en el Cuadro 4. En una cubeta de poliestileno se agregó 25 μ l de muestra a 975 μ l de solución de 100 μ M DPPH. La inhibición de los radicales libres se determinó

por la degradación del color violeta a amarillo, la cual fue leída a 515 nm cada 30 segundos por 10 min. La capacidad de secuestro fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = [(A_c - A_{m(t)}) / A_c] \times 100$$

Donde:

A_c : Absorbancia del control, DPPH (100 μ M)

$A_{m(t)}$: Absorbancia de la muestra en función a tiempo (10 min)

Los resultados de la capacidad de inhibir (IC_{50}) del radical DPPH fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2×3 y en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey $P < 0,01$, la distribución de los tratamientos se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 4. Preparación de las soluciones de trabajo para la prueba radical DPPH.

Tratamiento	Sin blanquear (SB)				Blanqueado (B)			
	Soluciones de trabajo (μ g/mL)							
T1 (45°C)	25	50	100	175	25	50	100	150
T2 (55°C)	25	50	100	200	25	50	100	200
T3 (65°C)	50	100	250	350	25	50	100	200

3.5.5.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical 1,1-diphenyl-2-picrilhidrazil (DPPH).

Se preparó soluciones stock en agua destilada desionizada (H_2O dd) de ABTS a 2,25 mM y ABAP a 20 mM, así mismo una solución buffer fosfato a pH 7,4 (PBS) con cloruro de sodio (NaCl) a 154 mM, fosfato de sodio heptahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) a 2,7 mM y fosfato de potasio (KH_2PO_4) a 1,5 mM. La preparación del radical peroxilo consistió en mezclar 10 ml de solución de ABTS, 10 ml ABAP y 80 ml de PBS (pH 7,4), se incubó a 70°C en baño maría por 20 minutos y se dejó enfriar 30 minutos. Para la Inhibición del radical peroxilo en hojas de stevia se partió del extracto acuoso de hojas blanqueadas y sin blanquear de 100 mg/mL (previamente filtrado y centrifugado), se prepararon soluciones de trabajo para cada tratamiento tal como se muestra en el Cuadro 4. Luego fue adicionado en una cubeta de poliestileno 10 μ l de soluciones de trabajo con 990 μ l de la solución stock del radical peroxilo, inmediatamente se procedió a leer las absorbancia a 414 nm cada 30 seg./ 10 min.

Cuadro 5. Preparación de las soluciones de trabajo para la prueba radical peroxilo.

Tratamiento	Sin blanquear (SB)				Blanqueado (B)			
	Soluciones de trabajo (μ g/mL)							
T1 (45°C)	5	10	20	35	1	5	10	20
T2 (55°C)	5	10	20	40	1	5	10	25
T3 (65°C)	5	10	10	60	1	5	10	25

La capacidad de secuestro fue determinado por la siguiente expresión:

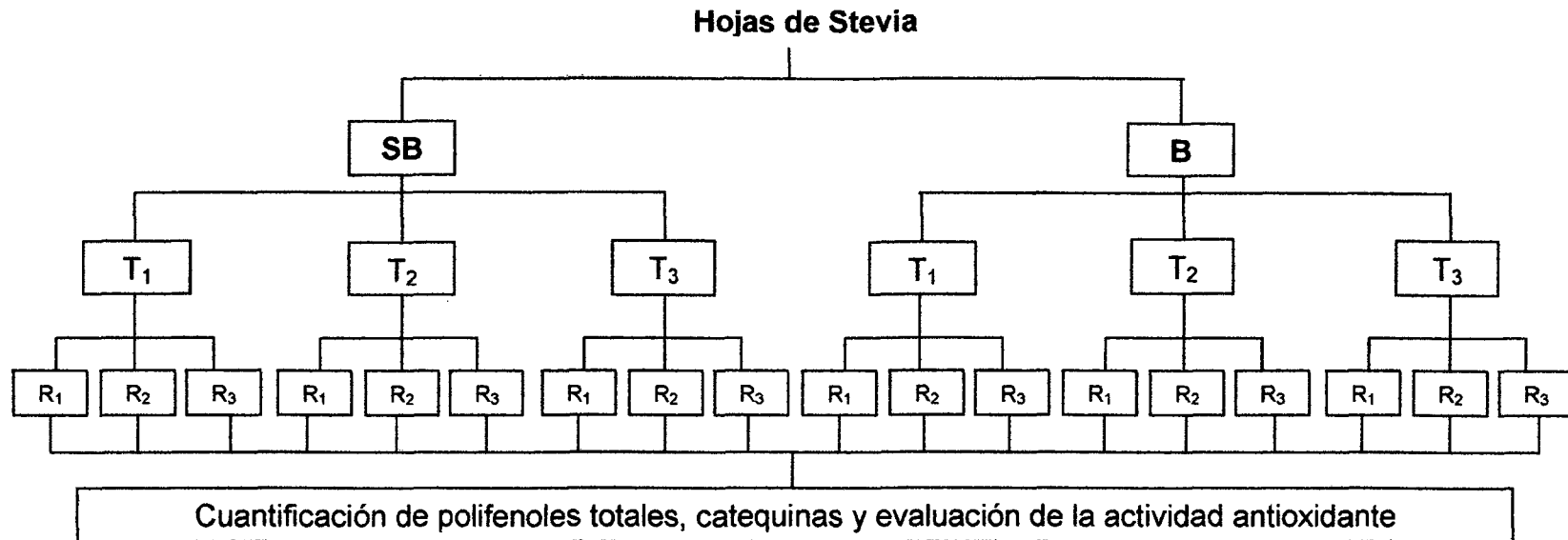
$$\% \text{ Inhibición radical peroxilo} = [(A_c - A_{m(t)}) / A_c] \times 100$$

Donde:

A_c : Absorbancia del control, radical peroxilo

$A_{m(t)}$: Absorbancia de la muestra en función al tiempo (10 min)

Los resultados de la capacidad de inhibir (IC_{50}) del radical DPPH fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2×3 y en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey $p < 0,01$



Donde: SB y B: SB (sin blanqueado); B (blanqueado)

T₁, T₂, T₃: Temperatura de secado (T₁ = 45 °C/12 h; T₂ = 55 °C/8 h; T₃ = 65 °C/4 h)

R₁, R₂, R₃: Repeticiones

Figura 8. Diseño experimental para la cuantificación de polifenoles, catequina y actividad antioxidante en hojas de stevia.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Cuantificación de polifenoles totales en hojas de stevia

4.1.1. Determinación de la curva estándar de ácido gálico.

Para realizar la cuantificación de polifenoles totales se elaboró una curva estándar en base a ácido gálico cuyas concentraciones fueron 2,00; 1,00; 0,50; 0,25; 0,125 $\mu\text{g/mL}$; los resultados se presenta en el Cuadro 6 y Figura 9, en ella se puede apreciar el diagrama de dispersión de las absorbancias, obteniendo una ecuación matemática de dos variables y un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9998$.

WEBSTER (2000), menciona que la regresión simple establece que "y" es una función de solo una variable. Solo hay dos variables una dependiente y una independiente. Es habitual colocar la variable independiente en el eje horizontal. Cuando los valores de (x, y) se mueven en la misma dirección se dice que es una relación lineal y positiva.

ANESINI *et al.*, (2008), realiza la cuantificación del contenido de polifenoles totales por espectrofotometría, usando como estándar ácido gálico. Las concentraciones de trabajo estuvieron en el rango de 10 – 50 $\mu\text{g/mL}$, con un coeficiente de correlación de $r^2=0,9996$.

Cuadro 6. Determinación de la curva estándar de ácido gálico

Concentraciones (mg AG/mL)	Absorbancias			Promedio
	R ₁	R ₂	R ₃	
0,125	0,129	0,132	0,129	0,130
0,250	0,261	0,269	0,263	0,264
0,50	0,536	0,565	0,549	0,550
1,00	1,162	1,176	1,115	1,151
2,00	2,181	2,244	2,391	2,272

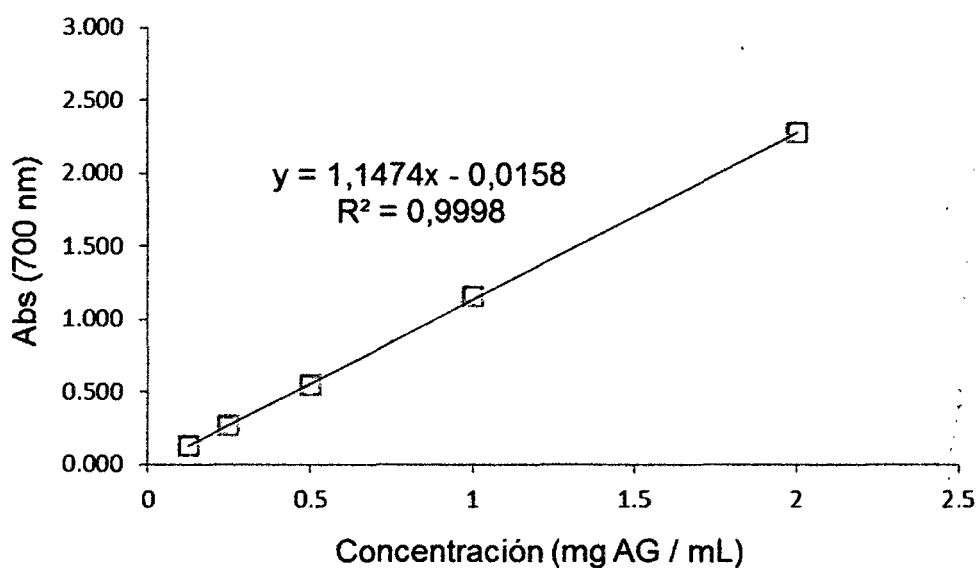


Figura 9. Curva estándar del ácido gálico para la cuantificación de polifenoles
totales

4.1.2. Cuantificación de polifenoles totales.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los polifenoles referidos a los efectos de blanqueado y sin blanquear y las temperaturas de secado en las hojas de stevia fueron analizados estadísticamente mediante el diseño completo al azar con arreglo factorial de 2*3 y se encontró que existe diferencia altamente significativa (A-I).

Observando los resultados del Cuadro 7 y Figura 10 con respecto a la cuantificación de polifenoles totales en hoja de stevia sin blanquear se encontró que existe diferencia significativa (A-II) con respecto al efecto de la temperatura de secado, realizando la comparación de medias entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey ($P < 0,01$) se aprecia que la mayor contenido de polifenoles totales lo posee el T1 (secado a 45 °C) 5,322 g EAG/100 g, y a medida que se va aumentando la temperatura de secado el contenido de polifenoles va disminuyendo, encontrándose el menor contenido en el T3 (secado a 65 °C) 2,381 g EAG/100 g; esta pérdida del contenido de polifenoles en la hoja de stevia debido a la temperatura de secado puede ser explicado por CHITINDINGU *et al.*, (2007), que indica que en algunos vegetales que son fuente rica en polifenoles que contribuyen a la actividad antioxidante, son afectados por la exposición a diferentes procesos y técnicas de secado.

CHIPURURA *et al.*, (2010), en su investigación demostró que el contenido de polifenoles puede aumentar o disminuir por las condiciones de calentamiento, el mismo autor indica que en espárragos cocinados el contenido de polifenoles decreció un 23 %. ROY *et al.*, (2007), reportó que a medida que

decrece la temperatura de procesamiento se preserva de 80 – 100 % el contenido de polifenoles en algunos vegetales.

Cuadro 7. Cuantificación de polifenoles totales en hojas de stevia

Tratamiento	Sin blanqueado (SB)	Blanqueado (B)
	g EAG / 100 g muestra	
T1 (45°C)	5,322 ± 0,12 ^a	4,325 ± 0,21 ^a
T2 (55°C)	3,916 ± 0,21 ^b	4,813 ± 0,27 ^a
T3 (65°C)	2,381 ± 0,17 ^c	4,861 ± 0,20 ^a

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=5) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos (p<0,01).

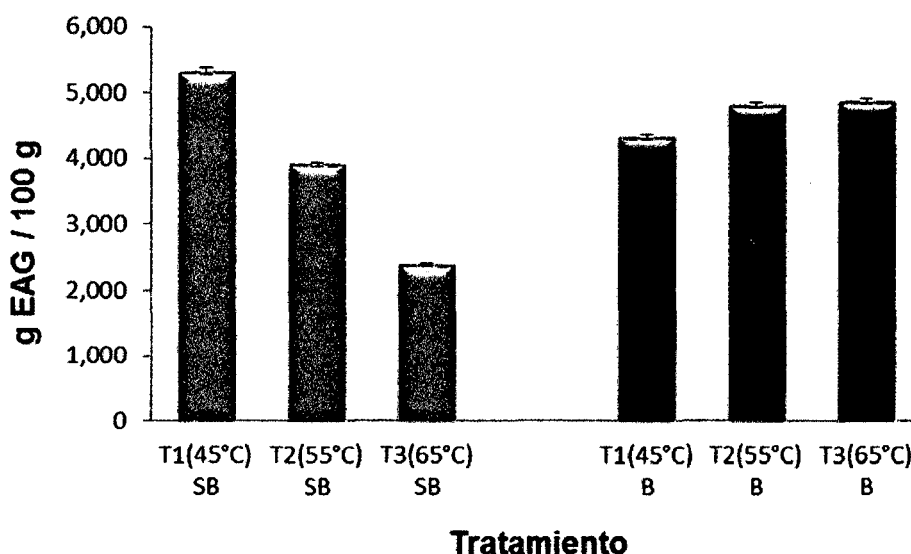


Figura 10. Representación del contenido de polifenoles totales en hoja de stevia.

Del Cuadro 7 y la Figura 10 referido a la cuantificación de polifenoles totales en hoja de stevia blanqueada y secado a diferentes temperaturas se puede apreciar que no existe diferencia significativa por efecto de la

temperatura de secado (A-III), en las tres temperaturas de secado el contenido de polifenoles fluctuó entre 4,325 a 4,861 g EAG/100 g.

Según SHEETAL *et al.*, (2008) indica que el blanqueado se realiza para inactivar la peroxidasa, enzima presente en los tejidos de la planta y estos causan oxidación de algunos componentes en presencia de oxígeno, cuando la peroxidasa reaccionan con peróxido de hidrogeno forma radicales fototoxicos, lo que provoca perdida de vitaminas y otros daños en el producto. El blanqueado puede realizarse con diferentes sistemas (vapor, agua caliente y microondas) con diferentes tiempos esto es influenciado por varios factores, temperatura, características físicas y fisiológicas de la planta; así mismo, el blanqueado se realiza con la finalidad de preservar el color verde de las hojas de los vegetales.

Comparando los procesos blanqueado, sin blanqueado y a diferentes temperatura de secado en las hojas de stevia se determinó que el mayor contenido de polifenoles fue en el tratamiento donde no se realizó el blanqueado y fue secado a 45 °C (5,322 g EAG/100 g), y el tratamiento que tuvo menor contenido de polifenoles totales fue también sin blanquear y secado a 65 °C, este comportamiento puede ser explicado por MADRAU *et al.*, (2009) en su estudio demostró que el contenido de polifenoles disminuye a medida que aumenta la temperatura del aire caliente de secado.

La variación de los resultados encontrados en la hoja de stevia puede ser explicado por KATIYAR y MUKHTAR (1997) quienes mencionan que los factores que influyen en la cantidad de polifenoles presentes en una hoja puede variar de acuerdo a las condiciones geográficas y procesamiento.

Así mismo, en secados controlados a 65 °C la actividad de las enzimas declina por encima de 30 °C, pero las distintas enzimas se inactivan a diferentes temperaturas, muchos siguen siendo activas por encima de 35 °C, pero la mayoría pierde su actividad a 45 °C (WILLS, 1999).

Según TUNER *et al.*, (2010), reporto en hojas de *Ilex paraguariensis* $7,59 \pm 0,09$ g EAG/100 g; SATHISHKUMAR *et al.*, (2009), en hojas de *Enicostemma litorale* que fue tratado con secado solar y secado asombra reportó $0,191 \pm 0,0041$ y $0,195 \pm 0,0056$ g EAG/ 100 g, respectivamente; NIHAL *et al.*, (2005), reporta en hojas té negro y mate de té negro $3,05 \pm 0,62$ y $3,05 \pm 0,62$ g EAG/100 g respectivamente; HUI-YIN y GOW-CHIN (2006), reportan en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) $16,6 \pm 1.41$ g EAG/100 g.

4.2. Cuantificación de catequina en hojas de stevia.

4.2.1. Determinación de la curva estándar.

Para realizar la cuantificación de catequina se elaboró una curva estándar en base a (+) catequina cuyas concentraciones fueron 3, 10, 30, 100, 300 µg/mL; los resultados se presenta en el Cuadro 8 y Figura 11, en ella se puede apreciar el diagrama de dispersión de las absorbancias, obteniendo una ecuación matemática de dos variables y un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9972$.

Cuadro 8. Resultados de lectura de la curva estándar de catequina en HPLC.

Concentración (µg/mL)	Área (µm ²)	Absorbancia (mUA)	Tiempo de retención (min)
300	2505572	22770	6,187
100	706221	5496	6,188
30	176809	2501	6,198
10	56497	336	6,188
3	21421	190	6,202

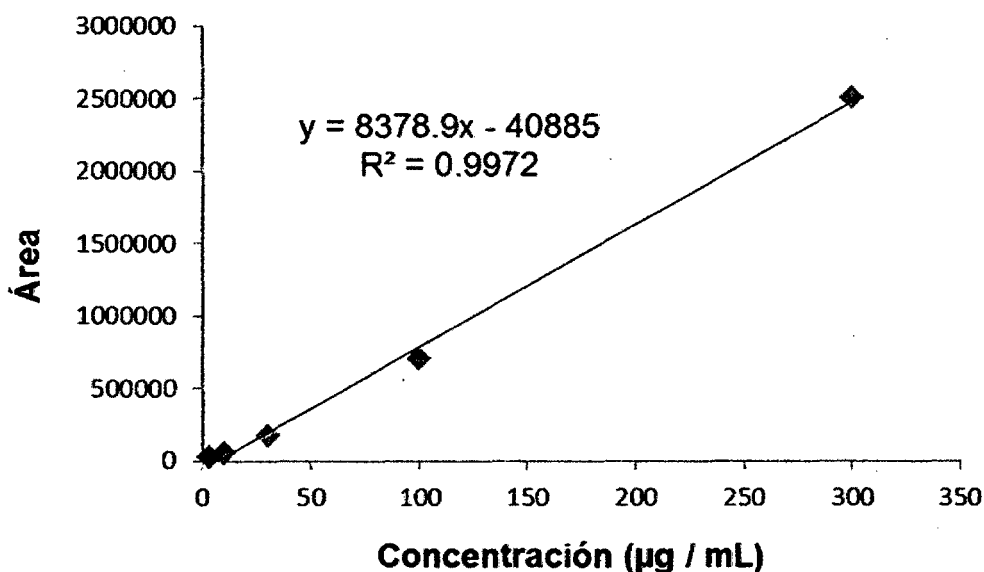


Figura 11. Grafica de la curva de calibración para catequina.

MURRAY (1969) indica que si "Y" tiende a incrementarse cuando incrementa "X" la correlación se dice positiva o correlación directa. CÓRDOVA (2003), manifiesta que los diagramas de dispersión o nube de puntos se le denomina a la gráfica de los valores (x, y), que pueden ser de relación lineal, no lineal o no tener ninguna relación lineal; así mismo, el coeficiente de correlación R^2 es una medida de la proximidad del ajuste de la recta de

regresión. Cuanto más alto sea el valor de R^2 mejor será el ajuste y más útil la recta de regresión.

La catequina que se caracteriza por ser sólido blanco a temperatura ambiente, puntos de fusión altos y son solubles en solventes polares. Las catequinas se encuentran de manera exclusiva en las plantas como metabolitos secundarios, que las protegen de los potenciales daños ocasionados por los radicales generados durante el proceso de fotosíntesis y actúa como antioxidante (CALA y VÁSQUEZ, 2008).

DUBEY *et al.*, (2009), menciona que para una curva de calibración es necesario graficar el área vs la concentración de Catequina, además presenta un rango de linealidad de 15 – 90 $\mu\text{g/mL}$, límite de detección de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, límite de cuantificación de 1,7 $\mu\text{g/mL}$ y la ecuación de regresión $Y = 15955 X - 27426$ con un $R^2=0,9988$ el cual presenta una excelente linealidad, el mismo menciona que la cantidad estimada de catequina, será por los valores aplicados en la ecuación de regresión.

YUANGANG *et al.*, (2006), determinó la linealidad por medio de la concentración de la catequina y el área, reportando un rango de linealidad de 0,011 – 0,520 mg/mL , su ecuación de regresión $Y=3,09 \times 10^{-8} X - 0,0261$ con un $R^2=0,9963$, presentando un excelente coeficiente de correlación.

4.2.2. Cuantificación de catequina.

Los resultados de la cuantificación de catequina fueron analizados estadísticamente en los tratamientos del blanqueado y sin blanquear, el efecto de las condiciones de secado y se encontró diferencia significativa (A-IV).

Uno de los compuestos fenólicos más conocidos es la catequina, el cual representa un grupo de compuestos de la familia de flavonoides, según el Cuadro 9 y Figura 12 se presenta la cuantificación de catequina en hojas de stevia blanqueado y sin blanqueado secados a diferentes temperaturas.

La preparación de las muestras para la cuantificación de catequinas, en hojas de stevia blanqueadas y sin blanquear secados a diferentes temperaturas, se realizó mediante un extracto acuoso, se pesó 3 g de muestra seca /30 mL de agua (100 mg/mL) y se sometió a ebullición por 10 minutos, según SONG *et al.*, (2003) indica que la forma de extracción de catequina en hojas de extracto acuosos debe hacerse a temperaturas de 90 – 100 °C ya que temperaturas menores disminuyen la extracción de catequinas.

Con respecto a las hojas sin blanquear se encontró que existe diferencia estadística altamente significativa (A-V) con respecto a la temperatura de secado, realizando la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P < 0,01$) se encontró que el tratamiento que presento la mayor cantidad de catequina fue T2 (secado a 55 °C) $17,342 \pm 0,11$ mg CAT/100 g muestra seca y el de menor contenido se encontró en la hoja de stevia secado a 45 °C, al respecto CHIPURURA *et al.*, (2010) indica que el contenido de polifenoles, que son los compuestos que poseen actividad antioxidante pueden ser afectados por los procesos tecnológicos (blanqueado, enlatado, congelado, etc), por ejemplo en espárragos verdes cocidos convencionalmente pueden incrementar un 23 % el contenido de polifenoles y en col roja cocinados convencionalmente pueden decrecer los polifenoles de 45,7 – 66,9 %.

Cuadro 9. Resultados de la cuantificación de catequina en hojas de stevia.

Tratamiento	Sin blanqueado (SB)	Blanqueado (B)
	mg CAT / 100 g muestra	
T1 (45°C)	7,135 ± 0,14 ^c	6,198 ± 0,04 ^b
T2 (55°C)	17,342 ± 0,11 ^a	6,854 ± 0,12 ^a
T3 (65°C)	13,354 ± 1,11 ^b	6,860 ± 0,02 ^a

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=3) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos (p<0,01).

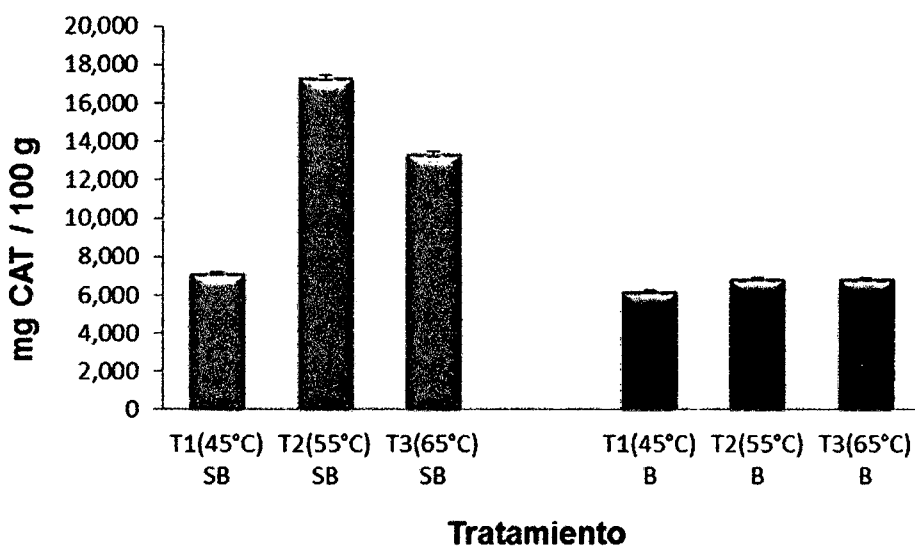


Figura 12. Representación del contenido de catequina en hoja de stevia.

Evaluando en el mismo Cuadro 9 y Figura 12 en las hojas de stevia blanqueadas también se encontró que existe diferencia significativa entre los tratamientos (A-VI) según la prueba de Tukey (P<0,01) se puede apreciar que las hojas blanqueadas y secadas a 55°C (6,854 ± 0,12 mg CAT/100 g de muestra seca) y 65°C (6,860 ± 0,02 mg CAT/100 g de muestra seca), no

presentan diferencia estadística. Por el contrario la hoja de stevia blanqueada y secado a 45°C fue la que presentó menor contenido ($6,198 \pm 0,04$ mg CAT/100 g de muestra seca), esto nos indica que el tratamiento de la hoja a 45°C no permite una buena liberación de catequina, esto puede ser debido a que los polifenoles se reducen sustancialmente cuando sucede pardeamiento enzimático (RADOJCIC *et al.*, 2009).

Comparando todos los resultados se puede indicar que el mayor contenido de catequina se encontró en hoja de stevia sin blanquear y secado a 55 °C ($17,342 \pm 0,11$ mg CAT/100 g de muestra seca) y el menor lo reporto los tratamientos de hoja blanqueado y sin blanquear secados a 45 °C ($7,135 \pm 0,14$ y $6,198 \pm 0,04$ mg CAT/100 g de muestra seca respectivamente), al respecto ANDRES-LACUEVA *et al.*, (2008) manifiesta que el contenido de flavonoles es variable y está afectado por el tipo de cultivar, geográfica, origen, factores medio ambientales, prácticas agrícolas, manejo pos cosecha y el procesamiento.

Comparando estos resultados en extracto hoja de buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) tiene 40 mg CAT/100 g (YUANGANG *et al.*, 2006). PRAT KRICUN (2011) reportó el contenido de catequina en cultivar de Té argentino (*Camellia sinensis*) 28 – 113 mg CAT/100 g; así mismo, SONG *et al.*, (2003) indica que en hojas secas más de 30% (w/w) puede ser catequina. El contenido de catequina en Té varía de 20 – 40 mg /100 g (BREWER, 2010). MADRAU *et al.*, (2009), reporta en 2 tipos de cultivares de albaricoque (pelese y cafona) 1,34 y 23,21 mg CAT/100 g respectivamente.

4.3. Evaluación de la actividad antioxidante en hojas de stevia

4.3.1. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical 1,1-diphenyl-2-picrilhidrazil (DPPH).

Los procesos de oxidación producen radicales libres que pueden interferir en los procesos normales y pueden dañar las células corporales causando estrés oxidativo, por esta razón es importante evaluar la actividad antioxidante que presenta la hoja de stevia blanqueado y sin blanquear secado a diferentes temperaturas, analizando el resultados según el diseño estadístico completamente al azar con arreglo factorial de 2×3 se encontró que existe diferencia significativa (A-VII)

Con respecto a la stevia sin blanquear presentados en el Cuadro 10 y Figura 13 se puede apreciar que entre las temperaturas de secado existe diferencia estadística significativa (A-III) comparando los promedios mediante la prueba de Tuckey ($P < 0.01$) se puede apreciar que la mayor actividad antioxidante lo presento las hojas de stevia sin blanqueadas y secado a 45°C (T1) un $IC_{50} = 75,962 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ y la menor actividad antioxidante se encontró en T3 (65°C) un $IC_{50} = 165,974 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$. Esta variación encontrada en la actividad antioxidante puede ser explicado por RAMOS *et al.*, (2009) que indica que la variabilidad entre los valores IC_{50} puede atribuirse a la diferencia entre la metodología para determinar la actividad antioxidante, la localización geográfica de la muestra, temperatura y tratamiento de proceso.

Cuadro 10. Resultados de la determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical DPPH en hojas de stevia

Tratamiento	Sin blanqueado (SB)	Blanqueado (B)
	IC_{50} ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	
T1 (45°C)	75,962 \pm 0,56 ^c	58,513 \pm 0,45 ^b
T2 (55°C)	95,239 \pm 0,61 ^b	74,552 \pm 0,59 ^a
T3 (65°C)	165,973 \pm 0,64 ^a	75,961 \pm 0,44 ^a

Los valores representan (promedio \pm SEM) los datos provienen del experimento (n=9) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos ($p < 0,01$).

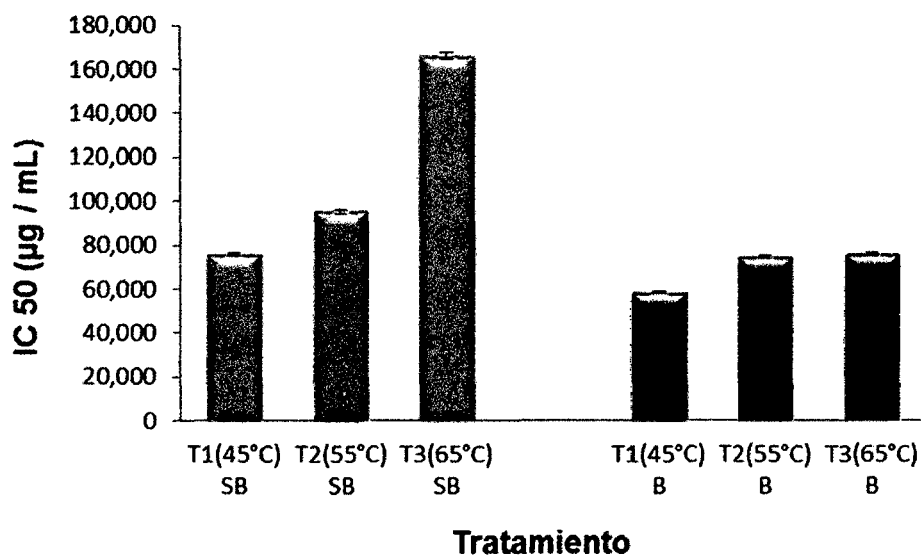


Figura 13. Comportamiento del IC_{50} con el radical DPPH en hojas de stevia, blanqueada y sin blanquear.

La hoja sin blanquear posiblemente no presenta la desactivación de la enzima polifenoloxidasasa ya que estas protegen a las sustancias fenólicas

contra la oxidación catalizada por las enzimas lo que conlleva a la formación de quinonas con escasa o nula actividad antioxidante (POKORNY *et al.*, 2005).

Comparando los resultados del Cuadro 10 y Figura 13 con referencia a las hojas de stevia blanqueadas y secadas a diferentes temperaturas 45, 55 y 65°C, se encontró diferencia estadística significativa (A-IX) comparando los promedios mediante la prueba de Tuckey ($P < 0.01$) la mayor actividad se encontró en la hoja de stevia blanqueada y secadas a 45°C ($IC_{50} = 58,513 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$) y los tratamientos que no presentaron diferencia estadística entre ellos fueron T2 (55°C) $IC_{50} 74,552 \pm 0,59 \mu\text{g/mL}$ y T3 (65°C) $IC_{50} 75,961 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$. Como se puede apreciar con el blanqueado se mejora la actividad antioxidante comparando con las hojas sin blanquear, al respecto CHIPURURA *et al.*, (2010) indica que el blanqueado puede aumentar o disminuir la actividad antioxidante, el mismo autor reporta en brócoli cocinado con agua la actividad antioxidante se disminuyó, sin embargo en brocoli cocinado con vapor la actividad antioxidante se incrementó. AMIN *et al.*, (2006) reporto que el blanqueado en vegetales más de 15 minutos provoca perdida en la actividad antioxidante, así mismo también se aduce a que esto depende de la especie.

SHEETAL *et al.*, (2008) indica que el blanqueado se realiza para inactivar la peroxidasa y se recomienda un tiempo de 1 minuto, en el trabajo el blanqueado se realizó en 5 segundos en agua a ebullición.

Comparando los resultados en general la mayor actividad antioxidante se encontró en las hoja de stevia blanqueada y secado a 45°C con un $IC_{50} 58,513 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$ y la menor actividad fue en la hoja sin blanquear y secado a 65°C con un $IC_{50} 165,074 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$, comparando la hoja de

stevia con otras hojas tenemos el reporte de RAMOS *et al.*, (2009) en extracto de té verde IC_{50} $32,4 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ y lemongrass IC_{50} $1350 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$, RUIZ (2004) reporta un IC_{50} $834,7 \mu\text{g/mL}$ en yerba luisa (*Cymbopogon citratus* Staph)

En extracto acuoso de hojas blanqueadas de mata pasto (*Pseudelephantopus spicatus*) reportado por VELA (2010) obtiene un IC_{50} $207,131 \pm 0,574 \mu\text{g/mL}$, DOMÍNGUEZ (2009) reporta un IC_{50} $10,75 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$ en pichirina colorada (*Vismia cayennensis*), así mismo CARRIÓN (2007) reporta en guanábana (*Annona Muricata* L.) un IC_{50} $86,712 \pm 0,58 \mu\text{g/mL}$.

4.3.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical peroxilo.

Los resultados del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical peroxilo de las hojas de stevia blanqueada y sin blanquear secados a diferentes temperaturas, analizando estadísticamente en los efectos de los factores en estudio se encontró que existe diferencia estadística significativa (A-X).

En el cuadro 11 y Figura 14 se presenta los resultados del IC_{50} de las hojas de stevia sin blanquear y realizado el análisis estadístico se encontró que existe diferencia estadística altamente significativa (A-XI) comparando los promedios de las temperaturas de secado se encontró que la mayor inhibición del radical peroxilo lo presentó el tratamiento T1(45°C) IC_{50} $13,037 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$; y el tratamiento que tuvo menor eficiencia fue T3 (65°C) IC_{50} $25,445 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$, este comportamiento coincide con la actividad antioxidante del

radical DPPH siendo menos eficiente los tratamiento T2(55°C) y T3 (65°C) en hojas sin blanqueado.

Cuadro 11. Resultados de la determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical peroxilo en hojas de stevia.

Tratamiento	Sin blanqueado (SB)	Blanqueado (B)
	IC_{50} ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	
T1 (45°C)	13,037 \pm 0,13 ^c	8,343 \pm 0,06 ^b
T2 (55°C)	15,682 \pm 0,11 ^b	10,951 \pm 0,07 ^a
T3 (65°C)	25,445 \pm 0,26 ^a	10,203 \pm 0,12 ^a

Los valores representan (promedio \pm SEM) los datos provienen del experimento (n=9) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos ($p < 0,01$).

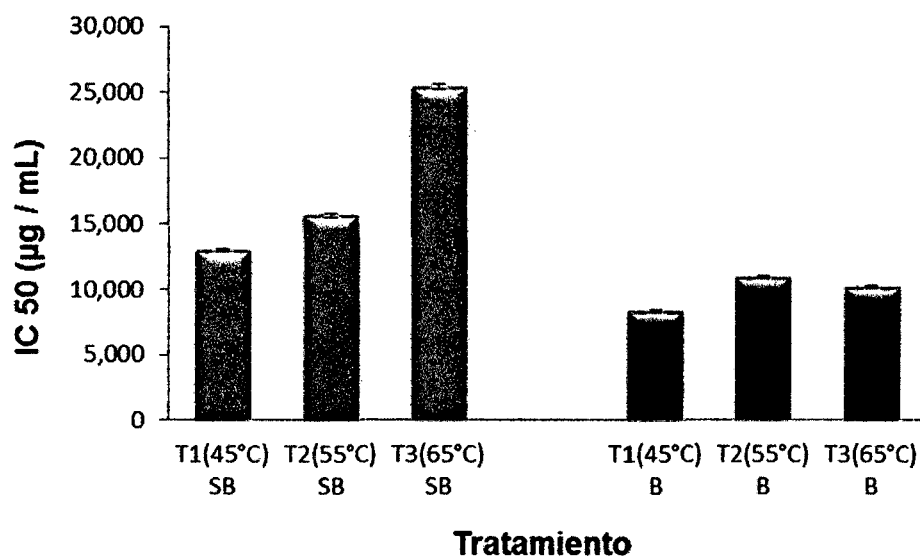


Figura 14. Comportamiento del IC_{50} con el radical peroxilo en hojas de stevia, blanqueada y sin blanquear.

Según HUI-YIN y GOW-CHIN (2006), indica que la actividad antioxidante de DPPH y el radical peroxilo son determinados por la demasiada oxidación de

matrices biomoleculares, tales como ácido linoleico y proteína. Así mismo CARRIÓN (2007) menciona que el radical peroxilo es el más abundante en el sistema biológico y se origina a partir de la adición del oxígeno al radical hidrocarburo y se forma como intermediario durante la ruptura de los lípidos en la reacción de la peroxidación lipídica.

Por otro lado en el tratamiento de las hojas blanqueadas del Cuadro 11 y Figura 14 se puede apreciar que entre los tratamientos existe diferencia estadística significativa $P < 0.01$ (A-XII.) se observa que la mayor actividad antioxidante referido al radical peroxilo lo presento T1(45°C) IC_{50} $8,343 \pm 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ y los tratamientos T2 (55°C) IC_{50} $10,951 \pm 0,07$ $\mu\text{g/mL}$, T3 (65°C) IC_{50} $10,202 \pm 0,12$ $\mu\text{g/mL}$ son similares estadísticamente, en este caso el comportamiento fue similar a los resultados de la evaluación con el radical DPPH, como se puede apreciar a menor valor existe mayor actividad antioxidante esto concuerda con VILLANUEVA *et al.*, (2010) que indica que IC_{50} menores refleja una alta actividad para inhibir radicales libres. Así mismo ORTIZ *et al.*, (2009) menciona que un radical libre ataca la doble unión de los ácidos grasos insaturados que contienen los fosfolípidos de las membranas celulares, daño que puede ocurrir en la membrana plasmática, mitocondrial y la del retículo endoplasmático.

Comparando con la actividad antioxidante del radical peroxilo en las hojas de stevia que blanqueadas y sin blanquear se puede indicar que la mayor actividad lo presenta el tratamiento a 45 °C (T2) en hojas blanqueadas IC_{50} $8,343 \pm 0,06$ $\mu\text{g/mL}$, comparando este resultado tenemos en mata pasto (*Pseudelephantopus spicatus*) reportado por VELA (2010) obtiene un IC_{50}

231,594 ± 1,076 µg/mL, CARRIÓN (2007) reporta en guanábana (*Annona Muricata L.*) un IC₅₀ 12,722 ± 0,18 µg/mL. Así mismo, tenemos en hoja de hierba luisa (*Cymbopogon citratus Staph*) IC₅₀ 834,6 µg/mL reportado por RUIZ (2004).

V. CONCLUSIONES

- El contenido de polifenoles totales, catequinas y actividad antioxidante (DPPH y radical peroxilo) varía por el proceso de blanqueado y secado en las hojas de stevia.
- El mayor contenido de polifenoles totales en extracto acuoso de hojas de stevia sin blanquear y secado a 45 °C/12 horas fue $5,322 \pm 0,12$ g EAG/100 g en muestra seca y el menor correspondió a 65 °C/4 horas $2,381 \pm 0,17$ g EAG/100 g en muestra seca.
- El mayor contenido de catequinas se encontró en hojas sin blanquear secado a 55 °C/8 horas con un valor de $17,342 \pm 0,11$ mg CAT/100 g muestra seca y el menor correspondió a 45 °C/12 horas con $7,135 \pm 0,14$ mg CAT/100 g muestra seca.
- La mayor eficiencia frente al radical DPPH y peroxilo correspondió a la hoja blanqueada y secado a 45 °C/12 h IC_{50} $58,513 \pm 0,45$ µg/ml y IC_{50} $8,343 \pm 0,06$ µg/ml respectivamente.
- La menor eficiencia frente al radical DPPH y peroxilo presentan las hojas blanqueadas y secadas a 65°C/4h (T3) IC_{50} $75,961 \pm 0,44$ µg/ml y IC_{50} $10,203 \pm 0,12$ µg/ml respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad antioxidante en hojas de *Stevia* empleando extractos hidroalcohólicos, metanólicos, etanólicos, etc.
- Evaluar la actividad antioxidante en diferentes tiempos de blanqueado en la hoja de *Stevia*.
- Realizar estudios de extracción sólido líquido para optimizar parámetros de extracción de los compuestos bioactivos de hojas de *Stevia*.
- Obtener un producto atomizado a partir del extracto acuoso de la hoja de *Stevia* para su aplicación en productos alimenticios.

ABSTRACT

This research work was developed in the laboratory of the Center for Natural Products Research in the Amazonian (CIPNA) and the Center for Biotechnology Research and Development of Amazonian (CIDBAM), of the Universidad Nacional Agraria de la Selva, in Tingo Maria. The objectives were to quantify total polyphenols, catechin and evaluation of antioxidant activity in leaves bleached and unbleached Stevia. Bleaching was performed by boiling for 5 sec., treatments were as follows: (T1; 45 °C/12 h), (T2; 55 °C / 8 h) and (T3; 65 °C / 4 h) then finely ground for the quantification of total polyphenols, catechin and antioxidant activity. Aqueous extract was prepared (boiling/15 min.) from a solution of 100 mg/mL, samples were filtered and centrifuged (1000 rpm/10 min./4 °C). Statistical analysis was done using a DCA 2x3 factorial arrangement and post analysis by Tukey test ($p < 0.01$), the SAS software 6.0 was used. The highest content of total polyphenols was for leaves and dried unbleached (T1) $5,322 \pm 0,12$ g EAG/100 g, the lowest concentration was for (T3) $2,381 \pm 0,17$ g EAG/100 g. The highest content of catechin was found in unbleached dried leaves (T2) $17,342 \pm 0,11$ mg CAT/100 g, and the lowest to (T1) $7,135 \pm 0,14$ mg CAT/100 g. The best efficiency of inhibiting DPPH and peroxy radical was for bleached and dried leaves (T1) $IC_{50} 58,513 \pm 0,45$ μ g /mL and $IC_{50} 8,343 \pm 0,06$ μ g/mL, respectively; and the lowest for bleached and dried leaves (T3) $IC_{50} 75,961 \pm 0,44$ μ g/mL and $IC_{50} 10,203 \pm 0,12$ μ g/mL, respectively.

VII. BIBLIOGRAFIA

- AMIN, I.; K, NORAZAIDAH.; E, HAINIDA. 2006. Antioxidant evaluation protocols: Food raw blanched *Amaranthus* species. Food Chem, 94: 47-52 p.
- ANDRES-LACUEVA, C.; MOVAGAS, M.; KHAN, N.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; URPI-SARDA, M.; PERMANYER, J.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. 2008. Flavonol and Contents of Cocoa Poder Products Influence of the Manufacturing Process. J Agric. Food Chem 56(9): 3111-3117.
- ANESINI, C.; FERRARO, G. E.; FILIP, R. 2008. Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. Universidad de Buenos Aires. J. Agric. Food Chem. 56: 9225-9229 p.
- AGUIRRE DAVILA, X. D. 2008. Evaluación de un sistema de producción *in vitro* y en invernadero de plantas de *Stevia rebaudiana Bertoni*. Tesis. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador. 134 p.
- AUGUSTO, A. 2007. Isolamento e Quantificação de Componentes Do Steviosídeo Comercial. Tesis. Universidade Federal do Paraná. Curitiba – Brasil. 93 p.

- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. 2005. Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry. 99: 191-203 p.
- BIANCHI, M.; ANTUNEZ, L. 1 999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev. Nutr., Campinas, 12 (2) 123 - 130.
- BOVANOVA, L.; BRANDSTETEROVA, E. 2000. Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 880, 149-168.
- BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol. 22, 25-30.
- BREWER SUSAN. 2010. Proseving Beet Quality With Natural antioxidants. University of Illinois. Reseach PKM Knowledge Management. 14 p.
- BRUCHER, H. 1974. Paraguay "Substoff" – Pflanze Stevia rebaudiana Bert. Págs. 231-233. Estados Unidos.
- CALA, M., VÁSQUEZ, A. 2008. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia *labiaceae*, y determinación de su actividad antioxidante. Tesis Ing. Químico. Universidad Industrial de Santander. 151 p.

- CARRION ROQUE, J.V. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de la yema terminal de guanábana (*Annona Muricata L.*) en tres niveles de altitud de la provincia de Leoncio Prado. Tesis. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Perú.
- CHAN, P; TOMLINSON, B; CHEN, Y.J. 2000. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *Br J. Clin. Pharmacology* . 215 – 220 p.
- CHIPURURA, B.; MUCHUWETI, M.; MANDITSERAA, F. 2010. Effects of Thermal Treatment on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Some Vegetables. Institute of Food, Nutrition and Family Science. *Asian Journal of Nutrition* 2 (3) 93 -100 p.
- CHITINDINGU, K.; A.R, NDHALA.;C, CHAPANO.; M.A, BENHURA.; M, MUCHUWETI. 2007. Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus hybridus* (Pigweed), *Brachiaria brizantha* (Upright brachiaria) and *Panicum maximum* (Guinee grass). *J. Food Biochem.* 31: 206-216 p.
- CÓRDOVA, M. 2003. Estadística descriptiva e inferencial. 5 ed. Lima, Perú, Moshera S.R.L. 495 p.
- DOMINGUEZ RENGIFO, D. 2009. Atividade antioxidante em folha e casca de pichirina colorada (*Vismia cayennensis*), atomização e aplicação em uma bebida funcional. Tesis. Universidad Nacional Agraria de la Selva.

- DUBEY, NIDHI.; DUBEY, NITIN.; MEHTA, R.; SALJA, A. 2009. A Selective High Performance Liquid Chromatographic Method for Estimation of Catechin in Ayurvedic Taila Preparations. School of Pharmacy. Asian J. Research Chem. 2(1): 66-69 p.
- DING, M.; YANG, H.; XIAO, S. 1999. Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 849, 637-640.
- GONZALES-TORRES, M., BETACOURT-RULE, M., ORTIZ-MUÑIZ, R. 2000. Daño Oxidativo y Antioxidantes. Bioquímica. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. Mexico. 25(1): 3-9 p.
- HORIE, H; KOHATA, K. 2000. Analysis of tea components by high performance liquid chromatography and high - capillary electrophoresis. J. Chrom A. 881, 4725 – 4738.
- HUI-YIN CHEN.; GOW-CHIN YEN. 2006. Antioiidant activity and fre radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava L.*) leaves. Research PROJECT, NSC 88-2313-B-166-001, supported by National Science Council. Republi of China. 6 p.
- JARMA O, A. J.; COMBATT C, E. M.; CLEVES L, J. A. 2010. Aspectos nutricionales y metabolismo de Stevia rebaudiana (*Bertoni*). Universidad de Córdoba, Montería (Colombia). 1-11 P.
- KÄHKÖNEN, MARJA P.; HOPIA, ANU. I.; VUORELA, HEIKKI. J.; RAUHA, JUSSI-PEKKA.; PIHLAJA, K.; KUJALA, TYTTI. S.; HEINONEN, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. University of Helsinki. Finland . J. Agric. Food Chem. 47: 3954-3962 p.

- KATIYAR, Y.; MUKHTAR, H. 1997. Tea polyphenols prevention of cancer and optimizing
- MADRAU, M.A.; PISCOPO, A.; SANGUINETTI, A.M; POIANA, M.; ROMERO, F.V.; PIGA, A. 2009. Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots. *Universita degli Studi di Sassari. Viena Italia. Eur Food Res Technol.* 228: 441-448 p.
- MARTINEZ F, S.; GONZALEZ G, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Universidad de León. España.* 6: 271-278 p.
- MARTINEZ M, A. 2005. Flavonoides. *Universidad de Antioquia. Medellín.* 76 p.
- MAVI, A.; TERZÍ, Z.; OZGEN, U.; YILDIRIM, A.; COSKUN, M. 2004. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biol. Pharm. Bull.* 27 (5) 702-705.
- MELCHOR, S. V. 2002. Procesamiento Tecnológico para la obtención de té verde (*Camellia sinensis*) determinación de su actividad antioxidante y cuantificación de flavonoles por HPLC. Tesis. *Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María - Perú.*
- MURRAY, R. 1969. Estadística. Teoría y 875 problemas resueltos. Edit. McGraw – Hill de México. Colombia. 241 p.

- NIHAL, T.; FERDA, S.; SEDAT, V. 2005. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous and Folin-Cicalteu methods. Ankara University. 6 p.
- ORIHUELA, L; HERNÁNDEZ, C; ROMERO, E; GONZÁLEZ, A. 1998. Lixiviación de formas solubles de Ca^{++} , K^+ y PO^4 y su relación con la ce y el pH en condiciones experimentales. Universidad de Huelva. España.
- ORTIZ H, F.; SANCHEZ, W.F.; MENDEZ A, J.; MURILLO P, E. 2009. Potencial antioxidante de hojas y cortezas de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms: contribución de sus flavonoides en esta actividad. Universidad de Tolima. Colombia. Botánica. 33: 183-191 p.
- PINEDA, A. 2005. Determinación de las propiedades antioxidantes de variedades de injerto (*Pouteria viridis*) que se cultivan en tres regiones de Guatemala. Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 79 p.
- PRAT KRICUN, S.D. 2011. Contenido de catequinas en cultivares argentinos de té (*Camellia sinensis*) elaborado como té negro. EEA Cerro Azul-INTA. RIA Vol 37 N° 1. 37-43 p.
- POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. 2005. Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. Zaragoza, España, Editorial ACRIBIA, S.A. 364 p.
- POLYAKOV, N.; LESHINA, T.; KONOVALOVA, T.; KISPERT, L. 2001. Carotenoids as scavengers of free radicals in fenton reaction. Antioxidants or pro-oxidants. J. Free. Rad. Biol. Med. 31(3): 398- 404 p.

- PSZCZOLA, D. E. 2001. Antioxidants from preserving food quality to quality of life. *Food Tech.* 56 (6). 51 p.
- RADOJCIC, I.; DELONGA, K.; MAZOR, E.; DRAGOVIC-UZELAC, U.; CARIC, M.; VARKAPIC-FURAC, J. 2009. polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquers. *Czechj. Food. Sci* 27(5):330-337.
- RAMOS, E.; CASTAÑEDA, B.; IBÁÑEZ, A. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. Centro de Investigación de Medicina Tradicional, Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad San Martín de Porres. *Revista Académica Perú Salud.* 15(1).
- RAMOS E, F.; CONDEZO H, L.A.; RAMOS E, M.; YAÑEZ, J.A. 2009. Design and Assessment of the in Vitro Antioxidant Capacity of a Beverage Composed of Green Tea (*Camellia Sinensis L.*) and Lemongrass (*Cymbopogon Citratus Stap*). Universidad San Martin de Porres. Perú. Ed. H. McKinley and M. Jamieson. 81-101 p.
- RODRIGUEZ, P.; D'AMICO, N.; DE PASQUALE, R.; COSTA, G. 2001. Effects of *Vaccinium myrtillus* Anthocyanins on Triiodothyronine Transport in the Rat. *Pharmacol. Res.* 22(Suppl. 3): 59-60 p.
- ROY, M.K.; M, TAKENAKA.; S, ISOBE.; T, TSUSHIDA. 2007. Antioxidant potencial, anti proliferartive activities and fhenolic content in water-soluble fractions of some commoly consumed vegetables: Efects of thermal treatment. *Food Chem.* 103:106-114 p.

- RUBINSON, K. y RUBINSON, J. 2001. Análisis Instrumental. Editorial Pearson Education, S.A. Madrid (España) 847 p.
- RUIZ YANCE, I.O. 2004. Actividad antioxidante, polifenoles totales en el extracto acuoso de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* Staph) y su estabilidad en modelos de bebida. Tesis . Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- RUSÇUKLI, D. 2005. Characterization and genetic mapping of health related traits in tomato. Tesis de Maestria. School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology. Izmir. 51 p.
- SAMEE, W.; VORARAT, S. 2007. Simultaneous determination of gallic acid, catechin, rutin, ellagic acid and quercetin en flower extracts of *Michelia alba*, *Caesalpinia pulcherrima* and *Nelumbo nucifera* by HPLC. Srinakharinwirot University. Thailand. Health Science Journal. 2:131-137 p.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F. 2001. Técnicas de investigación para determinar la actividad antioxidativa y anti-inflamatoria de plantas medicinales de la amazonía. 1st International Workshop. Iquitos – Perú. p. 35
- SATHISHKUMAR, R.; LAKSHMI, P.T.V.; ANNMALAI, A. 2009. Effect of drying treatment on the content of antioxidants in *Enicostemma littorale* Blume. Bharathiar University Coimbatore. Reasearch Journal of Medicinal Plant. 3(3): 93-101 p.
- SHEETAL G.; JYOTHI, L; JAMUNA, P. 2008. Effect of diferent blanching treatments on ascorbic acid retention in green leafy vegetables. University of Mysore. Natural Product Radiance. 7(2): 111-116 p.

- SKOOG, D y LEARY, J. 1994. Análisis instrumental. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. 935 p.
- SONG, G.; LIN, J.; QU, F.; C.W. HUIDE. 2003. Etraction of catechins and caffeine from different tealeaves and comparison with micellar electrokinetic chromatography. Research Center for Eco-Environmental Sciences academy of Scienses Beijing. China. Chinese Science Bulletin. Vol. 48. N° 22. 2438-2443 p.
- TURNER, S.; COGOI, L.; ISOLABELLA, S.; FILIP, R.; ANESINI, C. 2010. Evaluation of the antioxidant activity and polyphenols content of *Ilex paraguariensis* (Mate) during industrialization. University of Buenos aires. Advanced Journal of Food Science and Technology. 3(1): 23-30 p.
- VELA ROMERO, J.G. 2010. Determinación de la actividad antioxidante del *Pseudelephantopus spicatus* y su aplicación en un producto atomizado para filtrantes. Tesis. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 93 p.
- VILLANUEVA T, J.E.; CONDEZO H, L.A.; RAMIRES A, E. 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H:B.K) McVaugh). Universidad Nacional Agraria de la Selva. Centro de Investigación para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía. Tingo María – Perú. 1: 150-160 p.
- VON STASZEWSKI, M. 2011. Impacto de la interacción entre polifenoles de té verde y proteínas del lactosuero sobre las propiedades biológicas y funcionales de las mezclas. Tesis. Universidad de Buenos Aires. 250 p.
- WEBSTER, A. 2000. Estadística aplicada a los negocios y la economía. Trad. por Yelka García. 3 ed. Bogotá, Colombia, McGraw-Hill. 638 p.

- WILLS, R. 1999. Fisiología y Manipulación de Frutas y hortalizas en Post Recolección. Ed. Acribia. 189 p.
- YUANGANG, Z.; CHUNYING, L.; YUJIE, F.; CHUNJIAN, Z. 2006. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) leaves by RP-HPLC with DAD. Key Laboratory of Forest Plant Ecology. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41: 714-719 p.
- ZÚÑIGA, M. M. 2005. Caracterización de la fibra dietaria en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. Ingeniero en Ciencias Agrarias Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Chile. 68 p.

ANEXOS

A-I. Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g) en hojas de stevia sin blanquear y blanqueadas secadas a diferentes temperaturas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Tratamientos	5	27,232	5,446	27,02	**
Blanqueado (B)	1	4,720	4,720	23,42	**
Temperatura	2	7,357	3,679	18,25	**
B*Temperatura	2	15,156	7,578	37,60	**
Error experimental	24	4,837	0,202	-----	-----
Total	29	32,070	-----	-----	-----
$R^2 = 0,849$ $CV = 10,515$ $MSE = 0,449$ $Media = 4,270$					

A-II. Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles (g EAG/100 g) totales en hojas de stevia sin blanquear.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Temperatura	2	21,631	10,816	75,37	**
Error experimental	12	1,722	0,144	-----	-----
Total	14	23,353	-----	-----	-----
$R^2 = 0,926$ $CV = 9,781$ $MSE = 0,379$ $Media = 3,873$					

A-III. Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g) en hojas de stevia blanqueadas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Temperatura	2	0,881	0,441	1,70	**
Error experimental	12	3,115	0,260	-----	-----
Total	14	3,996	-----	-----	-----
$R^2 = 0,221$ $CV = 10,919$ $MSE = 0,509$ $Media = 4,666$					

A-IV. Análisis de varianza cuantificación de catequina (mg CAT/100 g) en hojas de stevia sin blanquear y blanqueadas secadas a diferentes temperaturas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Tratamientos	5	320,197	64,039	100,63	**
Blanqueado (B)	1	160,541	160,541	252,27	**
Temperatura	2	90,609	45,305	71,19	**
B*Temperatura	2	69,047	34,524	54,25	**
Error experimental	12	7,637	0,636	-----	-----
Total	17	327,834	-----	-----	-----
$R^2 = 0,977$ $CV = 8,289$ $MSE = 0,798$ $Media = 9,624$					

A-V. Análisis de varianza cuantificación de catequina (mg CAT/100 g), en hojas sin blanquear.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Temperatura	2	158,789	79,394	63,20	**
Error experimental	6	7,538	1,256	-----	-----
Total	8	166,327	-----	-----	-----
$R^2 = 0,955$ $CV = 8,888$ $MSE = 1,121$ $Media = 12,610$					

A-VI. Análisis de varianza cuantificación de catequina en hojas de stevia blanqueadas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Temperatura	2	0,868	0,434	26,36	**
Error experimental	6	0,099	0,016	-----	-----
Total	8	0,966	-----	-----	-----
$R^2 = 0,898$ $CV = 1,933$ $MSE = 0,128$ $Media = 6,637$					

A-VII. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical DPPH en hojas de stevia sin blanquear y blanqueadas secadas a diferentes temperaturas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Tratamientos	5	66755,765	13351,153	4807,360	**
Blanqueado (B)	1	24633,840	24633,840	8869,930	**
Temperatura	2	26999,047	13499,523	4860,790	**
B*Temperatura	2	15122,878	7561,439	2722,660	**
Error experimental	48	133,307	2,777	-----	-----
Total	53	66889,072	-----	-----	-----
R ² = 0,998		CV = 1,831	MSE = 1,667	Media = 91,033	

A-VIII. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical DPPH en hojas de stevia sin blanquear.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Temperatura	2	40430,951	20215,476	6101,80	**
Error experimental	24	79,513	3,313	-----	-----
Total	26	40510,464	-----	-----	-----
R ² = 0,998		CV = 1,619	MSE = 1,820	Media = 112,392	

A-IX. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical DPPH en hojas de stevia blanqueadas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Temperatura	2	1690,974	845,487	377,210	**
Error experimental	24	53,794	2,241	-----	-----
Total	26	1744,768	-----	-----	-----
R ² = 0,969		CV = 2,149	MSE = 1,497	Media = 69,675	

A-X. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical peroxilo en hojas de stevia sin blanquear y blanqueadas secadas a diferentes temperaturas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig
Tratamientos	5	1713,977	342,795	1945,04	**
Blanqueado (B)	1	912,679	912,679	5178,60	**
Temperatura	2	468,668	234,334	1329,63	**
B*Temperatura	2	332,630	166,315	943,68	**
Error experimental	48	8,460	0,176	-----	-----
Total	53	1722,437	-----	-----	-----
$R^2 = 0,995$		CV = 3,010	MSE = 0,420	Media = 13,943	

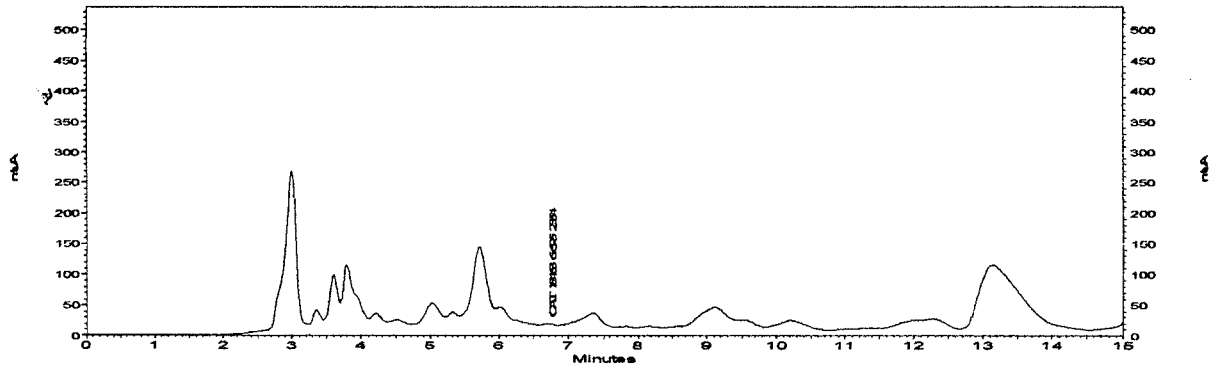
A-XI. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical peroxilo en hojas de stevia sin blanquear.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Temperatura	2	768,838	384,419	1347,42	**
Error experimental	24	6,847	0,285	-----	-----
Total	26	775,685	-----	-----	-----
$R^2 = 0,991$		CV = 2,958	MSE = 0,534	Media = 18,055	

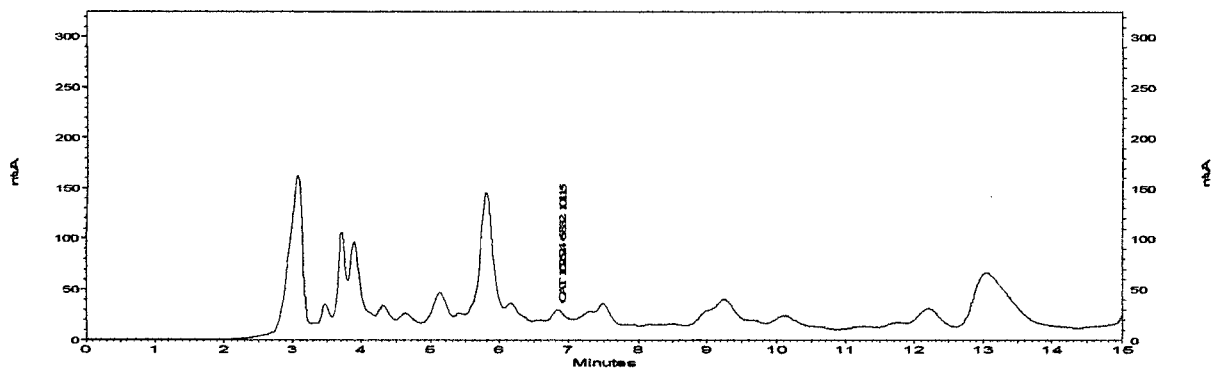
A-XII. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical peroxilo en hojas de stevia blanqueadas.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Temperatura	2	32,460	16,230	241,59	**
Error experimental	24	1,612	0,067	-----	-----
Total	26	34,072	-----	-----	-----
$R^2 = 0,953$		CV = 2,636	MSE = 2,59	Media = 9,832	

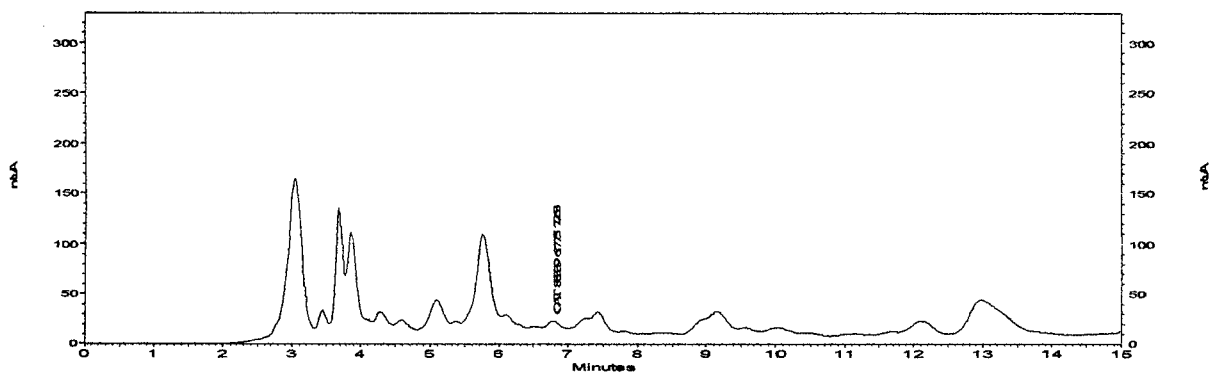
A-XIII. Cromatograma de catequina en hoja de stevia sin blanquear, secado a 45°C (T1)



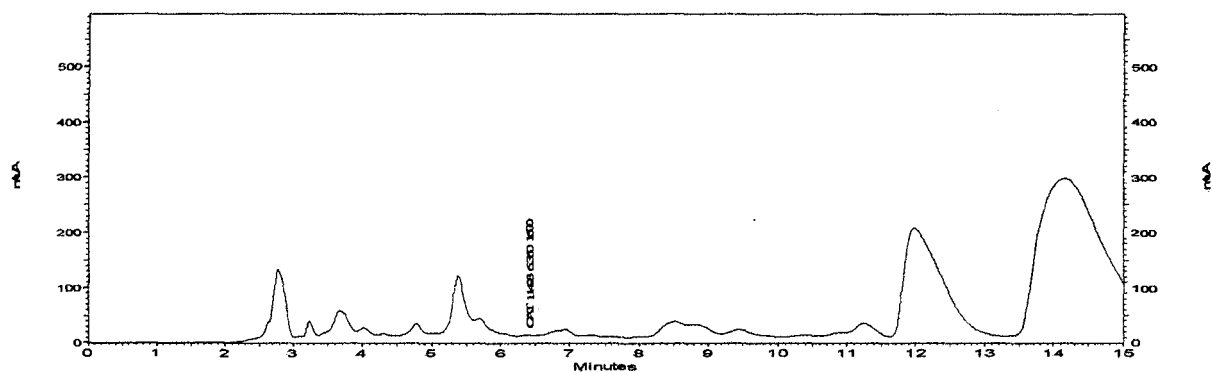
A-XIV. Cromatograma de catequina en hoja de stevia sin blanquear, secado a 55°C (T2)



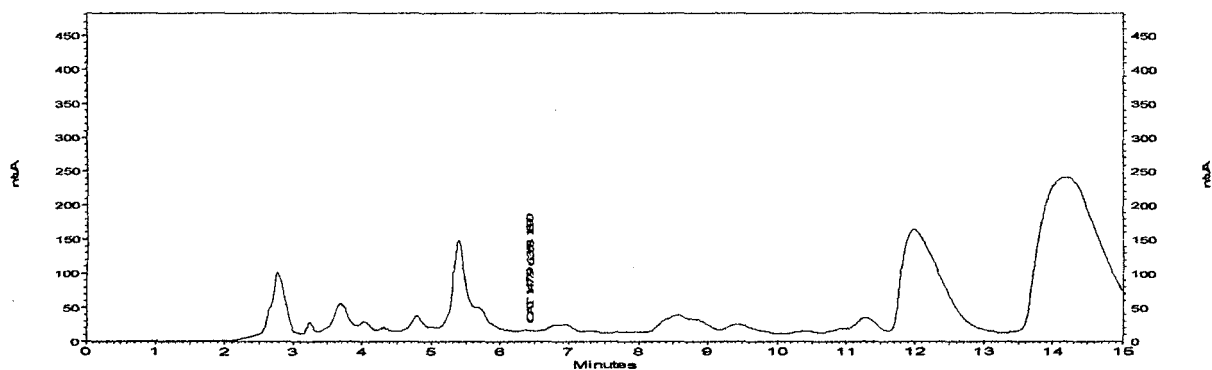
A-XV. Cromatograma de catequina en hoja de stevia sin blanquear, secado a 65°C (T3)



A-XVI. Cromatograma de catequina en hoja de stevia blanqueda, secado a 45°C (T1)



A-XVII. Cromatograma de catequina en hoja de stevia blanqueda, secado a 55°C (T2)



A-XVIII. Cromatograma de catequina en hoja de stevia blanqueda, secado a 65°C (T3)

