



Revista EIA, ISSN 1794-1246
Año XVII/ Volumen 17/ Edición N.34
Julio-Diciembre de 2020
Reia34006 pág 1-9

Publicación científica semestral
Universidad EIA, Envigado, Colombia

**PARA CITAR ESTE ARTÍCULO /
TO REFERENCE THIS ARTICLE /**

Mendoza-Isaza, N.A.; Hoyos-Arbeláez, J.A.; Peláez-Jaramillo, C.A.; (2020). Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales de extractos de tallo de *Stevia rebaudiana* en varios modelos in vitro. Revista EIA, 17(34), Julio-Diciembre, Reia34006. <https://doi.org/10.24050/reia.v17i34.1282>

✉ *Autor de correspondencia:*

Mendoza-Isaza, N.A. (Natalia Andrea): Universidad de Antioquia. Grupo GIEM, Instituto de Química. Medellín-Colombia. Calle 67 N.53-108, Bloque 2 Oficina 230. Teléfono: [+57 4] 2195652. Correo electrónico: andrea.mendoza@udea.edu.co

Recibido: 14-01-2019
Aceptado: 18-06-2020
Disponible online: 09-08-2020

Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales de extractos de tallo de *Stevia rebaudiana* en varios modelos in vitro

✉ NATALIA ANDREA MENDOZA-ISAZA¹
JORGE ANDRÉS HOYOS –ARBELÁEZ¹
CARLOS ALBERTO PELÁEZ-JARAMILLO¹

¹ Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM) Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Resumen

Este artículo presenta la determinación de la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales en dos extractos, acuoso y orgánico, de tallos de *Stevia Rebaudiana* variedad Morita II. La capacidad antioxidante se determinó a través de varios ensayos in vitro: el método 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), el ensayo de decoloración ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), el ensayo de la Capacidad de reducción Férrica Antioxidante (FRAP) y polifenoles totales por el reactivo Folin-Ciocalteu. Los resultados se analizaron mediante correlación Person's. Este trabajo se realizó con el fin de darle un valor agregado al tallo de *Stevia* y potencializar su uso como fuente de compuestos antioxidantes. Los resultados indican que los extractos de los tallos de *Stevia* cultivados en Colombia poseen una mayor actividad inhibidora de radicales libres comparado con los reportes de la literatura en cuanto a hoja y tallo. Por lo tanto se puede concluir que los tallos son una fuente accesible de antioxidantes.

Palabras clave: Capacidad antioxidante, Tallos de *Stevia rebaudiana*, DPPH, ABTS, FRAP, Polifenoles totales.

Antioxidant capacity and total polyphenol content extracts in *Stevia rebaudiana* stem in several in vitro models

Anstract

This paper presents the determination of antioxidant capacity and total polyphenol content in both aqueous and organic extracts of *Stevia Rebaudiana* stems variety Morita II. The

antioxidant capacity was determined through various in vitro assays: Method 2, 1,1-diphenyl-picryl-hidrazyl (DPPH) assay, discoloration 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6- sulfonic acid (ABTS) assay, ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), and total polyphenols by Folin-Ciocalteu. The results were analyzed by Person's correlation. This work was done in order to give added value to the stem of *Stevia* and their potential use as a source of antioxidant compounds. The results indicate that extracts of *Stevia* stems grown in Colombia have greater inhibitory activity of free radicals compared to reports in the literature regarding leaf and stem. Therefore it can be concluded that the stems are an accessible source of antioxidants.

Keywords: antioxidant capacity, stems *Stevia rebaudiana*, DPPH, ABTS, FRAP, total polyphenols.

1. Introducción

La generación de radicales libres, particularmente especies reactivas de oxígeno (ROS) y su alta actividad juegan un papel importante en la progresión de un gran número de alteraciones patológicas como inflamación, arterioesclerosis, enfermedades del corazón, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, entre otras (Amari et al. 2014). En pro de la cura o prevención de estas enfermedades, se ha centrado el reciente interés de búsqueda de antioxidantes naturales seguros y eficaces, especialmente los antioxidantes que están presentes en extractos de plantas, debido a su actividad captadora de radicales libres o a la inhibición de ROS (Aceval Arriola et al. 2016). La potencial actividad antioxidante de los extractos de plantas es atribuida a la presencia de algunos compuestos bioactivos, tales como ácidos fenólicos, diferentes clases de flavonoides, carotenoides, vitamina A, E y C, los cuales están ubicados en todos los órganos de la planta (Duda et al. 2015).

La capacidad antioxidante de un extracto no viene dado por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios (Kuskoski et al. 2005). Para medir la capacidad antioxidante de un extracto se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos, entre los más frecuentemente usados están los ensayos antioxidantes in vitro, los cuales utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres se encuentran el método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), el ensayo de decoloración ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Alam et al. 2013), Polifenoles totales por el reactivo (Folin-Ciocalteu) (Blainski et al. 2013), y el ensayo de la Capacidad de reducción Férrica Antioxidante (Pulido et al. 2000).

Dependiendo de las reacciones involucradas, los ensayos para determinar la capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET). Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran dos componentes en la mezcla de reacción, antioxidantes y oxidantes, el cambio de color de la reacción es proporcional a la concentración del antioxidante. La mayoría de los ensayos basados en HAT aplican un esquema de reacción competitivo, en el que el antioxidante y el sustrato compiten por los radicales peróxido generados térmicamente a través de los compuestos azoicos. (Huang et al. 2005).

Stevia rebaudiana Bertoni (*Stevia*) es una hierba perenne de la familia de las Asteraceae, nativa de América del Sur. Las hojas de *Stevia* contienen glucósidos de esteviol que se han utilizado como un edulcorante en América del Sur durante siglos y hoy en día su consumo se ha extendido por todo el mundo (Sadeghi et al. 2015).

En Colombia se están realizando grandes avances promisorios en el cultivo agrícola de *Stevia*, debido al alto contenido de diterpenos glucósidos edulcorantes en hoja, incluyendo esteviósidos y rebaudiósidos, que son hasta 100-300 veces más dulces que la sacarosa (Criado et al. 2015). Además del contenido de minerales, vitaminas, compuestos fenólicos, flavonoides que le otorgan un potencial beneficio para la salud humana (Barba et al. 2014). Teniendo en cuenta lo anterior, el cultivo de *Stevia* se viene desarrollando como una nueva alternativa económica para la agroindustria.

Gracias al poder edulcorante encontrado en las hojas de *Stevia*, estas tienen múltiples aplicaciones industriales en productos alimenticios, farmacéuticos y de belleza (Gawel-Beben et al. 2015).

Algunos autores han evaluado la capacidad antioxidante *in vitro* de diferentes extractos de hoja de *Stevia* en función del porcentaje de inhibición del método usado, los métodos más extensamente usados son FRAP, ABTS, DPPH y ORAC. Los métodos son a su vez correlacionados con el contenido de polifenoles totales a través del método de Folin-Ciocalteu, actividad captadora del radical hidroxilo, actividad captadora del radical anión superóxido y actividad captadora del peróxido de hidrógeno. A través de estas diferentes metodologías se ha demostrado una alta capacidad antioxidante de las hojas de *Stevia* (Lemus-Mondaca et al. 2012), (Shukla et al. 2009).

En el presente estudio se pretende determinar la capacidad antioxidante de extractos de tallo de *Stevia* a través de varios modelos *in vitro* y correlacionarlos con el contenido de polifenoles totales cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu, con el fin de darle un valor agregado a los tallos de *Stevia* y potencializar su uso como antioxidante.

2. Materiales y métodos

Localización

Todos los ensayos se realizaron en el laboratorio del Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM), del instituto de química de la Universidad de Antioquia, en Medellín-Colombia.

Procedencia de los tallos de Stevia Rebaudiana

Los tallos de *Stevia rebaudiana* variedad Morita II fueron recolectados en el Municipio de Olaya-Antioquia.

Reactivos químicos

2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzenothiazoline6-sulfonic acid) (ABTS), 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Reactivo de Folin-Ciocalteu, Carbonato de sodio, Cloruro férrico, Ácido acético y Ácido gálico fueron obtenidos de Merck. Metanol y otros reactivos químicos usados fueron de grado analítico.

Preparación de la muestra

Los tallos fueron deshidratados bajo un secador solar, el tallo fue molido en un molino (A11 B S1) y pasado por un tamiz # 30.

Se pesó 1 gramo de tallo en una balanza de ± 0.001 g (AR2140, OHAUS), se adicionaron 8 mL de metanol-agua (50 : 50, v/v pH 2 ajustado con ácido acético), se

agito en el vortex (V1 Plus, BOECO) por 1 min, se sónico en un ultrasonido (D-78224 Singen/Htw, Elma) a temperatura ambiente por 10 min (Gasmalla et al. 2014), se centrifugo a 6000 rpm/3 min (D-78532 Tuttlingen, Hettich). Se recoge el sobrenadante y se hace por triplicado. Luego se adiciono al residuo 8 mL de acetona-agua (70:30) seguido de agitación, sonicación y centrifugado, el procedimiento se realiza tres veces sucesivas. Los sobrenadantes son combinados y transferidos a un balón de 50 mL y se llevo a volumen final con agua destilada. Los extractos son filtrados por un papel de filtro (Whatman No. 2) y una membrana de Nitrato de Celulosa (0.20 mm) y almacenados a -20 °C. Se realizaron las mediciones antes de 24 h.

Para el extracto acuoso se repiten los mismos pasos cambiando los solventes usados por agua, sin modificar ninguna variable.

Determinación del contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales de extractos de tallo de *Stevia* fue determinado usando el método de Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico) y reportado como equivalentes de ácido gálico, a través de una curva de calibración (Blainski et al. 2013). Se tomaron 20 µL de muestra diluida con agua destilada, o solución estándar de ácido gálico en el caso de la curva, se adicionaron 1580 µL de agua, 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu y 300 µL de solución de carbonato de sodio al 20% (m/v). La mezcla fue agitada e incubada por 60 min en la oscuridad. La absorbancia fue medida a 725 nm usando como blanco agua (G10S UV-Vis). Las soluciones acuosas de ácido gálico (entre 0 y 1000 ppm) fueron usadas para la curva de calibración. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAEs) por gramo de muestra seca.

Determinación de la capacidad captadora del radical DPPH

La determinación de la actividad antioxidante de los diferentes extractos se llevó a cabo por medio de la preparación de una solución del radical sintético DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 0.5 mM en metanol (Brand-Williams et al. 1995). Se tomaron 100 µL de extracto a evaluar en un tubo de ensayo, se adicionaron 500 µL de metanol y 200 µL de DPPH, se homogenizó e incubó en la oscuridad por 30 min. Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 515 nm usando como blanco metanol (G10S UV-Vis).

La capacidad antioxidante de los extractos se expresó como µMol Trolox / g de muestra seca, el cual tiene capacidad captadora de los radicales (Tovar del Rio 2013). Se realizó una curva de calibración del antioxidante de referencia Trolox (entre 0 y 500 µM) usando metanol como solvente.

Determinación de la actividad inhibidora del catión radical ABTS

La determinación de la actividad antioxidante de los diferentes extractos se llevó a cabo de acuerdo con (Contreras-Calderón et al. 2011). 100 µL de extracto diluido con agua, o estándar de Trolox fue mezclado con 1 mL de solución de ABTS e incubado a 30 °C/30 min en oscuridad. Las lecturas fueron medidas a 730 nm (G10S UV-Vis). Se realizó una curva de calibración del antioxidante de referencia Trolox (entre 0 y 500 µM) usando metanol como solvente.

Determinación de actividad antioxidante por ensayo de FRAP

Los ensayos de FRAP fueron realizados de acuerdo a (Contreras-Calderón et al. 2011). El reactivo de FRAP contiene (2,5 ml de solución TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazin) con 2,5 ml de solución FeCl₃ 20 mM y 25 ml de buffer acético/acetato), se to-

maron 900 µL de reactivo recién preparado con el fin de evitar degradación, se mezcló con 90 µL de agua destilada y 30 µL de extracto diluido en agua destilada, o solución de Trolox e incubados a 37 °C/30 min. La absorbancia fue medida pasados los 30 minutos de incubación a oscuridad a 595 nm, usando buffer de acético/acetato como blanco (G10S UV-Vis). Se realizó una curva de calibración del antioxidante de referencia Trolox (entre 0 y 500 µM) usando metanol como solvente. Los resultados fueron expresados en mmoles equivalentes de Trolox (TEs) por gramo de muestra seca.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar (SD). Para determinar la correlación entre los métodos de actividad antioxidante, fue la correlación Person's coeficiente (R). Los análisis fueron realizados usando Statgraphics centurión XVI, versión 16.1.18, 20012.

3. Resultados

A continuación se muestran, en la **Tabla 1** y **2**, los valores obtenidos para los ítems.

TABLA 1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR LOS MÉTODOS ABTS, FRAP Y DPPH) Y CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES DE EXTRACTOS DE TALLO DE STEVIA				
MUESTRA	ABTS (mmol Tx/g DS)	FRAP (mmol Tx/g DS)	FOLIN (mg GAE/g DS)	DPPH (mmol Tx/g DS)
Extracto Orgánico	311,01 ± 4,50	257,24 ± 10,07	35,89 ± 2,67	176,57 ± 6,64
Extracto Acuoso	220,32 ± 4,46	147,44 ± 6,86	29,84 ± 1,28	114,53 ± 4,69

TABLA 2. CORRELACIÓN ORDINAL SPEARMAN'S ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES DE EXTRACTOS DE TALLO DE STEVIA			
	FRAP	ABTS	DPPH
FOLIN	0,7953 ^a	0,7215 ^b	0,8008 ^a

a significant at p<0.001
b significant at p<0.002

Correlaciones

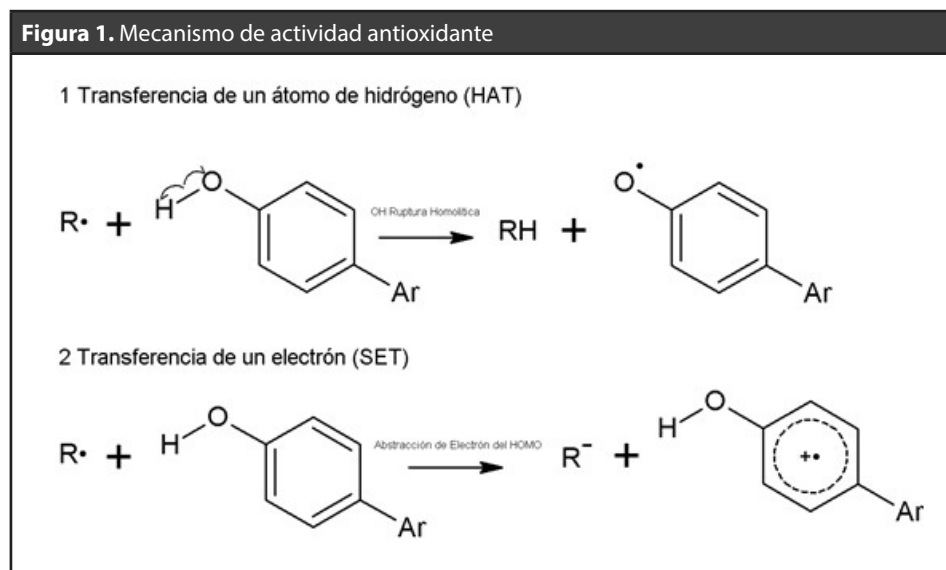
Para observar la relación existente entre el contenido de polifenoles totales y los métodos in vitro usados para determinar la capacidad antioxidante se calcularon los coeficientes de correlación descritos en la **Tabla 2**.

El contenido de polifenoles totales muestra la más alta correlación con la actividad antioxidante para DPPH y FRAP ($r = 0.800$, $r = 0.795$) respectivamente. Esto permitiría deducir que los fenoles son los principales causantes de esa actividad antioxidante. La correlación con respecto a ABTS también es positiva y mayor a 0.7 siendo una buena correlación, por lo cual se confirma que dicha actividad es atribuida a los grupos fenólicos presentes en el tallo.

Polifenoles totales

Los polifenoles como antioxidantes tienen dos mecanismos de acción, en el primero la molécula de polifenol reacciona con el radical libre, con la transferencia de un átomo de hidrógeno. En el segundo el oxidante transfiere un electrón singlete

a la molécula del polifenol, **Figura 1**. El producto de ambos mecanismos son: un radical oxidado, un catión radical y una especie energéticamente estable (Leopoldini *et al.* 2011).



El contenido polifenoles totales, fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu, y expresado como GAEs a través de una curva de calibración. En la **Tabla 1** se observa la cantidad de polifenoles en el extracto acuoso y en el extracto orgánico del tallo de *Stevia*. Los principales grupos de polifenoles son flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, cumarinas, taninos, estilbenos y lignanos (Oroian & Escriche 2015). Se ha reportado en la literatura el contenido de algunos compuestos fenólicos en extractos metanólicos de tallo de *Stevia*, entre ellos polifenoles ($6,5 \pm 2,31$ mg GAE), taninos ($7,21 \pm 2,95$ mg TAE) y flavonoides ($2,53 \pm 2,75$ % Quercetina) (Singh *et al.* 2012), en el estudio de cuatro líneas de *Stevia* se determinó el contenido de polifenoles totales en extractos metanólicos de tallo de *Stevia* entre 12,95 y 18,37 mg GAE/g (Zeng *et al.* 2013). En hoja también se han reportado compuestos fenólicos en extractos acuosos entre ellos el 1,2,3-Trihidroxibenceno (951,27 mg / 100 g), Ácido 4-metoxibenzoico (33,80 mg / 100 g), Ácido p-cumárico (30,47 mg / 100 g), 4-metilcatecol (25,61 mg / 100 g), Ácido Sinápico (9,03 mg / 100 g), Ácido Cinámico (2,42 mg / 100 g) y flavonoides (15,64 mg equivalentes de Quercetina/mg) (Kim *et al.* 2011). Además de estos estudios se ha reportado la caracterización y cuantificación de 98 compuestos polifenólicos en extractos de hoja de *Stevia*, entre los más representativos están el Ácido Dicafeoilquinico, Ácido Clorogénico, Quercetina 3-O-xilósido, Apigenina-7-O-glucósido, Ácido 3,4-Dimetoxicinámico, Luteolina 7-O-rutinósido, Ácido Cafeico, entre otros (Shivanna *et al.* 2013). La actividad captadora de los fenoles es atribuida a los grupos sustituyentes hidroxilo (-OH) y metoxi (-OCH₃) (Kim *et al.* 2011). La presencia de varios grupos fenólicos encontrados en tallo y hoja pueden ser los responsables de la actividad antioxidante de los extractos del tallo de *Stevia*, comparando los reportes de la literatura con los resultados se observa que el extracto orgánico tiene un contenido de polifenoles de aproximadamente el doble respecto a uno de los reportes en extractos etanólicos.

Capacidad captadora del radical DPPH

La capacidad de reducción del radical DPPH fue determinada por la disminución de su absorbancia a 515 nm, la cual es inducida por antioxidantes presentes en los

extractos y se cuantifica a través de una curva de calibración y expresado como $\mu\text{Mol Trolox} / \text{g}$ de muestra seca. Un resultado de DPPH positivo sugiere que los extractos son captadores de radicales libres. La capacidad captadora de los radicales libres por los oxidantes se puede atribuir a dos mecanismos, el mecanismo HAT en el cual el DPPH extrae un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de ciertos ácidos y derivados fenólicos, y el mecanismo SET en el cual se transfiere un electrón del fenol al DPPH. En el caso de compuestos fenólicos, el mecanismo principal de capacidad captadora es a través de la captura del átomo de hidrógeno por parte del DPPH para crear una molécula estable (Andzi Barhé & Feuya Tchouya 2016). Se ha reportado previamente que el porcentaje de actividad captadora del radical DPPH es de aproximadamente un 70 % en extractos metanólicos de tallo de *Stevia* a una concentración de $800 \mu\text{g} / \text{mL DPPH}$ (Singh *et al.* 2012). La actividad captadora del radical DPPH de los extractos acuoso y orgánico del tallo de *Stevia* en términos de porcentaje fue de 38,32 y 29,38 % respectivamente, esta actividad es relativamente alta comparada con la reportada en la literatura dado que esta se determinó a una concentración de 0.5 mM de DPPH. Estos resultados indican una alta capacidad captadora del radical DPPH por parte de los extractos, lo cual confirma que éstos actúan como antioxidantes donadores de hidrógeno y de ruptura de cadena.

Capacidad captadora del radical ABTS

El método de ABTS fue determinado a través de la decoloración del radical, con una reducción de la absorbancia a 730 nm. La capacidad captadora del radical ABTS de los extractos acuoso y orgánico del tallo de *Stevia* fue de $220,32 \pm 4,45$ y $311,01 \pm 4,49 \mu\text{Mol Trolox} / \text{g}$ de muestra seca respectivamente, la cual se cuantificó a través de una curva de calibración, usando Trolox como patrón. En la literatura se reporta la capacidad captadora del radical ABTS de aproximadamente $50 \mu\text{Mol Trolox} / \text{g}$ en extractos metanólicos de tallo de *Stevia* (Zeng *et al.* 2013).

Capacidad antioxidante de FRAP

El ensayo de FRAP fue determinado a través de la capacidad de los extractos de tallo de *Stevia* y de Trolox de reducir el hierro (III) a hierro (II) por medio de una reacción de transferencia de un electrón, esto se visualiza por la formación de un complejo de color azul intenso; un valor alto de absorbancia indica un fuerte poder de reducción por lo tanto una alta capacidad antioxidante (Prior *et al.* 2005). La actividad captadora del radical ABTS de los extractos acuoso y orgánico del tallo de *Stevia* fue de $147,44 \pm 6,86$ y $257,24 \pm 10,07 \mu\text{Mol Trolox} / \text{g}$ de muestra seca respectivamente, la cual se cuantificó a través de una curva de calibración usando Trolox como patrón. No se encontraron reportes de la actividad captadora de extractos de tallo por el ensayo de FRAP, pero si se encuentra en cuanto a la hoja de *Stevia*, extractos acuosos y metanólicos de $38,24 \pm 0,36$ y $37,40 \pm 1,58 \text{ mg Trolox} / \text{g DS}$ respectivamente (Tadhani *et al.* 2007). Es de aclarar que no todos los metabolitos responsables de la actividad antioxidante de las hojas tienen que estar presentes en los tallos, la comparación se hace solo con el objetivo de resaltar la alta capacidad reductora en el ensayo de FRAP de los extractos de tallo de *Stevia*.

Las diferencias significativas en cuanto al contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en los extractos evaluados demuestran que las propiedades químicas de los solventes influyen en la composición y actividad fisicoquímica de las plantas (M'hiri *et al.* 2015). Las diferencias en cuanto al contenido de polifenoles y capacidad antioxidante determinada por los métodos *in vitro* comparada con los reportes de la literatura pueden deberse a los métodos de extracción y a las condiciones climáticas como la temperatura, la precipitación, la humedad, así como las condiciones del suelo, altitud entre otros, que modifican la bioactividad de los pro-

ductos vegetales (Granato *et al.* 2016). Esto sugiere que los tallos de *Stevia* cultivados en la región Antioqueña pueden ser usados como potenciadores de la actividad antioxidante en diversas aplicaciones.

4. Conclusiones

En esta investigación, se ha observado que los extractos de tallo de *Stevia Rebaudiana* actúan como un potencial captador de radicales libres como lo indican los tres modelos in vitro evaluados FRAP, DPPH y ABTS y el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Por lo tanto, los extractos de tallo de *Stevia* podrían ser usados como una fuente accesible de antioxidantes en el tratamiento de varios problemas relacionados con el estrés oxidativo. Además, el alto contenido de polifenoles totales y el potencial antioxidante de los tallos de *Stevia*, determinados en este estudio, hacen muy interesante y factible la posibilidad de darle un valor agregado a los tallos a través de la posibilidad de incorporar los extractos en alimentos con el fin de mejorar sus propiedades funcionales y medicinales.

A través de las diferentes metodologías empleadas se determinó una mayor actividad antioxidante por ABTS, seguido de FRAP, DPPH, y por último polifenoles totales, la correlación entre las actividades fue positiva y con un valor-P <0.05. Además se encontró una mayor actividad inhibidora de radicales libres de los extractos comparados con los reportes de la literatura en cuanto a hoja y tallo de *Stevia*. Este hecho puede deberse, a los métodos de extracción empleados o a la favorabilidad de las condiciones geográficas de Colombia para el cultivo de *Stevia rebaudiana* variedad Morita II, lo cual se ve reflejado en el posible aumento en el contenido de metabolitos secundarios.

Referencias

- Aceval Arriola, N.D. et al., [2016]. Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content. *Food Bioscience*, 13, pp.32–40.
- Alam, M.N., Bristi, N.J. & Rafiquzzaman, M., [2013]. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 21[2], pp.143–52.
- Amari, N.O. et al., [2014]. Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsuta* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4[2], pp.104–109.
- Andzi Barhé, T. & Feuya Tchouya, G.R., [2016]. Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa* L., *Glycine max* L. Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. *Arabian Journal of Chemistry*, 9[1], pp.1–8.
- Barba, F.J. et al., [2014]. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: Processing parameter optimization. *Food Chemistry*, 148, pp.261–267.
- Blainski, A., Lopes, G.C. & de Mello, J.C.P., [2013]. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* (Basel, Switzerland), 18[6], pp.6852–65.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C., [1995]. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28[1], pp.25–30.
- Contreras-Calderón, J. et al., [2011]. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44[7], pp.2047–2053.
- Criado, M.N. et al., [2015]. Use of Weibull distribution to quantify the antioxidant effect of *Stevia rebaudiana* on oxidative enzymes. *LWT - Food Science and Technology*, 60[2], pp.985–989.

- Duda, S.C. et al., [2015]. Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. *Industrial Crops and Products*, 77, pp.499–507.
- Gasmalla, M.A. a. et al., [2014]. Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia* (*Stevia rebaudiana bertonii*) leaves. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Gawel-Beben, K. et al., [2015]. *Stevia rebaudiana* Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. *Molecules*, 20[4], pp.5468–5486.
- Granato, D. et al., [2016]. Effects of geographical origin, varietal and farming system on the chemical composition and functional properties of purple grape juices: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 52, pp.31–48.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R., [2005]. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Food Chemistry and Agricultural*, 53, pp.1841–1846.
- Kim, I.-S. et al., [2011]. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 44[5], pp.1328–1332.
- Kuskoski, E.M. et al., [2005]. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, 25[4], pp.726–732.
- Lemus-Mondaca, R. et al., [2012]. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132[3], pp.1121–1132.
- Leopoldini, M., Russo, N. & Toscano, M., [2011]. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125[2], pp.288–306.
- M'hiri, N. et al., [2015]. Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioproducts Processing*, 96, pp.161–170.
- Oroian, M. & Escriche, I., [2015]. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, pp.10–36.
- Prior, R., Wu, X. & Schaich, K., [2005]. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53[10], pp.4290–4302.
- Pulido, R., Bravo, L. & Saura-calixto, F., [2000]. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing / Antioxidant Power Assay. *Food Chemistry and Agricultural*, 48, pp.3396–3402.
- Sadeghi, B., Mohammadzadeh, M. & Babakhani, B., [2015]. Green synthesis of gold nanoparticles using *Stevia rebaudiana* leaf extracts: Characterization and their stability. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 148, pp.101–6.
- Shivanna, N. et al., [2013]. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of diabetes and its complications*, 27[2], pp.103–13.
- Shukla, S. et al., [2009]. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 47[9], pp.2338–43.
- Singh, S. et al., [2012]. In-Vitro antioxidative and antibacterial activities of various parts of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni). *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4[3], pp.468–473.
- Tadhani, M.B., Patel, V.H. & Subhash, R., [2007]. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20[3-4], pp.323–329.
- Tovar del Rio, J., [2013]. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera, tesis [Químico Industrial], Pereira, Universidad Tecnológica de Pereira, 150pp.
- Zeng, J. et al., [2013]. Antioxidant Abilities, Phenolics and Flavonoids Contents in the Ethanolic Extracts of the Stems and Leaves of Different *Stevia rebaudiana* Bert Lines. *Sugar Tech*, 15[2], pp.209–213.