

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE SECADO POR LECHO FLUIDIZADO SOBRE LOS ATRIBUTOS DE CALIDAD EN HOJAS DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana*)

EVALUATION OF THE FLUIDIZED BED DRYING PROCESS ON THE QUALITY ATTRIBUTES OF STEVIA LEAVES (*Stevia rebaudiana*)

Beatriz Noyola-Altamirano^{1*}, Lilia Leticia Méndez-Lagunas¹, Laura Victoria Aquino-González¹,
Juan Rodríguez-Ramírez¹, Sadoth Sandoval-Torres¹, Luis Gerardo Barriada-Bernal²

¹Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca. Hornos 1003, Colonia Noche Buena, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México, C.P. 71230. (bna76@hotmail.com). ²Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Hornos 1003, Colonia Noche Buena, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México, C.P. 71230.

RESUMEN

Las hojas de estevia (*Stevia rebaudiana*) son fuente de compuestos bioactivos benéficos para la salud humana; entre ellos destacan los glucósidos de esteviol. El valor comercial de las hojas deshidratadas de estevia se relaciona con su apariencia física y con la concentración de glucósidos. La hipótesis del estudio fue que la calidad de las hojas de estevia, con base en contenido de compuestos bioactivos presentes en las hojas puede ser visible y modificado por el secado. Para probarla, el objetivo fue evaluar el efecto de la temperatura, la velocidad de aire y la densidad de carga de hojas de estevia en un secador de lecho fluidizado no empacado y empacado sobre las características de color, concentración de glucósidos de esteviol (esteviosido y rebaudiosido A), concentración de compuestos fenólicos totales, concentración de flavonoides, y capacidad antioxidante. Las variables fisicoquímicas se evaluaron por medio de coordenadas CIEL*a*b*, cromatografía de líquidos fase reversa, métodos colorimétricos de Folin-Cicolteau, cloruro de aluminio y ensayo de inhibición de radicales libres DPPH*. El efecto de las variables de proceso se evaluó con un diseño de factorial completo con 24 combinaciones de factores y tres repeticiones de muestreo. La configuración de lecho fluidizado afectó ($p \leq 0.05$) la concentración de glucósidos de esteviol en el material foliar seco. En las dos configuraciones el contenido de glucósidos de esteviol aumentó entre 230-290% comparado con el material foliar fresco. Para la

ABSTRACT

Stevia leaves (*Stevia rebaudiana*) are a source of bioactive compounds beneficial to human health; among them, steviol glycosides stand out. The commercial value of dehydrated stevia leaves is related to their physical appearance and the concentration of glycosides. The hypothesis of the study was that the quality of stevia leaves, based on the content of bioactive compounds present in the leaves, can be visible and modified by drying. To test it, the objective was to evaluate the effect of temperature, air velocity, and load density of stevia leaves in a fluidized bed dryer unpacked and packed on the characteristics of colour, steviol glycoside concentration (stevioside and rebaudioside A), total phenolic compound concentration, flavonoid concentration, and antioxidant capacity. The physicochemical variables were evaluated by CIEL*a*b* coordinates, reverse phase liquid chromatography, Folin-Cicolteau colourimetric methods, aluminum chloride, and DPPH* free radical inhibition assay. The effect of process variables was evaluated with a full factorial arrangement with 24 combinations of factors and three sampling replicates. The fluidized bed configuration affected ($p \leq 0.05$) the concentration of steviol glycosides in the dry leaf material. In both configurations the steviol glycoside content increased between 230-290% compared to fresh leaf material. For the unpacked bed configuration, the bitter aftertaste (rebaudioside/stevioside ratio) was higher than the original evaluated in the fresh material. All process variables had a significant influence on polyphenol concentration. The packed bed configuration increased the concentration of phenolic compounds ($p \leq 0.05$) up to 248%. Whereas, with unpacked bed it decreased up to 17% ($p \leq 0.05$) in relation to fresh material. The decrease in drying times and the increase of bioactive compounds (steviol

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1783-2554>

Recibido: febrero, 2021. Aprobado: noviembre, 2021.

Publicado en Agrociencia 55: 583-596. 2021.

configuración de lecho no empacado, el retrogusto amargo (relación rebaudiósido A/esteviósido) fue mayor que el original evaluado en el material fresco. Todas las variables de proceso tuvieron influencia significativa en la concentración de polifenoles. La configuración con lecho empacado incrementó la concentración de compuestos fenólicos ($p \leq 0.05$) hasta 248%. En tanto que, con lecho no empacado disminuyó hasta un 17% ($p \leq 0.05$) en relación con el material fresco. La disminución en los tiempos de secado y el incremento de compuestos bioactivos (glucósidos de esteviol y compuestos antioxidantes) en la hoja de estevia, hacen de este método de secado una herramienta útil para el manejo y la preservación de materiales vegetales que contengan metabolitos secundarios de importancia económica.

Palabras clave: secado, glucósidos de esteviol, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, *Stevia rebaudiana*.

INTRODUCCIÓN

En el secado de productos herbales, la elección adecuada de las variables de proceso determina la calidad y las propiedades nutricionales, nutraceuticas y bioactivas en el producto final deshidratado (Mujumdar y Law, 2010). El uso de temperaturas altas durante el proceso de secado reduce el tiempo de proceso, aunque ocasiona alteraciones en esas propiedades. La industria de los alimentos busca reemplazar la sacarosa y la glucosa por edulcorantes de índice calórico bajo, tales como los glucósidos de esteviol (Durán *et al.*, 2012), presentes en las hojas de estevia. Estos edulcorantes además exhiben propiedades sensoriales adecuadas y ausencia de efectos teratogénicos y citotóxicos (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2013). Al utilizar infusiones de hojas de estevia como agente edulcorante, se incorporan a la dieta otros compuestos bioactivos benéficos para la salud humana (Shukla *et al.*, 2012; Amin *et al.*, 2017).

Los compuestos fenólicos presentes en infusiones herbales muestran alta capacidad antioxidante en experimentos *in vitro* (Jayaraman *et al.*, 2008; Shukla *et al.*, 2012); por ello se ha evaluado el uso de los polifenoles como aditivos con propiedades nutraceuticas en alimentos procesados (Carbonell-Capella *et al.*, 2013). Una de las razones principales de la depreciación, e incluso el rechazo de cosechas completas de estevia en casos determinados, se relaciona de modo importante con los atributos organolépticos del material foliar (en particular, color y dulzor). Algunos

glycosides and antioxidant compounds) in stevia leaf make of this drying method a useful tool for the management and preservation of plant materials containing secondary metabolites of economic importance.

Key words: drying, steviol glycosides, phenolic compounds, antioxidant capacity, *Stevia rebaudiana*.

INTRODUCTION

In the drying of herbal products, the appropriate choice of process variables determines the quality and the nutritional, nutraceutical and bioactive properties in the final dehydrated product (Mujumdar and Law, 2010). The use of high temperatures during the drying process reduces processing time, although it causes alterations in those properties. The food industry search to replace sucrose and glucose with low-calorie sweeteners, such as steviol glycosides (Durán *et al.*, 2012), present in stevia leaves. These sweeteners also exhibit adequate sensory properties and absence of teratogenic and cytotoxic effects (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2013). By using stevia leaf infusions as a sweetening agent, other bioactive compounds beneficial to human health are incorporated into the diet (Shukla *et al.*, 2012; Amin *et al.*, 2017).

Phenolic compounds present in herbal infusions show high antioxidant capacity in the *in vitro* experiments (Jayaraman *et al.*, 2008; Shukla *et al.*, 2012); therefore, the use of polyphenols as additives with nutraceutical properties in processed foods is evaluated (Carbonell-Capella *et al.*, 2013). One of the main reasons for the depreciation, and even the rejection of whole stevia harvests in certain cases, is significantly related to the organoleptic attributes of the leaf material (in particular, colour and sweetness). Some comparative studies addressed the effect of the drying process on the physicochemical properties of raw materials and concluded that fluidized bed drying processes require a shorter process time, in addition to minimizing physicochemical modifications on the finished product (Mahn *et al.*, 2017; Hincapié and Zapata, 2019).

Fluidized bed drying processes have wide use in the making of herbal infusions and the tea industry, since this type of drying does not affect the organoleptic properties of the final product (Lima and Ferreira, 2011; Dwivedy *et al.*, 2012). Thus, this

estudios comparativos abordaron el efecto del proceso de secado en las propiedades fisicoquímicas de materias primas y concluyeron que los procesos de secado por lecho fluidizado requieren un tiempo de proceso menor, además de minimizar las modificaciones fisicoquímicas del producto terminado (Mahn *et al.*, 2017; Hincapie y Zapata, 2019).

Los procesos de secado por lecho fluidizado tienen uso amplio en la elaboración de tisanas y en la industria del té, ya que este tipo de secado no afecta las propiedades organolépticas del producto final (Lima y Ferreira, 2011; Dwivedy *et al.*, 2012). Por lo anterior, en esta investigación se evaluó el efecto de la temperatura, la densidad de carga y la velocidad de entrada del aire caliente sobre el material foliar de *Stevia rebaudiana* dentro de un proceso de secado por lecho fluidizado empacado y no empacado, como alternativa a los métodos de secado comerciales en la producción de estevia, para conservar y mejorar los atributos de calidad del material foliar para su comercialización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y preparación de la muestra

Stevia rebaudiana variedad Morita II se colectó en el estado de Oaxaca, México (16° 20' 25" N, 98° 26' 47" O); se realizó una selección del material foliar para desechar aquellas hojas con daños físicos, presencia de insectos, bacterias u hongos. El material foliar seleccionado se lavó con agua corriente y se refrigeró a 4 °C hasta su uso.

Caracterización física de las hojas de estevia

Determinación de color y contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó de acuerdo con el método 934.01 del AOAC (1990). El color se determinó con un colorímetro Hunter Lab (MiniScan EZ 450/°C, EE. UU.) en hojas frescas y secas. Las coordenadas CIEL*a*b* consideradas tomaron como referencia las coordenadas de color de las hojas frescas. La diferencia total en color se determinó por medio de la Ecuación 1:

$$\Delta E = [(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2]^{0.5} \quad (1)$$

donde: ΔL^* ; cambio en la luminosidad del material foliar seco, con el material foliar fresco como referencia; Δa^* ; cambio en la

research evaluated the effect of temperature, load density and hot airflow velocity on *Stevia rebaudiana* leaf material in a packed and unpacked fluidized bed drying process, as an alternative to commercial drying methods in stevia production, to preserve and improve the quality attributes of the leaf material for commercialization.

MATERIALS AND METHODS

Sample selection and preparation

Stevia rebaudiana variety Morita II was collected in the state of Oaxaca, Mexico (16° 20' 25" N, 98° 26' 47" W); a selection of leaf material was made to discard those leaves with physical damage, presence of insects, bacteria or fungi. The selected leaf material was washed with tap water and refrigerated at 4 °C until use.

Physical characterization of stevia leaves

Determination of colour and humidity content

Humidity content was determined according to method 934.01 (AOAC, 1990). Colour was determined with a Hunter Lab colourimeter (MiniScan EZ 450/°C, USA) on fresh and dry leaves. The CIEL*a*b* coordinates considered were based on the colour coordinates of fresh leaves. The total difference in colour was determined by Equation 1:

$$\Delta E = [(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2]^{0.5} \quad (1)$$

where: ΔL^* ; change in brightness of the dried leaf material, with the fresh leaf material as reference; Δa^* ; change in the green to red range (fresh leaf material as reference); Δb^* ; change in the blue to yellow range (fresh leaf material as reference).

Drying equipment

A fluidized bed dryer with a glass fluidization chamber (0.5 × 0.1 m, height × diameter) was used; with a stainless-steel mesh of 0.1 m diameter and 0.1 m height, 0.36 cm² of pore size.

Drying process

The effect of temperature (T) 40, 50 and 60°C was evaluated, along with air velocity (VA), 2 and 3.5 m s⁻¹, stevia leaf load density (DC), 1.5 and 3.0 kg m⁻², for two types of bed configuration: unpacked (LNE) and packed (LE) (Table 1).

amplitud de color verde a rojo (material foliar fresco como referencia); Δb^* ; cambio en la amplitud de color azul a amarillo (material foliar fresco como referencia).

Equipo de secado

Un secador de lecho fluidizado con una cámara de fluidización de vidrio de 0.5 m de altura y 0.1 m de diámetro se utilizó; estaba equipado con una malla de acero inoxidable de 0.1 m de diámetro y 0.1 m de altura, con un tamaño de poro de 0.36 cm².

Proceso de secado

El efecto de la temperatura (T) 40, 50 y 60 °C se evaluó, junto con la velocidad del aire (VA), 2 y 3.5 m s⁻¹, la densidad de carga foliar de estevia (DC), 1.5 y 3.0 kg m⁻², para dos tipos de configuración de lecho: no empacado (LNE) y empacado (LE) (Cuadro 1).

El punto final del proceso de secado se estableció cuando el material foliar alcanzó una humedad del 10% en base seca (bs). El material foliar seco se resguardó en contenedores de polietileno en condiciones de humedad relativa (HR) del 10% a 25 °C de temperatura.

The end point of the drying process was established when the leaf material reached a moisture content of 10% on a dry basis (bs). The dried leaf material was stored in polyethylene containers at a relative humidity of 10% at a 25 °C temperature.

Chemical characterization: quantification of antioxidant compounds

Preparation of stevia leaf extract

The methodology of Periche *et al.* (2015) was used with some modifications. For the extraction of steviol glycosides and polyphenolic compounds, an extractant solution (v/v) composed of methanol (Fermont) and hydrochloric acid (Fermont) 1% was used. For the extraction of flavonoids, an extractant solution composed of methanol (Fermont) 80% was used.

The evaluated leaf material was ground by means of a blade grinder (Krupps GX4100, México). The extraction of secondary metabolites was performed by ultrasound. To the ground leaf material (0.4 g of fresh leaf, or 0.1 g of dry leaf) they were added 5 mL of the corresponding extractant solution and it was then subjected to an ultrasonic bath (Cole-Parmer 8892, USA) for 20 minutes at room temperature (25°C), with a frequency of 44 KHz, under dark conditions. The solution was recovered by centrifugation at 453 x g (Dynac Clay Adams, USA, 1993).

Cuadro 1. Combinaciones de factores para secado en lecho fluidizado de hojas de *S. rebaudiana*.
Table 1. Factor combinations for fluidized bed drying of *S. rebaudiana* leaves.

CF [†]	T [‡] (°C)	VA [§] (ms ⁻¹)	DC ^b (kg m ⁻²)	Tipo de lecho [°]	CF	T [‡] (°C)	VA [§] (ms ⁻¹)	DC ^b (kg m ⁻²)	Tipo de lecho
1	40	2.0	1.5	LNE	13	40	2.0	1.5	LE
2	40	2.0	3.0	LNE	14	40	2.0	3.0	LE
3	40	3.5	1.5	LNE	15	40	3.5	1.5	LE
4	40	3.5	3.0	LNE	16	40	3.5	3.0	LE
5	50	2.0	1.5	LNE	17	50	2.0	1.5	LE
6	50	2.0	3.0	LNE	18	50	2.0	3.0	LE
7	50	3.5	1.5	LNE	19	50	3.5	1.5	LE
8	50	3.5	3.0	LNE	20	50	3.5	3.0	LE
9	60	2.0	1.5	LNE	21	60	2.0	1.5	LE
10	60	2.0	3.0	LNE	22	60	2.0	3.0	LE
11	60	3.5	1.5	LNE	23	60	3.5	1.5	LE
12	60	3.5	3.0	LNE	24	60	3.5	3.0	LE

[†]CF, combinación de factores; [‡]T, temperatura; [§]VA, velocidad del aire de secado; ^bDC, densidad de carga del material foliar; [°]LE/LNE, tipo de lecho de secado, empacado y no empacado. ♦ [†]CF, combination of factors; [‡]T, temperature; [§]VA, drying air velocity; ^bDC, load density of leaf material; [°]LE/LNE, type of drying bed, packed and unpacked.

Caracterización química: cuantificación de compuestos antioxidantes

Preparación de extracto de hojas de estevia

La metodología de Periche *et al.* (2015) se utilizó con algunas modificaciones. Para la extracción de glucósidos de esteviol y compuestos polifenólicos se utilizó una solución extractora (v/v) compuesta de metanol (Fermont) y ácido clorhídrico (Fermont) 1%. Para la extracción de flavonoides se utilizó una solución extractora compuesta de metanol (Fermont) al 80%.

El material foliar evaluado se pulverizó por medio de un molino de cuchillas (Krupps GX4100, México). La extracción de metabolitos secundarios se realizó por medio de ultrasonido. Al material foliar pulverizado (0.4 g de hoja fresca, o 0.1 g de hoja seca) se le adicionaron 5 mL de la solución extractora correspondiente y se sometió a baño ultrasónico (Cole-Parmer 8892, EE. UU.) por 20 minutos a temperatura ambiente (25 °C), con una frecuencia de 44 KHz, en condiciones de oscuridad. La solución se recuperó mediante centrifugación a 453 x g (Dynac Clay Adams, EE. UU., 1993).

El proceso de extracción se repitió dos veces sobre el material sólido recuperado, y se recuperaron los sobrenadantes.

Determinación de polifenoles totales

La metodología de Singleton y Rossi (1965) se utilizó con algunas modificaciones. La mezcla reactiva consistió en 200 μ L del extracto foliar a evaluar, 2.6 mL de agua destilada (Fermont), 2.0 mL de hidróxido de sodio (Fermont) al 7% (p/v) y 200 μ L del reactivo de Folin-Cicolteau 2N (Sigma-Aldrich). La mezcla reactiva se dejó reposar 1:30 h en oscuridad.

La evaluación espectrofotométrica se realizó a una longitud de onda de 760 nm (GBC Cintral 4040, EE. UU.); con el uso de ácido gálico (Sigma-Aldrich) como estándar de referencia. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de sólido seco (mgEAG g⁻¹).

Determinación de flavonoides totales

De acuerdo con la metodología de Ivanova *et al.* (2010), con algunas modificaciones. La mezcla reactiva consistió en 1 mL del extracto foliar a evaluar, 4 mL de agua destilada (Fermont), y 0.3 mL de nitrito de sodio (Baker) al 5% (p/v). La solución se dejó reposar 5 minutos en oscuridad y transcurrido el tiempo, se adicionaron 0.3 mL de cloruro de aluminio (Baker) al 10% (p/v). La solución se resguardó por 6 minutos (min) en oscuridad para después adicionar 2 mL de hidróxido de sodio (1M) y 2.4 mL de agua destilada.

The extraction process was repeated twice on the recovered solid material, and the supernatants were recovered.

Determination of total polyphenols

The methodology of Singleton and Rossi (1965) was used with some modifications. The reagent mixture consisted of 200 μ L of the leaf extract for evaluation, 2.6 mL of distilled water (Fermont), 2.0 mL of 7% (w/v) sodium hydroxide (Fermont), and 200 μ L of 2N Folin-Cicolteau reagent (Sigma-Aldrich). The reagent mixture was left to rest for 1:30 h in the dark.

Spectrophotometric evaluation was performed at a 760 nm wavelength (GBC Cintral 4040, USA); with the use of gallic acid (Sigma-Aldrich) as the reference standard. Results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry solid (mgEAG g⁻¹).

Determination of total flavonoids

According to the methodology of Ivanova *et al.* (2010), with some modifications, the reagent mixture consisted of 1 mL of the leaf extract for evaluation, 4 mL of distilled water (Fermont), and 0.3 mL of 5% (w/v) sodium nitrite (Baker). The solution was left to rest for 5 minutes in the dark and after that time, 0.3 mL of 10% (w/v) aluminium chloride (Baker) were added. The solution was kept for 6 minutes (min) in the dark, then 2 mL of sodium hydroxide (1M) and 2.4 mL of distilled water were added.

Spectrophotometric evaluation was performed at a wavelength of 510 nm (GBC Cintral 4040, USA); with quercetin (Sigma-Aldrich) as the reference standard. Results were expressed as milligrams of quercetin equivalents per gram of dry solid (mgEQ g⁻¹).

Antioxidant activity

The methodology of Shukla *et al.* (2012) was used with some modifications. The reagent mixture consisted of 100 μ L of the leaf extract for evaluation, and 2.9 mL of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH*, Sigma-Aldrich) methanolic solution at a concentration of 0.039 mg mL⁻¹. The mixture was left to rest 30 min in the dark.

Spectrophotometric evaluation was performed at a 517 nm wavelength (GBC Cintral 4040, USA), with 80% methanol (Fermont) as blank. The results were expressed as percentage inhibition of the DPPH* solution according to Equation 2:

$$\% \text{ inhibition} = [(A_o - A_t) (A_o)^{-1}] \times 100 \quad (2)$$

La evaluación espectrofotométrica se realizó a una longitud de onda de 510 nm (GBC Cintral 4040, EE. UU.); con quercetina (Sigma-Aldrich) como estándar de referencia. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de sólido seco ($\text{mgEQ g}_{\text{ss}}^{-1}$).

Actividad antioxidante

La metodología de Shukla *et al.* (2012) se utilizó con algunas modificaciones. La mezcla reactiva consistió en 100 μL del extracto foliar a evaluar y 2.9 mL de solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH[•], Sigma-Aldrich) en una concentración de 0.039 mg mL^{-1} . La mezcla se dejó en reposo 30 min en la oscuridad.

La evaluación espectrofotométrica se realizó a una longitud de onda de 517 nm (GBC Cintral 4040, EE. UU.), con metanol (Fermont) al 80% como blanco. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición de la solución de DPPH[•] de acuerdo con la Ecuación 2:

$$\% \text{ inhibición} = [(A_o - A_t) / (A_o - 1)] \times 100 \quad (2)$$

donde: A_o ; absorbancia del control (blanco); A_t ; absorbancia de la muestra.

Cuantificación de glucósidos de esteviol

Un cromatógrafo de líquidos (Perkin Elmer Flexar Series, EE. UU.) se utilizó con una columna C18 (Thermo Fisher Scientific ODS Hypersil, EE. UU.); se filtraron alícuotas del extracto foliar por evaluar (20 μL) a través de filtros de 0.45 μm de abertura de poro (Bejin, China). Un régimen isocrático se usó de acetonitrilo-agua (Sigma-Aldrich) en proporción 35:65 (v/v).

La evaluación espectrofotométrica se realizó a una longitud de onda de 210 nm (Perkin Elmer UV-Vis Flexar series, EE. UU.) con el uso de esteviósido y rebaudiósido A (Sigma-Aldrich) como estándares de referencia. Los resultados se expresaron como miligramos de glucósido de esteviol por gramo en base seca ($\text{mg g}_{\text{ss}}^{-1}$).

Muestreo experimental y análisis de datos

El análisis experimental fue el de un arreglo factorial con 24 combinaciones de factores y 3 repeticiones (determinaciones) de muestras al azar. Los cuatro factores evaluados fueron temperatura del proceso de secado (40 °C, 50 °C y 60 °C); configuración del lecho de secado (empacado y no empacado); velocidad de la corriente de aire (2 y 3.5 m s^{-1}) y carga del material foliar de estevia (1.5 y 3 kg m^{-2}).

El orden para el muestreo (determinaciones) de cada combinación de factores (Cuadro 1) se estableció a través del algoritmo

where: A_o ; absorbance of the control (blank); A_t ; absorbance of the sample.

Quantification of steviol glycosides

A liquid chromatograph (Perkin Elmer Flexar Series, USA) was used with a C18 column (Thermo Fisher Scientific ODS Hypersil, USA); aliquots of the leaf extract for evaluation were filtered (20 μL) through 0.45 μm pore opening filters (Beijing, China). An isocratic regime was used of acetonitrile-water (Sigma-Aldrich) in 35:65 (v/v) ratio.

Spectrophotometric evaluation was performed at a 210 nm wavelength (Perkin Elmer UV-Vis Flexar series, USA) with the use of stevioside and rebaudioside A (Sigma-Aldrich) as reference standards. The results were expressed as milligrams of steviol glycoside per gram on a dry basis ($\text{mg g}_{\text{ss}}^{-1}$).

Experimental sampling and data analysis

The experimental analysis was that of a factorial arrangement with 24 combinations of factors and 3 replicates (determinations) of random samples. The four factors evaluated were drying process temperature (40 °C, 50 °C and 60 °C); drying bed configuration (packed and unpacked); airflow velocity (2 and 3.5 m s^{-1}) and stevia leaf material load (1.5 and 3 kg m^{-2}).

The order for sampling (determinations) of each factors combination (Table 1) was established through the Mersenne Twister MT19937 prime number algorithm by means of a hierarchical but unranked list of the 1st to 24th factor combinations in Excel® 2013. To evaluate the differences between the mean values of each process variable and their interactions, Fisher's test was performed with significant criterion at $p \leq 0.05$.

For the statistical analysis, Statistica v. 7.0 software was used (StatSoft, Inc. 2004. STATISTICA, data analysis software system; www.statsoft.com).

RESULTS AND DISCUSSION

Drying time

The unpacked bed configuration at a temperature of 60 °C load of 1.5 kg m^{-2} and an air velocity of 3.5 m s^{-1} showed the shortest drying times (24 min) at a final material humidity content of 10% (bs).

In both of bed configurations, the temperature of 40 °C significantly increased drying times. The packed bed configuration recorded the longest drying time (160 min), when a load of 3.0 kg m^{-2} of leaf material was processed with an airflow velocity of 2.0 m s^{-1} .

del número primo Mersenne Twister MT19937 por medio de una lista jerarquizada pero no ordenada de las combinaciones de factores 1 al 24 en Excel® 2013. Para evaluar las diferencias entre los valores medios de cada variable de proceso y sus interacciones se realizó la prueba de Fisher con criterio significativo en $p \leq 0.05$.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistica v. 7.0 (StatSoft, Inc. 2004. STATISTICA, *data analysis software system*; www.statsoft.com).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tiempo de secado

La configuración de lecho no empacado a una temperatura de 60 °C carga de 1.5 kg m⁻² y una velocidad de aire de 3.5 m s⁻¹ mostró los menores tiempos de secado (24 min) con un contenido de humedad final del material del 10% (bs).

En ambas configuraciones de lecho, la temperatura de 40 °C incrementó significativamente los tiempos de secado. La configuración de lecho empacado es la que registró el mayor tiempo de secado (160 min), cuando se procesó una carga foliar de 3.0 kg m⁻² con una velocidad de aire de 2.0 m s⁻¹.

Estos resultados son consistentes con los de Lemus-Mondaca *et al.* (2015) quienes secaron hojas de *Stevia rebaudiana* con secado por convección a 40, 50 y 60 °C, una velocidad de aire de 2 m s⁻¹ y una densidad de carga de 2.0 kg m⁻². Los tiempos de proceso para obtener una humedad final del 10% (bs) fueron de 480, 270 y 180 min en esas temperaturas.

Por otra parte, otros métodos de secado presentan tiempos de secado mayores, como los documentados por Ruiz-Ruiz *et al.* (2015) y Periche *et al.* (2015) quienes secaron material foliar particulado de *Stevia rebaudiana* var. Morita II y hojas de *Stevia rebaudiana* en secadores solares directos e indirectos, con tiempos de secado que oscilaron entre los 480 minutos y los 30 días. El contacto del aire de secado alrededor de toda la partícula durante el secado en lecho fluidizado favoreció la rapidez de secado y mejoró el tiempo de secado.

Color

La configuración de lecho influyó en el cambio de color (ΔE) de las hojas de estevia secas. La interacción de las otras variables de proceso, velocidad del

These results are consistent with those of Lemus-Mondaca *et al.* (2015) who dried *Stevia rebaudiana* leaves with convective drying at 40, 50 and 60 °C, an airflow velocity of 2 m s⁻¹ and a load density of 2.0 kg m⁻². The process times to obtain a final humidity content of 10% (bs) were 480, 270 and 180 min at these temperatures.

On the other hand, other drying methods present longer drying times, such as those reported by Ruiz-Ruiz *et al.* (2015) and Periche *et al.* (2015) who dried particulate leaf material of *Stevia rebaudiana* var. Morita II and leaves of *Stevia rebaudiana* in direct and indirect solar dryers, with drying times ranging from 480 min to 30 days. Drying air contact around the entire particle during fluidized bed drying favoured drying velocity and improved drying time.

Colour

The bed configuration influenced the colour change (ΔE) of the dried stevia leaves. The interaction of the other process variables, airflow velocity, load and temperature, had no significant effect on colour change.

In the unpacked bed configuration (LNE), the greatest colour change occurred at a temperature of 50 °C, an airflow of 2.5 m s⁻¹, and a leaf material load of 1.5 kg m⁻². Whereas in the packed bed (LE) configuration, the greatest colour change occurred at a temperature of 40 °C, an airflow of 2.0 m s⁻¹, and a leaf material load of 3.0 kg m⁻².

Colour changes in *Origanum vulgare*, *Mentha spp.* and *Coriandrum sativum* subjected to drying processes are attributed to changes in chlorophyll concentration and structure. These modifications were related to the thermal effect of the process regardless the oxidative effect promoted by the increase of oxygen present in the carrier gas (Rudra *et al.*, 2008; Dwivedy *et al.*, 2012).

Steviol glycosides

The concentration of steviol glycosides was affected by the drying bed configuration. The interaction of the other process variables, airflow velocity, leaf material load and temperature, had no significant effect on stevioside concentration.

Unpacked bed drying retained the highest amount of stevioside (Figure 1) and the highest concentration

flujo de aire, carga y temperatura, no tuvieron efectos significativos sobre el cambio de color.

En la configuración de lecho no empacado (LNE), el mayor cambio de color ocurrió a una temperatura de 50°C, un flujo de aire de 2.5 m s⁻¹, y una carga de material foliar de 1.5 kg m⁻². En tanto que en la configuración de lecho empacado (LE), el mayor cambio de color ocurrió a una temperatura de 40°C, un flujo de aire de 2.0 m s⁻¹, y una carga de material foliar de 3.0 kg m⁻².

Los cambios en el color en *Origanum vulgare*, *Mentha* spp. y *Coriandrum sativum* sometidos a procesos de secado se han atribuido a cambios en la concentración y estructura de la clorofila. Estas modificaciones se relacionaron con el efecto térmico del proceso y no con un efecto oxidativo propiciado por el aumento de oxígeno presente en el gas acarreador (Rudra *et al.*, 2008; Dwivedy *et al.*, 2012).

Glucósidos de esteviol

La concentración de glucósidos de esteviol resultó afectada por la configuración de lecho. La interacción de las otras variables de proceso, velocidad del flujo de aire, carga de material foliar y temperatura, no tuvo efecto significativo sobre la concentración de los esteviósidos.

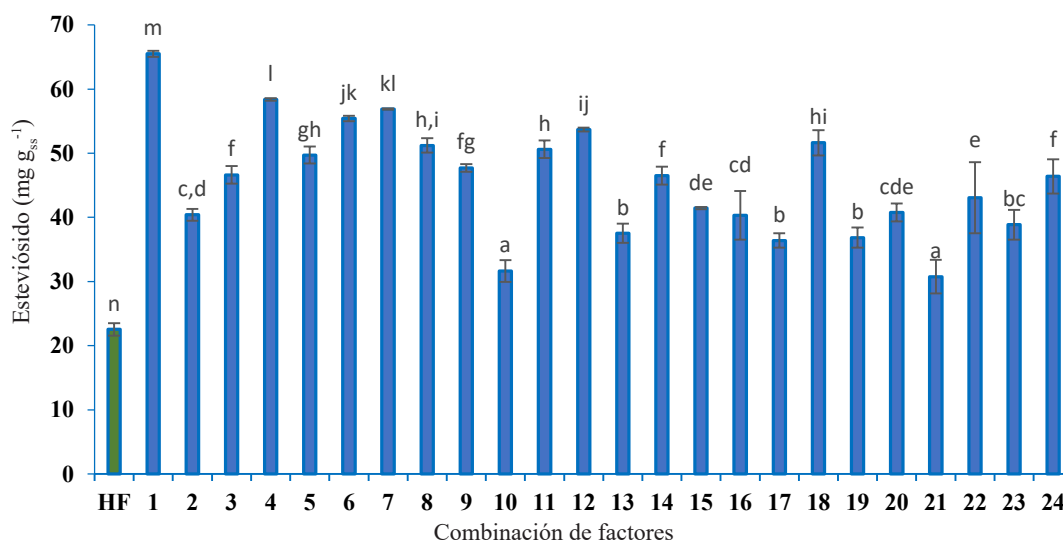
El secado en lecho no empacado retuvo mayor cantidad de esteviósido (Figura 1) y se alcanzó la

(65.50 mg g⁻¹) was reached with combination 1. In contrast, the concentration of rebaudioside A (Figure 2) was higher in packed bed drying and the highest concentration was reached with combination 17 (92.94 mg g⁻¹).

The interaction of the other process variables, airflow velocity, leaf material load and temperature, had no significant effect on the rebaudioside A concentration.

The evaluation of other drying methods of leaf material and aqueous extracts of *Stevia rebaudiana* suggest that the thermal effect has an inverse relationship with the concentration of some steviol glycosides. Chranioti *et al.* (2016) observed a reduction in the final concentration of rebaudioside A in spray-dried *Stevia rebaudiana* extracts, while Periche *et al.* (2015) reported a decrease in the concentration of stevioside and rebaudioside A in *Stevia rebaudiana* leaves dried at 100 and 180°C with convective drying. Jookan *et al.* (2012) evaluated the concentration of nine steviol glycosides in leaf material dried at 180°C; those authors found a decrease in the concentration of stevioside and rebaudioside A related to the increase in the concentration of rebaudioside B.

Aftertaste is a characteristic of great importance in sweeteners other than glucose. This characteristic of stevia glycosides (the bitter taste) is related to



†Literales diferentes indican diferencia estadística (Fisher, $p \leq 0.05$). ♦ †Different literals indicate statistical difference (Fisher, $p \leq 0.05$).

Figura 1. Concentración de esteviósido.
Figure 1. Stevioside concentration.

concentración mayor ($65.50 \text{ mg g}_{\text{ss}}^{-1}$) con la combinación 1. Por el contrario, la concentración de rebaudiósido A (Figura 2) resultó mayor en el secado con lecho empacado y se alcanzó la mayor concentración con la combinación 17 ($92.94 \text{ mg g}_{\text{ss}}^{-1}$).

La interacción de las otras variables de proceso, velocidad del flujo de aire, carga de material foliar y temperatura, no tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de rebaudiósido A.

La evaluación de otros métodos de secado de material foliar y extractos acuosos de *Stevia rebaudiana* sugieren que el efecto térmico tiene una relación inversa con la concentración de algunos glucósidos de esteviol. Chranioti *et al.* (2016) observaron una reducción en la concentración final de rebaudiósido A en extractos de *Stevia rebaudiana* secados por aspersión, mientras que Periche *et al.* (2015) documentaron un decremento en la concentración de esteviósido y rebaudiósido A en hojas de *Stevia rebaudiana* secadas a 100 y 180°C con secado por convección. Jookan *et al.* (2012) evaluaron la concentración de nueve glucósidos de esteviol en material foliar secado a 180°C ; esos autores encontraron una disminución en la concentración de esteviósido y rebaudiósido A relacionado con el aumento de la concentración de rebaudiósido B.

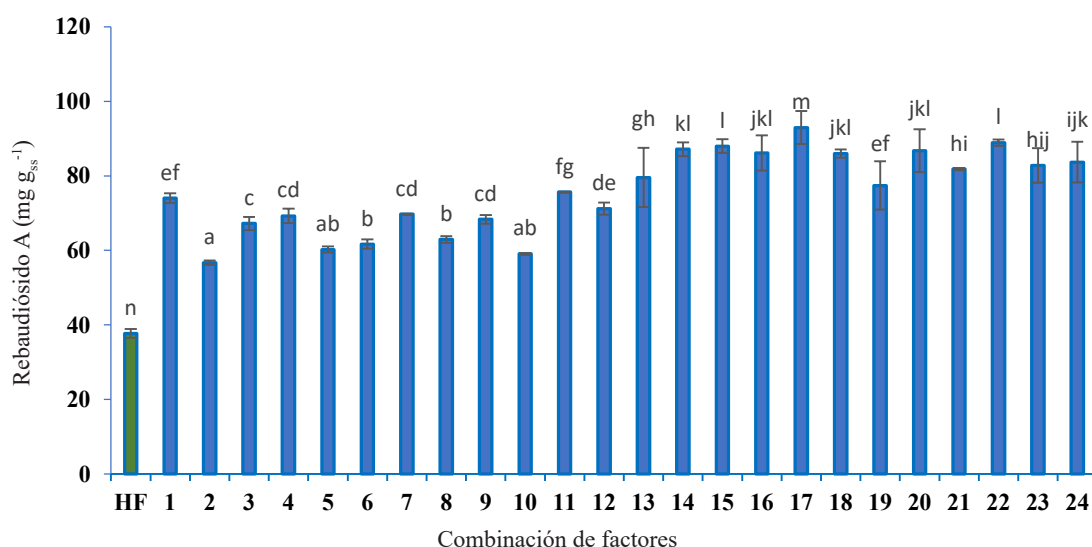
the rebaudioside A/stevioside ratio, where a higher concentration of rebaudioside A decreases the aftertaste of the final product (Upreti *et al.*, 2012). In the unpacked bed configuration, the rebaudioside A/stevioside ratio was lower than that found in fresh leaves (1.67). Combination 21 generated the best sweetener ratio (2.66) (Figure 3).

Lemus-Mondaca *et al.* (2015) proposed that the increase in concentration of stevioside and rebaudioside A is a result of the presence of enzymatic precursors of steviol glycosides, which promote the binding of carbohydrates to aglycone nuclei (steviol) present in the intracellular medium.

Polyphenolic compounds

Total polyphenol content

The process variables evaluated had a significant effect on the concentration of polyphenols and flavonoids in the dried leaf material. Packed bed drying increased the concentration of phenolic compounds compared to fresh material (Figure 4). Combination 18 presented the highest phenol concentration ($118.19 \text{ mgEAG g}_{\text{ss}}^{-1}$). In contrast, the unpacked bed configuration at 60°C reduced the



[†]Literales diferentes indican diferencia estadística (Fisher, $p \leq 0.05$). ♦ [†]Different literals indicate statistical difference (Fisher, $p \leq 0.05$).

Figura 2. Concentración de Rebaudiósido A.
Figure 2. Rebaudioside A Concentration.

El retrogusto es una característica de gran importancia en edulcorantes diferentes a la glucosa. Esta característica de los glucósidos de estevia (el sabor amargo) se ha relacionado con la proporción rebaudiósido A/esteviósido, en ella una concentración mayor de rebaudiósido A disminuye el retrogusto del producto final (Upreti *et al.*, 2012). En la configuración de lecho no empacado, la relación rebaudiósido A/esteviósido fue menor que la encontrada en hojas frescas (1.67). La combinación 21 generó la mejor relación de edulcorantes (2.66) (Figura 3).

Lemus-Mondaca *et al.* (2015) propusieron que el incremento en concentración de esteviósido y rebaudiósido A es resultado de la presencia de precursores enzimáticos de glucósidos de esteviol, los cuales propician la unión de carbohidratos hacia núcleos aglicones (esteviol) presentes en el medio intracelular.

Compuestos polifenólicos

Contenido de polifenoles totales

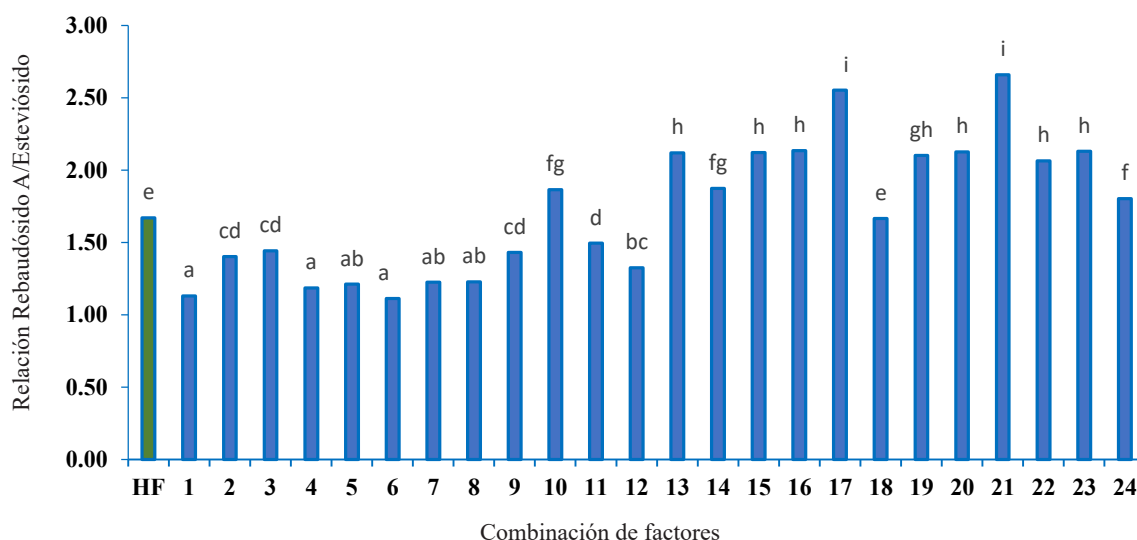
Las variables de proceso evaluadas tuvieron un efecto significativo en la concentración de polifenoles y de flavonoides del material foliar seco. El secado por lecho empacado incrementó la concentración de compuestos fenólicos en relación con el material fresco (Figura 4). La combinación 18 presentó la mayor

concentración de compuestos fenólicos hasta 17% en relación al material fresco.

La concentración de compuestos fenólicos encontrada en este estudio fue mayor que la reportada por otros autores. Lemus-Mondaca *et al.* (2015) indicó modificaciones en la concentración de polifenoles cuando el material de hoja fue procesado en horno convectivo. Sus resultados mostraron que una temperatura superior a 60 °C disminuyó la concentración de compuestos fenólicos (27.1 mgEAG g⁻¹), mientras que a una temperatura de 40 °C la concentración de compuestos polifenólicos (55.05 mgEAG g⁻¹) aumentó comparado al material fresco (29 mgEAG g⁻¹).

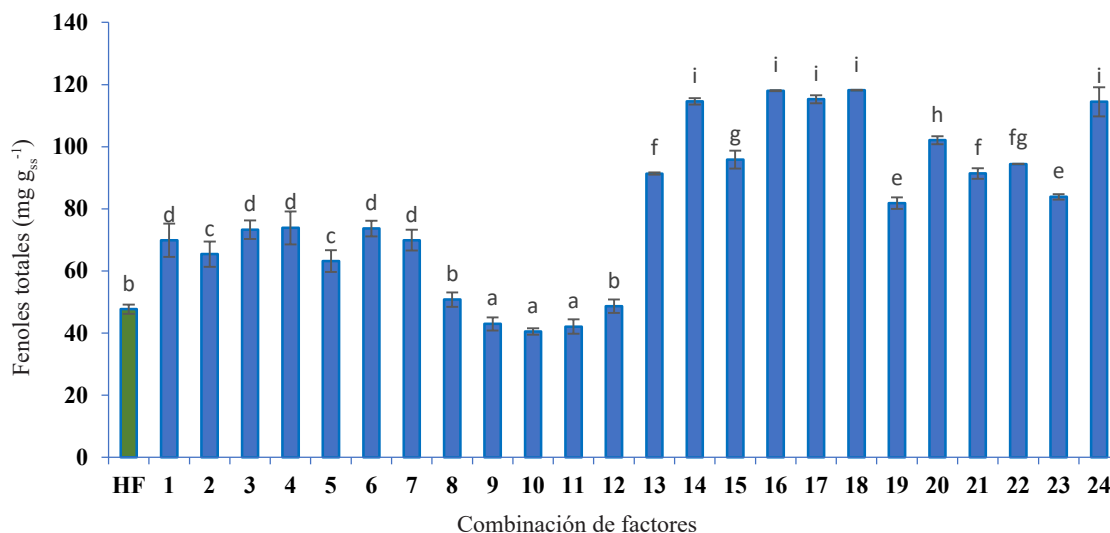
Periche *et al.* (2015) reportó un aumento en el nivel de polifenoles en hojas de stevia (76.80 mgEAG g⁻¹) comparado al material no tratado (44.40 mgEAG g⁻¹), en el secado por convección a una temperatura de 180 °C. Muanda *et al.* (2011) reportó un contenido de 25.5 mgEAG g⁻¹ en procesos de secado por convección en sistemas de secado a bajas temperaturas (25-40 °C).

El aumento o disminución en las concentraciones de compuestos polifenólicos está relacionado con los procesos de oxidación mediados por la interacción del flujo de oxígeno y la temperatura del flujo de aire caliente utilizado en el proceso de secado. Así como un aumento en los compuestos fenólicos por acción de las reacciones de hidrólisis mediadas por la temperatura (Lemus-Mondaca *et al.*, 2015; Periche *et al.*, 2015).



† Literales diferentes indican diferencia estadística (Fisher, $p \leq 0.05$). ♦ † Different literals indicate statistical difference (Fisher, $p \leq 0.05$).

Figura 3. Relación entre concentraciones de Rebaudiósido A/Esteviósido.
Figure 3. Rebaudioside A/Stevioside concentration ratio.



†Literales diferentes indican diferencia estadística (Fisher, $p \leq 0.05$). ♦ †Different literals indicate statistical difference (Fisher, $p \leq 0.05$).

Figura 4. Concentración de compuestos fenólicos totales.
Figure 4. Concentration of total phenolic compounds.

concentración de fenoles (118.19 mgEAG g⁻¹). En cambio, la configuración con lecho no empacado a 60 °C redujo hasta un 17% la concentración de compuestos fenólicos en relación con el material fresco.

La concentración de compuestos fenólicos encontrados en este estudio fue superior a la informada por otros autores. Lemus-Mondaca *et al.* (2015) indicaron modificaciones en la concentración de polifenoles cuando el material foliar se procesó en horno de convección. Sus resultados mostraron que una temperatura superior a los 60 °C disminuía la concentración de compuestos fenólicos (27.1 mgEAG g⁻¹), mientras que en una temperatura de 40 °C la concentración de compuestos polifenólicos (55.05 mgEAG g⁻¹) se incrementaba en comparación con el material fresco (29 mgEAG g⁻¹).

Periche *et al.* (2015) informaron un incremento en el nivel de polifenoles en hojas de estevia (76.80 mgEAG g⁻¹) comparado con el material sin tratar (44.40 mgEAG g⁻¹), en secado por convección a una temperatura 180 °C. Muanda *et al.* (2011) documentaron un contenido de fenoles de 25.5 mgEAG g⁻¹ en procesos de secado por medio de sistemas por convección a temperaturas bajas (25- 40 °C).

El aumento o disminución de las concentraciones de compuestos polifenólicos se relaciona con los procesos de oxidación mediados por la interacción

Total flavonoid content

The packed bed configuration generated an increase in flavonoid concentration in most of the combinations in regard to the concentration of flavonoids in the fresh material. The highest flavonoid concentration (40.28 mgEQ g⁻¹) occurred with combination 24. The use of the unpacked bed caused a decrease in flavonoid concentration at temperatures of 60 °C; while for the other thermal conditions an increase in total flavonoid concentration was observed. The highest flavonoid concentration (38.63 mgEQ g⁻¹) occurred in combination 3 (Figure 5).

Lemus-Mondaca *et al.* (2015) reported values lower than those of this study (1.38 mgEQ g⁻¹); whereas Ruiz-Ruiz *et al.* (2015) found concentrations of 39.3-36.7 mgEQ g⁻¹ in aqueous extracts of two agronomic lines, after air convection drying at 60 °C for 24 h.

Antioxidant capacity

In packed bed drying, the antioxidant capacity remained between 91.55-93.8%, values very close to the fresh leaf material (92.79%). In unpacked bed configuration and temperatures of 40-50 °C the antioxidant capacity remained between 92.35-

del flujo de oxígeno y la temperatura del flujo de aire caliente utilizados en el proceso de secado. Así como un aumento de los compuestos fenólicos ligados por acción de las reacciones de hidrólisis mediadas por la temperatura (Lemus-Mondaca *et al.*, 2015; Periche *et al.*, 2015).

Contenido de flavonoides totales

La configuración de lecho empacado generó un aumento en la concentración de flavonoides en la mayoría de las combinaciones referido a la concentración de flavonoides en el material fresco. La mayor concentración de flavonoides ($40.28 \text{ mgEQ g}_{\text{ss}}^{-1}$) se presentó con la combinación 24. El uso del lecho no empacado ocasionó una disminución en la concentración de flavonoides a temperaturas de 60°C ; mientras que para las otras condiciones térmicas se observó un incremento en la concentración de flavonoides totales. La mayor concentración de flavonoides ($38.63 \text{ mgEQ g}_{\text{ss}}^{-1}$) se presentó en la combinación 3 (Figura 5).

Lemus-Mondaca *et al.* (2015) consignaron valores menores a los de este estudio ($1.38 \text{ mgEQ g}_{\text{ss}}^{-1}$); en tanto que Ruiz-Ruiz *et al.* (2015) encontraron concentraciones de $39.3\text{-}36.7 \text{ mgEQ g}_{\text{ss}}^{-1}$ en extractos acuosos de dos líneas agronómicas, después de un secado por convección de aire a 60°C por 24 h.

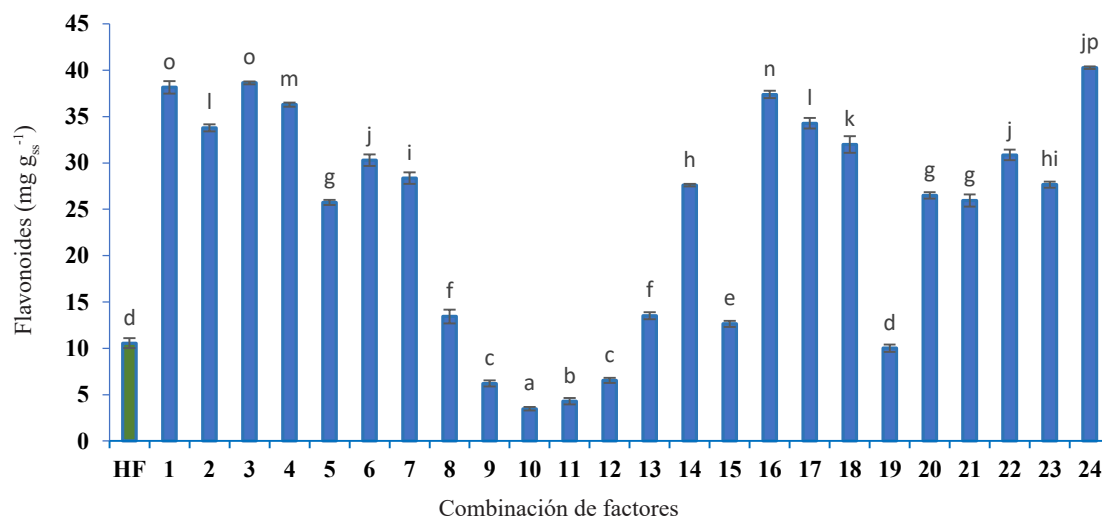
93.87%, but at temperatures of 60°C a decrease was observed compared to the fresh stevia leaf material. The interaction of the other process variables, airflow velocity, leaf material load, and temperature had no effect on the antioxidant capacity of the aqueous extracts (Figure 6).

Muanda *et al.* (2011) reported antioxidant capacity values of 96.61% in stevia methanolic extracts evaluated by the DPPH* radical stabilization method. Tavarini and Angelini (2012) also evaluated the antioxidant activity of methanolic extracts of stevia leaves by the DPPH* radical stabilization method; those authors recorded inhibition percentages in the range of 86.5 to 89.8%.

CONCLUSIONS

In fluidized bed drying of stevia leaves, drying bed configuration and temperature were the main factors in the increase of steviol glycosides and antioxidant compounds. The aftertaste (rebaudioside/stevioside ratio), as an accepted measure of commercial sweetness quality in stevia leaf, was increased by packed bed drying.

The decrease in drying times and the increase of bioactive compounds in stevia leaf (steviol glycosides and antioxidant compounds), make of this drying method a useful tool in the management and



†Literales diferentes indican diferencia estadística (Fisher, $p \leq 0.05$). ♦ †Different literals indicate statistical difference (Fisher, $p \leq 0.05$).

Figura 5. Concentración de flavonoides.
Figure 5. Flavonoid concentration.

Capacidad antioxidante

En el secado por lecho empacado la capacidad antioxidante se mantuvo entre 91.55-93.8%, valores muy cercanos al material foliar fresco (92.79%). En configuración de lecho no empacado y temperaturas de 40-50°C la capacidad antioxidante se mantuvo entre 92.35-93.87%, pero a temperaturas de 60 °C se observó una disminución respecto al material fresco de hoja de estevia. La interacción de las otras variables de proceso, velocidad del flujo de aire, carga de material foliar y temperatura no tuvo efectos sobre la capacidad antioxidante de los extractos acuosos (Figura 6).

Muanda *et al.* (2011) informaron valores de capacidad antioxidante de 96.61% en extractos metanólicos de estevia evaluados por el método de estabilización del radical DPPH[†]. Tavarini y Angelini (2012) también evaluaron la actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de estevia por el método de la estabilización del radical DPPH[†]; esos autores documentaron porcentajes de inhibición en la amplitud de 86.5 a 89.8%.

CONCLUSIONES

En el secado de hoja de estevia por lecho fluidizado, la configuración del lecho de secado y la temperatura

preservation of plant materials containing secondary metabolites with economic importance.

ACKNOWLEDGEMENTS

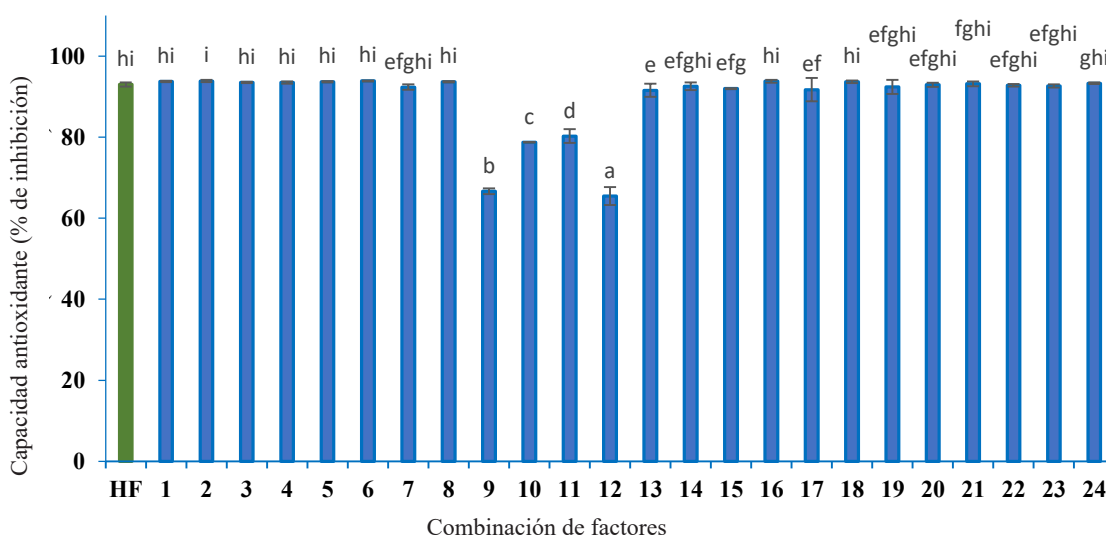
To the Instituto Politécnico Nacional (IPN) for funding the project SIP20160839, to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for postgraduate scholarship No. 590996, and to the Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (COFAA) for publications funds.

—End of the English version—

—*—

fueron los factores principales en el incremento de glucósidos de esteviol y compuestos antioxidantes. El retrogusto (relación rebaudiósido A/esteviósido), como medida aceptada de calidad de dulzura comercial en la hoja de estevia, aumentó por el secado en lecho empacado.

La disminución en los tiempos de secado y el incremento de compuestos bioactivos en la hoja de estevia (glucósidos de esteviol y compuestos antioxidantes), hacen de este método de secado una herramienta útil



[†]Literales diferentes indican diferencia estadística (Fisher, $p \leq 0.05$). ♦ [†]Different literals indicate statistical difference (Fisher, $p \leq 0.05$).

Figura 6. Capacidad antioxidante expresada como porcentaje de inhibición del DPPH*
Figure 6. Antioxidant capacity expressed as percentage of DPPH* inhibition.

en el manejo y la preservación de materiales vegetales que contengan metabolitos secundarios con importancia económica.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por el financiamiento del proyecto SIP20160839; al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de posgrado No. 590996; y a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (COFAA) por el financiamiento para publicaciones.

LITERATURA CITADA

- Amin, K., S. Ozgen, and Z. Selamoglu. 2017. *Stevia rebaudiana*: A potential boon for human health. *SM J. Med. Plant. Stud.* 1:1005
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. *Official Methods of Analysis*. Kenneth Helrich. 15th edition. Washington D.C.
- Carbonell-Capella, J. M., F. J. Barba, M. J. Esteve, and A. Frígola. 2013. High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with *Stevia rebaudiana* Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. *Innov. Food Sci. Em. Tech.* 18: 48–56. DOI: 10.1016/j.ifset.2013.01.011.
- Chranioti, C., S. Chanioti, and C. Tzia. 2016. Comparison of spray, freeze and oven drying as a means of reducing bitter aftertaste of steviol glycosides (derived from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant). Evaluation of the final products. *Food Chem.* 190: 1151–1158. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.06.083.
- Durán A.S., M. P. Rodríguez, K. Córdón, y J. Record. 2012. *Estevia (Stevia rebaudiana)*, edulcorante natural y no calórico. *RCHNUT* 39: 203–206. DOI: 10.4067/S0717-75182012000400015.
- Dwivedy, S., K. Rayaguru, and G. R. Sahoo. 2012. Effect of drying methods on quality characteristics of medicinal indian borage (*Coleus aromaticus*) leaves. *J. Food Process. Tech.* 1:3-11 DOI: 10.4172/2157-7110.1000188.
- Gupta, E., S. Purwar, S. Sundaram, and G. K. Rai. 2013. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *J. Med. Plants Res.* 46: 3343–3353. DOI: 10.5897/JMPR2013.5276.
- Hincapié, M.A., y J.E. Zapata. 2019. Estudio de la cinética de deshidratación de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en un secador de lecho fluidizado. *Inf. Tech.* 30:115-124. DOI: 10.4067/S0718-07642019000200115.
- Ivanova, V., M. Stefova, and F. Chinnici. 2010. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J. Serb. Chem. Soc.* 75: 45–59. DOI: 10.2298/JSC1001045I.
- Jayaraman, S., M. Manoharan, and S. Illanchezian. 2008. In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia Rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Trop. J. Pharm. Res.* 7:1143-1149. DOI: 10.4314/tjpr.v7i4.14700.
- Jookan, E., R. Amery, T. Struyf, B. Duquenne, J. Geuns, and B. Meesschaert. 2012. Stability of steviol glycosides in several food matrices. *J. Agr. Food Chem.* 60: 10606–10612. DOI: 10.1021/jf302261j.
- Lemus-Mondaca, R., A. Vega-Galvez, L. Zura-Bravo, and K. Ah-Hen. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.* 132: 1121–1132. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140.
- Lemus-Mondaca, R., K. Ah-Hen, A. Vega-Galvez, C. Honores, and N.O. Moraga. 2015. *Stevia rebaudiana* leaves: Effect of drying process temperature on bioactive components, antioxidant capacity and natural sweeteners. *Plant. Food Hum. Nutr.* DOI: 10.1007/s11130-015-0524-3.yada
- Lima, R. A., and M. C. Ferreira. 2011. Fluidized and vibrofluidized shallow beds of fresh leaves. *Particuology*. 9:139–147. DOI: 10.1016/j.partic.2010.07.024.
- Muanda, F. N., R. Soulimani, B. Diop, and A. Dicko. 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT-Food Sc. Tech.* 44: 1865–1872. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.12.002.
- Mahn, A.V., C.E. Pérez, y A.E. Reyes. 2017. Efecto de las condiciones de secado en lecho fluidizado pulsante sobre el contenido de sulforafano de brócoli. *Rev. Inf. Tech.* 28:17-28. DOI: 10.4067/S0718-07642017000400004.
- Martínez, M. 2015. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. *Cult. Trop.* 36:5-15. ISSN impreso: 0258-5936.
- Mujumdar, A. S., and C. L. Law. 2010. Drying technology: trends and applications in postharvest processing. *Food Biopr. Tech.* 3: 843–852. DOI: 10.1007/s11947-010-0353-1.
- Periche, A., M. L. Castelló, A. Heredia, and I. Escriche. 2015. Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chem.* 172: 1-6. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.029.
- Rudra, S. G., H. Singh, S. Basu, and U. S. Shivhare. 2008. Enthalpy entropy compensation during thermal degradation of chlorophyll in mint and coriander puree. *J. Food Eng.* 86: 379–387. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2007.10.020.
- Ruiz-Ruiz, J. C., Y. B. Moguel-Ordoñez, A. Matus-Basto, and M. R. Segura-Campos. 2015. Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in México. *Nutr. Hosp.* 31: 1163–1170. DOI: 10.3305/nh.2015.31.3.8043.
- Shukla, S., A. Mehta, P. Mehta, and V. K. Bajpai. 2012. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Exp. Tox. Path.* 64: 807-811. DOI: 10.1016/j.etp.2011.02.002.
- Singleton, V. L., and J. A. Rossi. 1965. Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *Am. J. En. Vin.* 16:144-58. <http://garfield.library.upenn.edu/classics1985/A1985AUG6900001.pdf> (Consultado: febrero 2018).
- Tavarini, S., and L.G. Angelini. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. DOI: 10.1002/jsfa.6016.
- Upreti, M., G. Dubois, and I. Prakash. 2012. Synthetic study on the relationship between structure and sweet taste properties of steviol glycosides. *Molecules*. 17: 4186–4196. DOI: 10.3390/molecules17044186.