

Extracción de glucósidos de *stevia rebaudiana* (bertoni) a partir de tecnologías de extracción verdes

Glycosides extraction from *stevia rebaudiana* (bertoni) using green extraction technologies

Palacio-Vasquez, Esteban; Arroyave-Roa, Juan Diego; Cardona-Caicedo, Mauricio; Hurtado-Ibarbo, John Heverth; Martínez-Girón, Jader



 Esteban Palacio-Vasquez

epalaciov@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira,
Colombia

 Juan Diego Arroyave-Roa

jdarroyaver@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira,
Colombia

 Mauricio Cardona-Caicedo

maucardonacai@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira,
Colombia

John Heverth Hurtado-Ibarbo

jhhurtadoi@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira,
Colombia

 Jader Martínez-Girón

jader.martinez@correounivalle.edu.co

Universidad del Valle-Sede Palmira, Colombia

Revista de Investigación Agraria y Ambiental

Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia

ISSN: 2145-6097

ISSN-e: 2145-6453

Periodicidad: Semestral

vol. 10, núm. 1, 2019

riaa@unad.edu.co

Recepción: 23 Mayo 2018

Aprobación: 15 Agosto 2018

Publicación: 18 Diciembre 2018

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/130/130782003/>

DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.2336>

<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/about>



Resumen: La obesidad y la diabetes generada por el consumo excesivo de sacarosa, ha impulsado tendencias de consumo de productos con edulcorantes naturales de bajo poder calórico. Los glucósidos de estevia son una alternativa edulcorante que poseen un dulzor 200-400 veces superior al de la sacarosa y con nulo aporte calórico. Estos glucósidos han sido obtenidos con técnicas convencionales de extracción que generan altos consumos energéticos y un impacto ambiental negativo. Este trabajo identifica las técnicas de extracción verdes más empleadas para la obtención de glucósidos. Entre ellas, las microondas que generan un rápido calentamiento debido a campos eléctricos y magnéticos. El ultrasonido que incrementa el área de transferencia debido a la cavitación. Los disolventes en condiciones supercríticas que tienen una mejor capacidad de extracción, y las enzimas que favorecen la disponibilidad del analito al romper la celulosa. El ultrasonido presentó los rendimientos más altos con valores de 96,46 mg/g y 36,92 mg/g de extracto para esteviósido y Rebaudiósido-A, respectivamente. Algunas de las nuevas técnicas de extracción basadas en las altas presiones y temperaturas como la efectuada con disolventes acelerados (con rendimientos hasta de 63,20 mg/g de extracto, para esteviósido), son tecnologías amigables con el medio ambiente y con potencial uso industrial.

Palabras clave: Esteviósido, microondas, Rebaudiósido-A, fluidos supercríticos, ultrasonido.

Abstract: Generated by the overconsumption of sucrose, diabetes and obesity has led to consumption trends of products with low calorie natural sweeteners. Glycosides of Stevia are an alternative sweetener that has a sweetness 200-400 times greater than sucrose and also have zero calorie. These glycosides have been obtained with conventional extraction techniques that generate high energy consumption and negative environmental impact. This work identifies the most used green extraction techniques for obtaining the glycosides. Some of them like microwaves generate rapid heating due to electric and magnetic fields; ultrasound increases the area of mass transfer due to cavitation, solvents in supercritical conditions have better ability to extraction, and enzymes promote the availability of the

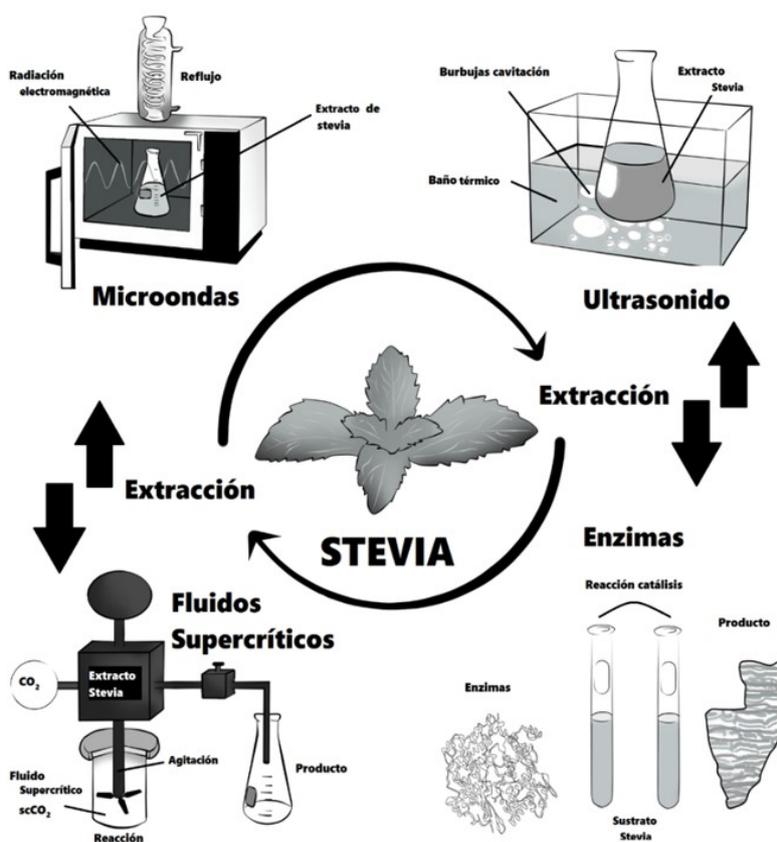
Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

CÓMO CITAR: Palacio Vásquez, E., Arroyave Roa, J. D., Cardona Caicedo, M., Hurtado Ibarbo, J. H. y Martínez Girón, J. (2019). Extracción de glucósidos de *Stevia rebaudiana* (bertoni) a partir de tecnologías de extracción verdes. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 10(1), 43–56. <https://doi.org/10.22490/21456453.2336>

analyte breaking the cellulose. Ultrasound presented higher yields with values of 96,46 and 36,92 (mg/g of extract) for stevioside and Rebaudioside-A, respectively. Some of the new extraction techniques based on high pressures and temperatures like the use of accelerated solvents extraction (with yields of up to 63,20 mg/g dry extract, for stevioside), are environmentally friendly technologies with the environment and they have potential industrial uses.

Keywords: Microwaves, Rebaudioside-A, Stevioside, ultrasound, supercritical fluids.

RESUMEN GRÁFICO



Procesos de extracción verde para obtención de glucósidos de *Stevia rebaudiana*

Autores

INTRODUCCIÓN

El consumo de sacarosa ha ido incrementando durante las últimas cuatro décadas, y se ha utilizado como el edulcorante predilecto en diferentes productos como jugos, yogurt, postres, etc. Sin embargo, se ha establecido que el consumo excesivo de azúcar es una de las principales causas de la epidemia de diabetes tipo 2 (Mooradian, Smith & Tokuda, 2017) y del evidente incremento en la obesidad de las personas. Para el año 1980 se estimaba 29% de adultos obesos, y para el año 2013 se reportó 38% de este mismo tipo de población (Lobete et al., 2017); un incremento que a la fecha puede ser mayor.

En respuesta a esta situación, la industria alimentaria está investigando el desarrollo de productos con edulcorantes de bajo aporte calórico, para disminuir el deterioro de la salud y satisfacer las necesidades de sus consumidores. Dentro de este tipo de edulcorantes se encuentran los glucósidos de esteviol provenientes de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni; un arbusto perenne de la familia Astaraceae oriundo de América del Sur (Prakash et al., 2017; Khattab et al., 2015).

La estevia ha adquirido un importante valor económico para la industria debido a su alto contenido en compuestos dulces. La cantidad de glucósidos de diterpenos es alrededor de un 4-20% de la materia seca de las hojas de la planta; entre ellos se encuentran el esteviósido, rebaudiósidos A, B, C, D, E y F; dulcósido A y esteviolbíosido (Wolwer, 2012). Sin embargo, el esteviósido y el rebaudiósido-A (Reb-A) son los que se encuentran en mayor proporción, convirtiéndose así en los compuestos de referencia para este estudio.

Referenciado específicamente al esteviósido y Reb-A, el porcentaje en peso seco de las hojas de estevia para cada compuesto es de 4-13% y 2-4%, respectivamente. Cabe mencionar, que el poder edulcorante es de 250-300 veces superior al de la sacarosa para el caso de esteviósido, y 300-450 veces para el Reb-A (Khattab et al., 2015; Ljaz et al., 2015; Jentzer et al., 2015). Además, este edulcorante natural ha resultado ser atractivo para la industria agroalimentaria por su alta resistencia al tratamiento térmico, estabilidad en medios ácidos, carácter natural y nulo aporte calórico (0 kcal/g) (Le Donne et al., 2017; Sylvetsky & Rother, 2016); aun así, su uso ha sido motivo de investigación debido a que la reducción o sustitución de la sacarosa en una matriz alimentaria, genera un incremento en la actividad de agua del producto, y por tanto vulnerabilidad ante el deterioro microbiano (Lobete et al., 2017).

La “Administración de alimentos y medicamentos” (FDA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos y la “Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria” (AESA, por sus siglas en inglés) reconocieron los glucósidos puros derivados de la *Stevia rebaudiana* (Bertoni) como productos “Generalmente reconocidos como seguros” (GRAS, por sus siglas en inglés) en los años 2008 y 2010, respectivamente (Lobete et al., 2017). En relación con el consumo de este edulcorante, el “Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios” (JECFA por sus siglas en inglés) aprobó el uso de los glucósidos de estevia como edulcorantes, y sugirió una ingesta diaria admisible (IDA) de 4 mg/kg/día (Khattab et al., 2015). Además, la Unión Europea los clasificó como edulcorantes bajo el código E960 (Sylvetsky & Rother, 2016; Edwards et al., 2016).

Actualmente, se utilizan diferentes técnicas de extracción para la obtención de esteviósido y Reb-A. Entre estas, la extracción con disolventes orgánicos es el método más empleado. No obstante, la calidad y cantidad que se puede conseguir de un extracto depende de la técnica de extracción, el tipo de disolvente y las condiciones de la materia prima usada en el proceso. En la actualidad, los métodos convencionales de extracción (basados principalmente en el uso de agua caliente y disolventes orgánicos) generan problemas como la degradación de compuestos, elevado gasto de disolventes, problemas ambientales y largos periodos de operación (Oliveira et al., 2016). Diversas investigaciones realizadas durante los últimos años han tratado de solucionar estos problemas, aplicando técnicas de extracción verde, como, por ejemplo, extracciones con fluidos supercríticos (EFS), extracciones asistidas por ultrasonidos (EAU), extracciones asistidas por microondas (EAM) y extracciones asistidas por enzimas (EAA) (Oliveira et al., 2016; Zlabur et al., 2015; Barrales, Alves & Martinez, 2015).

Dentro de las tendencias agroindustriales que buscan obtener compuestos bioactivos a partir de plantas, se distinguen estos métodos de extracción por ser amigables con el medio ambiente. Por tal motivo, y teniendo en cuenta la amplia variedad de técnicas existentes para la obtención de glucósidos a partir de *Stevia rebaudiana* Bertoni, se hace necesario utilizar métodos de extracción que permitan optimizar el proceso, minimizando el uso de disolventes orgánicos, ofreciendo una opción “verde” para mejorar la disponibilidad de los compuestos a extraer (Koubaa et al., 2015).

Algunos autores, señalan que este tipo de extracciones, pueden entenderse como un nuevo concepto para abordar los retos del siglo XXI en las diferentes industrias en las que se pueden aplicar. Dado que con la implementación de estas técnicas se busca proteger al medio ambiente, a los consumidores y al mismo tiempo,

aumentar la competitividad de las industrias de una forma ecológica, económica e innovadora (Chemat et al., 2017).

Esta revisión presenta un estudio del conocimiento actual sobre algunos procesos de extracción verdes aplicados para la obtención de glucósidos de estevia (principalmente esteviósido y Reb-A). Se abordan las técnicas de extracción más utilizadas, los mecanismos implicados en la tecnología, los parámetros influyentes dentro del proceso y los diferentes casos de investigación que se han publicado en el periodo de tiempo comprendido entre el año 2009 y el 2017.

MATERIALES Y MÉTODOS

La información se obtuvo a partir de un proceso de búsqueda en bases de datos de origen internacional como ScienceDirect, Springer Link y Wiley Online Library. En la búsqueda se utilizaron palabras clave como “stevia extraction”, “rebaudioside extraction”, “estevioside extraction”, “green extraction of stevia” y “steviol glycosides extraction”. Los artículos se seleccionaron teniendo en cuenta su fecha de publicación y en su contenido debía mencionarse que la técnica de extracción empleada era “verde” o “amigable con el medio ambiente”, salvo aquellas técnicas de extracción convencional que fueron utilizadas como medio de comparación.

PLANTEAMIENTO DE LA TEMÁTICA

Extracción asistida por microondas (EAM)

Las microondas son radiaciones no ionizantes que se utilizan en un intervalo de frecuencia entre 300 Mhz – 300 GHz (Koubaa et al., 2015; Barrera-Vásquez, 2015; Estel et al., 2017). Son de naturaleza electromagnética, lo que implica la generación de campos eléctricos y magnéticos perpendiculares entre sí, y perpendiculares a la dirección de la energía y la propagación de ondas. El fundamento de la técnica es producir un rápido calentamiento a través de dos fenómenos, la conducción iónica y la rotación dipolar, en un medio que tenga buenas propiedades dieléctricas (Barrera-Vásquez, 2015; Estel et al., 2017). En el primer fenómeno, el medio ofrece resistencia a la migración de electrones generada por el campo eléctrico, y en el segundo, los dipolos de las moléculas rotan de conformidad al cambio de dirección del campo eléctrico, produciendo fricción con las moléculas contiguas. Debido al calentamiento generado, se evapora la humedad de la célula vegetal produciendo una enorme presión sobre la pared celular, que conlleva a su ruptura. De igual forma, se favorece el arrastre de lixiviados por parte del disolvente desde la célula rota (Koubaa et al. 2015; Barrera-Vásquez, 2015).

Los rendimientos de extracción obtenidos con esta técnica son superiores en comparación con métodos de extracción convencional (Ver anexo Tabla 1), a pesar de ello, son sensibles al cambio en el tiempo del tratamiento, la polaridad del disolvente utilizado y la potencia de las microondas (Ameer et al. 2017; Zekovic et al. 2017). Un incremento en el tiempo favorece el contacto entre el disolvente y la matriz donde reposan los compuestos de interés, incrementando la tasa de difusión de los glucósidos hacia el disolvente. Por otro lado, el requerimiento de potencia a utilizar es directamente proporcional a dos factores, el tamaño de partícula y la cantidad de muestra utilizada (Yildiz-Ozturk et al., 2015).

Por otro lado, la articulación de microondas con técnicas como la hidro-destilación, ha resultado ser una alternativa que reduce el consumo energético del proceso, debido a una mayor velocidad de transferencia de calor promovida por EAM. Se ha reportado que la reducción es de unos 0,05kWh/kg, ya que la hidro-destilación consume 0,12 kWh/kg, y al estar asistida con microondas genera un consumo de 0,07 kWh/kg (Koubaa et al. 2015).

A partir de lo anterior, se puede establecer que la extracción asistida por microondas es una tecnología con potencial uso en la extracción de glucósidos de Stevia, que produce rendimientos significativos y únicamente requiere una buena definición de las condiciones experimentales óptimas, que permitan la mejor extracción con un gasto energético justo.

Extracción asistida por Ultrasonido (EAU)

EAU es una tecnología que se ha utilizado ampliamente en los últimos 20 años como un método eficiente de extracción en diversas industrias como la de alimentos, la química y la farmacéutica (Esclapez et al., 2011). El ultrasonido inducido en un medio líquido genera un fenómeno conocido como cavitación. Este fenómeno tiene lugar cuando se propagan ondas ultrasónicas de baja frecuencia (20 kHz a 100 kHz). Como consecuencia se generan en el medio ciclos de compresión y descompresión que forman micro-burbujas que terminan por colapsar produciendo ondas de choque de varios cientos de atmósferas y temperaturas aproximadas a los 5000 K. Los efectos mecánicos producidos por la implosión de estas burbujas en la interfaz sólido-líquido incluyen impactos micro-chorro y daños inducidos por las ondas de choque. Esto, a su vez conlleva a que la transferencia de masa de compuestos extraíbles se acelere sustancialmente (Esclapez et al. 2011; Zlabur et al. 2015).

Las investigaciones relacionadas a la EAU de glucósidos de estevia han aumentado en los últimos años. Un estudio de Liu & Tang (2010) relacionado con la optimización de la extracción de carbohidratos totales de estevia empleando el método de superficie de respuesta (MSR), indicó que el rendimiento de los extractos era significativamente afectado por la temperatura y la potencia. Se determinó que la EAU afectó de manera positiva el rendimiento en comparación con el método de extracción clásico, aumentándolo 1,4 veces. Además, la cantidad relativa de Reb-A incrementó en los extractos obtenidos mediante EAU, promoviendo una mejor calidad y un menor regusto amargo en los mismos.

Otros estudios relacionados, como el realizado por Zlabur et al. (2015), ha revelado la influencia del diámetro de la sonda de ultrasonido y el tiempo de sonicación en el proceso de extracción, indicando que existe una gran influencia en el rendimiento de los glucósidos de estevia dada por la variación de estos dos parámetros. El cambio en el diámetro de la sonda de extracción (7mm a 22 mm) conllevó a un cambio en la temperatura del proceso de 45,5°C a 81,2°C. Dicho estudio también comparó la EAU con la extracción con disolvente tradicional (agua y etanol al 70%), encontrando que la EAU presentaba rendimientos superiores de estevósido y Reb-A.

Por otra parte, se han realizado estudios para determinar los disolventes adecuados para optimizar el rendimiento. En el estudio de Gasmalla et al. (2014) tres tipos de disolventes fueron evaluados (agua, etanol e isopropanol), y se determinó que las mejores concentraciones eran etanol al 30% e isopropanol al 60%. El estudio señala que el incremento en la potencia de la sonicación de 400 a 480 W durante periodos de extracción de 12, 18 y 24 minutos, podría dañar la estructura del Reb-A extraído.

Teniendo en cuenta lo anterior, estudios realizados por Gasmalla, Yang & Hua (2015) un año después, en los que se evaluaron el tiempo y potencia de sonicación utilizando isopropanol al 60%; reportaron que, en promedio, el rendimiento de Reb-A aumentaba cuando se utilizan potencias de sonicación que iban de 300-360 W, pero disminuía cuando el nivel de potencia iba de 400-480 W. Esto sugiere considerar un riesgo de degradación de compuestos extraídos a dichas potencias. Además, este estudio también determinó que hay una disminución significativa del tamaño de partícula con el aumento de la potencia y del tiempo de sonicación.

En definitiva, la EAU se posiciona como una tecnología atractiva en la extracción de glucósidos de Stevia, presentando mejores rendimientos de extracción y extractos de mayor calidad, en tiempos y temperaturas menores a las establecidas en otros métodos (Ver anexo Tabla 1).

Extracción con fluidos supercríticos (EFS)

EFS es una técnica emergente que puede solucionar las limitaciones que presenta la extracción convencional. Se caracteriza por el uso de disolventes a presiones y temperaturas por encima de su punto

crítico, de modo que puede proporcionar diferentes capacidades de extracción dependiendo de la naturaleza fisicoquímica del extracto. Uno de los fluidos supercríticos más utilizados es el CO₂, dado que presenta excelentes propiedades extractivas en diferentes compuestos. Sin embargo, cuando se requiere extraer de manera eficaz compuestos de carácter polar y elevado peso molecular, es necesario utilizar co-disolventes como etanol, metanol y acetona, para modificar las propiedades fisicoquímicas del fluido en mención (Li et al., 2017; Santos et al., 2017; Flores & De Almeida, 2016).

La EFS que emplea CO₂ como medio de extracción es más rápida que Soxhlet y no aporta ningún disolvente residual en el extracto final, dado que el CO₂ a altas temperaturas y altas presiones, en relación con su punto crítico, se comporta como un gas. Los glucósidos de estevia se benefician de las propiedades fisicoquímicas del CO₂ supercrítico, al poseer mayor difusividad y menor viscosidad que otros disolventes líquidos. Sin embargo, el CO₂ puro carece de poder de solvatación para el esteviósido y Reb-A polar, por lo tanto, un co-disolvente polar debe ser adicionado (Erkucuk, Akgun & Yesil-Celiktas, 2009; Hinojosa-Gonzalez, 2017; Venturi et al., 2017).

En un estudio relacionado con la extracción de glucósidos de estevia mediante la EFS, se evaluaron variables como temperatura (40-80°C) y concentración de mezcla etanol-agua (70:30) que actuó como co-disolvente (0-20%); con un flujo de CO₂ de 15 g/min durante 60 min. Las condiciones óptimas de extracción se obtuvieron a 250 bar de presión, 80°C de temperatura y 20% de co-disolvente. Con un rendimiento de 41,10 mg/g para esteviósido y 18,8 mg/g para Reb-A. La composición total de glucósidos obtenida mediante Soxhlet (64,49 mg/g) fue cercana a la obtenida mediante la técnica EFS (59,90 mg/g) (Erkucuk et al., 2009).

De acuerdo con lo mencionado y evidenciado en la Tabla 1. La EFS representa una alternativa atractiva para la obtención de extractos de esteviósido y en especial de Reb-A, dado que con esta tecnología de extracción se obtienen rendimientos superiores a los conseguidos con la extracción convencional Soxhlet. Sin embargo, es imprescindible la realización de nuevos estudios relacionados con la extracción de los glucósidos de Stevia, mediante la técnica EFS.

Extracción asistida por enzimas (EAA)

En la actualidad, se emplean medios enzimáticos para romper los enlaces β -1,4 de la primera capa de la estructura correspondiente a la lámina central de la celulosa, catalizando su descomposición en glucosa y celobiosa; esto permite que los glucósidos de estevia almacenados en las vacuolas de la célula sean más fáciles de extraer. Se ha determinado que las extracciones con mayores rendimientos en la obtención de esteviósidos se presentan con las hemicelulasas, celulasas y pectinasas (Tabla 1) (Koubaa et al., 2015; Adari et al., 2016).

Sin embargo, mediante estas enzimas hidrolíticas, también se busca mejorar las propiedades edulcorantes de los extractos. Aunque el esteviósido y el Reb-A son atractivos por su alto poder edulcorante, este último ofrece una sensación de mayor dulzor, y sin características de amargura, convirtiéndolo en un compuesto de mayor aceptación para el consumidor final (Puri et al., 2012; Adari et al. 2016; Khattab et al. 2015).

La glicosilación *in vitro* del esteviósido para la producción de Reb-A, es una alternativa de bajo costo, donde la actividad específica de la enzima glicosiltransferasa, permite aumentar la proporción Reb-A/esteviósido; se utiliza la UDP-glucosa como donador activo de azúcar, permitiendo obtener rendimientos de hasta el 50 % de conversión a Reb-A, en un periodo de incubación de 24 h (Wang Y. et al. 2016).

Se han reportado estudios en los que se produce Reb-A a partir de esteviósidos, al emplear la celulasa (0,5-3% v/v) para hidrolizar las paredes celulares de las hojas de la planta, liberando material intracelular que contiene glucósidos de esteviol, α -amilasas y transglucosilasas endógenas. En presencia de un medio rico en almidón soluble (1-5% p/v), las α -amilasas degradan el polisacárido en estructuras de menor peso molecular como la glucosa. Dichas glucosas son transferidas al C-13 del esteviósido, cuya reacción es catalizada por las glicosiltransferasas, permitiendo sintetizar el Reb-A (Adari et al. 2016).

Cabe resaltar, que se deben garantizar las condiciones fisicoquímicas que exigen las enzimas hidrolíticas como la α -Amilasa procedente del *Aspergillus oryzae* (TAKA); esta requiere de una temperatura estándar de 70°C, un rango favorable de pH de 5.0-7.0, una concentración de enzima de 50 U/mL y una concentración

inicial de sustrato menor a 20g/100 mL (punto de nula difusión enzimática por elevada viscosidad) (Carbonell-Capella et al., 2015). A partir de los anteriores métodos de purificación y obtención del Reb-A, se han obtenido rendimientos entre el 4 y 66 % de conversión (Adari et al., 2016).

Por otra parte, se ha reportado que la celulosa en presencia de sales con metales de transición (0,1 M FeCl₃) tiene la capacidad de extraer el 72% de los glucósidos de esteviol presentes en la planta (Tabla 1), donde el 43,62% corresponde a los esteviósidos y el 28,96% al Reb-A (Rao et al., 2015).

El enfoque actual de los tratamientos enzimáticos para los glucósidos de estevia, se basan en la conversión de estos compuestos por medio de hidrólisis enzimática específica (β -galactosidasa) y/o transglicosilación, para mitigar el regusto amargo, sin afectar el poder edulcorante del mismo (Chen et al., 2016). Por ejemplo, la actividad de las glucoproteínas extracelulares como la fructosiltransferasa del *Aspergillus spp.* Tienen la capacidad de sintetizar fructoligosacáridos de estevia (FOSGs), transfiriendo moléculas de fructosa a los residuos de glucosa propias del Reb-A. Aunque dicha transferencia es especificada y catalizada por enzimas como la fructosiltransferasa de *Microbacterium saccharophilum*, se logra obtener un edulcorante intenso, con un sabor semejante a la sacarosa, sin restos amargos, y con funciones prebióticas, convirtiéndolo en un alimento funcional (Spohner & Czermak, 2016).

RECUPERACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Otras técnicas emergentes ambientalmente amigables

Existen otras técnicas aparte de las mencionadas que pretenden cumplir con algunos de los principios que fundamentan la extracción verde de productos naturales, estos son: selección de la mejor variedad de la planta, uso de solventes verdes o agro-solventes, reducción del consumo energético, reutilización de solventes o insumos, simplificación de procesos y eliminación de agentes contaminantes (Chemat, Vian & Cravotto, 2012).

Figuran dentro de dichas técnicas, la maceración dinámica, la extracción con solvente acelerado, la extracción dinámica sólido-líquida rápida, extracción con agua subcrítica, la turbo extracción y la extracción con agua caliente presurizada. Técnicas que a la luz del argumento de los investigadores que las han trabajado recientemente, tienen un enfoque ambientalmente amigable debido a la búsqueda de las mejores condiciones de extracción para evitar el consumo excesivo de energía y disolventes, la reducción de los tiempos de tratamiento elevando la temperatura y la presión del disolvente, y el uso de disolventes verdes como el agua o el etanol. Los rendimientos obtenidos en las extracciones de esteviósido y Reb-A utilizando las técnicas mencionadas con anterioridad, se muestran en la Tabla 2 (ver anexo).

DISCUSIÓN DE LOS HALLAZGOS

Extracción asistida por microondas

El uso de microondas para la extracción de glucósidos de estevia es una técnica que ofrece una serie de ventajas, desventajas y limitaciones, que deben ser tenidas en cuenta, al momento de ser empleada en algún tratamiento a escala de laboratorio, piloto e industrial. Esta técnica en comparación con técnicas de extracción convencional ofrece los siguientes beneficios: reducción en los tiempos de extracción y en el consumo de disolventes orgánicos, el incremento en los rendimientos de extracción y la obtención de un extracto de mayor calidad. Estos beneficios redundan en un impacto positivo en términos económicos, dado que el gasto energético es menor y además un disolvente de bajo costo como el agua, ha mostrado los mejores resultados. (Carbonell-Capella et al., 2017; Ameer et al., 2017; Periche et al., 2015).

Sin embargo, la técnica presenta algunas desventajas que están relacionadas con la potencia de operación de las microondas, ya que, a pesar de que una alta potencia (500–900 W) genera una tasa de extracción rápida,

disminuye el rendimiento de los compuestos extraídos a causa de la degradación producida en los mismos. Por el contrario, aunque el uso de una baja potencia (300 W) incrementa la recuperación de los compuestos de interés; disminuye las tasas de extracción, obstaculizando la extracción completa de los glucósidos de estevia (Kovacevic, et al., 2018).

Para finalizar debe establecerse que una de las mayores limitaciones de la técnica, está relacionada con su uso industrial, debido a los altos costos que implica la adquisición de un equipo de microondas de esta magnitud (Koubaa, et al., 2015).

Extracción asistida por ultrasonido

La aplicación de ultrasonido en un proceso de extracción conlleva a un incremento en su eficiencia y velocidad, reduciendo los tiempos y temperaturas de operación. Esta tecnología presenta diversas ventajas, entre las que se encuentran, una mejor transferencia de masa, diversidad de equipos, alta reproducibilidad, menor consumo de disolventes y un menor impacto ambiental (Zlabur et al. 2015). Entre ellas, el menor consumo de disolventes se fundamenta en el hecho, que la EAU puede aplicarse con pequeños volúmenes de disolventes (1–15 mL) a presión atmosférica, temperatura ambiente y durante un tiempo de extracción muy corto. Adicionalmente, se puede mencionar que la EAU es un sistema de extracción simple y económico en su mantenimiento, que puede operarse rápidamente con una gran variedad de disolventes, aún a escala industrial (Koubaa et al., 2015).

La técnica presenta desventajas asociadas con la potencia de operación del ultrasonido, dado que en el rango de los 300–360 W se reportan incrementos en el rendimiento de extracción de Reb-A, pero en potencias de 400–480 W, se genera una disminución del mismo (Gasmalla, Yang & Hua, 2015). El menor efecto del ultrasonido a alta potencia podría explicarse desde el efecto de vibración generado, que además de romper las paredes celulares puede generar un movimiento de partículas, mismo que produciría rutas de evacuación para el disolvente a través del lecho de extracción, reduciendo la eficiencia del proceso (Liu, Li & Tang, 2010).

Finalizando el tema, se puede establecer que la exposición de los productos al ultrasonido puede implicar una degradación de compuestos, por cuanto la definición de las mejores condiciones de operación, es imperativa. Adicionalmente, se ha reportado la presencia de sabores extraños en materias primas con un alto contenido lipídico, situación que puede perjudicar su aceptación sensorial; y aunque no es aplicable para la estevia, es importante tenerlo en cuenta para otro tipo de aplicaciones (Koubaa et al., 2015).

Extracción con fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos es una alternativa atractiva para obtener un extracto de estevia que no contenga constituyentes indeseados o que alteren su sabor, es decir, un extracto de mayor calidad (Erkucuk, Akgun & Yesil-Celiktas, 2009). A esta técnica también son aplicables las ventajas asociadas a su carácter “verde” (reducción de tiempo de procesamiento, menor consumo energético, etc.) y al incremento en los rendimientos de extracción.

Aunque hay algunas aplicaciones industriales para la EFS (extracción de nicotina, cafeína, y teína), el uso de EFS en la industria alimentaria sigue siendo limitado por sus altos costos de equipo e instalación (Koubaa et al., 2015). Sin embargo, autores como Erkucuk, Akgun & Yesil-Celiktas (2009) sostienen que, al realizar una comparación entre los costos asociados a la EFS y un método de extracción convencional, el costo de capital en la EFS es más alto por la cuestión de la inversión en equipos, pero es menor en lo que se refiere a la operación del mismo, ya que; en el sistema convencional el costo energético que acarrea la evaporación de agua, es muy alto. Por el contrario, Koubaa et al. (2015) establece que la EFS tiene un alto costo de procesamiento, relacionado principalmente con el alto consumo de CO₂, que en la mayoría de los casos se pierde al final de la extracción y no se recicla.

Extracción asistida con enzimas

La extracción asistida por enzimas minimiza el uso de disolventes orgánicos, y también es una alternativa “verde”, que puede mejorar la disponibilidad de material intracelular debido a la degradación de las paredes celulares de la planta (Koubaa et al., 2015).

Muchos de los métodos de extracción convencionales, tanto de Reb-A como de esteviósidos, emplean disolventes químicos como soluciones de cloroformo-metanol o propilenglicol, seguido de una decolorización, coagulación y cristalización, dando como resultado unos rendimientos bajos en el proceso. Como tecnología verde, la EAA permite aumentar los rendimientos de extracción de compuestos bioactivos, sin hacer uso de disolventes químicos u orgánicos.

De igual manera, hay que tener en cuenta que esta tecnología cuenta con limitaciones para su escalado a nivel industrial; los elevados costos de los complejos enzimáticos, las exigentes condiciones de operación (bajas temperaturas, disponibilidad de oxígeno, homogeneidad con el sustrato) y la inhabilidad para degradar completamente la pared celular del material vegetal, hacen que la EAA sea una alternativa con obstáculos a nivel técnico y comercial. Aun así, al solventar dichas limitaciones, la EAA es considerada como un método de extracción que no sólo incrementa los rendimientos de Reb-A y esteviósidos en el extracto, sino que también mejora considerablemente su calidad sensorial.

CONCLUSIONES

La EAM, EAU, EFS y EAA son técnicas de extracción alternativas a los métodos sólido-líquido convencionales, consideradas verdes, por cuanto generan un menor impacto ambiental, al requerir menores tiempos de tratamiento, reducir el consumo energético y el uso de disolventes orgánicos.

La EAM, EAU, EFS y EAA, generan mayores rendimientos de extracción de esteviósido y Reb-A en comparación con las técnicas de extracción convencional, sólido-líquido con agua caliente, Soxhlet y maceración fría.

EAU y EFS generaron los mayores rendimientos de extracción con valores de, 96,49 mg (esteviósido/g de extracto) y 36,92 mg (Reb-A/g de extracto), y 95,76 mg (esteviósido/g materia seca) y 62,95 mg (Reb-A/g materia seca); respectivamente, en comparación con EAM y EAA.

La maceración dinámica, la extracción con disolvente acelerado, la extracción dinámica sólido-líquido rápida, la extracción con agua subcrítica, la turbo extracción y la extracción con agua caliente presurizada; son alternativas “verdes” que se usan hace poco o en pocas ocasiones para la extracción de glucósidos de estevia. Adicionalmente tienen rendimientos superiores a los reportados por EAM, EAU, EFS y EAA, específicamente para el caso de la extracción de agua caliente presurizada donde se obtuvieron 1448,3 mg de esteviósido/100 g de extracto y 1442,1 mg Reb-A/100 g de extracto.

MATERIALES SUPLEMENTARIOS

Anexo (pdf)

LITERATURA CITADA

- Adari, B.R., Alavala, S., George, S.A., Meshram, H.M., Tiwari, A.K. & Sarma, A.V. (2016). Synthesis of rebaudioside-A by enzymatic transglycosylation of stevioside present in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Food Chemistry*, 200, 154-158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.033>
- Ameer, K., Bae, S.W., Jo, Y., Chung, N., Gao, Y. & Kwon, J.H. (2017). Optimization and modeling for heat reflux extraction of total yield, stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves. *Separation Science and Technology*, 52(7), 1193-1205. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1285313>

- Ameer, K., Bae, S.W., Jo, Y., Lee, H.G., Ameer, A. & Kwon, J.H. (2017). Optimization of microwave-assisted extraction of total extract, stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves, using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) modelling. *Food Chemistry*, 229, 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.121>
- Ameer, K., Chun, B.S. & Kwon, J.H. (2017). Optimization of supercritical fluid extraction of steviol glycosides and total phenolic content from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves using response surface methodology and artificial neural network modeling. *Industrial Crops and Products*, 109, 672-685. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.023>
- Barrales, F.M., Alves, C., & Martinez, J. (2015). Supercritical CO₂ extraction of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) seed oil assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104, 183-192. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.06.006>
- Barrera-Vázquez, M.F. (2015). Métodos alternativos para la extracción y purificación de productos naturales de interés para la industria farmacéutica [Tesis Doctoral, Ciencia de la Ingeniería]. Córdoba (Argentina): Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 203 p.
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Esteve, M.J. & Frígola, A. (2015). Effect of *Stevia rebaudiana* addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. *Food Chemistry*, 184, 122-130
- Carbonell-Capella, J.M., Zlabur, J.S., Brncic, S.R., Barba, F.J., Grimi, N., Koubaa, M., Brncic, M., & Vorobiev, E. (2017). Electrotechnologies, microwaves, and ultrasound combined with binary mixtures of ethanol and water to extract steviol glycosides and antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41 (5), 1 – 8.
- Chemat, F., Rombaut, N, Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chemat, F., Vian, M.A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615-8627.
- Chen, J.M., Ding, L., Sui, X.C., Xia, Y.M., Wan, H.D. & Lu, T. (2016). Production of a bioactive sweetener steviolbioside via specific hydrolyzing ester linkage of stevioside with a β -galactosidase. *Food Chemistry*, 196, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.035>
- Edwards, C.H., Rossi, M., Corpe, C.P., Butterworth, P.J. & Ellis, P.R. (2016). The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 158-166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.008>
- Erkucuk, A., Akgun, I.H. & Yesil-Celiktas, O. (2009). Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51(1), 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.07.002>
- Esclapez, M.D., García-Pérez, J.V., Mulet, A. & Cárcel, J.A. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, 3, 108-120. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9036-6>
- Estel, L., Poux, M., Benamara, N. & Polaert, I. (2017). Continuous flow-microwave reactor: Where are we? *Chemical Engineering and Processing*, 113, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2016.09.022>
- Flores, J.C., & De Almeida, M.A. (2016). Construction of a supercritical fluid extraction (SFE) equipment#: validation using annatto and fennel and extract analysis by thin layer chromatography coupled to image. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36(2), 210-247. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0027>
- Gallo, M., Vitulano, M., Andolfi, A., DellaGreca, M., Conte, E., Ciaravolo, M. & Naviglio, D. (2017). Rapid solid-liquid dynamic extraction (RSLDE): a new rapid and greener method for extracting two steviol glycosides (stevioside and rebaudioside A) from stevia leaves. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(2), 141-148. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0598-1>

- Gasmalla, M.A., Yang, R. & Hua, X. (2015). Extraction of rebaudioside-A by sonication from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf and decolorization of the extract by polymers. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5946-5953. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1717-3>
- Gasmalla, M.A., Yang, R., Musa, A., Hua, X., & Ye, F. (2014). Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia (Stevia rebaudiana bertoni)* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 726-731. <https://doi.org/10.1016/j.arabjch.2014.06.012>
- Hinojosa-Gonzalez, J.J., Tun-Navarrerete, A., Canul-Lopez, A., Ruiz-Mercado, C., Rocha-Uribe, J. A., y Betancur-Ancona, D. (2017). Extracción de glucósidos edulcorantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni por métodos de fluidos supercríticos. *JONNPR*, 2 (5), 202-209.
- Ijaz, M., Masood, A.P., Saqib, M., & Latif, M.M. (2015). *Stevia rebaudiana*: An alternative sugar crop in Pakistan – a review. *Journal of medicinal and spice plants*, 20(2), 88-96.
- Javad, S., Naz, S., Ilyas, S., & Javed, S. (2014). Optimization of the microwave assisted extraction and its comparison with different conventional extraction methods for isolation of stevioside from *Stevia rebaudiana*. *Asian Journal of Chemistry*, 26(23), 8043-8048. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.17031>
- Jentzer, J.B., Alignan, M., Vaca-García, C., Rigal, L., & Vilarem, G. (2015). Response surface methodology to optimize accelerated solvent extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chemistry*, 166, 561-567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.078>
- Khattab, S.N., Massoud, M.I., Jad, Y., Bekhit, A.A. & El-Faham, A. (2015). Production and physicochemical assessment of new stevia amino acid sweeteners from the natural stevioside. *Food Chemistry*, 173, 979-985. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.093>
- Koubaa, M., Roselló-Soto, E., Zlabur, J., Jambrak, A., Brncic, M., Grimi, N., Boussetta, N. & Barba, F.J. (2015). Current and new insights in the sustainable and green recovery of nutritionally valuable compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 6835-6846. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01994>
- Kovacevic, D.B., Barba, F.J., Granato, D., Galanakis, C.M., Herceg, Z., Dragovic-Uzelac, V., & Putnik, P. (2018). Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chemistry*, 254, 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.192>
- Kovacevic, D.B., Maras, M., Barba, F.J., Granato, D., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., Montesano, D., Lorenzo, J.M. & Putnik, P. (2018). Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: a review. *Food Chemistry*, 268, 513 – 521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.091>
- Le Donne, C., Mistura, L., Goscinny, S., Janvier, S., Cuypers, K., D'Addezio, L., Stte, S., Catasta, G., Ferrari, M., Piccinelli, R., Van Loco, J., & Turrini, A. (2017). Assessment of dietary intake of 10 intense sweeteners by the Italian population. *Food and Chemical Toxicology*, 102, 186-197. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.014>
- Li, H., Zhang, Y., Yao, M., Wang, Y., Yang, Y., & Gao, W. (2017). An improved modeling on convection heat transfer of supercritical fluids for several advanced energy systems. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 111, 771-781. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2017.04.059>
- Liu, J., Li, J., & Tang, J. (2010). Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food and Bioprocess Technology*, 88 (2-3), 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.12.005>
- Lobete, M.M., Baka, M., Noriega, E., Jookan, E., Monballiu, A., de Beurme, S., Meesschaert, B., & Van Impe, J.F. (2017). *Stevia*-based sweeteners as a promising alternative to table sugar: The effect on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* growth dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 38-52. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.008>
- Martins, P.M., Lanchote, A.D., Thorat, B.N. & Freitas A.P. (2017). Turbo-extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* using a fractional factorial design. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27, 510-518. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.007>

- Martins, P.M., Thorat, B.N., Lanchote, A.D., & Freitas A.P. (2016). Green extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bert.) with low solvent consumption: A desirability approach. *Resource-Efficient Technologies*, 2(4), 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2016.11.007>
- Mooradian, A.D., Smith, M. & Tokuda, M. (2017). The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clinical Nutrition ESPEN*, 18, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.01.004>
- Oliveira, D.A., Angonese, M., Gomes, C., & Ferreira, R.S. (2016). Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. *The Journal of Supercritical Fluids*, 111, 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.01.010>
- Periche, A., Castelló, M.L., Heredia, A., & Escriche, I. (2015). Influence of extraction methods on the yield of steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* extracts. *Plant Foods Hum Nutr*, 70(2), 119-127. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0475-8>
- Prakash, I., Ma, G., Bunders, C., Charan, R.D., Ramirez, C., Devkota, K.P., & Snyder, T.M. (2017). A novel diterpene glycoside with nine glucose units from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Biomolecules*, 7(1), 1-10. <https://doi.org/10.3390/biom7010010>
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C.J., & Tiwary, A.K. (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, 132(3), 1113-1120. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.063>
- Rai, C., Majumdar, G.C., & De, S. (2012). Optimization of Process Parameters for Water Extraction of Stevioside using Response Surface Methodology. *Separation Science and Technology*, 47 (7), 1014-1022
- Rao, A.B., George, S.A., Alavala, S., Meshram, H.M. & Shekar, K.C. (2015). Metal Salts Assisted Enzyme-Based Extraction of Stevioside from the Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(12), 734-743. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.612075>
- Santos, R.M., Oliveira, N.M., Oliveira, E.J., Azevedo, H.G., Jesus, A.A., Madeiros, A.M., Dariva, C. & Sousa M.B.D. (2017). Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. *The Journal of Supercritical Fluids*, 122, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.11.019>
- Spohner, S.C. & Czermak, P. (2016). Enzymatic production of prebiotic fructo-oligosteviol glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 131, 79-84. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.06.006>
- Sylvetsky, A.C. & Rother, K.I. (2016). Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiology & Behavior*, 164, 446-450. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.03.030>
- Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W., Hew, C.S. & Ong, E.S. (2009). Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Separation Science*, 32(4), 613-622. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800552>
- Venturi, F., Sanmartin, C., Taglieri, I., Andrich, G. & Zinnai, A. (2017). A Simplified Method to Estimate Sc-CO₂ Extraction of Bioactive Compounds from Different Matrices: Chili Pepper vs. Tomato By-Products. *Applied Sciences*, 7(4), 361-372. <https://doi.org/10.3390/app7040361>
- Wang, Y., Chen, L., Li, Y., Yan, M., Chen, K., Hao, N., & Xu, L. (2016). Efficient enzymatic production of rebaudioside A from stevioside. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 80(1), 67-73. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1072457>
- Wolwer-Rieck, U. (2012). The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 886-895. <https://doi.org/10.1021/jf2044907>
- Yildiz-Ozturk, E., Nalbantsoy, A., Tag, O. & Yesil-Celiktas, O. (2015). A comparative study on extraction processes of *Stevia rebaudiana* leaves with emphasis on antioxidant, cytotoxic and nitric oxid inhibition activities. *Industrial Crops and Products*, 77, 961-971. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.010>
- Yildiz-Ozturk, E., Tag, O. & Yesil-Celiktas, O. (2014). Subcritical water extraction of steviol glycosides form *Stevia rebaudiana* leaves and characterization of the raffinate phase. *Journal of Supercritical Fluids*, 95, 422-430. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.10.017>

- Zekovic, Z., Pintac, D., Majkic, T., Vidovic, S., Mimica-Dukic, N., Teslic, N., Versari, A., & Pavlic, B. (2017). Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery – Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 99, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.028>
- Zlabur, J.S., Voca, S., Dobricevic, N., Brncic, M., Dujmic, F., & Brncic, R. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *International Agrophysics*, 29(2), 231-237. <https://doi.org/10.1515/intag-2015-0017>

ENLACE ALTERNATIVO

<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/2336/2985> (html)

<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/2336/3028> (pdf)