

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PRODUTIVIDADE DE MASSA SECA E EDULCORANTES EM FOLHAS
DE ESTÉVIA RELACIONADOS À ÉPOCA DE COLHEITA**

TESE DE DOUTORADO

Carlise Pereira

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**PRODUTIVIDADE DE MASSA SECA E EDULCORANTES EM FOLHAS
DE ESTÉVIA RELACIONADOS À ÉPOCA DE COLHEITA**

Carlise Pereira

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Agronomia.**

Orientador: Prof. Dr. Lindolfo Storck

Santa Maria, RS, Brasil, 2014.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**PRODUTIVIDADE DE MASSA SECA E EDULCORANTES EM FOLHAS
DE ESTÉVIA RELACIONADOS À ÉPOCA DE COLHEITA**

elaborada por
Carlise Pereira

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Agronomia.

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Prof. Dr Lindolfo Storck (UFSM)
Presidente/Orientador**

Prof. Dr. Sidinei José Lopes (UFSM)

Prof. Dr. Dilson Antônio Bisognin (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Cátia Regina Storck (Centro Universitário Franciscano)

Prof. Dr. Paulo Henrique de Oliveira (UTFPR)

Santa Maria, 16 de Dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Matilde

Às minhas irmãs, Cacá e Miu.

AGRADECIMENTOS

À nova chance para viver.

Aos meus pais e irmãs, por todo apoio e amor incondicionais e aos docinhos Luísa e Miguel por me receberem com alegria em cada chegada.

Aos meus irmãos de coração, Alexandre e Leonardo, por toda descontração em cada encontro.

Ao meu orientador Professor Lindolfo Storck, pela oportunidade de orientação, profissionalismo e dedicação durante todo o período.

Aos Professores co-orientadores Sidinei Lopes e Thomas Martin, pela paciência e ensinamentos, mesmo à distância.

Ao meu querido Mauricio, por seu amor genuíno, companheirismo e simplicidade – even far away you were so close to me.

Aos Pesquisadores, Dr. Maurício Hunsche, Dr^a Christa Lankes e Dr^a Ursula Wölwer-Rieck pela orientação e amizade recebidas na Uni-Bonn.

Aos Professores Wilson e Nublea Manara pela contribuição neste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, por toda ajuda profissional recebida.

À equipe do Laboratório de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas, pelo apoio e dedicação oferecidos durante os experimentos.

A todos os amigos que estiveram presentes durante essa etapa e tiveram sua contribuição de carinho, amizade e apoio – sendo essenciais para minha motivação e bem-estar.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Centro de Ciências Rurais pelos conhecimentos adquiridos no decorrer de minha formação acadêmica e de Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos e concretização do Curso de Doutorado.

À Universidade de Bonn, por toda infraestrutura oferecida para a realização dos experimentos.

Muito obrigada.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUTIVIDADE DE MASSA SECA E EDULCORANTES EM FOLHAS DE ESTÉVIA RELACIONADOS À ÉPOCA DE COLHEITA

AUTOR: CARLISE PEREIRA

ORIENTADOR: LINDOLFO STORCK

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 16 de Dezembro de 2014.

Originária da América do Sul, *Stevia rebaudiana* é uma planta arbustiva perene que possui edulcorantes naturais (glicosídeos de esteviol) com alto poder adoçante em suas folhas, livre de calorias, podendo substituir a sacarose sem apresentar problemas na dieta de pessoas diabéticas. O cultivo de estévia é difundido em muitos países e os fatores climáticos podem influenciar significativamente o resultado de produtividade desta cultura. Os objetivos deste estudo foram avaliar massa seca e concentração de edulcorantes em folhas de estévia (*Stevia rebaudiana*) em diferentes períodos do ano para determinar a melhor época para a colheita e, verificar a influência dos fatores climáticos na quantidade dos edulcorantes. Os experimentos foram realizados nos anos agrícolas 2011/2012 e 2012/2013. No primeiro experimento 120 plantas foram divididas em seis grupos de 20 plantas cada. Doze cortes foram realizados, sendo a maior produtividade alcançada no mês de dezembro nos primeiros cortes dos grupos 3, 4 e 2 (292,4; 285,2 e 206,7 g m⁻², respectivamente). A concentração dos edulcorantes nas folhas de estévia variou entre os períodos dos cortes e entre os compostos analisados. As concentrações mais altas de esteviosídeo (12,16% e 11,36%) e rebaudiosídeo C (2,95% e 1,95%) foram nas colheitas realizadas em janeiro, enquanto que para o rebaudiosídeo A (7,01%; 6,16% e 6,15%), as maiores porcentagens foram alcançadas nos meses de dezembro, fevereiro e março. O fotoperíodo influenciou o número de dias para o corte realizado bem como a concentração de edulcorantes nas folhas. No segundo experimento foram testados sete genótipos selecionados a partir de plantas já estabelecidas. A maior produtividade de massa seca foi encontrada no corte realizado no mês de março e, as concentrações dos edulcorantes diminuíram no segundo corte em todos os genótipos. As porcentagens mais altas de esteviosídeo no primeiro corte foram nos genótipos C1, C4 e C8 (11,24; 11,14 e 10,32%, respectivamente) e, o genótipo C6 apresentou as maiores concentrações de rebaudiosídeo A e C (8,94 e 1,96% respectivamente).

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana*, fatores climáticos, glicosídeos de esteviol.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Federal University of Santa Maria

DRY WEIGHT AND SWEETENER YIELD IN STEVIA LEAVES RELATED TO HARVEST TIMES.

AUTHOR: CARLISE PEREIRA
ADVISER: LINDOLFO STORCK

Place and Date of the Defense: Santa Maria, December, 16th, 2014.

Stevia rebaudiana is a perennial plant, native to South America; it has natural sweeteners (steviol glycosides) on their leaves free of calories, very sweet and could be replaced by sucrose without presenting problems to diabetic people diet. Stevia cultivation is widespread all over the world under different weather conditions and the environmental factors could affect the stevia yield. The aims of this study were to evaluate dry weight and sweetener concentration in *Stevia rebaudiana* leaves during different periods in the year to determinate the best time for harvesting and to verify the influence of environmental conditions in the sweeteners yield. The first trial was carried out during 2012/2013 agricultural year. In total 120 plants were selected and divided in six groups – with 20 plants each. Twelve harvests were performed and the higher yield was reached in December at the first harvest for groups 3, 4 and 2 (292.4; 285.2 and 206.7 g m⁻², respectively). The sweetener concentrations have differentiated between the date of the harvest and the compounds analysed. The highest concentrations of stevioside (12.16% and 11.36%) and rebaudioside C (2.95% e 1.95%) were found during the harvest in January while the sweetener rebaudioside A, the highest concentrations were 7.01%; 6.16% and 6.15% in December, February and March, respectively. The heighest stevioside concentrations (per cent) (12.16% and 11.36%) and rebaudioside C (2.95% and 1.95%) were found to the harvest done in January, whereas to rebaudioside A, the heighest concentration were in December (7.01%); February (6.16%) and March (6.15%). Photoperiod has influenced the number of days for each harvest as well as the sweetener concentration on the leaves. The second trial seven genotypes were tested by plants already established on the field. The higher yield of dry mass was found during the harvest in March and the sweetener concentrations have decreased to the second harvest comparing to the first one. The highest sweetener concentrations of stevioside in the first harvest were with the genotypes C1, C4 and C8 (11.24; 11.14 and 10.32%, respectively) and genotype C6 has presented the highest rebaudioside A and C concentrations (8.94 and 1.96% respectively).

Key-words: *Stevia rebaudiana*, environmental conditions, steviol glycosides.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de dias (ND) entre a data do início e a data de corte das plantas de <i>Stevia rebaudiana</i> em diferentes grupos e colheitas, fotoperíodo médio (horas: minutos), precipitação (Chuva, mm), temperatura média (TM, °C) e radiação solar média (Rad, kJ m ⁻²). Santa Maria, Brasil, 2012-2013.....	35
Tabela 2. Média e semi-amplitude do intervalo de confiança (\pm IC, 1-p=0,95) referente à altura (cm) e número de ramos por planta, massa seca (MS) de folhas (MSFo, g planta ⁻¹) e de ramos (MSRa, g planta ⁻¹), percentagem de umidade nas folhas (UmFo) e nos ramos (UmRa), MSFo por ramo (Fo/Ra, g ramo ⁻¹) e produtividade de MS de folhas (Prod, g m ⁻²) de <i>Stevia rebaudiana</i> nos diferentes grupos e cortes. Santa Maria, Brasil, 2012-2013.....	39
Tabela 3. Concentração (%) de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C na massa seca de folhas de <i>S. rebaudiana</i> e respectivas estimativas da produtividade. Santa Maria, 2012-2013.....	42
Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson entre número de dias (ND), fotoperíodo médio, chuva, temperatura média (TM), radiação média (Rad), altura de plantas (Alt), número de ramos (NR), massa seca (MS) de folhas (MSFo) e ramos (MSRa), teor de umidade nas folhas (UmFo) e nos ramos (UmRa), MS por ramos (Fo/Ra), produtividade de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C em folhas de <i>Stevia rebaudiana</i> . Santa Maria, Brasil, 2012-2013.....	45
Tabela 5. Média e semi-amplitude do intervalo de confiança (\pm IC, 1-p=0,95) referentes à concentração (%) de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C na massa seca de folhas (g planta ⁻¹) de <i>S. rebaudiana</i> nos sete genótipos testados. Santa Maria, 2012-2013.....	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema simplificado da biosíntese dos terpenos via rotas metabólicas do methylerythritol fosfato (MEP) ocorrendo nos plastídeos e mevalonato (MVA) ocorrendo no citosol. IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranylgeranyl difosfato. (Adaptado de WOELWER-RIECK et al., 2014). 20
- Figura 2.** Muda de estévia aos 28 dias após a semeadura. Santa Maria, RS, 2011.... 27
- Figura 3.** Estaca de um dos genótipos de estévia selecionados. Santa Maria, RS, 2012. 30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 – Distribuição da espécie e descrição botânica	16
2.2. Propagação da espécie	17
2.3 Glicosídeos de esteviol	18
2.4 Extração dos edulcorantes em estévia	21
2.5 Fatores climáticos e a cultura da estévia	22
2.5.1 Fotoperíodo	23
2.5.2 Temperatura do ar e radiação solar.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Produção de mudas de estévia e plantio	26
3.2 Avaliação das plantas	28
3.3 Determinação dos dados climáticos	29
3.4 Experimento de genótipos	29
3.5. Extração dos edulcorantes.....	31
3.6 Correlação entre caracteres.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÕES	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, o estudo sobre adoçantes tem se tornado intenso – fato esse comprovado pelos inúmeros produtos dietéticos oferecidos no mercado. A busca por esses produtos não-calóricos está relacionada com o estilo de vida mais sedentário da maioria das pessoas e a ausência de atividade física.

As doenças cardiovasculares, a obesidade e o diabetes tipo 2, estão relacionadas à dieta a qual contém elevados níveis de açúcar nos alimentos (POLLAN, 2009). A obesidade e o *Diabetes mellitus*, cada vez mais comuns na população brasileira, exigem a restrição do uso da sacarose na alimentação, favorecendo a prescrição de produtos de baixa caloria (TORLONI et al., 2007). Todavia, a maioria desses edulcorantes (substitutos do açúcar) são produtos sintéticos (ciclamato, aspartame, sucralose e acesulfame-K) (TORLONI et al., 2007) utilizados em alimentos “diet” (gelatinas, bolos, biscoitos, balas, chicletes, sucos e refrigerantes) e são responsáveis por desencadear distúrbios neurais, alterações de humor, depressão, dores de cabeça e ainda estão relacionados com o comprometimento da memória (LINDSETH et al., 2014; GUO et al., 2014). Por esses motivos, a indústria alimentícia tem procurado desenvolver, ao longo dos últimos anos, agentes edulcorantes oriundos de fontes naturais que contenham as propriedades e características capazes de adoçar alimentos (GONZÁLEZ et al., 2014).

Desde a década de 70, um edulcorante natural despertou interesse por possuir um poder adoçante muito maior que a sacarose e com a possibilidade de substituir o açúcar (BARBET-MASSIN et al., 2013). Esse edulcorante é obtido através do extrato das folhas da *Stevia rebaudiana*, um arbusto nativo da América do Sul, utilizado pelos índios para adoçar suas bebidas. Esse extrato é um adoçante não-calórico que pode ser consumido diretamente tanto na forma de folhas secas ou ainda refinado (pó cristalino).

A procura por produtos naturalmente de baixa caloria possibilitou que a planta de estévia fosse difundida mundialmente, e atualmente é consumida e aprovada em muitos países, entre eles Japão, Brasil, Colômbia, China e Paraguai. Os edulcorantes presentes na estévia são classificados como glicosídeos diterpênicos, sendo o esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C os compostos

encontrados em maior concentração nas folhas (CEUNEN et al., 2011; ANGELINI et al., 2013; TAVARINI; ANGELINI, 2013). Esses compostos possuem propriedades químicas relevantes para a indústria alimentícia (UDDIN et al., 2006), entre elas, citam-se a alta estabilidade do pH quando submetido a 100°C e a não alteração de cor como as mais importantes (BRANDLE, et al., 1998).

Recentemente, no ano de 2011, o consumo da planta de estévia como edulcorante foi aprovado pela União Européia, gerando dessa forma um mercado com alto potencial de produção (BARBET-MASSIN et al., 2013). Os glicosídeos extraídos das folhas de estévia podem ser adicionados em cafés, chás, bolos, biscoitos e comidas processadas, além de serem também utilizados na produção de pasta de dentes e enxaguantes bucais (AHMED et al., 2007), uma vez que esses compostos também possuem ação antimicrobiana, adstringente e antioxidante. Além dessas propriedades, a estévia é requerida por se tratar de um produto natural (BRANDLE et al., 1998).

A maioria das pesquisas com *Stevia rebaudiana* está centrada nas propriedades toxicológicas, farmacológicas e nutricionais dos compostos purificados (CEUNEN; GEUNS, 2012) e é fundamental que se tenha conhecimento das possíveis alterações que esses compostos podem sofrer, uma vez que a produção dos mesmos pela planta está diretamente relacionada às condições climáticas da região, pois as características morfológicas e fisiológicas da planta são fortemente influenciadas por fatores climáticos, entre eles o comprimento do dia, temperatura e radiação solar (CEUNEN; GEUNS, 2012).

As mudanças climáticas podem influenciar o comportamento das plantas, fazendo com que as mesmas se adaptem às mais diversas condições de cultivo. Essas mudanças causam estresse fisiológico, responsável por provocar reações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas – conferindo às plantas inúmeras mudanças, entre elas de arquitetura de planta, área foliar e rotas metabólicas. Todas essas reações têm como objetivo a sobrevivência da espécie.

A estévia é uma planta versátil, pois vem sendo cultivada em vários países com diferentes condições meteorológicas com resultados positivos e crescentes de produtividade (OROZCO, 2008; TAVARINI; ANGELINI, 2013; SERFATY et al, 2013). Apesar do esforço de muitos pesquisadores em desenvolver estudos e apresentar resultados satisfatórios em relação à produtividade da cultura, a produção de biomassa e a concentração dos edulcorantes estão longe daquela idealizada pela

indústria. Informações sobre o cultivo da espécie são importantes para que pesquisas com melhoramento genético possam ser efetuadas futuramente, possibilitando o desenvolvimento de cultivares adaptadas a essas diferentes regiões, com alta produtividade e concentração de edulcorantes. Pesquisas envolvendo estudo sobre o comportamento e produtividade da estévia são inexistentes na região central do Estado do Rio Grande do Sul e, a ausência de informações pode ser um fator limitante quando se deseja introduzir uma nova cultura na região.

Frente ao potencial econômico da espécie e sua importância para a saúde humana, esse estudo foi desenvolvido com o propósito de gerar informações a respeito do comportamento da espécie frente às condições climáticas específicas do local de cultivo e, através dos resultados obtidos, direcionar novas pesquisas.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram avaliar massa seca e concentração de edulcorantes em folhas de estévia em diferentes períodos do ano para determinar a melhor época para a colheita para a Região Central do Estado do Rio Grande do Sul, baseado na produtividade de massa seca de folhas e concentração dos edulcorantes, e verificar a influência dos fatores climáticos na quantidade dos edulcorantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Distribuição da espécie e descrição botânica

Nas regiões de fronteira do Brasil com a Colômbia, Paraguai e Bolívia, os índios tupis-guaranis faziam utilização de uma erva-doce, então denominada “Kaá-Hê-ê”, que tinha a função de adoçar suas preparações (WOOD et al., 1955). Mais tarde, no século XVIII o botânico suíço Moisés Santiago Bertoni juntamente com o químico paraguaio Ovídio Rebaudi iniciaram cientificamente os estudos sobre a planta. Seguido desses primeiros estudos, cresceu o interesse pela planta e atualmente inúmeras pesquisas relatam o potencial produtivo da estévia e sua composição química, bem como os efeitos medicinais de seus componentes.

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni é originária do Paraguai, podendo ser encontrada na Argentina, sul dos Estados Unidos, México, América Central e Brasil (KINGHORN, 2002). De acordo com a classificação taxonômica de Cronquist (1988) a estévia pertence à divisão Magnoliophyta; classe Magnoliopsida; subclasse Asteridae; ordem Asterales; família Asteraceae; gênero e espécie *Stevia rebaudiana* (Bertoni), sendo uma das 154 espécies do gênero *Stevia*. Conforme descrito por Monteiro (1980) e Lima Filho et al. (2004), é de porte arbustivo, podendo alcançar até 90 cm de altura em seu habitat natural e até 100 cm quando cultivada nos trópicos - sendo seu crescimento determinado. Possui sistema radicular pivotante e filiforme. As folhas são simples, opostas, sésseis, oblongo-lanceoladas, pecioladas, raramente alternadas, serradas na porção média superior e inteiras na base estreitada (SHOCK, 1982). A superfície superior da folha é levemente pubescente (SERFATY et al., 2013).

As flores são hermafroditas, pequenas e esbranquiçadas. Corola tubular, pentalobulada, em capítulos pequenos terminais ou axilares, agrupados em panículas corimbosas (SHOCK, 1982). Os frutos são aquênios cilíndricos, fusiformes, com faces côncavas medindo 2,5 mm de comprimento com cinco vértices; possuem formato angular e apresentam superfície pilosa (LORENZI; MATOS, 2002). A espécie é autoincompatível (protandria) e de polinização entomófila (MONTEIRO, 1980; LANDÁZURI; TIGRERO, 2009).

2.2. Propagação da espécie

A propagação da estévia pode ser por via sexual (sementes) ou assexual (propagação vegetativa). A planta apresenta problemas de autoincompatibilidade, baixa viabilidade das sementes, alta porcentagem de frutos estéreis (MANARA et al., 1989) e conseqüentemente baixa porcentagem de germinação, 49% de germinação quando a polinização for cruzada (ÔZYIGIT et al., 2013). A propagação via sementes também apresenta alta variabilidade genética, dificultando a seleção de populações homogêneas e produtivas (CARVALHO; ZAIDAN, 1995). E, mesmo quando realizada a propagação por sementes, os produtores optam pela semeadura em bandejas com substrato e posteriormente o transplante – pois essa técnica auxilia a propagação assexuada elevando as chances de obtenção de brotações sadias (CARNEIRO, 1997). Sendo assim, a propagação vegetativa torna-se a alternativa de melhor desempenho para padronização das mudas a campo e garantia de preservação das características fenotípicas e genotípicas. Dentre as técnicas de propagação vegetativa utilizadas para a produção de novas mudas de estévia, a cultura de tecidos (micropropagação) e a propagação por estacas, são dois métodos igualmente eficazes quando se deseja preservar as características genéticas de determinado genótipo.

A multiplicação *in vitro* ou cultura de tecidos é uma técnica de propagação estudada para diferentes espécies vegetais (CARVALHO et al., 2006), incluindo a estévia (BONDAREV et al., 2001; PATRÃO et al., 2007; TADHANI et al., 2007; DESHMUKH; ADE, 2012). Essa técnica é uma alternativa para se produzir, em larga escala, plantas de estévia em um curto espaço de tempo e isentas de patógenos (EL-MOTALEB et al., 2013), além de ser um sistema confiável para produção de mudas geneticamente uniformes, preservando as características genéticas desejadas (DAS et al., 2011), principalmente o conteúdo de edulcorantes. Diferentes partes da planta podem ser utilizadas para a obtenção de novas mudas a partir da cultura de tecidos. Entre os explantes (partes da planta) comumente utilizados tem-se folhas, brotos axilares, parte apical do caule e brotos primordiais (BESPALHOK FILHO; HATTORI, 1997). Entretanto, a infraestrutura necessária para a produção de mudas de estévia por micropropagação apresenta custos elevados, aumentando desta forma o valor final das mudas – sendo este método, um fator limitante para a implantação da cultura da estévia.

A obtenção de mudas por estacas é o método comumente utilizado de propagação da estévia (SHOCK, 1982) e requer menor infraestrutura quando comparado à cultura de tecidos. Na propagação vegetativa por estacas em estévia tem-se a vantagem da ausência de hormônios que auxiliam no enraizamento, reduzindo assim o custo dessa operação. No entanto, as condições climáticas exercem uma significativa influência sobre o sucesso desse tipo de propagação, sendo a temperatura e a umidade fatores importantes e que devem ser levados em consideração quando se deseja o maior número de estacas enraizadas (YADAV et al., 2011), pois o enraizamento é um importante indicador que determinará o desenvolvimento dos brotos nas estacas.

Apesar das desvantagens da propagação sexual, muitas vezes torna-se a única alternativa para iniciar uma nova produção. Pois, a principal dificuldade encontrada é a obtenção de mudas sadias e de procedência idônea.

2.3 Glicosídeos de esteviol

Stevia é usada regularmente no preparo de alimentos e produtos farmacêuticos em países como China, Coréia e Japão. Novas técnicas de extração e refinamento dos edulcorantes presentes na estévia foram desenvolvidas por pesquisadores japoneses partir da década de 70, resultando em um aumento no seu consumo neste país. Cerca de 200 toneladas de folhas secas de estévia são consumidas anualmente pelo Japão (RAJASEKARAN et al., 2007). As principais áreas produtivas de estévia se encontram atualmente no norte da China e sul da Ásia (TAVARINI; ANGELINI, 2013).

Estima-se que na Colômbia, 30.000 consumidores, fazem uso de esteviosídeo mensalmente, totalizando 250 kg mês⁻¹ do produto (LOPES; PEÑA, 2004). Na Europa, embora não existindo uma larga escala de cultivo de estévia ou de extração dos glicosídeos, o mercado de produtos à base de estévia vem crescendo e se desenvolvendo principalmente após sua aprovação para consumo na União Européia em 11 de Novembro de 2011 (STONES, 2011; WOELWER-RIECK, 2012). Na França os edulcorantes à base de estévia são permitidos para comercialização desde 2009. Os glicosídeos de esteviol, no qual se incluem o esteviosídeo e rebaudiosídeo A são permitidos para consumo como aditivos

alimentares em muitos países (WOELWER-RIECK, 2012). Nos Estados Unidos, os glicosídeos de esteviol receberam o status GRAS (Generally Recognized As Safe – Reconhecidos como Seguros) em 2008 e 2009 (CARGILL, 2008). A crescente demanda mundial por adoçantes de baixa caloria oriundos de fontes naturais, tem estimulado cada vez mais a procura pelos glicosídeos de esteviol (SERFATY et al., 2013).

A ingestão diária aceitável (IDA, ou do inglês, ADI - Acceptable Daily Intake) dos glicosídeos de esteviol estabelecida pela Autoridade Européia de Segurança Alimentar (EFSA) é de 4,0 mg kg⁻¹ de peso (EFSA, 2010). Atualmente, 31 alimentos, incluindo cereais matinais possuem em sua formulação os glicosídeos e são comercializados (ZAHN et al., 2013).

Os glicosídeos de esteviol são diterpenos tetraciclídeos derivados do mesmo precursor do ácido giberélico (BRANDLE; TELMER, 2007) e sintetizados via MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate) (TOTTE et al., 2000). Sua síntese ocorre nos plastídeos e tem o gliceraldeído-3-fostato e piruvato como precursores (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN; BORONATO, 2002) (Figura 1). Esses glicosídeos são produtos do metabolismo secundário (TAIZ; ZEIGER, 2009) da planta de estévia e, como tais, desempenham função de proteção das plantas contra patógenos, atraem insetos polinizadores e dispersores de sementes (OROZCO et al., 2010) e também preparam as plantas para as possíveis variações ambientais. Nas folhas de *Stevia rebaudiana* podem ser encontrados mais de 30 diferentes compostos de glicosídeos de esteviol, sendo variáveis em sua composição (BRANDLE et al., 1998). Os principais glicosídeos extraídos das folhas de estévia são esteviosídeo e o rebaudiosídeo A.

Esses compostos diferenciam-se principalmente quanto ao seu poder adoçante. O esteviosídeo está presente em maior quantidade nas folhas de estévia (MIOTO; MACHADO, 2004) e possui poder adoçante maior do que a sacarose (300 vezes mais) (KUMAR et al., 2012). Apesar disso, apresenta um sabor residual amargo em sua composição, limitando sua utilização na indústria alimentícia. Estudos realizados em amostras de folhas de estévia com diferentes concentrações de esteviosídeo e rebaudiosídeo A mostraram que o esteviosídeo é menos solúvel e apresenta um amargor mais acentuado que o rebaudiosídeo A, sendo necessário a mistura entre os dois edulcorantes para que se diminua o sabor amargo e residual do esteviosídeo (GOTO; CLEMENTE, 1998).

Ambos os edulcorantes (esteviosídeo e rebaudiosídeo A) tem a sua estabilidade dependente das variações de pH presente nas amostras. Pesquisas desenvolvidas com esses edulcorantes adicionados em bebidas (refrigerantes e bebidas energéticas) mostraram que o esteviosídeo possui um comportamento menos estável em comparação com o rebaudiosídeo A, quando analisado na mesma bebida (limonada em presença de cafeína) (WOELWER-RIECK, 2010), ou seja, o esteviosídeo foi fortemente degradado até a molécula de esteviol após 72 horas em contato com a solução. Essas informações são pertinentes principalmente para a inserção desses produtos no mercado alimentício e também a sua manipulação na indústria.

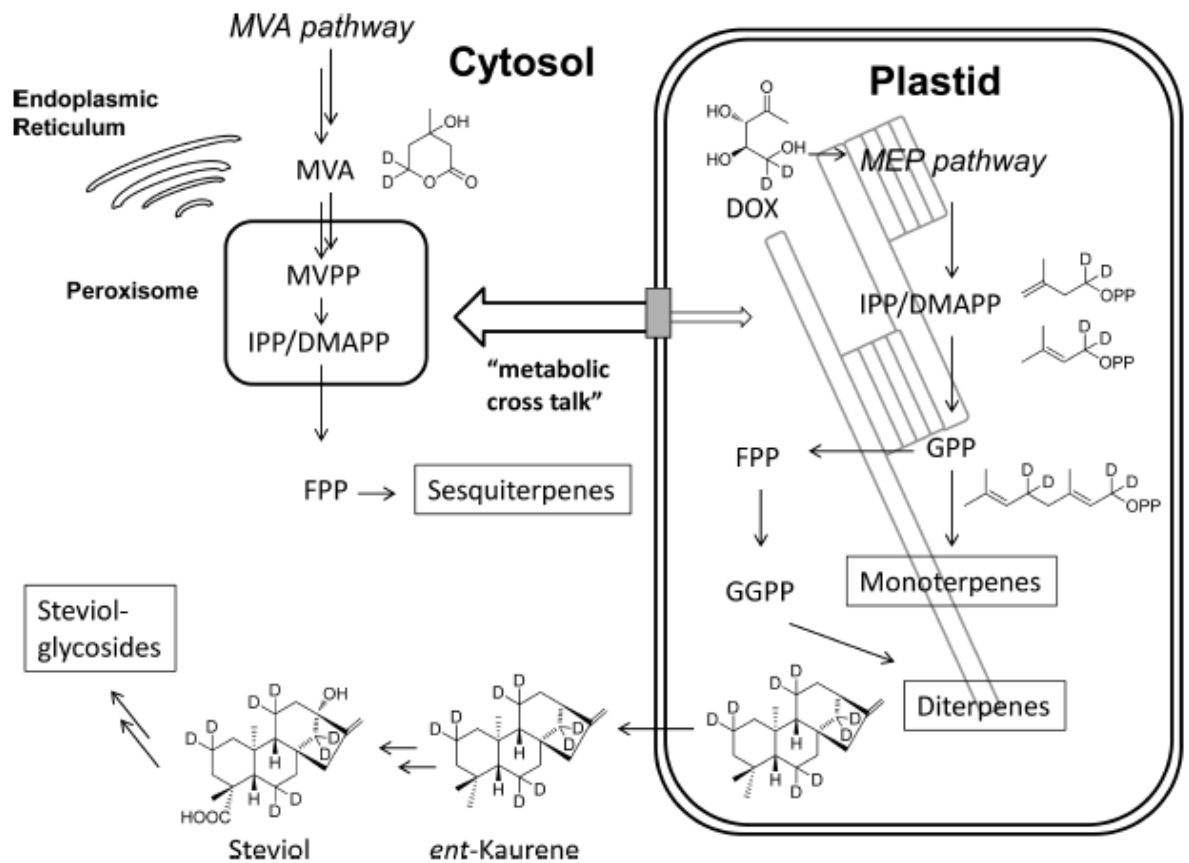


Figura 1. Esquema simplificado da biosíntese dos terpenos via rotas metabólicas do methylerythritol fosfato (MEP) ocorrendo nos plastídeos e mevalonato (MVA) ocorrendo no citosol. IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranylgeranyl difosfato. (Adaptado de WOELWER-RIECK et al., 2014).

A concentração desses compostos metabólicos nas folhas pode variar de acordo com o genótipo e condições de cultivo (BRANDLE; ROSA, 1992; WOELWER-RIECK, 2012), além de outros fatores, como ambientais e fisiológicos. Sendo assim, o período de cultivo da estévia é uma informação importante quando se preconiza altas produtividades – tanto de massa seca quanto de edulcorantes.

2.4 Extração dos edulcorantes em estévia

No Brasil, apenas uma empresa privada trabalha com a extração, isolamento, purificação e comercialização dos edulcorantes de estévia, estando localizada no Paraná, fazendo deste estado o único produtor de estévia do Brasil. A produção paranaense é responsável por produzir 100 toneladas de adoçante por ano, sendo 35% desse montante exportado (Uruguai, Peru, Chile, França, Canadá e Estados Unidos) e 6% representando o consumo interno brasileiro (GOTO, 2014). O restante dessa produção é destinado para indústrias terceirizadas as quais utilizam o extrato na mistura para outros produtos.

Atualmente diferentes processos de extração e purificação dos glicosídeos de esteviol das folhas de estévia estão protocolados, com distintos instrumentos para o isolamento e identificação desses compostos.

Os processos diferenciam-se pelo uso de solventes orgânicos ou água para a extração e no método de isolamento e purificação dos compostos. Um dos métodos utilizados envolve o uso de água para a extração (WOELWER-RIECK, 2010) e outros utilizam etanol (HEARN; SUBEDI, 2009). Técnicas como a cromatografia centrífuga de contra-corrente (high-speed counter-current chromatography - HSCCC) já é utilizada para o isolamento e purificação de produtos naturais (LIU et al., 2008) e também foi testada com sucesso na extração de esteviosídeo e rebaudiosídeos A e C (HUANG et al., 2010). A escolha do método a ser utilizado é determinada em função do tempo despendido para na técnica, do menor uso de solventes orgânicos (WOELWER-RIECK et al., 2010), do menor custo e de sua confiabilidade (KEDIK et al., 2003).

O processo de extração tradicional dos edulcorantes das folhas de estévia resume-se em alguns passos, entre eles a extração com água ou solventes,

filtragem, precipitação de impurezas, purificação, cristalização e secagem (PASQUEL et al., 2000; MIDMORE; RANK, 2002).

A primeira parte do processo consiste na diluição de folhas moídas de estévia em água aquecida (102°C) e após o resfriamento, a mistura é filtrada a fim de que as partículas em suspensão sejam retiradas. O próximo passo é a clarificação, no qual substâncias são adicionadas a esta mistura para que ocorra a precipitação de outras impurezas no fundo do tanque. Ao final desse processo, tem-se o edulcorante na forma líquida que necessita ser desidratado, evaporando todo o conteúdo de água para facilitar a cristalização. Para se obter o edulcorante em pó, é necessário que essa mistura passe por um secador – para retirar a umidade do produto e então realiza-se a moagem, resultando em um pó cristalino (BONDAREV, 2001; TORRES; GUEVARA, 2004).

As folhas são comercializadas direto para a indústria de extração e são classificadas quanto a sua pureza e concentração de edulcorantes (LIMA FILHO et al., 2004). Amostras de folhas secas com concentração do princípio ativo (edulcorantes) menor que 6% são descartadas e não possuem valor comercial. A partir dessa porcentagem, o preço pago ao produtor aumenta conforme a concentração encontrada. São consideradas puras, amostras que contenham apenas folhas verdes de estévia e botões florais.

O mercado externo, o qual o Brasil atende, compete com os mercados asiáticos de produção de edulcorantes, tendo algumas vantagens, como por exemplo o número de colheitas realizadas. Na China, maior produtor de estévia do mundo, somente uma colheita é realizada anualmente em função da disponibilidade de luminosidade requerida para a cultura.

2.5 Fatores climáticos e a cultura da estévia

A produtividade dos glicosídeos de esteviol é medida através da sua concentração na massa seca da planta e, essa varia em função das condições ambientais as quais a planta está exposta (SERFATY et al., 2013) e o estágio de desenvolvimento (PRINS et al., 2010). Fatores climáticos como radiação solar, temperatura e comprimento do dia, além do tipo de solo, fertilidade, densidade populacional e o fator genético também influenciam diretamente sua síntese

(OROZCO, 2008). Outros fatores como condições da colheita e armazenamento também podem influenciar na concentração final dos glicosídeos.

2.5.1 Fotoperíodo

O fenômeno do fotoperiodismo é utilizado pelas plantas para ajustar o florescimento – que se dá através do comprimento do dia. Diferentes períodos de luminosidade (ciclos diários de luz e escuro) provocam mudanças metabólicas no crescimento das plantas (acumulação de amido, respiração e fotossíntese) (MICHELET; LISZKAY, 2012), interferindo também no movimento das folhas e pétalas, abertura e fechamento de estômatos e processos metabólicos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Esse mecanismo cíclico é denominado de ritmo circadiano ou também chamado relógio circadiano e pode sofrer mudanças dependendo da época do ano (HIGUCHI et al., 2011), permitindo que as plantas adaptem a sua condição de crescimento às diferentes latitudes e longitudes, que correspondem aos locais as quais foram submetidas (IZAWA, 2007).

A resposta fotoperiódica classifica as plantas e as divide em três grupos: plantas de dias curtos, (SDPs - *short day plants*), plantas de dias longos (LDPs – *long day plants*) e plantas de dias neutros (DNPs – *day neutral plants*) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As plantas de dias curtos necessitam de uma luminosidade em horas menor que o comprimento crítico do dia e, o florescimento dessas plantas é estimulado primariamente pela duração do escuro; sendo necessário noites curtas para provocar o florescimento nas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009). *Stevia rebaudiana* comporta-se como planta de dia curto, sendo necessário um fotoperíodo crítico de 13h de luz (LIMA FILHO et al., 2004; CEUNEN et al., 2011).

A maior concentração dos glicosídeos de esteviol é alcançada quando a planta atinge os períodos de início da formação do botão floral e início do florescimento (CEUNEN; GEUNS, 2012). Eles são transportados para os órgãos generativos da planta (YADAV et al., 2011) e, por esta razão, o florescimento determina a colheita para essa cultura e interfere no conteúdo de glicosídeos nas folhas de estévia (BRANDLE; ROSA, 1992).

2.5.2 Temperatura do ar e radiação solar

Além do fotoperíodo, o desenvolvimento vegetal é influenciado também pela temperatura e a radiação solar, sendo de extrema importância para os processos fotossintéticos (KUNZ et al., 2007). A temperatura aparece como fator dominante no desenvolvimento de uma cultura (YANG et al, 1995), influenciando o florescimento e datas de colheita (KADIOGLU; SAYLAN, 2001).

Várias culturas tem a sua acumulação térmica determinada através da utilização de um parâmetro que a descreve. Esse parâmetro denominado soma térmica (ou graus-dia), pode ser definido como a energia acumulada favorável ao desenvolvimento e crescimento das plantas (BRUNINI, 1976), pois os processos metabólicos vitais dos organismos vivos são dependentes da temperatura (STRECK, 2004). Desta forma, as plantas apresentarão desenvolvimento conforme acumulam energia para esses processos (SOUZA et al., 2010).

As plantas ajustam seu aparato fotossintético de acordo com a luminosidade do ambiente e o crescimento das plantas é o resultado da eficiência de como essa luz é utilizada (GOMES et al., 2011). A radiação fotossinteticamente ativa varia de acordo com a região e o ano, refletindo na fenologia do cultivo e nas datas de plantio – influenciando a acumulação de biomassa pelas plantas (OROZCO et al., 2010). Segundo Monteith e Unsworth (1990), o espectro de radiação emitido pelo sol e que alcança a superfície terrestre pode ser dividido em três partes: radiação ultravioleta, que compreende os raios UV-A, UV-B e UV-C (na faixa de 300-400 nm); radiação fotossinteticamente ativa (PAR) ou visível (na faixa de 400-700 nm) e radiação infravermelha (na faixa de 700-1500 nm).

Estudos sobre o impacto do aumento da radiação ultravioleta em plantas têm sido realizados nos últimos 20 anos, em função de que a depleção da camada de ozônio faz com que a incidência dessa radiação aumente (PAUL; GWYNN-JONES, 2003; MÜLLER et al., 2013). A radiação ultravioleta pode provocar redução no crescimento das plantas, causando efeitos deletérios nas moléculas de proteínas e ácidos nucleicos e até mesmo produção de espécies reativas de oxigênio, afetando diretamente o crescimento das plantas (MAZZA et al., 2000). Apesar disso, a

radiação fotossinteticamente ativa (PAR 400 a 700 nm) (MONTEITH; UNSWORTH, 1990; MAZZA et al., 2000), componente natural da luz solar, torna-se essencial pois é responsável por um dos processos fisiológicos cruciais para as plantas, a fotossíntese, resultando na acumulação de biomassa e expansão foliar (MAZZA et al., 2000).

Os danos causados pela radiação ultravioleta levam as plantas a se adaptarem a esta alta exposição energética (HOFFMAN et al., 2015), exigindo que sejam feitos ajustes bioquímicos e fisiológicos (integridade e fluidez da membrana plasmática) (ZHENG et al., 2011). Além dessas alterações internas, as plantas são capazes de modificar sua estrutura foliar (área foliar e produção de biomassa) para que uma menor concentração de luz UV penetre nas camadas mais profundas dos tecidos (TERAMURA; MURALI, 1986). Entre outros processos de adaptação também se incluem a acumulação de metabólitos secundários (MÜLLER et al., 2013).

As plantas são capazes de alterar seu sistema fisiológico e bioquímico, bem como morfológico, a fim de que sobrevivam às mais adversas condições e estresses ambientais. Essas adaptações fazem parte do seu processo evolutivo e permitem que as espécies perpetuem em diferentes ecossistemas. É importante que se conheça a fisiologia da espécie em função do ambiente para que se possa implementar práticas de cultivo que otimizem a produção (OROZCO, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento com a cultura de estévia, foi conduzido na área experimental do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil (latitude 29° 41' S e longitude 53° 48' W, altitude: 95 m) nos anos agrícolas de 2011/2012 e 2012/2013. De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região de Santa Maria caracteriza-se por ser Cfa, subtropical úmido, com verões quentes e sem estação seca definida (KUNINCHNER; BURROL, 2001). O preparo do solo foi realizado com enxada rotativa, revolvendo-o antes da aplicação dos fertilizantes. A adubação da área seguiu a recomendação para a cultura (LIMA FILHO et al., 2004) com base em análise de solo realizada em Agosto de 2011. Foram aplicados 10 kg de N; 90 kg de P₂O₅ e 60 kg de cloreto de potássio por hectare. Sendo as fontes de N e P₂O₅ a uréia e superfosfato simples, respectivamente. O controle de plantas invasoras foi através da capina manual e, quando necessário, utilizado herbicida não seletivo, aplicado de forma direcionada sobre as plantas invasoras.

3.1 Produção de mudas de estévia e plantio

As sementes⁽¹⁾ que originaram as mudas de estévia foram fornecidas pelo Laboratório de Sementes do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, Paraná e, foram colocadas para germinar em outubro de 2011 em bandejas alveoladas (128 células) preenchidas com substrato comercial (à base de casca de pinus triturada, esterco de peru, organomineral, terra preta, cinza e calcário).

⁽¹⁾ Sementes de estévia cedidas pelo Professor M.Sc. José Walter Carneiro da Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Bloco J45, Campus Universitário, Maringá, Paraná.

As bandejas permaneceram em casa de vegetação do Laboratório de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria e foram irrigadas diariamente.

Aos 28 dias após a semeadura, as mudas (Figura 2) foram transplantadas para sacos plásticos pretos (8 x 10 x 13 cm), contendo substrato comercial idêntico ao descrito para a semeadura. As mudas permaneceram nos sacos plásticos até atingirem 20 cm de altura e/ou 10 pares de folhas e, após esse período foram transplantadas para o campo experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria em dezembro de 2011. As mudas foram monitoradas a fim de que aquelas eventualmente mortas pudessem ser replantadas.



Figura 2. Muda de estévia aos 28 dias após a semeadura. Santa Maria, RS, 2011.

Foram implantados dois canteiros de 10 m de comprimento e 5,0 m de largura, sendo o espaçamento utilizado de 50 cm entre linhas e 30 cm entre plantas. Ao atingirem o período do início do florescimento (março de 2012), as plantas foram podadas a 5,0 cm de altura do solo, com o objetivo de uniformizar as mudas. Após a poda foi realizada uma adubação nitrogenada a lanço, seguindo a recomendação para a cultura (LIMA FILHO et al., 2004), utilizando-se uréia como fonte de nitrogênio. Em decorrência da ausência de precipitação no período do plantio e desenvolvimento das mudas, a irrigação foi diária e realizada manualmente (com uso de mangueira). O controle de plantas invasoras foi através da capina manual e, quando necessário, utilizado herbicida não seletivo aplicado, de forma direcionada sobre as plantas invasoras.

3.2 Avaliação das plantas

No início do novo período de crescimento (agosto 2012) do segundo ano (2012), realizou-se a identificação das plantas e posteriormente uma segunda poda de uniformização. As plantas foram escolhidas por seleção para o florescimento. O primeiro grupo de plantas que atingiu a fase de início de formação do botão floral foi selecionado, identificado e podado. A partir da data desta poda em 23 de agosto (grupo 1), mais 20 plantas foram marcadas aos 21 (grupo 2), 35 (grupo 3), 46 (grupo 4), 70 (grupo 5) e 77 (grupo 6) dias após a realização da poda de uniformização do primeiro grupo, totalizando 120 plantas, resultando em diferentes épocas de colheita de acordo com a data na qual a poda de uniformização foi efetuada. O critério utilizado para o corte foi a fase de início do botão floral em 50% das plantas. Após o corte, da mesma forma feito a 5 cm de altura do solo, as plantas foram colocadas individualmente em sacos de papel com identificação do número da planta, grupo e data da colheita. Em laboratório foi realizada a contagem dos ramos, separado as folhas dos ramos e realizada a pesagem da massa verde (ramos e folhas). Posteriormente a massa verde foi colocada em estufa de ar forçado a 60°C até peso constante. Foi determinada a massa da matéria seca (folhas e ramos) para a estimativa da produtividade de cada componente (folha e ramo) por planta. Para as pesagens utilizou-se uma balança digital de precisão de 1,0 g. O material seco foi armazenado em sacos de papel para análise de quantificação dos edulcorantes de

estévia. Para cada colheita e repetição de colheita, os dados da altura, massa verde (folhas e ramos) e massa seca (folhas e ramos) da poda de colheita referentes as 20 plantas, foram usados para estimar as médias, por ponto e por intervalo ($p = 0,05$), usando o aplicativo Excel.

3.3 Determinação dos dados climáticos

Os dados de temperatura, radiação solar e precipitação foram obtidos na Estação Meteorológica Automática, a 100 m do local do experimento. A temperatura média do ar e da radiação foram estimadas pela média dos valores obtidos nas médias das 24 horas do dia. Na estimativa da média da radiação foram usados somente os valores positivos. O comprimento do dia de cada período de colheita foi estimado pela média de horas de luz de todos os dias que compunham cada período, utilizando como ferramenta o website (<http://www.solartopo.com>).

3.4 Experimento de genótipos

Em março de 2012, uma semana antes da poda de uniformização das plantas já estabelecidas a campo, foram escolhidas sete plantas a fim de que pudessem representar diferentes genótipos de estévia e foram identificadas como C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7. Essas plantas foram selecionadas de acordo com a uniformidade no seu desenvolvimento e quantidade visual de massa verde de folhas representando alta produtividade e ainda, que não mostrassem sinais do início do florescimento. O genótipo denominado C1 era proveniente de uma planta de estévia introduzida no campus da UFSM pelos professores Wilson e Nublea Manara em 1985. Ramos de cada uma dessas plantas foram coletados e selecionados, confeccionando-se estacas de 5 cm de comprimento contendo um par de folhas (Figura 3). Utilizou-se a parte mediana superior dos ramos jovens para a propagação vegetativa e as estacas foram colocadas para enraizar em bandejas alveoladas (128 células) contendo substrato comercial (idem item 3.1) e permaneceram em casa de vegetação com irrigação manual diariamente. Não foi necessário a utilização de

qualquer hormônio para enraizamento. As mudas foram transplantadas para sacos plásticos pretos (8 x 10 x 13 cm), contendo substrato comercial idêntico ao descrito para a semeadura (item 3.1) e permaneceram em casa de vegetação até atingirem 20 cm de altura. Ao atingirem a altura desejada, as mudas foram transplantadas para o campo experimental, localizado ao lado do primeiro experimento implantado com as mudas oriundas de sementes. No total, foram implantados seis blocos com seis linhas de plantio cada, com espaçamento de 50 cm entre linhas e 20 cm entre plantas. Cada bloco media 5 m de comprimento por 1,2 m de largura, espaçados 0,60 m entre eles. O transplante foi realizado em setembro de 2012. As plantas foram colhidas por linha e por genótipo e colocadas em sacos de papel identificados, de maneira que a amostra de massa verde e seca era representada pelas seis plantas presentes na linha. Esse procedimento foi efetuado para cada repetição dos genótipos. As amostras colhidas foram pesadas e levadas para secar em estufa de ar forçado a 60°C até peso constante. Após a secagem, as amostras foram armazenadas até o momento da análise dos edulcorantes.



Figura 3. Estaca de um dos genótipos de estévia selecionados. Santa Maria, RS, 2012.

3.5. Extração dos edulcorantes

O material seco armazenado (massa seca de folhas) foi utilizado para as análises de extração e quantificação de edulcorantes de estévia. As análises das amostras de massa seca das folhas foram realizadas no Laboratório do Departamento de Nutrição e Ciência dos Alimentos (Institut für Ernährungs und Lebensmittelwissenschaften) da Universidade de Bonn, Alemanha em um convênio de bolsa PDSE (CAPES). As amostras foram moídas no Laboratório de Nutrição e Ciência dos Alimentos (moedor de vibração MM 2000) a fim de que essas apresentassem partículas com tamanho de 0,12 mm. O processo de extração bem como o método de avaliação foi realizado conforme descrito por Wölwer-Rieck et al. (2010). Dez mililitros de água deionizada foram adicionados em 250 mg de amostra e posteriormente levados para aquecimento a 102 °C por 30 minutos. Após este período as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado e armazenado em balão volumétrico com capacidade para 25 mL. Esse processo foi repetido duas vezes com 10 mL de água e uma vez com 5 mL de água, totalizando uma amostra com 25 mL de extrato de estévia. O procedimento de extração em fase sólida (SPE) foi realizado utilizando cartridges, onde 1 mL de metanol foi adicionado para afetar a lavagem dos mesmos e após, 5 mL de acetonitrila/água (2:8) foram adicionados, sendo descartada essa solução após a passagem completa de acetonitrila pelos cartridges. Posteriormente foram injetados 0,3 mL da amostra e imediatamente após a adição da amostra, injetou-se 1,0 mL de acetonitrila/água (8:2). O eluente coletado foi colocado em frascos com capacidade de 20 µL e levados para leitura em HPLC. O resultado da concentração dos edulcorantes é dado em porcentagem de edulcorante em 100 g de amostra, pela fórmula:

$$\text{Stevioside} \left[\frac{g}{100g} \right] = (X[\mu g \text{ mL}] * F * 25 \text{ mL}) / (E[\text{mg}] * 10)$$

Onde:

F=3,33 (se 0,3 mL do extrato e 1 mL da fase móvel é usado para eluir as análises do sistema de SPE (extração em fase sólida))

X=teor de esteviosídeo calculado da curva de calibração (µg/mL)

E=peso da amostra (mg)

3.6 Correlação entre caracteres

Para cada repetição de colheita, os dados da altura, da massa verde (folhas e ramos), da massa seca (folhas e ramos), concentração dos edulcorantes e os valores médios da temperatura do ar e da radiação solar durante o período das respectivas colheitas foram usados para estimar a correlação linear de Pearson entre os mesmos. Para tais análises foi utilizado o recurso do Microsoft Office Excel 2007.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O início da germinação ocorreu aos 10 dias após a semeadura, sendo que as sementes (3.000 sementes g^{-1}) apresentaram 49% de germinação. Constatou-se 67% de sobrevivência nas plantas transplantadas para o campo, sendo necessária reposição, a qual foi realizada aos 18 dias após o transplante.

Durante o período de avaliação das plantas a campo, iniciado em 23 de agosto de 2012 e finalizado em 06 de abril de 2013, foram realizados um total de 12 colheitas nos seis grupos de 20 plantas estabelecidas. Na Tabela 1 encontram-se os dados meteorológicos obtidos durante todo o período experimental. O número de dias entre a poda e a colheita variou dentro de cada grupo e, essa variação relacionou-se com a época do ano em que as plantas se desenvolveram e as condições ambientais para tal. A região de origem da espécie situa-se na latitude 22° S e diferentes latitudes influenciam o número de dias do ciclo da cultura (LIMA FILHO et al., 2004). O cultivo dessa espécie está desenvolvido em diferentes locais no mundo, onde as condições ambientais são distintas e interferem nos resultados obtidos. Cultivos na região sudoeste do Paraguai relatam que o ciclo de desenvolvimento da cultura pode chegar até 70 dias após o transplante (CABALLERO et al., 2002) ou até 80 dias, conforme relatado por Fronza & Folegatti (2003) em experimentos realizados na região centro-oeste da Itália. Analisando o número de dias de cada um dos ciclos deste estudo, conclui-se que estão mais próximos daquele estabelecido para a região de origem, sendo que o maior ciclo apresentou 89 dias. Acredita-se que o fotoperíodo influenciou o número de dias que as plantas levaram para atingir o ponto de colheita. A estévia é uma planta sensível ao fotoperíodo e requer entre 12 e 13 horas de luz para a máxima acumulação de esteviosídeo nas folhas (Mandan et al, 2010), sendo classificada obrigatoriamente como uma planta de dias curtos (CEUNEN; GEUNS, 2013), conseqüentemente seu florescimento se dá preferencialmente sob condições de dias curtos. Embora sendo uma planta responsiva ao fotoperíodo, a temperatura e a radiação solar também são igualmente importantes para o estabelecimento e desenvolvimento das mudas no campo. Conforme relatado por Serfaty et al. (2013), plantas de estévia transplantadas para campo aberto durante a primavera apresentam maior

quantidade de biomassa quando comparado com as plantas que se desenvolvem durante o outono.

O fotoperíodo na região de estudo apresentou a quantidade de horas de luz necessárias para o florescimento da espécie (Tabela 1). Dias com longos períodos de luminosidade resultam em aumento de massa verde (SERFATY et al., 2013), mas também podem ocasionar retardo no florescimento e crescimento. No caso da estévia o comprimento do dia influencia o desenvolvimento vegetativo e o florescimento (BRANDLE; ROSA, 1992), causando alterações na acumulação de glicosídeos (CEUNEN et al., 2011). A redução do número de dias de um ciclo para o outro pode ser interessante quando se pensa em número de colheitas por ano, aliado à quantidade de biomassa produzida. Para isso, o planejamento da época de transplante para o campo o qual oferece à cultura condições favoráveis, torna-se essencial na resposta à produtividade.

A radiação solar aumentou a partir do final do mês de setembro, tendo seu valor máximo no período entre os meses de novembro e janeiro, declinando até o final do período do experimento. Para os dados de temperatura média do ar, o comportamento foi semelhante, porém esse parâmetro teve seu maior valor entre dezembro e fevereiro – correspondendo ao verão na região. A precipitação durante todo o período experimental foi satisfatória, não sendo um fator limitante para a cultura. A disponibilidade de água no solo é importante para o desenvolvimento da cultura, influenciando o crescimento radicular e a absorção e transporte de nutrientes na planta (FRONZA, 2002). Os fatores climáticos temperatura do ar, radiação solar, umidade e ventos atuam sobre as plantas durante todo o ciclo, influenciando em diversos processos (taxa fotossintética, evapotranspiração, disponibilidade de água, crescimento e desenvolvimento das plantas) e são requeridos pelas plantas dependendo do seu estágio de desenvolvimento (FRONZA, 2002; SERFATY et al., 2013).

Tabela 1. Número de dias (ND) entre a data do início e a data de corte das plantas de *Stevia rebaudiana* em diferentes grupos e colheitas, fotoperíodo médio (horas: minutos), precipitação (Chuva, mm), temperatura média (TM, °C) e radiação solar média (Rad, kJ m⁻²). Santa Maria, Brasil, 2012-2013.

Grupo	Colheita	Início	Corte	ND	Foto	Chuva	TM	Rad
1	Primeira	23/08/2012	23/10/2012	61	12:05	474,8	18,30	1021,6
1	Segunda	23/10/2012	16/01/2013	85	13:39	559,2	23,48	1670,4
1	Terceira	16/01/2013	6/04/2013	80	12:45	405,4	22,28	1552,0
2	Primeira	13/09/2012	3/12/2012	81	13:01	367,86	20,77	1426,8
2	Segunda	3/12/2012	26/02/2013	85	13:48	547,4	24,04	1677,0
3	Primeira	27/09/2012	17/12/2012	81	13:22	521,3	22,16	1504,2
3	Segunda	17/12/2012	27/2/2013	72	13:39	407,00	23,77	1689,6
4	Primeira	8/10/2012	19/12/2012	72	13:32	420,6	22,67	1584,5
4	Segunda	19/12/2012	7/03/2013	78	13:33	459,00	23,42	1661,3
5	Primeira	1/11/2012	17/01/2013	77	13:46	541,4	23,82	1727,8
5	Segunda	17/01/2013	6/04/2013	79	12:44	405,4	22,25	1545,7
6	Primeira	8/11/2012	5/02/2013	89	13:49	504,4	23,91	1711,6

Os primeiros cortes dos grupos 3, 4 e 2 – que tiveram suas colheitas realizadas durante o mês de dezembro, alcançaram as maiores produtividades (Tabela 2). Porém, esse resultado não se repetiu para os cortes seguintes dos mesmos grupos. Analizando os cortes de todos os grupos denominados, percebeu-se que o segundo corte resultou em menor produtividade quando comparado com o primeiro – dentro do mesmo grupo. A observação desses resultados indicaria que colheitas sucessivas influenciam negativamente a produtividade dos ciclos posteriores.

A sequência de cortes realizados num mesmo grupo de plantas interferiria na quantidade de massa seca produzida, fazendo com que a segunda colheita fosse menos produtiva que a primeira. A baixa produtividade (massa seca) pode estar diretamente ligada à data do primeiro corte, pois este definirá o período de recuperação e crescimento das plantas para o próximo corte. Essa hipótese foi confirmada por Serfaty et al. (2013), os quais concluíram que plantas de estévia submetidas a diferentes épocas de corte, conseqüentemente diferentes períodos de crescimento durante o ano, apresentaram baixa produção de biomassa na segunda colheita. Segundo esses autores, as condições ambientais do local de cultivo interferiram na velocidade de recuperação das plantas, ou seja, no número de dias para o início da brotação, desenvolvimento vegetativo e floração. De acordo com Pinto et al. (2007), a temperatura do ar, a intensidade da radiação solar e o fotoperíodo são os principais fatores climáticos que podem determinar a época ideal de corte que resultará em maiores rendimentos de massa verde de planta.

As produtividades dos grupos relatados anteriormente não foram alcançadas no mesmo período em que a radiação solar e a temperatura do ar foram mais altas. Conforme estudo realizado por González et al. (2005), a eficiência fotossintética da folha é maior em níveis mais baixos de radiação solar, isso porque quando expostas diretamente ao sol, as folhas saturam-se com o excesso de radiação. Jarma et al. (2005) comprovaram que o genótipo de estévia “Morita 1”, testado sob diferentes níveis de radiação, apresentou redução na acumulação de biomassa quando submetido aos maiores níveis de radiação testados. A radiação solar força a planta a estabelecer um novo posicionamento foliar em função do ângulo de radiação interceptada ao longo do dia e da qualidade dessa radiação e, também está diretamente ligada à quantidade de folhas requeridas para interceptar essa radiação (GONZÁLEZ, et al., 2005), enquanto que a temperatura pode determinar a

velocidade das reações bioquímicas e a eficiência fotossintética. A radiação solar é mais acentuada no final da manhã (entre 11 e 12h) e os valores vão decrescendo ao longo do dia (JARMA et al., 2005). Evidentemente, esse comportamento da radiação solar varia em função do local e do clima, estando mais ou menos disponível para as plantas.

Em relação à temperatura, quando altas, podem aumentar a taxa respiratória, fazendo com que a eficiência fotossintética diminua (JARMA et al., 2005). O intervalo ideal de temperatura que proporciona um melhor desenvolvimento para as plantas de estévia está entre 15° e 30°C (SUMIDA, 1980 citado por OROZCO et al., 2012). Lavini et al. (2008) comprovaram que altas temperaturas (acima de 36°C) e precipitação de até 200 mm prejudicam a produtividade, afetando diretamente a quantidade de biomassa acumulada por planta, passando de 4,6 t ha⁻¹ na primeira colheita para 3,3 t ha⁻¹ na terceira colheita.

A produtividade da cultura da estévia pode variar em função do local e das condições de cultivo. Produtividades de 94,9 g m⁻² (949 kg ha⁻¹) de massa seca foram alcançadas em cultivos localizados em Israel durante a primavera/verão na região (SERFATY et al., 2013) e ao redor 4,0 t ha⁻¹ em cultivos na China (YANG et al., 2013). Na Colômbia, esse rendimento pode chegar até 5,5 t ha⁻¹ mas a produtividade tende a diminuir a partir da terceira colheita (MORENO ANDRADE, 2012). No Brasil, a produtividade desse cultivo é estimada para ser entre 3,5 a 4,5 t ha⁻¹ (LIMA FILHO et al., 2004). Os resultados do presente estudo mostraram que a produtividade variou entre os grupos dependendo da época de corte, atingindo valores entre 0,61 a 2,9 t ha⁻¹. A diversidade de produtividade nos cortes entre os grupos também pode estar ligada à forma de propagação das plantas para este estudo. A variabilidade genética presente nas sementes utilizadas, pode ter sido responsável por estes valores e permite que hajam adaptações às diversas situações, normalmente consideradas estressantes para as plantas, pois a sobrevivência da espécie dependerá dessa adaptação. De acordo com Skiryicz & Inzé (2010), a resposta do crescimento das plantas ao estresse está inicialmente relacionada a uma resposta inibitória aguda, seguida de uma recuperação e posteriormente a adaptação à nova condição imposta. Segundo esses autores, essa resposta depende da variabilidade genética da espécie estudada e pode ser traduzida em dias ou horas, preparando as plantas para condições adversas.

O crescimento e desenvolvimento de uma determinada espécie estão relacionados à sua habilidade de adaptação às divergências climáticas e podem refletir na capacidade fotossintética (ALMEIDA et al., 2004), pois a eficiência com que as folhas converterão a energia luminosa em energia química pela fotossíntese, influencia a produção final de massa seca (ASSIS; MENDEZ, 1989) - principal parâmetro de rendimento para a cultura da estévia.

A disponibilidade de radiação solar, a temperatura favorável, juntamente com a precipitação adequada formam uma combinação satisfatória para a produção de estévia. Em função da posição geográfica, a região possui estações bem definidas, enfrentando invernos com temperaturas baixas e verões muito quentes. Isso faz com que o desenvolvimento das plantas inicie preferencialmente no mês de outubro, uma vez que, e também observado nesse trabalho, o mês de setembro apresenta baixas temperaturas, desfavoráveis ao desenvolvimento das novas plantas. O tamanho de cada muda transplantada define bom desenvolvimento das mudas a campo. A quantidade de folhas expandidas e a altura são imprescindíveis quando se objetiva uma alta taxa de sobrevivência. Conforme resultados gerados por esse estudo (de produtividade de massa seca e concentração dos edulcorantes), ficaram definidos os períodos para o crescimento e desenvolvimento de plantas de estévia, comprovando que há um período viável para essa cultura na região. Esse período deve proporcionar às plantas melhores condições para sua estabilidade e conseqüentemente melhor produtividade. Considerando que as quantidades mais altas de massa seca foram encontradas para o mês de dezembro e, que o número de dias para esses cortes foi entre 72 e 81 dias, o transplante para o campo deve ser realizado, preferencialmente, na segunda quinzena de setembro, compreendendo início da primavera, onde a temperatura, radiação solar e fotoperíodo são crescentes.

Tabela 2. Média e semi-amplitude do intervalo de confiança (\pm IC, 1-p=0,95) referente à altura (cm) e número de ramos por planta, massa seca (MS) de folhas (MSFo, g planta⁻¹) e de ramos (MSRa, g planta⁻¹), percentagem de umidade nas folhas (UmFo) e nos ramos (UmRa), MSFo por ramo (Fo/Ra, g ramo⁻¹) e produtividade de MS de folhas (Prod, g m⁻²) de *Stevia rebaudiana* nos diferentes grupos e cortes. Santa Maria, Brasil, 2012-2013.

Grupo	Corte	Altura		Ramos		MSFo		MSRa		UmFo		UmRa		Fo/Ra	Prod	
		Média	(\pm IC)	Média	(\pm IC)	Média	(\pm IC)	Média	(\pm IC)	Média	(\pm IC)	Média	(\pm IC)		Média	(\pm IC)
1	23/10/2012	28,1	2,5	33	10	9,2	2,4	5,3	1,4	75,9	1,9	79,2	1,2	0,30	61,1	15,9
1	16/01/2013	52,3	5,7	57	15	24,5	7,3	42,2	12,6	65,0	2,2	64,7	1,4	0,46	163,5	48,5
1	6/04/2013	46,3	3,5	29	11	8,7	3,5	13,9	6,3	71,8	1,3	67,1	1,4	0,33	57,8	23,6
2	3/12/2012	41,5	4,6	57	12	31,0	8,3	23,6	8,1	71,2	1,1	71,5	7,6	0,62	206,7	55,6
2	26/02/2013	47,5	4,7	50	15	20,2	6,0	27,7	12,8	70,8	1,0	72,3	2,1	0,45	134,6	40,3
3	17/12/2012	51,2	5,5	56	13	43,9	12,6	35,6	11,3	71,6	1,4	74,7	1,8	0,82	292,4	84,3
3	27/02/2013	42,0	6,7	54	15	16,4	6,0	20,7	11,5	71,2	1,8	71,4	2,5	0,30	109,3	40,2
4	19/12/2012	48,1	5,3	64	12	42,8	12,3	30,1	9,4	71,5	1,3	74,4	1,2	0,72	285,2	81,8
4	7/03/2013	43,4	7,2	62	17	17,4	7,3	23,5	11,0	73,1	2,2	70,5	2,0	0,26	115,8	49,0
5	17/01/2013	53,7	4,5	55	13	26,4	9,0	35,5	11,8	68,1	1,4	67,4	1,1	0,51	176,2	59,8
5	6/04/2013	44,9	3,2	42	13	9,2	3,0	15,0	6,6	75,3	1,8	70,7	2,4	0,24	61,0	20,2
6	5/02/2013	46,3	4,1	48	12	21,9	10,0	29,8	15,4	67,7	1,3	67,6	1,1	0,46	146,3	66,4

Os valores médios das concentrações dos principais edulcorantes presentes nas folhas de estévia para as diferentes datas de colheita das plantas e a estimativa da produtividade de edulcorantes estão descritos na Tabela 3. A data de colheita das plantas é fundamental e define o conteúdo de edulcorantes nas folhas. O ponto de colheita ideal para estévia é aquele o qual as plantas estão em início do desenvolvimento do botão floral – onde se encontra a maior concentração de glicosídeos de esteviol (CEUNEN; GEUNS, 2013). Após esse estágio, inicia-se um rápido declínio no teor desses edulcorantes.

Esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C foram os três compostos identificados e quantificados que apresentaram as maiores concentrações nas amostras dos 12 cortes realizados. As concentrações dos edulcorantes estão relacionadas com os meses em que foram mostrados valores elevados de temperatura média do ar e radiação solar, além da maior luminosidade durante o dia. Os cortes nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro podem ter proporcionado às plantas um maior acúmulo desses edulcorantes nas folhas em função da energia disponibilizada pelos fatores climáticos. Rebaudiosídeo A apresentou as maiores concentrações entre os meses de dezembro a fevereiro, enquanto que para rebaudiosídeo C as maiores concentrações foram observadas em dezembro e janeiro. Comparando os três compostos identificados e avaliados neste estudo, esteviosídeo (principal composto e em maior quantidade nas folhas) mostrou perceptíveis variações na sua concentração entre as colheitas. As maiores concentrações deste edulcorante foram encontradas nas colheitas do mês de janeiro. Orozco et al. (2012) relataram em seus estudos com diferentes épocas de cultivo de estévia que, os glicosídeos possuem uma tendência em variar sua concentração de acordo com a radiação e temperatura as quais as plantas estão expostas. Temperaturas altas podem ocasionar estresse para a planta, fazendo com que a mesma altere suas reações bioquímicas (ABREU; MAZZAFERA, 2005; ZOBAYED et al., 2005; LIANOPOULOU et al., 2014), desencadeando um desvio de energia do metabolismo primário para o secundário (MÜLLER et al., 2013).

O isopentenil difosfato (IPP) é a unidade básica para a formação dos terpenos (cadeia terpênica) (TAIZ, ZIEGER, 2009) podendo ser sintetizado via rota metabólica do metileritritol fosfato (MEP) (TOTTÉ et al., 2000), que mais tarde formarão os

glicosídeos diterpênicos, aos quais se incluem esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C. A síntese do IPP é influenciada pela luz, uma vez que a fixação do carbono (CO_2), principal composto necessário para a biossíntese dos metabólitos secundários e outras sínteses, é dependente da energia luminosa (BARNI et al., 1995). E, uma vez que as moléculas dos glicosídeos de esteviol são sintetizadas na cadeia terpênic, deduz-se que a luminosidade interfere positivamente na síntese desses compostos (GUEVARA-GARCIA et al., 2005). De acordo com a temperatura e os estímulos luminosos recebidos, as plantas reconhecem mudanças no ambiente onde estão expostas – podendo modificar seu crescimento e a síntese de determinadas moléculas (OROZCO et al., 2012). O aumento na concentração dos metabólitos secundários nas folhas está associado à divisão da translocação do carbono que é utilizado na biossíntese dos compostos. Isso porque, em condições adversas, as plantas realocam o carbono destinado ao crescimento para a síntese de compostos secundários (ZOBAYED et al., 2005; MÜLLER et al., 2013). Zobayed et al. (2005) estudando o estresse da temperatura na concentração de metabólitos secundários em *Hypericum perforatum* concluiu que a temperatura influencia a taxa de transpiração nas folhas que também é responsável por modificar a concentração dos constituintes ativos dessa planta. Em condições de cultivo a campo, como as plantas do presente estudo, os fatores climáticos relacionados às altas concentrações dos glicosídeos de esteviol não atuam isoladamente, ou seja, a radiação solar está associada com altas temperaturas, que estão relacionadas diretamente com a taxa transpiratória e evaporação (FRONZA, 2002).

Tabela 3. Concentração (%) de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C na massa seca de folhas de *S. rebaudiana* e respectivas estimativas da produtividade. Santa Maria, 2012-2013.

Grupo	Corte	Steviosídeo	Reb A	Reb C	Produtividade (g m ⁻²)		
					Steviosídeo	Reb A	Reb C
1	23/10/2012	7,90	2,94	1,54	4,83	1,80	0,94
1	16/01/2013	12,16	5,02	1,95	19,88	8,21	3,19
1	06/04/2013	6,89	3,37	1,82	3,98	1,95	1,05
2	03/12/2012	10,00	5,06	2,10	20,67	10,46	4,34
2	26/02/2013	10,07	5,61	1,55	13,56	7,55	2,09
3	17/12/2012	11,11	4,28	1,70	32,48	12,51	4,97
3	27/02/2013	8,41	6,15	1,78	9,19	6,72	1,95
4	19/12/2012	8,34	6,16	1,74	23,79	17,57	4,96
4	07/03/2013	9,90	4,95	1,58	11,47	5,73	1,83
5	17/01/2013	11,36	5,77	2,43	20,02	10,17	4,28
5	06/04/2013	7,35	3,53	0,89	4,48	2,15	0,54
6	05/02/2013	9,36	7,01	1,71	13,69	10,25	2,50
Mínimo		6,89	2,94	0,89	3,98	1,80	0,54
Média		9,40	4,99	1,73	14,84	7,92	2,72
Máximo		12,16	7,01	2,43	32,48	17,57	4,97

Na Tabela 4 está demonstrada a correlação linear de Pearson efetuada entre os dados de produtividade de plantas e os fatores climáticos avaliados. O coeficiente de correlação é uma importante estatística (ALVAREZ; CASTRO, 1999) e neste caso, aponta a influência do ambiente sobre os fatores de produtividade para a cultura estudada.

O número de ramos, a massa seca de ramos, a umidade de folhas, a altura das plantas e as concentrações de esteviosídeo e rebaudiosídeo A estão correlacionadas com o fotoperíodo, mostrando que esse fator foi importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas e que pode afetar a produtividade. O número de dias correlacionou-se com a altura das plantas, massa seca de ramos e umidade de folha e ramos. De uma maneira geral, os fatores climáticos avaliados estão relacionados com os principais parâmetros de rendimento da cultura: altura de plantas e massa seca de ramos – levando a concluir que as condições ambientais são importantes para a cultura e, irão interferir no crescimento e desenvolvimento das plantas. Estudos realizados com estévia em diferentes locais relataram resultados semelhantes. Plantas de estévia expostas às altas radiação e temperatura, tendem a diminuir a massa verde total por planta, afetando a concentração de edulcorantes (JARMA et al., 2006), pois recebendo uma maior quantidade de radiação solar, as plantas desenvolvem mais as raízes como uma forma de compensar as perdas por transpiração (POORTER, 1999). As estimativas das correlações entre produtividade de planta e condições climáticas estão de acordo com os resultados obtidos por Serfaty et al. (2013) e Ceunen & Geuns (2013) que observaram um melhor desenvolvimento das plantas (altura e quantidade de massa seca acumulada) quando essas foram submetidas a condições ambientais de temperatura favorável e maior luminosidade – maior comprimento do dia (primavera-verão).

Ramesh et al. (2006), afirmaram que o crescimento vegetativo, a massa seca de folhas e a concentração de esteviosídeo variaram de acordo com o comprimento do dia. De acordo com esses autores, esses parâmetros de rendimento foram maiores em plantas que estavam submetidas a condições de dias longos quando comparadas àquelas que estavam sob dias curtos. Estudos conduzidos por Tavarini e Agelini (2013) com plantas de estévia em diferentes locais e épocas de colheita, concluíram que a concentração dos glicosídeos de esteviol foi influenciada pelas datas das colheitas, com os melhores resultados obtidos em colheitas realizadas

durante o verão. Esses autores também concluíram, nesse estudo, que o conteúdo de esteviosídeo nas folhas sofreu alterações em função das diferentes fases de desenvolvimento das plantas – apresentando uma maior concentração durante o estágio vegetativo e menor durante o período do florescimento e, que a biosíntese dos metabólitos secundários das plantas de estêvia são fortemente afetados pelas condições ambientais do local e época de realização da colheita.

Conforme relatado anteriormente, a biosíntese dos produtos secundários, neste caso, edulcorantes, pode ser influenciada por vários fatores, entre eles, luminosidade, temperatura, patógenos e aplicação de agroquímicos (ABREU; MAZZAFERA, 2005). A temperatura a qual as plantas estão expostas altera o funcionamento das enzimas envolvidas na biosíntese dos compostos metabólicos, modificando a sua concentração (ENGLISH-LOEB et al., 1997). Estudos realizados com *Hypericum brasiliense* também concluíram que a temperatura influenciou no conteúdo dos compostos fenólicos que esta planta apresenta (ABREU; MAZZAFERA et al., 2005) e, as condições de cultivo regulam a síntese dos produtos do metabolismo secundário das plantas (KARAKOSYAN et al., 2004). Metabólitos secundários são formados com o objetivo de proteger as plantas de estresses ambientais (ataque de patógenos, alta radiação solar ou ausência dela, fertilização e irrigação, além da temperatura). Com isso, as plantas desenvolvem diferentes mecanismos (bioquímicos e fisiológicos) que irão regular a síntese desses compostos (KARAKOSYAN et al., 2004).

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson entre número de dias (ND), fotoperíodo médio, chuva, temperatura média (TM), radiação média (Rad), altura de plantas (Alt), número de ramos (NR), massa seca (MS) de folhas (MSFo) e ramos (MSRa), teor de umidade nas folhas (UmFo) e nos ramos (UmRa), MS por ramos (Fo/Ra), produtividade de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C em folhas de *Stevia rebaudiana*. Santa Maria, Brasil, 2012-2013.

	ND	Foto	Chuva	TM	Rad	Alt	NR	MSFo	MSRa	UmFo	UmRa	Fo/Ra	Stev	RebA	RebC
ND		0,59*	0,32	0,65*	0,68*	0,68*	0,21	0,18	0,59*	-0,63*	-0,70*	0,20	0,44	0,39	0,09
Foto	0,59*		0,46	0,90*	0,88*	0,72*	0,71*	0,46	0,81*	-0,73*	-0,49	0,31	0,61*	0,87*	0,38
Chuva	0,32	0,46		0,35	0,25	0,43	0,16	0,19	0,61*	-0,55	-0,20	0,19	0,71*	0,21	0,23
TM	0,65*	0,90*	0,35		0,99*	0,77*	0,46	0,15	0,64*	-0,62*	-0,67*	0,02	0,36	0,70*	0,17
Rad	0,68*	0,88*	0,25	0,99*		0,80*	0,49	0,19	0,65*	-0,64*	-0,73*	0,05	0,36	0,69*	0,22
Alt	0,68*	0,72*	0,43	0,77*	0,80*		0,47	0,50	0,84*	-0,69*	-0,65*	0,46	0,56	0,43	0,34
NR	0,21	0,71*	0,16	0,46	0,49	0,47		0,73*	0,72*	-0,40	-0,09	0,51	0,63*	0,65*	0,32
MSFo	0,18	0,46	0,19	0,15	0,19	0,50	0,73*		0,70*	-0,35	0,14	0,95*	0,54	0,44	0,40
MSRa	0,59*	0,81*	0,61*	0,64*	0,65*	0,84*	0,72*	0,70*		-0,83*	-0,48	0,62*	0,85*	0,60*	0,49
UmFo	-0,63*	-0,73*	-0,55	-0,62*	-0,64*	-0,69*	-0,40	-0,35	-0,83*		0,73*	-0,33	-0,70*	-0,63*	-0,64*
UmRa	-0,70*	-0,49	-0,20	-0,67*	-0,73*	-0,65*	-0,09	0,14	-0,48	0,73*		0,17	-0,32	-0,31	-0,34
Fo/Ra	0,20	0,31	0,19	0,02	0,05	0,46	0,51	0,95*	0,62*	-0,33	0,17		0,47	0,30	0,42
Stev	0,44	0,61*	0,71*	0,36	0,36	0,56	0,63*	0,54	0,85*	-0,70*	-0,32	0,47		0,37	0,55
RebA	0,39	0,87*	0,21	0,70*	0,69*	0,43	0,65*	0,44	0,60*	-0,63*	-0,31	0,30	0,37		0,39
RebC	0,09	0,38	0,23	0,17	0,22	0,34	0,32	0,40	0,49	-0,64*	-0,34	0,42	0,55	0,39	

*Significativo pelo teste t (se $|r| > 0,576$; $p < 0,05$; $n = 12$)

Resultados das colheitas e das análises dos edulcorantes das amostras dos diferentes genótipos pode ser conferido na Tabela 5. As concentrações dos edulcorantes identificados na massa seca de folhas variam com o genótipo e a época de realização do corte. Duas colheitas foram realizadas com os genótipos, produzindo dois cortes. O primeiro corte compreendeu o período entre 06/09/2012 a 11/01/2013, totalizando 126 dias após o transplante e o segundo foi entre 11/01/2013 a 24/03/2013, finalizando com 72 dias após a primeira colheita. O maior número de dias do primeiro ciclo em relação ao segundo está relacionado à desuniformidade dos genótipos na época do florescimento, fazendo com que houvesse atraso na colheita. Essa desuniformidade também pode estar vinculada à época do plantio, que foi realizada ainda no período de inverno na região (início de setembro), com temperaturas baixas, provocando um desenvolvimento mais lento das plantas.

Comparando os dois cortes, percebeu-se que todos os genótipos testados apresentaram redução na concentração dos edulcorantes no segundo corte quando comparado com o primeiro. O genótipo C7 apresentou uma redução na concentração dos edulcorantes menos acentuada do primeiro no segundo corte, possivelmente demonstrando uma maior estabilidade na concentração de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C.

As condições de fotoperíodo o qual as plantas estiveram expostas podem explicar a diferença de concentração desses compostos nas folhas. De acordo com Zaidan et al. (1980), plantas de estévia submetidas a fotoperíodo de 10 horas de luz produziram menos esteviosídeo do que plantas submetidas a um fotoperíodo de 14 horas de luz. A condição mais próxima do natural faz com que as plantas se adaptem em um menor período de tempo. Apesar das baixas temperaturas durante o transplante, o primeiro corte das plantas ficou submetido a um acréscimo de horas de luz e também de temperatura ao longo de toda a colheita até o corte. E, a segunda colheita, embora estando sobre temperaturas favoráveis, a quantidade de horas de luz foi gradualmente diminuindo, encurtando dessa forma o número de dias e também o resultado final da concentração dos edulcorantes.

Com exceção dos genótipos C3 e C4, a quantidade de massa seca por plantas foi maior durante a segunda colheita. A condição de fotoperíodo a qual as plantas estavam submetidas influenciou em uma produtividade mais alta, mas a concentração de edulcorantes foi mais baixa. Dias mais curtos proporcionam melhor

crescimento vegetativo mas influenciam negativamente para a síntese de edulcorantes. Portanto, a data de transplante para o campo deve ser observada, a fim de que proporcione às plantas, condições satisfatórias de produção.

A cultura da estévia, assim como qualquer outra cultura em que se deseja alta produtividade, exige tecnologia de cultivo. Essa tecnologia se traduz principalmente na utilização de genótipos estabelecidos para cada região, que caracterizem alta produção de biomassa e conteúdo de edulcorantes que não sofram variações. Os edulcorantes de estévia movem, atualmente, um mercado milionário, onde a qualidade e a quantidade estão diretamente relacionados aos fatores climáticos aos quais as plantas estão submetidas. A estévia é uma planta cultivada em diferentes regiões do mundo (Israel, China, Colômbia, Índia, Portugal, Brasil, Japão) com diferentes disponibilidades de radiação solar e temperatura, sendo que esses fatores definem a produtividade da cultura. O conhecimento dessas condições ambientais é necessário a fim de que se possa estabelecer, para cada região, um período do ano em que se obtém o melhor desempenho das plantas.

O melhoramento genético contribuiu para que novas cultivares dessa espécie tivessem sido desenvolvidas a fim de que altas produtividades fossem alcançadas independente de onde fossem produzidas. Isso nos mostra que, apesar de esta cultura ter sido introduzida por um curto período na região central do Estado, considerando o tempo em que permaneceu no campo, ela mostrou respostas positivas de produtividade e de concentração de edulcorantes. Esses resultados podem ser traduzidos como uma boa adaptação, mas que necessita de maiores estudos a respeito do melhor período produtivo, podendo oferecer futuramente uma nova alternativa de produção com rendimentos satisfatórios.

Tabela 5. Média e semi-amplitude do intervalo de confiança (\pm IC, 1-p=0,95) referentes à concentração (%) de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C na massa seca de folhas (g planta⁻¹) de *S. rebaudiana* nos sete genótipos testados. Santa Maria, 2012-2013.

Colheita		Esteviosídeo	\pm IC	Reb A	\pm IC	Reb C	\pm IC	Massa seca
11/01/2013	C1	11,24	0,235	2,53	0,022	0,88	0,013	66,00
	C2	7,35	0,249	7,64	0,221	1,45	0,014	75,00
	C3	9,00	0,116	5,15	0,083	1,89	0,032	76,00
	C4	11,14	0,352	3,30	0,093	1,65	0,013	82,00
	C5	9,47	0,312	3,13	0,067	1,54	0,025	81,00
	C6	4,54	0,048	8,94	0,067	1,96	0,023	71,00
	C7	10,32	0,004	5,64	0,042	1,93	0,026	62,00
24/03/2013	C1	7,86	0,301	1,63	0,044	1,04	0,007	131,00
	C2	5,21	0,154	5,18	0,169	1,44	0,042	133,00
	C3	7,82	1,087	4,37	0,583	1,63	0,161	72,00
	C4	3,48	0,236	5,82	0,373	1,56	0,119	41,00
	C5	4,22	0,061	1,96	0,011	1,05	0,031	95,00
	C6	2,24	0,004	5,74	0,002	1,43	0,008	144,00
	C7	9,28	0,146	4,89	0,091	1,77	0,030	149,00

5 CONCLUSÕES

1. A melhor produtividade de massa seca de folhas de estévia são obtidos em colheitas no mês de dezembro. As maiores concentrações de edulcorantes nas folhas obtidos na região central do Estado do Rio Grande do Sul foram encontradas para colheitas nos meses de dezembro e janeiro.

2. A temperatura e radiação solar afetam mais a concentração de edulcorantes do que a produtividade de massa seca de folhas de estévia.

3. O número de dias para cada colheita (período entre um corte e outro) foi influenciado pelo fotoperíodo, sendo estabelecido um ciclo médio de colheita de 75 dias para a cultura na região.

4. O fotoperíodo influenciou a concentração de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C nas amostras de folhas secas dos sete genótipos testados e nas amostras dos 12 cortes realizados. Plantas expostas em condições de maior luminosidade aumentam sua concentração de edulcorantes.

5. O plantio da estévia deve ser ajustado para que as colheitas sejam realizadas durante os meses onde a radiação solar e o fotoperíodo são crescentes, para maximizar a produtividade de massa seca e a concentração e qualidade de edulcorantes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU de, I.N.; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.241-248, 2005.
- AHMED, M.B. et al. An efficient method for *in vitro* clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh, **American Eurasian Journal of Scientific Research**, v.2, n.2, p.121-125, 2007.
- ALMEIDA, L.P.de. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.83-88, 2004.
- ALVAREZ, I. A.; CASTRO, P.R.C. Crescimento da parte aérea de cana crua e queimada. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1069-1089, 1999.
- ANGELINI, L.G. et al. Sustainable production chain of stevia in Italy: Agronomy, phytochemical assessment and downstream processing. Proceedings of 7th Stevia Symposium, EUSTAS, **Knowledge on tour in Europe**, 212p. 2013.
- ASSIS, F.N.de; MENDEZ, M.E.G. Relação entre radiação fotossinteticamente ativa e radiação global. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, n.7, p.797-800, 1989.
- BARBET-MASSIN, C. et al. Effect of genotype and environment on steviol glycosides content and composition in stevia at flower budding stage, **Proceedings of the 7th Stevia symposium, organized by EUSTAS 2013 – Knowledge on tour in Europe**, 212p, 2013.
- BARNI, N. A. et al, Rendimento máximo do girassol com base na radiação solar e temperatura: II. Produção de biomassa e rendimento de grãos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.1, n.2, p. 201-216, 1995.
- BESPALHOK FILHO. J.C.; HATTORI. K. Embriogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni florets explants. **Revista Brasileira de Fisiologia**, v. 9, n.3, p. 185-188, 1997.
- BONDAREV, N. et al. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plant Science**, n.161, p.155-163, 2001.
- BRANDLE. J.E.; ROSA. N. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. **Canadian Journal of Plant Science** v.72, p.1263-1266, 1992.
- BRANDLE, J.E.; STARRATT. A.N.; GIJZEN, N. *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, v.78, p.527-536, 1998.
- BRANDLE. J.E.; TELMER. P.G. Steviol glycosides biosynthesis. **Phytochemistry**. v.68, p.1855-1863, 2007.
- BRUNINI, O. Temperatura-base para alface cultivar “White Boston”, em um sistema de unidades térmicas. **Bragantia**. v.35, n.19, p. 213-219, 1976.
- CABALLERO, R.E.G. et al. Necesidad de agua para el cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana*, Bert.), calculado sobre la base de lectura de microlisímetro. **Investigación Agrária**, v.4, p.19-24, 2002.

- CARGILL GRAS **Notification for the use of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni.** Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn_275.pdf. Acesso em 23 de janeiro de 2014.
- CARNEIRO, J.W. Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Disponível em: <http://pubs.aic.ca/doi/pdf/10.4141/P96-166>. Acesso em 09 de Setembro de 2014.
- CARVALHO, J.M.F.C; SILVA, M.M de A.; MEDEIROS, M.J.L. **Fatores inerentes à micropropagação.** Embrapa Algodão. Campina Grande. PB. 2006. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/276578/1/DOC148.pdf>. Acesso em 5 de Março de 2014.
- CARVALHO, M.A.M.de; ZAIDAN, L.B.P. Obtenção de plantas de *Stevia rebaudiana* através de estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** v.30, n.2, p.201-206, 1995.
- CEUNEN, S. et al. Accumulation pattern of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni and its stimulation by red light. Proceedings of the 5th *Stevia* symposium, organized by EUSTAS 2011 – **Stevia: Break-through in Europe.** 209p. 2011.
- CEUNEN, S.; GEUNS, J.M.C. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Proceedings of the 6th *Stevia* symposium, organized by EUSTAS 2012 – **Stevia: Six months beyond authorization.** 226p. 2012.
- CEUNEN, S.; GEUNS, J.M.C. Spatio-temporal variation of the diterpene steviol in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. **Phytochemistry.** v.89, p.32-38, 2013.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants.** Second edition. The New York Botanical Garden. Bronx. NY. 1988.
- DAS, A.; GANTAIT, S.; MANDAL. N. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bertoni. **International Journal of Agricultural Research.** v.6, n.1, p. 40-48, 2011.
- DESHMUKH, S.; ADE. R. In vitro rapid multiplication of *Stevia rebaudiana*: an important natural sweetener herb. **Nusantara Bioscience,** v.4, n.3, p. 105-108, 2012.
- EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion. **Scientific Opinion on establishing food-based dietary guidelines.** 2010. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1460.pdf>. Acesso em 11 de Setembro de 2014.
- EL-MOTALEB, M. A. et al. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Egypt. **Journal of Applied Sciences Research,** v.9, n.8, p. 4597-4605, 2013.
- ENGLISH-LOEB, G. et al. Drought stress in tomatoes: changes in plant chemistry and potential nonlinear consequences for insect herbivores. **OIKOS,** v.79, p.456-468, 1997.
- FRONZA, D. **Consumo de água da cultura da estévia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) estimado por microlisímetro automático.** Tese 127p. Doutorado em Agronomia. Área de concentração: Irrigação e Drenagem. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. São Paulo, 2002.

- FRONZA, D.; FOLEGATTI, M.V. Water consumption of the stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. **Scientia Agricola**, v.60, p.595-599, 2003.
- GOMES, J.A.de O. et al. Produção de biomassa e teor de óleo essencial de *Melissa officinalis*. L. sobre sombreamento em Montes Claros, MG. In: **Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia** – Fortaleza, CE – 12 a 16/12/2011, 2011.
- GONZÁLEZ, A.Z.; et al. Reflectividad y absorción de la radiación en tres densidades de planta y su relación con el rendimiento de maíz (variedad Cafime). **Agrociencia**, v.39, p.285-292, 2005.
- GONZÁLEZ, C et al. Caracterización de cultivares de *Stevia rebaudiana* Bertoni de diferentes procedencias. **Bioagro**, v.26, n.2, p.79-88, 2014.
- GOTO, A. Diretor fala sobre adoçante natural de estêvia. **UOL**. Disponível em: <http://tvuol.uol.com.br/video/diretor-fala-sobre-adoçante-natural-stevia-0402CC193266CC895326>. Acesso em 15 de Outubro de 2014.
- GOTO, A.; CLEMENTE. E. Influência do rebaudiosídeo A na solubilidade e sabor do esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.18, n.1, 1998.
- GUEVARA-GARCIA, A. et al. Characterization of the arabidopsis clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. **Plant Cell**, v.17, n.2, p.628-643, 2005.
- GUO, X. et al. Sweetened beverages, coffee and tea and depression risk among older US adults. **Plosone**, v.9, n.4, 2014.
- HEARN, L.K.; SUBEDI, P.P. Determining level of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.22, p.165-168, 2009.
- HIGUCHI, Y. et al. Constitutive expression of the GIGANTEA ortholog affects circadian rhythms and suppresses one-shot induction of flowering in *Pharbitis nil*, a typical short-day plant. **Plant Cell Physiology**, v.52, n.4, p.638-650. 2011.
- HOFFMAN, A.M.; NOGA, G.; HUNSCHE, M. High blue light improves acclimation and photosynthetic recovery of pepper plants exposed to UV stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.109, p.254-263, 2015.
- HUANG, X.Y. et al. Preparative isolation and purification of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni using high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v.71, p.220-224, 2010.
- IZAWA, T. Adaptation of flowering-time by natural and artificial selection in Arabidopsis and rice. **Journal Experimental Botany**, v.58, p.3091-3097, 2007.
- JARMA, A. et al. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe Colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomassa. **Agronomía Colombiana**, v.23, n.2, p.207-216, 2005.
- JARMA, A. et al. Fisiología de *Stevia rebaudiana* en función de la radiación en el Caribe Colombiano. II. Analisis de crecimiento. **Agronomía Colombiana**, v.24, p.38-47, 2006.
- KADIOGLU, M.; SAYLAN, L. Trends of growing degree-days in Turkey. **Water, Air and Soil Pollution**, v.126, p.83-96, 2001.

- KARAKOSYAN, A. et al. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. **Physiologia Plantarum**, v.121, p.182-186, 2004.
- KEDIK, S.A. et al. Chromatographic determination of stevioside in raw plant material. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.37, p.529-532, 2003.
- KINGHORN, A.D. The genus *Stevia*, Medicinal and aromatic plants – Industrial Profiles. **Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy University of Chicago, USA**, v.19, 211p. 2002.
- KUINCHTNER, A.; BURIOL, G.A. Clima do Estado do Rio Grande do Sul segundo a classificação climática de Köppen e Thornthwaite. **Disciplinarum Scientia**, v.2, p.171-182, 2001.
- KUMAR, H. et al. 2C-methyl-D-erythritol 2,4 cyclodiphosphatesynthase from *Stevia rebaudiana* Bertoni is a functional gene. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.10971-10978, 2012.
- KUNZ, J.H. et al. Uso da radiação solar pelo milho sob diferentes preparo do solo, espaçamento e disponibilidade hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.11, p.1511-1520, 2007.
- LANDÁZURI, P. A. A.; TIGRERO, R.O.S. *Stevia rebaudiana* Bertoni: Una planta medicinal. Bol. Téc. Edición Especial. ESPE, Sangolquí, Ecuador, 2009. Disponível em: <http://biblioteca.espe.edu.ec/upload/Manudefinit1.pdf>. Acesso em 09 de Janeiro de 2014.
- LAVINI, A. et al. Yield, quality and water consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni growth under different irrigation regimes in Southern Italy. **Italian Journal of Agronomy**, v.2, p.135-143, 2008.
- LIANOPOULOU, V. et al. Effects of chilling stress on leaf morphology, anatomy, ultrastructure, gas exchange, and essential oil in the seasonally dimorphic plant *Teucrium polium* (Lamiaceae). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, p.2271-2281, 2014.
- LIMA FILHO, O. F.; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. Estévia. Sistemas de Produção: 57p. 1ª ed. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS, 2004.
- LINDSETH, G.N et al. Neurobehavioral effects of aspartame consumption. **Research in Nursing and Health**, v.37, v.3, 2014.
- LIU, Z. et al. Preparative isolation and purification of acetophenones from the Chinese medicinal plant *Cynanchum bungei* Decne. By high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v.64, p.247-252, 2008.
- LOPES, L.D.T.; PEÑA, L.G.G. Plan estratégico para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de edulcorante a base de estevia. **Trabajo de Grado**. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ingeniería, 125p, 2004.
- LORENZI, H.; MATOS, F. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

- MANARA, N. T.F.; MANARA, W.; LOPES, M.C. Comportamento reprodutivo em *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v.19 n.1-2, p.5 – 10, 1989.
- MANDAN, S.; et al. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – a review. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v.1, n.3, p.267-286, 2010.
- MAZZA, C.A. et al. Functional, significance, and induction by solar radiation of ultra-violet absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. **Plant Physiology**, v.122, p.117-125, 2000.
- MICHELET, L.; LISZKAY, A.K. Reactive oxygen intermediates produced by photosynthetic electron transport are enhanced in short-day grown plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1817, p.1306-1313, 2012.
- MIDMORE, D.J.; RANK, A.H. **A new rural industry – Stevia – to replace imported chemical sweeteners**. Rural Industries, Research, and Development Corporation, 2002. Disponível em: <http://acquire.cqu.edu.au:8080/vital/access/manager/Repository/cqu:4896>. Acesso em 8 de Outubro de 2014.
- MIOTO, D.M.M.; MACHADO, N.R.C.F. Purificação do subproduto do processo de extração de esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.24, n.1, p.146-150, 2004.
- MONTEIRO, R. Taxonomia e biologia da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. Dissertação. 104p. Instituto de Biologia, UNICAMP, 1980.
- MONTEITH, J. L; UNSWORTH, M. **Principles of environmental physics**. Second edition. Biophysics, 1990.
- MORENO ANDRADE, A.E. **Análisis de la incidencia y relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* B. En condiciones de invernadero en la Sabana de Bogotá**. 99p. Dissertação (Mestrado em Desenho e Gestão de Processos), Universidad de la Sabana, Colômbia, 2012.
- MÜLLER, V. et al. Centelloside accumulation in leaves of *Centella asiatica* is determined by resource partitioning between primary and secondary metabolism while influenced by supply levels of nitrogen, phosphorus or potassium. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p.1165-1175, 2013.
- MÜLLER, V. et al. Ecologically relevant UV-B dose combined with high PAR intensity distinctly affect plant growth and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Centella asiatica* L. Urban. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.127, p.161-169, 2013.
- OROZCO, J.A. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v.2, n.1, p.110-121, 2008.
- OROZCO, J.A. et al. Captación y uso de la radiación em plantas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe Colombiano. **Agronomía Colombiana**, v.26, n.1, p.37-46, 2010.
- OROZCO, J.A. et al. Efecto de la temperatura y radiación en la producción de glucósidos de esteviol en *Stevia rebaudiana* en el Caribe húmedo Colombiano.

- Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica** v.15, n.2, p.339-347, 2012.
- OUESLATI, S. et al. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, p.289-296, 2010.
- ÔZYIGIT, Y.; UÇAR, E.; TURGUT, K. Effect of different pollination methods on seed yield of *Stevia rebaudiana* (Bert). Proceedings of the 7th Stevia Symposium. EUSTAS. **Knowledge on tour in Europe**. 212p. 2013.
- PASQUEL, A. et al. Extration of stevia glycosides with CO₂ + water, CO₂ + ethanol and CO₂ + water +ethano. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, n.3, p.271-282, 2000.
- PATRÃO, A.N. et al. Comparação de diferentes metodologias para a obtenção de cultura de calos de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. *Acta Scientiarum. Health Scienc*, v.29, n.2, p.121-124, 2007.
- PAUL, N.D; GWYNN-JONES, D. Ecological roles of solar UV radiation: towards in integrated approach. **TRENDS and Ecology and Evolution**, v.18, n.1, p.48-55, 2003.
- PINTO, J.E.B.P. et al. Apectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, v.25, p.210-214, 2007.
- POLLAN, M. **Food Rules: an eater's manual**. 1^a Edição. Versão Kindle. Localização 125; eISBN: 978-1-101-16316-0; Penguin Books, 2009.
- POORTER, L. Growth responses of 15 rain-forest treesspecies to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traist. **Functional Ecology**, v.13, p.396-410, 1999.
- PRINS, C.L. et al. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.22, n.2, p.91-102, 2010.
- RAJASEKARAN, T.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. A. Production of steviosides *ex vitro* and *in vitro* grown *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, p. 420-424, 2007.
- RAMESH, K.; SINGH, V.; MEGEJI, N.W. **Cultivation of stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni): A comprehensive review**. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211305890030>. Acesso em 24 de Março de 2014.
- RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BORONATO, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plat Physiology**, v.130, p.1079-1089, 2002.
- SERFATY, M.; et al. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. **Industrial Crops and Products**, v.50, p.731-736, 2013.
- SHOCK, C. Rebaudi's stevia: natural noncaloric sweeteners. **California Agriculture**, 1982. Disponível em: <https://ucanr.edu/repositoryfiles/ca3609p4-61878.pdf>. Acesso em 21 de Outubro de 2014.

- SKIRY CZ, A.; INZÉ, D. More from less: plant growth under limited water. **Current Opinio on Technology**, v.21, p.197-203, 2010.
- SOUZA, F.E.F. et al. Relação entre acúmulo de graus-dias e unidades fototérmicas e crescimento vegetativo do maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis* SIMS). **UNICiências**, v.39-51, 2010.
- STONES, M. **Stevia wins final EU approval**. Disponível em: <http://www.foodmanufacture.co.uk/Ingredients/Stevia-wins-final-EU-approval>. Acesso em 22 de Janeiro de 2014.
- STRECK, N.A. A temperature response function for development of (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat.). **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.49-54, 2004.
- TADHANI, M. B.; et al. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p.323-329, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4.Ed. Porto Alegre: Artmed, 848p. 2009.
- TAVARINI, S.; ANGELINI, L.G. *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. **Journal Science Food Agriculture** v.93, p.2121-2129, 2013.
- TERAMURA, A.H.; MURALI, N.S. Intraspecific differences in growth and yield of soybean exposed to ultraviolet B radiation under greenhouse and field conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v.26, n.1, p.89-95, 1986.
- TORLONI, M.R. et al. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, n.15, p. 267-675, 2007.
- TORRES, L.D.L; GUEVARA, L.G.P. **Plan estratégico para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de edulcorante a base de stevia**. Trabajo de Grado, 125p. Ingeniería Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, 2004.
- TOTTE, N. et al. Biosynthesis of diterpenoid steviol, an *et*-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni via methylerythritol phosphate pathway, **Tetraedron Letters**. v.41, p.6407-6410, 2000.
- UDDIN, M. S.; et al. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bert in Bangladesh. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.13, p.1238-1240, 2006.
- WOELWER-RIECK, U. et al. Investigations on the stability of stevioside and rebaudioside A in soft drinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.12216-12220, 2010.
- WOELWER-RIECK, U. et al. Methylerythritol and mevalonate pathway contributions to biosynthesis of mono-, sesqui- and diterpenes in glandular trichomes and leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.62, p.2428-2435, 2014.
- WOELWER-RIECK, U. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. **European Food Research Technology**, v.231, p.581-588, 2010.

- WOELWER-RIECK, U. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof a review. **Journal of Agricultural Food Chemistry** v.60, p.886-895, 2012.
- WOOD. H.B.et al. Stevioside I. The structure of the glucose moieties. **National Institutes of Health, Public Health Service, U. S. Department of Health, Education, and Welfare**, v.20, 1955.
- YADAV, A.K. et al. A review on the improvement of stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)). **Canadian Journal of Plant Science**, n.91, p.1-27, 2011.
- YANG, J, et al. Effect on different mixer fertilizer on yield, quality and economic benefits in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Advanced Journal of Food Science and Technology**, v.5, p.588-591, 2013.
- ZAHN, S. et al. Combined use of rebaudioside A and fibers for partial sucrose replacement in muffins. **Food Science and Technology**, v.50, p.695-701, 2013.
- ZAIDAN, L.B.P. et al. Effect of photoperiod on flowering and stevioside content in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Japanese Journal of Crop Science**, v.49, p.569-574, 1980.
- ZHENG, G. et al. Plant adaptations to frequent alterations between high and low temperatures: remodeling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels. **Plant, Cell and Environmental**, v.34, p.1431-1442, 2011.
- ZOBAYED, S.M.A. et al. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.977-984, 2005.