UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie

EFFETTI DI TRATTAMENTI AGRONOMICI SU ACCUMULO DI GLICOSIDI STEVIOLICI IN STEVIA *REBAUDIANA* BERTONI

Relatore

Prof. Paolo Sambo

Correlatori

Dott. ssa Silvia Santagata

Dott. ssa Elisa Casalini

Laureanda

Arianna Bittante

Matricola n.

1005788

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

Indice generale

Riassunto..... 5

Abstract..... 7

1. Introduzione..... 9

    1.1. Cenni storici..... 9

    1.2. Caratteri botanici..... 10

    1.3. Aspetti qualitativi e nutrizionali..... 16

        Glicosidi steviolici..... 16

        Composti fenolici..... 21

        Vitamine idrosolubili..... 22

        Zuccheri semplici..... 23

        Lipidi..... 23

        Sali minerali e acidi organici..... 24

    1.4. Tecniche colturali..... 25

    1.5. Aspetti economici e legislativi..... 35

2. Scopo della tesi..... 38

3. Materiali e metodi..... 39

    3.1. Analisi chimiche..... 41

        Zuccheri liberi..... 41

        Glicosidi steviolici..... 42

4. Risultati e discussione..... 44

5. Conclusioni..... 48

Bibliografia..... 50

Tabelle e Figure

Riassunto

La stevia *rebaudiana* bertoni è una pianta poliennale originaria del Paraguay le cui foglie sono note da lungo tempo per la loro intensa dolcezza; la conoscenza di questa pianta nonché delle sue particolari proprietà è rimasta confinata per molti secoli fra le popolazioni indigene, e solo in seguito si è diffusa in Paesi come Giappone, Cina e Brasile. La pianta di stevia si è dimostrata altamente adattabile da un punto di vista pedo-climatico e a conferma di ciò essa, ad oggi, viene coltivata con successo in molti Paesi diversi dal luogo d'origine, sia per temperatura che per esposizione solare. Per quanto concerne la produzione di biomassa fogliare (le foglie di stevia rappresentano la parte commercializzabile della pianta), i territori più adatti si sono rivelati quelli situati ad elevate latitudini.

In relazione alla composizione chimica della pianta ed in particolare delle sue foglie, le molecole che le conferiscono dolcezza si definiscono "glicosidi steviolici": fra questi, quelli preponderanti sono lo "stevioside" e il "rebaudioside A" i cui poteri dolcificanti sono in media 300 volte superiori a quelli del saccarosio o dello zucchero di canna. L'importanza che ricoprono tali composti, in aggiunta al loro potere dolcificante, è legata altresì alle loro particolari proprietà: essi infatti sono *non-calorici* e svolgono un ruolo importante nel contrastare alcune malattie oggigiorno diffuse come l'iperglicemia e l'ipertensione.

In Europa, nonostante la stevia fosse già nota sin dalla fine dell'800, il via libera alla commercializzazione dei glicosidi steviolici è stato concesso soltanto a partire dal 2010: in ottemperanza al principio di precauzione, l'EFSA (European Food Safety Authority) ha condotto alcune ricerche atte a scongiurare l'esistenza di particolari controindicazioni in relazione all'utilizzo alimentare della pianta in questione. Non a caso, dal 2011, gli

estratti di stevia sono stati commercializzati esclusivamente sotto forma di additivi alimentari e inseriti in specifiche categorie di alimenti quali a "ridotto valore energetico" o "senza zuccheri aggiunti".

Per quanto riguarda la parte sperimentale della tesi sono state analizzate le principali proprietà della pianta di stevia, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo, nello specifico in termini di resa e contenuto di glicosidi steviolici.

In relazione al profilo prettamente agronomico è emerso che al fine di ottenere una resa in sostanza secca e un quantitativo di glicosidi steviolici maggiori, un ruolo essenziale va attribuito alle differenti modalità di irrigazione piuttosto che ai livelli di concimazione impiegati; da ciò si evince che la stevia non è una pianta che necessita di elevate esigenze nutrizionali.

Abstract

Stevia rebaudiana bertoni is a perennial plant native to Paraguay whose leaves have been known for a long time for their intense sweetness; the knowledge of this plant and its special properties remained confined for many centuries among the indigenous population, and only later it spread to other countries such as Japan, China and Brazil. The stevia plant showed highly adaptability from the pedo-climatic point of view and to confirming this, today it is grown successfully in many countries aside from the place of origin, for both temperature and solar exposure. As regards the leaves biomass production (the leaves of stevia are the marketable part of the plant), the most suitable territories are those located at high latitudes.

Depending on the chemical composition of the plant and in particular of its leaves, the molecules that impart sweetness are defined "steviol glycosides": among them, the preeminent ones are "stevioside" and "rebaudioside A" whose sweetening powers are 300 times higher than those of sucrose or sugar cane. The importance that holding these compounds, in addition to their sweetening power, is also linked to their special properties: they are non-caloric and play an important role in combating certain diseases, nowadays spread in the world, like hyperglycemia and hypertension.

In Europe, despite the stevia was already known since the late 800 's, the go-ahead to commercialization of steviol glycosides have been granted only starting from 2010: in accordance with the precautionary principle, the EFSA (European Food Safety Authority) has conducted some research in order to prevent the existence of particular contraindications in relation to the food use of the plant in question. Accordingly to that, since 2011, stevia extracts were marketed exclusively in the form of food additives and placed

in specific food categories such as "reduced energy value" or "no added sugar".

The experimental part of this thesis analyzes the main characteristics of the stevia plant, both from a qualitative and quantitative point of view, specifically in terms of yield and content of steviol glycosides.

In relation to purely agricultural profile, the results shown that, in order to dry matter yield and content of steviol glycosides, an essential role should be attributed to the different irrigation mode rather than to fertilizing levels; from this, it appears that the stevia is not a plant that requires high nutritional needs.

1. Introduzione

1.1 Cenni storici

La stevia è una pianta nativa del Paraguay sviluppatasi nei territori situati all'altezza del tropico del Capricorno. Precisamente, la stevia sembra essere originaria dalla Valle del Rio Monday sulle alture del Paraguay (tra i 25 e i 26 gradi latitudine sud), dove cresce in suoli sabbiosi, nelle immediate vicinanze di corsi d'acqua (Brandle, 1998). Le foglie di stevia sono state utilizzate per secoli dalla popolazione indigena del Paraguay, gli Indiani Guarani, per dolcificare bevande locali come il Mate o per migliorare il sapore di medicinali altrimenti sgradevoli o ancora come semplice alimento da masticare piacevolmente. Non è un caso che le stesse popolazioni indigene la chiamassero *caa-ehe*, ovvero "erba dolce" (Lewis, 1992).

La stevia è stata per la prima volta portata all'attenzione degli europei nel 1887 quando M.S. Bertoni venne a conoscenza delle sue proprietà uniche dagli indiani paraguaiani e dai Mestizos (Brandle, 1998). L'introduzione di tale coltura però ha preso avvio solo dagli anni Trenta e Quaranta del '900, durante la Seconda Guerra Mondiale, come possibile sostituto dello zucchero (Rank e Midmore, 2006).

La pianta di stevia, alle latitudini proprie della sua zona nativa, cresce come pianta poliennale, sviluppandosi in territori posti ad elevate altitudini o ancora in aree paludose situate all'interno di vallate. Nei Paesi dove è stata esportata, invece, ha presentato un'adattabilità climatica in aggiunta ad una certa variabilità genetica che si riflette quindi in altrettanta variabilità del contenuto di glicosidi. Inoltre la coltivazione di stevia si è sviluppata con successo in aree tropicali come Indonesia, Thailandia, Brasile ma anche in zone temperate e fredde (fino a latitudini superiori ai 50 ° Nord) includendo

il Nord della Russia, la Cina settentrionale, la Corea e il Canada (Rank e Midmore, 2006).

1.2 Caratteri botanici

La *stevia* è uno dei novecentocinquanta generi della famiglia delle *Asteraceae* (Lester, 1999; Soejarto *et al.*, 1983). Anche se esistono più di duecento differenti specie appartenenti al genere *stevia*, Soejarto e colleghi (1983) hanno dimostrato che la *stevia rebaudiana* è quella che fornisce i composti più dolci.

La *stevia rebaudiana* è normalmente descritta nel suo habitat naturale in Paraguay come una pianta perenne, anche se in diverse condizioni ambientali può assumere un ciclo annuale. La pianta si presenta come un arbusto cespuglioso ramificato (Dwivedi, 1999). Poiché le foglie rappresentano la principale fonte dolcificante dell'intera pianta, risulta essere di fondamentale importanza la valutazione del rapporto in peso delle foglie rispetto alla pianta. Inoltre, a causa delle scarse concentrazioni di glicosidi steviolici presenti nel tessuto del gambo (< 5 mg/g), sono preferibili alti rapporti di foglie rispetto ai fusti. Cresce a circa 50-60 cm di altezza dal suolo (Brandle e Rosa, 1992; Lester, 1999), fino a raggiungere un massimo di 120 cm (Dwivedi, 1999).

Le radici sono fibrose, affusolate e perenni, e formano ceppi consistenti (Figura 1) (Schmeling, 1967), ma difficilmente tendono a ramificare andando in profondità, insediandosi perciò solo nella parte superiore del terreno. Lo stesso Sunk (come citato da Taiariol, 2004) sostiene che le radici più sottili si concentrano nella parte superficiale del terreno, mentre quelle più spesse nella parte più profonda.

I fusti sono una struttura che si rinnova annualmente, semi-legnosa, con tendenza a flettersi, più o meno ricoperti di peluria. (Sakaguchi e Kan, 1982).

Le foglie sono piccole, lanceolate, oblunghe, e dentellate (Dwivedi). La disposizione fogliare, lungo i germogli, ha andamento alternato (Figura 2). I primi organi fotosintetici, di forma arrotondata, si formano subito dopo la germinazione e corrispondono ai due cotiledoni. La pianta ha un habitus vegetativo erbaceo, con fiori collocati sugli apici di germogli indeterminati.

I fiori di stevia sono auto-incompatibili (Chalapathi *et al.*, 1997b; Miyagawa *et al.*, 1986), e probabilmente l'impollinazione avviene per via entomofila (Oddone, 1997). I fiori sono piccoli e bianchi (Dwivedi, 1999) e presentano una gola viola pallido. I piccoli fiori risultano perfetti e sono collocati in piccoli corimbi composti da due fino a sei fiorellini (Figura 3). I corimbi, a loro volta, sono raggruppati in formazioni a pannocchia (Goettemoller e Ching, 1999). I fiori impiegano più di un mese a schiudersi (Taiariol, 2004).

I semi sono contenuti in particolari frutti indeiescenti, detti acheni, di circa 3 mm di lunghezza: ogni achenio è dotato di pappo composto di circa venti setole (Ramesh *et al.*, 2006). In natura, la stevia si riproduce principalmente mediante impollinazione anemofila, sebbene la vitalità dei semi sia molto scarsa e variabile (Lester, 1999); non a caso i semi hanno un bassissimo contenuto di endosperma in modo tale da facilitarne la dispersione nel vento tramite il pappo (Figura 4).

Il tempo che intercorre dalla semina alla germinazione del seme è correlato alla temperatura, dove i 24° C sono considerati ottimali per la germinazione dei semi (Goettemoeller e Ching, 1999).

I vari organi della pianta contengono differenti quantità di glicosidi steviolici, il cui contenuto decresce nell'ordine: foglie, fiori, gambi, semi e radici, queste ultime prive di steviosidi. La dolcezza delle foglie risulta

essere due volte superiore a quella relativa all'infiorescenza (Dwivedi, 1999). Le diverse concentrazioni di stevioside nei differenti organi della pianta hanno fatto ipotizzare a Metievier e Viana (1979a) che lo stevioside potrebbe fungere da protettore delle parti aeree della pianta rendendola così inappetibile ai predatori erbivori.

Il contenuto massimo di steviosidi è stato rilevato nei germogli più giovani e nelle aree con intensa attività di crescita, mentre un minor quantitativo di tali componenti è stato osservato nelle parti più senescenti dei germogli stessi. Inoltre, durante l'ontogenesi è stato riscontrato un graduale aumento della concentrazione di stevioside nelle foglie mature e nei fusti, ma questo processo è durato soltanto nel lasso di tempo compreso fra il germogliamento e l'insorgenza della fioritura (Bondarev *et al.*, 2003).

La stevia è stata coltivata con successo nelle più disparate aree geografiche nel mondo sebbene sia originaria delle regioni nord-orientali degli altipiani del Paraguay, alle latitudini di 23° - 24° Sud (Shock, 1982) e alla longitudine di 54° - 56° Est (Alvarez, 1984; Bertonha *et al.*, 1984; Monteiro, 1986): è proprio l'estrema versatilità della suddetta pianta a conferirle importanza. La stevia è coltivata come coltura perenne nelle regioni subtropicali, comprese alcune parti degli Stati Uniti, mentre viene coltivata come coltura annuale nelle Regioni ad alta latitudine (Goettemoeller e Ching, 1999). I risultati indicano che il rendimento agronomico dipende principalmente dai caratteri genetici della pianta e di conseguenza dall'espressione fenotipica, che in definitiva è governata da fattori climatici e ambientali (Ermakov e Kotechetov, 1996; Metivier e Viana, 1979a). Inoltre, in molte piante, la sintesi dei terpeni è sempre governata geneticamente (Guenther, 1949; Krupski e Fischer, 1950; Langston e Leopold, 1954).

Così come la maggior parte delle piante, la crescita e la fioritura della stevia sono garantite da radiazione solare, lunghezza del giorno,

temperatura, acqua tellurica e vento. Già nel 1976 la variazione stagionale nel contenuto di stevioside è stata studiata da Chen e colleghi (1978). A detta di Tateo e colleghi (1999) i fattori ambientali e quelli agronomici hanno maggiore influenza sulla produzione di stevioside rispetto al fattore di crescita. Per la coltivazione della stevia il clima ideale potrebbe essere considerato quello subtropicale semi-umido, con temperature che vanno da -6°C a 43°C con una media di 23°C (Brandle e Rosa, 1992).

Bertoni (1905) aveva descritto l'area di distribuzione della stevia tra 22° 30' - 25° 30' latitudine Sud e tra 55° - 57° longitudine Ovest, mentre Sunk (1975) la descrisse più precisamente tra 22° - 24° latitudine Sud e 55° - 56° longitudine Ovest, rispettivamente, all'interno di altitudini corrispondenti a 200 - 700 m.

La stevia è altamente sensibile alla lunghezza del giorno e richiede 12-16 ore di luce solare. Ciò ha indotto molti ricercatori ad esaminare l'effetto della lunghezza del dì e della notte e della variazione di temperatura sulla coltivazione e sui livelli di stevioside presenti (Kudo, 1974; Metivier e Viana, 1979a; Mizukami *et al.*, 1983; Valio e Rocha, 1966; Viana, 1981). Risultati sperimentali hanno evidenziato che le piante mantenute in condizioni di “giorno lungo” hanno internodi lunghi e un singolo e robusto fusto principale, che sostiene orizzontalmente foglie ovali; inoltre, nelle medesime condizioni, si è avvertita una certa influenza sulla fioritura delle piante. Indagini precise in relazione alla lunghezza del giorno e al tempo richiesto per la fioritura sono state effettuate da Kudo (1974), il quale ha riportato che la fioritura si è verificata dopo quarantasei giorni dalla semina, ognuno dei quali avente undici ore di luce, mentre si è verificata in media dopo ben novantasei giorni quando le ore di luce al dì erano ridotte a dodici e mezzo. La pianta fiorisce con otto, dieci, dodici e tredici ore di fotoperiodo, anche se la più alta percentuale di fioritura avviene con il fotoperiodo di tredici ore. Questo ha portato i ricercatori a credere che la

stevia sia un'obbligata brevi-diurna (Lester, 1999) con una lunghezza critica del giorno di circa tredici ore.

Poiché la sintesi dei glicosidi viene ridotta al momento della fioritura o poco prima, quando la fioritura avviene in condizioni di lungo fotoperiodo, si verifica una maggior produzione di glicosidi. Di conseguenza, la produzione di stevia si è rivelata più adatta ad ambienti esposti alla luce naturale per molte ore al giorno, laddove la crescita vegetativa è più lunga e quindi i contenuti di steviosidi glicolici sono più alti. Oltre al semplice incremento in resa della foglia, è aumentata del 50% anche la concentrazione di stevioside rispetto alle piante cresciute con una bassa esposizione solare (Métivier e Viana, 1979a).

Nel suo habitat nativo, le piante di stevia iniziano la fioritura nel periodo compreso fra gennaio e marzo, che corrisponde al periodo compreso fra luglio e settembre nell'emisfero settentrionale. Le fioriture successive alla prima avvengono in rapida successione e si sviluppano sempre meno man mano che ci si avvicina all'inverno (Shock, 1982); anche la radicazione delle talee dipende dalla lunghezza del giorno, infatti Zubenko e colleghi (1991) hanno registrato una migliore radicazione e crescita di talee realizzate ad aprile rispetto a quelle realizzate a febbraio a causa della maggiore lunghezza (e intensità) delle ore di luce. Nel caso in cui la stevia cresca ad una temperatura di circa 25° C, in condizioni continue di fotoperiodo a 16 ore al dì, questa è destinata a rimanere in una fase vegetativa indeterminata (Monteiro *et al.*, 2001). La correlazione tra la pianta di stevia e il fotoperiodo risulta quindi evidente: così come i giorni corti favoriscono la fioritura, i giorni lunghi favoriscono la resa in biomassa (Parsons, 2003). La conclusione dei ricercatori in merito all'influenza del fotoperiodo sulla pianta tende a dimostrare che la coltivazione nelle zone temperate, sotto lunghe giornate estive, sarebbe l'ideale per ottenere alti

rendimenti di stevioside anche se la produzione di semi risulterebbe difficoltosa (Shock, 1982).

La stevia è una pianta amante del sole dato che origina da un ambiente caldo, umido e con clima soleggiato (Jia, 1984). Nel suo habitat naturale la stevia cresce insieme ad erbe alte, e quindi in penombra, di conseguenza la produttività è scarsa. Slamet e Tahardi (1988) hanno confermato che l'ombra riduce il tasso di crescita e di fioritura; inoltre, una riduzione del 60% di luce ritarda la fioritura (diminuendo la percentuale di piante fiorite) e la produzione di biomassa vegetale.

È stato riscontrato che la temperatura influisce sulla disponibilità di nutrienti del suolo, sulla germinazione e sulla crescita della pianta e dei germogli, sulla sopravvivenza invernale, sulla fotosintesi e sulla respirazione della pianta. Secondo Sumida (1980) e come citato da Sakaguchi e Kan nel 1982, l'intervallo di temperatura ottimale per la crescita della stevia è 15-30° C, anche se la pianta può tollerare una temperatura critica di 0-2° C. Tuttavia, gli stessi autori hanno individuato come limite di temperatura assoluto i -3 °C. Mizukami e colleghi (1983) affermano che la variazione di temperatura tra notte e giorno è un altro fattore determinante per la produzione di stevioside e che le piante cresciute meglio e con una maggior resa di stevioside sono quelle sottoposte ad un regime di 25 °C di giorno e 20 °C di notte.

La presenza della stevia in natura, in suoli acidi, poco fertili, sabbiosi, o in terreni pesanti con ampia ritenuta idrica è conforme alle osservazioni relative alla produttività della pianta coltivata (Shock, 1982). La medesima può essere coltivata in una vasta gamma di terreni, tuttavia, avendo scarsa tolleranza alla salinità, non dovrebbe essere coltivata in terreni salini (Chalapathi *et al.*, 1997b).

La tipologia di terreno più adatta alla coltivazione della stevia è quella avente un rifornimento di umidità e drenaggio adeguato. Ciò si verifica, in

natura, in zone come i bordi delle pianure fertili dell'Argentina (pampe) e delle praterie (Lester, 1999); può altresì crescere anche nelle praterie e nei boschi della macchia mediterranea o ancora sulle aree alpine (Commissione Europea, 1999).

1.3 Aspetti qualitativi e nutrizionali

In Tabella 1 sono riportati studi effettuati sulle foglie di stevia (Wölwer-Rieck, 2012) e di seguito si riporta una descrizione delle principali classi di composti presenti nella pianta.

Glicosidi steviolici

Nel 2004 il JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) ha stabilito che il nome comune da attribuire alle componenti dolcificanti della stevia dovrebbe essere quello di *glicosidi steviolici*, che comprendono dieci diversi glicosidi tra cui lo stevioside e il rebaudioside A, che corrispondono a più del 70% dei glicosidi presenti nelle foglie di stevia (Rank e Midmore, 2006).

Per l'uso commerciale sotto forma di alimento, le foglie di stevia non hanno una valenza particolare, ma risulta essere molto più importante il purificato di glicosidi steviolici che se ne ricava, con una purezza superiore al 95% (Wolwer-Rieck, 2012). L'apporto totale dei glicosidi steviolici ammonta al 8-10% del peso secco della foglia (Rank e Midmore, 2006).

La dolcezza della stevia è dunque attribuibile alla presenza dei glicosidi, che sono dei composti solubili in acqua (Duca e deCellier, 1993; Lester, 1999), con un potere edulcorante circa trecento volte maggiore dello

zucchero di canna (Métivier e Viana, 1979b); essi vengono ottenuti chimicamente dalla reazione di un monosaccaride (emiacetale ciclico) con un alcol. Le foglie di stevia contengono una miscela di almeno otto diversi glicosidi diterpenici tetraciclici (Brandle *et al.*, 1998) quali: stevioside, rebaudioside A, rebaudioside B, rebaudioside C, rebaudioside D e rebaudioside E, dulcoside A e steviolbioside, i cui poteri dolcificanti sono rispettivamente 250-300 volte, 350-450 volte, 300-350 volte, 50-120 volte, 200-300 volte, 250-300 volte, 50-120 volte e 100-125 volte superiori al saccarosio (Crammer e Ikan, 1986). Altri glicosidi steviolici sono steviolbioside 2, rebaudioside A4, rebaudioside B5, rebaudioside C6, rebaudioside D7, rebaudioside E8, rebaudioside F9 e dulcoside A10, presenti in bassa concentrazione (Kennely, 2002; Starrat *et al.*, 2002).

I glicosidi (Figura 5 e 6) condividono la struttura base dello steviolo e si differenziano per i sostituenti in posizione C13 e C19 (Shibata *et al.*, 1995). I componenti principali sono lo stevioside (5-10 % peso secco), il rebaudioside A (2-4 %), il rebaudioside C (1-2 %) e il dulcoside A (0.4–0.7 %) (Wood *et al.*, 1955).

Lo stevioside ha un retrogusto leggermente amaro, simile alla liquirizia, mentre il rebaudioside A possiede una minore astringenza [e un gusto più puro] (Pol *et al.*, 2007). Poiché, nelle varietà native, lo stevioside costituisce solitamente il 60% del totale dei glicosidi, mentre il rebaudioside A il 30%, si ottiene un effetto complessivo sul gusto che porta nelle stesse un retrogusto di liquirizia (Rank e Midmore, 2006).

Ci possono essere notevoli variazioni nel contenuto di rebaudioside A nelle singole piante, e per questo è stata intrapresa con successo una selezione atta a generare piante con un maggior contenuto di tale composto [e quindi un miglior gusto], con conseguente rilascio di varietà “migliorate” (Rank e Midmore, 2006). La selezione di varietà ad alto contenuto di rebaudioside

A e la rallentata tendenza a fiorire consente di ottenere in definitiva produttività e redditività più elevate (Rank e Midmore, 2006).

La qualità del prodotto finito, ovvero l'estratto di glicosidi steviolici, richiede due caratteristiche fondamentali: purezza e assenza di agenti contaminanti; tali requisiti sono in gran parte determinati dall'igiene e dal metodo di trasformazione legato alla varietà di glicosidi presenti. I livelli di purezza delle polveri in commercio di glicosidi steviolici variano dall'80% al 95%. La qualità del potere dolcificante varierà sia per la composizione glicosidica contenuta nelle foglie, sia per i metodi di estrazione dei glicosidi (Rank e Midmore, 2006).

La qualità del sapore è generalmente espressa in base alla percentuale di rebaudioside A: più è alta, migliore è la qualità; dove la percentuale di rebaudioside A è superiore al 50% la qualità viene definita *enhanced quality* mentre laddove essa sia superiore all'80% viene definita *premium quality*. Con la tecnologia moderna di estrazione e l'uso di cristallizzazione piuttosto che di atomizzazione, è stato possibile raggiungere livelli di elevata purezza (Rank e Midmore, 2006). Ci sono alternative possibili per migliorare la qualità del gusto: mediante una lavorazione tecnologica più complessa oppure tramite miglioramento genetico e selezione della pianta: un certo numero di industrie utilizza una vasta gamma di procedure di lavorazione per migliorare il gusto del prodotto aumentando il livello di rebaudioside a rispetto allo stevioside. Queste lavorazioni possono includere varie separazioni o modificazioni enzimatiche dello stevioside producendo rebaudioside a o un glicoside con sapore simile (Lobov *et al.*, 1991; Kitahata *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1994). D’altro canto, il miglioramento genetico e la selezione della pianta, spesso sponsorizzati dalle aziende, sono stati attuati per molti anni per aumentare il contenuto totale di glicosidi steviolici (dal 10% al 15% o più) e soprattutto il

contenuto di rebaudioside A (dal 4% al 10% o più) (Rank e Midmore, 2006).

Il principale processo di trasformazione primaria della stevia è effettuato in Paesi come Cina, Giappone, Corea, Brasile o Paraguay, dove le fabbriche si trovano nei pressi delle aree di crescita originale (Rank e Midmore, 2006). Il principio della trasformazione tecnologica è piuttosto semplice: vengono immerse le foglie in acqua calda per estrarre i glicosidi, poi viene filtrata la soluzione e fatta evaporare per produrre una polvere bianca (o micro cristalli) che è 250-300 volte più dolcificante dello zucchero (Rank e Midmore, 2006). Si riporta di seguito il processo più comune di estrazione dei glicosidi steviolici:

* estrazione con acqua calda o in bollitura
* filtraggio (spesso dopo l'aggiunta di un agente di precipitazione)
* concentrazione mediante evaporazione sottovuoto
* utilizzo di resina di scambio per separare i glicosidi in frazioni ad alto e basso contenuto di rebaudioside A
* purificazione mediante scambio ionico
* evaporazione e atomizzazione o, meno frequentemente, cristallizzazione per convertire l'estratto in polvere/cristalli (Rank e Midmore, 2006).

In seguito della richiesta della Commissione europea (EFSA, 2010), è stato chiesto ad esperti scientifici sugli additivi alimentari e sulle fonti di nutrienti aggiunte agli alimenti (ANS), di esprimere un parere scientifico sulla sicurezza dei glicosidi steviolici utilizzati come dolcificanti in determinati alimenti. La JECFA, una volta esaminata la sicurezza dei glicosidi steviolici (nel 2000, 2005, 2006, 2007 e 2009) ne ha stabilito una DGA (dose giornaliera accettabile; espressa in equivalenti di glicosidi) di 4 mg kg^{-1} di peso corporeo.

Studi metabolici sui glicosidi steviolici negli animali e negli esseri umani hanno dimostrato che questi composti sono scarsamente assorbiti dopo l'assunzione orale: essi sono idrolizzati dalla microflora del colon, dove una parte viene assorbita, mentre il resto viene escreto nelle feci. In particolare, per merito dell'idrolizzazione dello stevioside vengono prodotti altri glicosidi steviolici e glucosio (Wingard *et al.*, 1980; Hutapea *et al.*, 1997; Koyama *et al.*, 2003a); è improbabile poi che lo stevioside in quanto tale sia assorbito dall'intestino, essendo un glicoside diterpene idrofilo con un peso molecolare relativamente elevato (Chatsudthipong e Muanprasat, 2008). Nel fegato i glicosidi reagiscono con l'acido glucuronico formando coniugati glucuronidati (EFSA, 2010): questi, sono gli unici metaboliti rilevabili nell'urina di chi ha ingerito i glicosidi steviolici (EFSA, 2010).

Non c'è nessuna prova di controindicazioni sulla salute umana in oltre 1500 anni di uso continuo da parte dei paraguaiani; in Giappone (il più grande mercato di consumo della stevia), non ci sono state segnalazioni di effetti collaterali (Ramesh et. Al, 2006). Una discussione più dettagliata su biosintesi, tossicità, metabolismo e implicazioni nutrizionali dello stevioside è stata affrontata da Geuns (2003), il quale ha concluso che la maggior parte degli esiti sulle prove di tossicità eseguite sullo stevioside sono risultate negative e che l'uso dello stevioside purificato come additivo alimentare appare preferibile, rispetto allo zucchero comune, dal punto di vista della sicurezza pubblica (EFSA, 2010). Infatti, l'eccessivo consumo di saccarosio può provocare malnutrizione e patologie, come l'obesità, la carie dentale e il diabete (Levine *et al.*, 2003) e, per questo motivo, è stata rivolta una sempre maggior attenzione alla ricerca di sostituti poco calorici, come lo stevioside in questione (Ramesh *et al.*, 2006). La conclusione è quindi che la stevia e lo stevioside sono sicuri nel momento in cui vengono utilizzati come dolcificanti. A supportare queste evidenze, i risultati di

molti studi tossicologici dimostrano che i glicosidi steviolici non sono né genotossici né cancerogeni (EFSA, 2010).

Alcuni studi hanno dimostrato inoltre che, nello specifico, lo stevioside possiede anche proprietà terapeutiche. Alcuni di questi benefici riscontrati sono: attività anti-iperglicemica, anti-ipertensiva, anti-infiammatora, anti-tumorale, anti-diarroica, diuretica e azione immunomodulatoria (Chatsudthipong e Mutanprasat, 2008). È interessante notare che gli effetti di questi composti sul livello di glucosio ematico e sulla pressione sanguigna si osservano solo quando questi parametri di assunzione sono superiori alla norma; lo stevioside e i composti correlati influenzano il livello di glucosio nel plasma tramite la modulazione della secrezione di insulina e la sensibilità alla stessa, favorendo la rimozione di glucosio dal plasma. Essi inibiscono inoltre l'assorbimento intestinale del glucosio e la generazione di glucosio dal fegato alterando l'attività di alcuni enzimi chiave coinvolti nella sintesi del glucosio. In aggiunta, lo stevioside ha un effetto inibente sulla contrazione del muscolo liscio intestinale, stimolazione che provocherebbe dissenteria dovuta all'ipermotilità associata (Chatsudthipong e Muanprasat, 2008).

Composti fenolici

I composti fenolici delle piante rappresentano un gruppo chimicamente eterogeneo: a seconda della loro diversità chimica, questi rivestono ruoli differenti nella pianta. Per esempio, alcuni servono come difesa contro erbivori e patogeni, altri come sostegno meccanico, come fonte di attrazione per i pronubi impollinatori e per la dispersione del frutto, o in ultimo come inibitori di crescita nei confronti di piante che competono per spazio e nutrienti (Taiz e Zeiger, 2002).

Riguardo alla funzione che possono svolgere nell'alimentazione umana, i composti fenolici assumono attivamente un'azione antiossidante (Duh et al., 1999), e per questo motivo rivestono un ruolo importante nella prevenzione del cancro e di malattie cardiache (Kahkonen *et al.*, 1999). L'interesse verso i composti fenolici inoltre si è rivelato crescente anche nell'industria alimentare, poiché questi composti rallenterebbero la degradazione ossidativa dei lipidi, migliorando di conseguenza la qualità e il valore nutrizionale degli alimenti (Aneta, Jan & Renata, 2007). Il contenuto totale di fenoli in stevia, nell'estratto di foglie secche, è risultato essere di 130,67 μg (in equivalenti di catechina) (Il-Suk *et al.*, 2011).

Ai composti fenolici appartiene l'ampio gruppo dei flavonoidi: il contenuto totale di questi nella stevia ammonta a 15,64 μg (in equivalenti di quercetina) (Il-Suk *et al.*, 2011).

Un'altra classe di composti fenolici presenti in stevia sono gli acidi fenolici, e tra questi l'acido pirogallico (pirogallolo) è risultato essere il componente principale con 951.27 mg 100 g^{-1}, seguito da acido 4-metossibenzoico (33,80 mg 100 g^{-1}), acido p-cumarico (30,47 mg 100 g^{-1}), 4-metilcatecolo (25,61 mg 100 g^{-1}), acido sinapico (9,03 mg 100 g^{-1}) e acido cinnamico (2,42 mg 100 g^{-1}) (Il-Suk *et al.*, 2011). L'acido clorogenico totale presente nelle foglie secche, invece, è risultato essere 37.0 mg 100 g^{-1} (Wölwer-Rieck, 2012). Karaköse (2011) ha rilevato ventiquattro derivati dell'acido clorogenico, ventitré dei quali riscontrati per la prima volta in stevia *rebaudiana.*

Vitamine idrosolubili

Le vitamine sono delle componenti essenziali per la salute umana essendo composti biologicamente attivi che fungono da agenti di controllo sulla

salute e sulla crescita di un organismo; vengono classificate secondo due categorie: idrosolubili e liposolubili.

I principali composti vitaminici idrosolubili presenti nella stevia sono l'acido folico (vitamina B9), con quantitativi di 52,2 mg 100 g^{-1}, l'acido ascorbico (vitamina C) (15 mg 100 g^{-1} p.s.) e la vitamina B2 (0,43 mg 100 g^{-1} p.s.) (Wölwer-Rieck, 2012).

Zuccheri semplici

I più comuni monosaccaridi delle piante come glucosio e fruttosio, sono normalmente presenti nella stevia ma con quantitativi piuttosto bassi (Wölwer-Rieck, 2012). Non a caso, il motivo per cui le foglie di stevia possono considerarsi non caloriche, nonostante l'intenso potere dolcificante, è proprio per il ridotto contenuto in zuccheri semplici.

Lipidi

La frazione lipidica (Tabella 2) è ricca in acidi grassi insaturi come l'acido linoleico e l'acido linolenico: in particolare l'acido linolenico risulta utile per equilibrare il rapporto di acidi grassi nella dieta umana (Tadhani e Subhash, 2006).

Sali minerali e acidi organici

L'alto contenuto di ceneri indica che le foglie di stevia rappresentano una buona fonte di minerali inorganici (Tadhani e Subhash, 2006). Quantità discrete di potassio, calcio, magnesio, fosforo, sodio e zolfo (molto importanti dal punto di vista nutrizionale) sono state trovate all'interno della foglia (Tadhani e Subhash, 2006): nello specifico, il minerale maggiormente presente è il potassio, seguito dal calcio (Wölwer-Rieck, 2012). Questi elementi inorganici svolgono un ruolo importante nel mantenimento della normale tolleranza al glucosio e nel rilascio di insulina dalle cellule beta contenute nelle isole di Langerhans del pancreas (Choudhary e Bandypadhysy, 1999). Selenio, zinco e manganese sono considerati, a loro volta, dei micro-nutrienti antiossidanti (Tona *et al.*, 1989) e la loro presenza potrebbe pertanto stimolare il sistema immunitario (Jimoh e Oladiji, 2005) nella prevenzione di malattie causate dai radicali liberi.

Il ferro è un elemento essenziale per la sintesi dell'emoglobina: l'alta quantità di ferro nelle foglie di stevia è utile al mantenimento del normale livello di emoglobina nel corpo, oltre che a contrastare l'anemia da carenza di ferro, considerata un grande disturbo nutrizionale nei Paesi in via di sviluppo (Tadhani e Subhash, 2006).

Fra gli acidi organici invece, la presenza dell'acido ossalico, dato il suo elevato contenuto (2,3 g 100 g^{-1}), potrebbe risultare indesiderata in quanto renderebbe il composto nocivo per la salute umana. Un termine di paragone utile a valutare questo dato è rappresentato dagli spinaci, anch'essi rinomati per possedere un alto contenuto di acido ossalico: infatti, in media, contengono un quantitativo variabile da 0.12 g 100 g^{-1} a 1.3 g 100 g^{-1} (Wölwer-Rieck, 2012).

1.4 Tecniche colturali

In generale, la germinazione dei semi rappresenta una problematica per la stevia (Felippe e Lucas, 1971; Randi, 1980; Randi e Felippe, 1981; Rocha e Valio, 1972). Ad esempio, seminare in periodi freddi comporta una scarsa germinazione (Shock, 1982). Alvarez e colleghi (1994) hanno dimostrato che non è possibile seminare subito dopo il raccolto concludendo che i semi dovrebbero essere tenuti in contenitori sigillati in frigorifero a 4° C, poiché se conservati a temperatura ambiente perderebbero di vitalità. In aggiunta, alcuni studi indicano che la germinazione risulta più efficace ad una temperatura di 25° C (Felippe e Randi, 1984; Randi e Felippe, 1981), e a questa temperatura si ottiene il 63,2% della massima germinazione (90,03%), verificatasi dopo 101,4 ore (Takahashi *et al.*, 1996). Non è stato segnalato nessun trattamento per la vitalità dei semi atto a migliorarne la germinabilità (Ramesh *et al.*, 2006).

La stevia viene coltivata a partire da semi o talee (Figg. 7 e 8); i semi vengono fatti germinare in serra in primavera e le piantine, di sei/sette settimane, vengono trapiantate in campo (Lester, 1999). Alle latitudini temperate, il ciclo di produzione per le colture annuali inizia con piante di sei/sette settimane, coltivate da seme.

La coltivazione della stevia inizia solitamente mediante l'utilizzo di talee, che radicano piuttosto facilmente ma richiedono un alto input di lavoro; infatti, la scarsa germinabilità dei semi è uno dei fattori che limita l'utilizzo degli stessi su larga scala. La radicazione di talee si è dimostrata molto efficiente: infatti, Gvasaliya *et al.* (1990) hanno segnalato che nel caso di talee prese nello stesso anno e dalle ascelle delle foglie, si è ottenuto un livello di radicazione variabile fra il 98% e il 100%. Secondo Tirtoboma (1988), la migliore radicazione è avvenuta con talee ottenute dai germogli laterali (96.7%) e dagli apici dei germogli principali (92,3%), soprattutto se

prelevate dalla parte dell'asse superiore ai quattro internodi. È stato osservato che la percentuale di radicazione è influenzata anche dalla stagione e dalla quantità di foglie sulle talee: le talee con quattro paia di foglie hanno dimostrato di radicare scarsamente, sopratutto nel mese di febbraio; nello stesso mese invece, le talee con due paia di foglie hanno radicato meglio, mentre hanno radicato meglio ancora quelle con tre paia di foglie, ma nel mese di aprile (Zubenko *et al.*, 1991). L'utilizzo di talee di 15 cm ha dato una percentuale di germogliamento significativamente maggiore (con germogli e radici migliori) rispetto a talee di circa 7.5 cm, mentre il trapianto diretto di talee in campo ha riscontrato un successo limitato (Chalapathi *et al.*, 1999c, 2001). La crescita delle piante e il contenuto di stevioside nelle foglie coltivate da talee sono risultati più uniformi rispetto alle piante coltivate dai semi; inoltre, il numero di radici rispetto alla biomassa e al contenuto di stevioside è risultato superiore nelle piante ottenute tramite propagazione vegetativa (Truong e Valicek, 1999).

La produzione di semi, nelle condizioni naturali, è spesso limitata per una qualità molto scarsa dei medesimi (bassa germinazione, inferiore al 50%). D'altra parte, quando l'attenzione è rivolta alla produzione di sementi di alta qualità, si possono ottenere alte rese di produzione e una buona qualità (superiore all'80% di germinazione). I semi maturano progressivamente e con la maturazione cadono, dunque si rende necessaria una raccolta frequente dei semi per ottenere buone rese. Alcuni specialisti della produzione di semi in Cina, riescono a produrre semi che ammontano ad oltre 200 kg/ha. Poiché i semi sono molto piccoli (1.5-2 milioni per kg), [durante la fase di semina è possibile utilizzarne un elevato numero] e ciò comporta una maggiore resa di produzione (Rank e Midmore, 2006). Siccome la stevia è una specie con elevata eterozigosi, la variabilità genetica intraspecie risulta essere elevata, perciò è richiesta una costante riselezione dei semi madre. I semi mantengono una buona germinazione

per un limitato periodo (6-12 mesi) se stoccati a 4° C e non possono essere conservati per periodi superiori (Rank e Midmore, 2006). Tassi di germinazione molto scarsi mostrano anche la tendenza ad una produzione di piantine con scarsa sopravvivenza alle dimensioni di trapianto. É stato dimostrato che sono richiesti un controllo di temperatura (24-25°C) e di umidità in condizioni protette, per due settimane, per ottenere alti tassi di germinazione; inoltre, la crescita delle piantine per il primo mese è estremamente lenta e richiede una buona cura oltre che igiene, per prevenirne la morte in tale periodo. Questa bassa germinazione unita ad una lenta crescita iniziale non rendono fattibile la semina diretta in campo delle sementi (Rank e Midmore, 2006).

È possibile ottenere una resa in seme fino a 8,1 kg/ha (Carneiro, 1990). Tuttavia, le esigenze climatiche, di lunghezza del giorno e di temperatura, sono inversamente proporzionali alla massima produzione vegetativa rispetto alla massima fioritura e produzione di sementi (Hoyle, 1992): infatti, il raccolto viene effettuato nel momento della fioritura in condizioni di "giorno lungo". Le condizioni ambientali però non sono l'unico fattore che determina e regola la produzione di semi, ma è necessario fornire anche un apporto maggiore di nutrienti. Per poter produrre efficacemente semi nell'emisfero settentrionale sarebbe opportuno effettuare tale produzione in territori compresi fra 20° e 30° latitudine Nord.

Le piantine potrebbero essere trapiantate in campo a febbraio-marzo in modo tale da poter raccogliere i semi in tarda estate. I semi di stevia hanno un peso standard che si aggira tra gli 0.15-0.30g (Brandle *et al.*, 1998) e gli 0.30-0.50g alle condizioni di Palampur (Ramesh, comunicazione personale). Il trapianto effettuato ad inizio primavera sembra essere l'opzione migliore in quanto le piantine risultano essere maggiormente produttive, specialmente laddove possono svilupparsi il prima possibile (Lee *et al.*, 1979). In particolare, nell'emisfero settentrionale, il trapianto

viene effettuato nella metà di maggio (Brandle *et al.*, 1998). In base a considerazioni empiriche però, sono diversi i fattori e le situazioni agricole locali che determinano il tempo di trapianto. In breve, una buona cura delle piantine effettuata durante l'inverno, in condizioni protette, offre una soluzione affidabile affinché il trapianto possa essere effettuato nella primavera successiva (Ramesh *et al.*, 2006).

La densità di piantagione è un parametro determinato dallo spazio occupato dalla parte aerea della coltura senza interferire con lo sviluppo delle piante adiacenti. Va considerato però che esso è un parametro che può variare a seconda delle condizioni ambientali (Ramesh *et al.*, 2006). Lee e colleghi (1980) hanno segnalato che l'altezza della pianta, il numero di rami e il numero di nodi sono influenzati negativamente dalla densità d'impianto, e la resa in foglia secca per pianta diminuisce all'aumentare della densità; in conformità con questi dati, Donalisio e colleghi (1982) hanno raccomandato una densità di piantagione di 80.000-100.000 piante per ettaro. Non a caso, una densità di piantagione di 70.000-80.000 per ettaro è ritenuta essere il minimo indispensabile per ottenere rendimenti ragionevoli. Densità superiori favoriscono il controllo delle malerbe ma i costi di produzione per ettaro aumentano (Rank e Midmore, 2006). Nel caso in cui la sistemazione in campo della pianta venga effettuata in piano, [cioè senza sopraelevazione su porche], sarà necessario un sesto d'impianto di interfila di 35-50 cm e intrafila di 20-25 cm. Il sesto finale sarà inoltre determinato dalla dimensione degli organi locomotori dei macchinari utilizzati (Rank e Midmore). Il rendimento massimo, in Abkhazia, è stato ottenuto con un sesto d'impianto a 70 x 25 cm, (Gvasaliya *et al.*, 1990), ma è un parametro che può variare in base alle diverse zone e condizioni climatiche.

In generale, i fabbisogni nutrizionali della pianta di stevia variano da bassi a moderati (Goenadi, 1987) poiché si adatta bene a terreni di scarsa qualità,

come nel suo habitat naturale in Paraguay. Tuttavia, i sintomi più evidenti che rispecchiano deficit nutrizionali sono: ingiallimento delle foglie per carenza di azoto, foglie pigmentate verde scuro per carenza di fosforo, e foglie clorotiche e screziate per carenza di potassio; sintomi invece dovuti a carenze di elementi nutritivi secondari possono essere: necrosi apicale, clorosi, foglie piccole e pallide, rispettivamente per carenza di calcio, magnesio e zolfo (Utumi *et al.*, 1999). Relativamente al fabbisogno di macro-nutrienti, alcune ricerche effettuate in Giappone hanno dimostrato che, al momento massimo di accumulo di sostanza secca, la stevia si componeva per l'1,4% di azoto, lo 0,3% di fosforo e il 2,4% di potassio (Katayama *et al.*, 1976). Un apporto di azoto è risultato fondamentale (Kawatani *et al.*, 1977) in quanto induce ad un aumento della crescita, dello spessore del fusto e del numero di rami. In media una coltura richiederebbe all'incirca 105 kg di azoto, 23 kg di fosforo e 180 kg di potassio per ottenere una resa di biomassa moderata pari a 7500 kg Ha^{-1}, in condizioni ambientali canadesi (Brandle *et al.*, 1998), suggerendo così l'importanza che riveste un'adeguata fertilizzazione. Deficit di azoto, potassio e magnesio riducono la crescita vegetativa della foglia, e in definitiva determinano una riduzione del valore di mercato della pianta. Le carenze di azoto, fosforo, potassio e zolfo diminuiscono la resa in peso secco della pianta, riducendo il rapporto germogli-radici, mentre la carenza di magnesio aumenta la resa stessa. Inoltre, la richiesta nutrizionale per la produzione di semi è risultata sicuramente maggiore rispetto alla produzione di sola foglia, che necessita di: 130 kg di azoto, 18,8 kg di fosforo, 131,5 kg di potassio, 43,7 kg di calcio, 8.3kg di magnesio e 9,7 kg di zolfo per una resa di 1 tonnellata (Son *et al.*, 1997). Per quanto concerne i micronutrienti, sembra esserci una scarsa richiesta degli stessi. Infatti, poiché la stevia predilige terreni acidi con pH basso, questa stessa condizione assicura un'adeguata disponibilità di micronutrienti. Risulta

quindi evidente che, se si effettua una coltivazione a scopo di reddito, è necessario effettuare una concimazione adeguata (Donalisio *et al.*, 1982; Goenadi, 1985). Le richieste di fertilizzanti sono modeste, anche se non sono state avviate sperimentazioni di fertilizzazioni complete. Il quantitativo suggerito di NPK da utilizzare è 50:25:25, applicato in 2 o 3 interventi (Rank e Midmore, 2006).

Studi condotti in diverse parti del mondo hanno riscontrato una stretta correlazione tra apporto nutritivo e accumulo di glicosidi nella stevia (Ramesh *et al.*, 2006). Anche se il fabbisogno di micronutrienti è minore rispetto a quello relativo ai macronutrienti, alcuni esperimenti condotti con soluzioni nutritive, contenenti boro alla concentrazione di 5 ppm, hanno registrato un elevato contenuto di stevioside e rebaudioside (Sheu *et al.*, 1987). Tra gli elementi nutritivi secondari invece, l'unico ad aver causato una riduzione della concentrazione di glicoside è stato il calcio (Filho *et al.*, 1997b). Infine, è risultato che la carenza di potassio, calcio e zolfo e fosforo porta ad una diminuzione della concentrazione di stevioside (Utumi *et al.*, 1999).

La pianta dimostra scarsa tolleranza ad elevati valori di pH, pertanto essa non dovrebbe essere irrigata con acqua di scarsa qualità (Shock, 1982).

La conoscenza del fabbisogno idrico della coltura, nelle varie fasi di crescita, favorisce una maggiore resa delle colture oltre ad un utilizzo razionale della risorsa idrica. Nel suo habitat naturale, la stevia è presente in zone con tassi di umidità pressoché costanti, tuttavia non sottoposte ad inondazione prolungata: solitamente si tratta di siti aventi una falda sotterranea piuttosto alta o aventi terreno costantemente umido. La stevia non necessita di irrigazione frequente, sebbene preferisca un suolo umido, in quanto potrebbe andare incontro a stress da eccessiva bagnatura (Shock, 1982). Risulta evidente, però, che per coltivare la stevia a fini di lucro è necessario servirsi dell'irrigazione (Donalisio *et al.*, 1982). La pianta

sviluppatasi in un suolo avente un contenuto di acqua tellurica pari al 43-48%, ha rivelato un livello di crescita più che soddisfacente. Il fabbisogno idrico medio giornaliero è di 2,33 mm per pianta (Goenadi, 1983); la stevia richiede annaffiature generose dopo il trapianto in pieno campo nonché prima e dopo la raccolta delle foglie (Andolfi *et al.*, 2002). Possono essere effettuate diverse tipologie di irrigazione: per aspersione, tramite solco o tramite gocciolatoio; il gocciolatoio è preferibile poiché permette interventi irrigui più frequenti e con volumi più limitati e, inoltre, permette di non irrigare inutilmente l'interfila e le malerbe (Rank e Midmore, 2006). L'evapotraspirazione media delle colture (Ete) ammonta a 5,75 mm giorno, di conseguenza il consumo di acqua è risultato elevato durante l'intero ciclo e il valore del coefficiente di coltura (Kc) (rapporto tra l'Ete effettivo e l'Ete potenziale) è stato osservato oscillare tra valori di Kc pari a 1.45 da 0 a 25 giorni, 1.14 da 26 a 50 giorni e 1.16 da 51 a 80 giorni (Fronza e Folegatti 2003).

La stevia ha una scarsa capacità di competere con le malerbe durante il periodo iniziale di crescita, considerato il suo lento tasso di crescita nella suddetta fase (Shock, 1982), che favorirebbe l'insediamento e la competizione delle infestanti. Le malerbe rinvenute con maggior frequenza nelle colture di stevia sono risultate essere: Ageratum *houstonianum*, Borreria *alata*, Digitaria spp., Eleusine *indica*, Erechtites *valerifolia*, Erigeron *sumatrensis*, Galinsoga *parviflora* e Sida *rhombifolia* (Basuki, 1990). Sono state messe in atto determinate metodiche "naturali" per la gestione delle infestanti, come la scelta di un'elevata densità di coltura (200.000/ha) (Basuki, 1990), dimostrando che quest'ultima combinata con una pacciamatura (in plastica nera), ha fornito un'efficace controllo sulla proliferazione delle infestanti. Purtroppo, ad oggi, non vi sono ancora pubblicazioni scientifiche che riportino informazioni relative all'esistenza di erbicidi compatibili con la stevia (Ramesh *et al.*, 2006).

Thomas (2000) ha riscontrato la presenza di alcune malattie che colpiscono la stevia, come l'oidio (Erysiphe *cichoracearum* DC), la moria dei semenzali (Rhizoctonia *solani* Kuehn.) e il marciume del fusto (Sclerotium *dephinii* Welch.); la ricorrenza del marciume del fusto ha avuto una percentuale dello 0,1% nel campo di colture sito in Palampur, India (Megeji *et al.*, 2005). Altre due malattie fungine, come la Septoria *steviae* e la Sclerotinia *sclerotiorum* invece, sono state segnalate in alcune piante di stevia cresciute in Canada (Chang *et al.*, 1997; Lovering e Reeleeder, 1996; Reeleder, 1999). Riguardo invece agli attacchi di insetti, Thomas (2000) ha posto l'attenzione sulla presenza di afidi, cocciniglie, acari, ragnetti rossi e aleurodidi.

Il momento ottimale per effettuare la raccolta della stevia dipende dalla tipologia di cultivar e dalla stagione in cui essa viene coltivata. Le foglie sono raccolte all'incirca quattro mesi dopo il trapianto, tagliando le piante a circa 5-10 cm sopra il livello del terreno (Donalisio *et al.*, 1982). Questo deve avvenire, tuttavia, nel momento in cui risulta massima la biomassa della coltura, altrimenti è possibile ottenere un rendimento ridotto (Shuping e Shizhen, 1995). Poiché la coltura è altamente sensibile alle basse temperature, nelle zone fredde il raccolto può essere effettuato all'inizio dell'inverno o poco prima (Columbus, 1997). Durante e dopo la fioritura, lo stevioside decresce nelle foglie (Bian, 1981; Hoyle, 1992), perciò le foglie dovrebbero essere raccolte al momento della fioritura (Dwivedi, 1999) o prima che la stessa si verifichi (Barathi, 2003). La raccolta meccanica non è stata ancora impiegata su scala mondiale; non a caso, come da tradizione, la raccolta avviene manualmente secondo le seguenti fasi: asportazione di foglie o steli mediante taglio manuale; rimozione del prodotto per essiccazione effettuata altrove. L'essiccazione delle piante falciate, mediata dal sole, può essere abbastanza veloce (24 ore o meno) quando il livello di umidità è basso (Rank e Midmore, 2006). La raccolta meccanica post

essiccazione, al fine di trasportare il prodotto, non è stata ancora intrapresa. Qualora si dovesse optare per una metodica di raccolta meccanica, le convenzionali imballatrici quadrate risulterebbero probabilmente le più adatte, con un eventuale adattamento del meccanismo di pick-up: in particolare, si rende necessaria una certa attenzione volta ad evitare una eccessiva perdita di foglie, dal momento che la coltura è piuttosto leggera (stimata a 4 tonnellate di materia secca Ha^{-1}). Una volta essiccata, la stevia si presenta come il "fieno" e può essere conservata in modo sicuro per lunghi periodi (anni) senza perdite di qualità (Rank e Midmore, 2006).

Laddove il clima lo permette, la stevia è una pianta semiperenne perciò può essere mantenuta in vita fino a cinque o sei anni, effettuando due o tre raccolti all'anno. In precedenza, Bridel e Lavielle (1931a, b, c) e Métivier e Viana (1979a) avevano segnalato una resa in stevioside rispettivamente di 60-65g e 72g per chilogrammo di foglia secca. In termini di produttività economica in biomassa, il rendimento della foglia secca nell'habitat naturale, in Paraguay, è fra 1500 kg e 2500 kg per ettaro, in condizioni di terreno secco, con circa 4300 l Ha^{-1} di irrigazione all'anno (Jordan Molero, 1984). Il rapporto foglia/fusto diminuisce all'aumentare della dimensione dei singoli fusti: con piccoli fusti, meno di 2,5 mm di diametro, le foglie possono rappresentare oltre il 55% del rapporto foglia/fusto. Quindi il principale determinante del rendimento sarà il numero di fusti per pianta (Rank e Midmore, 2006).

Se coltivata come coltura perenne può essere produttiva fino a quattro anni nello stesso campo; è altresì noto che la durata del raccolto può raggiungere i 7-8 anni e che il rendimento della pianta diventa massimo al quarto anno, mentre l'apporto massimo di foglie avviene nel terzo o quarto anno. In Giappone, per esempio, sono possibili uno o due raccolti all'anno con una resa in foglia secca di 3000-3500 kg Ha^{-1} nel primo anno, 4000-4500 kg Ha^{-1} nel secondo, 4000-6000 kg Ha^{-1} nel terzo, per arrivare infine a 4000 kg

Ha^{-1} nel quarto anno (Sunk, come citato da Taiariol, 2004). Nelle condizioni agro-climatiche di Palampur, il primo raccolto è stato effettuato a 90-110 giorni dopo il trapianto, cioè tra giugno e luglio; il secondo raccolto invece è stato effettuato invece dopo 60-75 giorni dal primo raccolto, quindi ai primi di settembre, nel momento dei primissimi stadi della fioritura (Ramesh *et al.*, 2006). Nel caso di ritardato trapianto, per le colture coltivate per singolo taglio, la raccolta avviene dopo 3-4 mesi dal trapianto e continua fino a quando inizia la fioritura; quest'ultima fase dovrebbe essere evitata e la potatura del germoglio apicale dovrebbe essere effettuata per migliorare la crescita dei germogli laterali (Ramesh *et al.*, 2006).

1.5 Aspetti economici e legislativi

Attualmente, le foglie di *stevia rebaudiana* sono molto richieste dal mercato, e di conseguenza il loro prezzo aumenta, grazie anche ai loro più disparati utilizzi: dalla medicina alla produzione di prodotti farmaceutici o come semplice dolcificante di bevande. Tuttavia la ricerca sull'estrazione di foglie di stevia risulta ancora limitata (Samah *et al.*, 2012). A causa della dolcezza e delle [svariate] proprietà terapeutiche della foglia, la *stevia rebaudiana Bertoni* ha attirato molti interessi economici e scientifici. Il Giappone è stato il primo paese in Asia ad avviare il mercato dello stevioside come dolcificante nell'industria alimentare e droghiera; da allora, la coltivazione di questa pianta si è diffusa in diversi paesi dell'Asia, tra cui Cina, Malesia, Singapore, Corea del Sud, Taiwan e Thailandia. La stevia è stata coltivata con successo anche negli Stati Uniti d'America, in Canada e in Europa (Brandle *et al.*, 2000).

Per l'uso alimentare [e commerciale], le foglie di stevia non hanno un ruolo importante, altresì è molto più importante il loro purificato di glicosidi steviolici, autorizzati come additivi alimentari in molte categorie di alimenti (ad esempio in Europa), con una purezza superiore al 95% (Wölwer-Rieck, 2012). I prodotti e gli estratti di stevia possono essere e sono usati in una vasta gamma di alimenti come alternativa allo zucchero in quasi tutti i suoi usi e possono sostituirlo in toto o in parte. A differenza di alcuni dolcificanti artificiali chimici, tali estratti si mantengono stabili chimicamente laddove riscaldati e quindi possono essere utilizzati in prodotti da forno in modo sicuro e con successo. Inoltre, i glicosidi steviolici possono essere utilizzati in combinazione con altri edulcoranti (ad es., zucchero, fruttosio) e agiscono come esaltatori di sapidità, così come dolcificanti; essi sono stati utilizzati in diversi Paesi per molti anni (per esempio in Giappone da più di 35 anni) (Rank e Midmore, 2006). Alcuni

prodotti alimentari, contenenti estratti di stevia che vengono prodotti e consumati con successo, includono: bibite gassate, acque minerali, bevande alla frutta e succhi di frutta, gelati, yogurt, latte e altri prodotti lattiero-caseari, salse, mostarde, sottaceti, biscotti, torte e conserve di frutta, vegetali e carni lavorati e surgelati, cereali al cioccolato e barrette muesli. Prodotti di altro genere, contenenti anch'essi stevia, sono: dentifrici, gomme da masticare e compresse medicinali. Spesso l'uso della stevia è consigliabile negli integratori dietetici, per la perdita di peso, o in alimenti per diabetici o ancora come parte di diete, per combattere una serie di infezioni e malattie croniche (Rank e Midmore, 2006).

In molti Paesi, la coltivazione della stevia è ancora di recente adozione, pertanto le considerazioni agronomiche dovrebbero avere una priorità maggiore nel tentativo di esprimere il potenziale massimo della coltura (Ramesh *et al.*, 2006). Il costo principale della coltura, essendo trapiantata, potrebbe essere ridotto se i coltivatori producessero le proprie piantine, ma ciò richiederebbe esperienza e abilità. Questo nuovo impiego potrebbe rappresentare una possibilità per alcuni coltivatori fra i quali quelli del tabacco. Inoltre, potrebbero essere identificati degli erbicidi adatti, atti a facilitare il lavoro sul controllo delle infestanti. Il trapianto su vasi e in piccoli appezzamenti, in condizioni di pieno campo, non è ad oggi ancora affidabile: motivo per cui, in pratica, bisogna ancora constatere quale sia l'effettivo rendimento commerciale del prodotto (Rank e Midmore, 2006).

L'utilizzo dei glicosidi steviolici non è sempre stato permesso in tutti i Paesi: i Paesi con approvazione senza restrizioni sono: Giappone, Cina, Corea, Taiwan, Indonesia, Thailandia, Paraguay, Brasile, Argentina, Israele e Russia. Un uso limitato del prodotto è consentito, invece, in alcuni Paesi tra cui Stati Uniti ed Europa, dove può essere utilizzato solo in qualità di additivo alimentare con alcune limitazioni (Rank e Midmore, 2006).

Attualmente, la legislazione in Europa è ottemperata dal Regolamento (UE) N. 1131/2011. Questo riporta quanto segue:

“Considerato che:

Il regolamento (CE) n. 1333/2008 istituisce un elenco dell’Unione degli additivi alimentari autorizzati negli alimenti e le condizioni del loro utilizzo (L 354 del 31.12.2008).

L’Autorità europea per la sicurezza alimentare ha valutato la sicurezza dei glicosidi steviolici, estratti dalle foglie della pianta *stevia rebaudiana Bertoni*, come dolcificante e ha espresso il suo parere il 10 marzo 2010; inoltre, ha stabilito una dose giornaliera ammissibile (DGA) per i glicosidi steviolici, espressa in equivalenti steviolici, di 4 mg/kg di peso corporeo al giorno (EFSA, 2010a).

Nel gennaio 2011 è stata pubblicata una dichiarazione su una nuova valutazione dell’esposizione. Nonostante la revisione degli utilizzi, le conclusioni sono state molto simili, vale a dire che la DGA può essere superata, negli adulti e nei bambini, con livelli di consumo elevati (EFSA, 2011).”

Il regolamento in questione riporta inoltre un allegato in cui sono segnalate determinate categorie di alimenti per le quali sono concesse restrizioni o eccezioni all'utilizzo di glicosidi steviolici: in linea generale, le restrizioni fanno sempre riferimento ad alimenti a “ridotto valore energetico” o “senza zuccheri aggiunti”.

2. Scopo della tesi

La stevia *rebaudiana* bertoni è una pianta coltivata oggi in molte regioni del mondo per il suo alto contenuto in composti edulcoranti: le sue foglie infatti sono note per la loro intensa dolcezza. Le molecole che le conferiscono tale proprietà sono note come "glicosidi steviolici".

Le pubblicazioni scientifiche sulla stevia come fonte di edulcoranti sono ancora limitate, ma un'accurata ricerca bibliografica sulle sue proprietà nutrizionali ha permesso di caratterizzare chimicamente la pianta, consentendo di valutare l'effetto dei trattamenti agronomici sulla produzione di glicosidi steviolici.

3. Materiali e metodi

La caratterizzazione dei principali glicosidi steviolici (stevioside e rebaudioside-A) nelle piante di stevia è stata condotta presso il Dipartimento di Agronomia Animali Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE) dell'Università di Padova. Le prove di coltivazione si sono svolte in due differenti località: Pojana Maggiore (VI) e Padova.

Prove svolte a Pojana Maggiore

Lo scopo delle prove svolte a Pojana Maggiore è stato quello di valutare gli effetti sulla produzione di foglie e sul relativo contenuto di edulcoranti in seguito a tre diversi livelli crescenti di concimazione (in proporzione: 1, 1,5 e 2), e a due diversi metodi di irrigazione (aspersione e microirrigazione) (Tabella 4). Il trapianto è stato effettuato il 29 giugno 2012 suddividendo anzitutto il campo in due comparti (a loro volta suddivisi in parcelle) e in seguito sottoponendo l'uno all'irrigazione per aspersione mediante micro splinker, e l'altro alla microirrigazione tramite manichetta (Tabella 3). Il quantitativo d'acqua somministrato è stato conteggiato attraverso un contalitri posto sulle due diverse linee di irrigazione. In seguito, sono stati preparati dei sacchetti contenenti concime composto da differenti dosi di N-P-K (Urea 46%, Solfato di potassio e perfosfato triplo) destinate alle varie parcelle, che sono stati quindi distribuiti ed interrati in campo (Tabella 4). Due giorni dopo è stata fatta un'irrigazione di fondo per preparare il terreno al trapianto delle piantine di stevia (ottenute da seme e non da talee). Il sesto d'impianto (inferiore a quello ottimale, cioè 60x20 cm) è stato di 75 cm tra le file e 35 cm sulla fila; ciò comporterebbe una maggior dimensione delle piante con una probabile minor resa in foglie.

Oltre ciò va considerato che il trapianto è stato parecchio tardivo in quanto solitamente il medesimo viene messo in atto a partire dalla fine del mese di febbraio, laddove il clima lo permetta, in modo tale da ottenere, nella stagione calda, piante ben radicate con numerosi raccolti nell'arco dell'anno. Lo schema sperimentale è stato di tipo a blocchi randomizzati con quattro repliche. La suddivisione in parcelle è riportata in Tabella 3.

La concimazione di copertura è stata messa in atto dopo 33 giorni sulle parcelle irrigate per aspersione e dopo 35 giorni sulle parcelle irrigate mediante microirrigazione. Il concime da disporre sulle singole piante, vista l'esigua quantità da distribuire, è stato scelto quale azotato con titolo inferiore rispetto all'urea precedentemente distribuita sul fondo. In tabella 4 è riportato lo schema relativo alla concimazione azotata e alle concimazioni totali.

Considerato che ogni parcella è composta da sette file, la concimazione è stata effettuata soltanto su sei file poiché la prima fila, utilizzata come testimone, non è stata concimata. All'interno di ogni comparto è stata individuata l'area di saggio composta da 24 piante centrali (Figura 7) all'interno delle quali, seguendo una linea teorica obliqua che attraversa l'area di saggio, sono state individuate sei piante significative; la raccolta delle medesime è avvenuta il 3 settembre 2012, poco prima del periodo di fioritura, ad un'altezza di 15 cm, essiccate all'aria, divise in foglie e steli e sottoposte a caratterizzazione qualitativa. Le rimanenti 18 piante presenti nella parcella di rilievo sono state tagliate e pesate al fine di ottenerne la percentuale di sostanza secca.

Prove svolte a Padova

Le prove svolte a Padova hanno avuto lo scopo di valutare gli effetti relativi a tre livelli crescenti di concimazione con azoto, potassio e fosforo rispettivamente nelle proporzioni di 1, 1.5 e 2. Le diverse dosi di N-P-K (Tabella 5) sono state apportate come urea, solfato di potassio e perfosfato triplo. La densità del trapianto è stata di 55 cm tra le file e 40 cm sulla fila. Il trapianto in campo è avvenuto in data 1 luglio 2012 mentre la raccolta è avvenuta il 25 settembre 2012. Lo schema sperimentale (Figura 8) è stato di tipo a blocchi randomizzati con 3 repliche.

Analisi statistica

L'elaborazione statistica dei dati ottenuti è stata effettuata utilizzando il metodo di "analisi della varianza" ANOVA (Analysis of Variance) e la separazione delle medie è stata realizzata mediante il Test HSD di Tukey.

3.1 Analisi chimiche

Zuccheri liberi

0,2 g di prodotto secco sono stati estratti con 20 mL di acqua demineralizzata, successivamente sono stati agitati su piastra rotante per 20 min, filtrati con carta da filtro e ulteriormente filtrati con filtri per siringa in acetato di cellulosa da 0,45 μm e infine iniettati in HPLC.

Il contenuto di zuccheri riducenti (glucosio e fruttosio) è stato determinato utilizzando la cromatografia liquida ad alte pressioni (HPLC) usando un sistema cromatografico a gradiente (Jasco X.LC), costituito da una pompa binaria basata sul principio di mescolamento ad alta pressione a da un detector a indice di rifrazione. La colonna utilizzata per la separazione dei componenti estratti è stata la HyperRez XP Carbohydrate Ca^{2+} con dimensioni 300 x 7,7 mm. I dati forniti sono stati elaborati usando il software ChromNAV Chromatography Data System. È stato utilizzato un compartimento di termostatazione della colonna che permette di ottenere dati riproducibili ad una temperatura di 80 °C.
E' stata utilizzata come fase mobile acqua ultrapura con una velocità di flusso di 0,6 ml/min.

L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante curva di calibrazione, ottenuta con diluizioni seriali degli standard di glucosio e fruttosio sciolti in acqua demineralizzata (10-1000 mg/L).

Glicosidi steviolici

0,2 g di prodotto secco sono stati estratti con 50 mL di acqua portata precedentemente ad ebollizione. L'ebollizione è stata mantenuta per 10 min. L'estratto è stato filtrato con carta da filtro e diluito in rapporto 1:3 con acetonitrile al fine di ottenere una soluzione analoga alla fase mobile. Infine l'estratto è stato ulteriormente filtrato con filtri per siringa in cellulosa rigenerata (0,45 μm) e analizzato in HPLC-DAD.
La cromatografia liquida ad alte pressioni (HPLC) è stata eseguita usando il sistema cromatografico a gradiente (Jasco X.LC) e da un rivelatore a serie di diodi. La colonna utilizzata per la separazione dei componenti estratti è

stata una Hypersil APS-2 (150 x 4.6 mm, 5µm). I dati forniti sono stati elaborati usando il software ChromNAV Chromatography Data System. E' stato utilizzato un compartimento di termostatazione della colonna che permette di ottenere dati riproducibili ad una temperatura di 25°C. La fase mobile è stata acetonitrile: acqua con rapporto 70:30 v/v con velocità di flusso di 1 mL/min. L'identificazione degli steviosidi analizzati è avvenuta alla lunghezza d'onda di 205 nm.

L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante curva di calibrazione, ottenuta con diluizioni seriali degli standard di stevioside e rebaudioside-A (500-5 mg/L).

4. Risultati e discussione

Prova sperimentale su stevia coltivata a Pojana Maggiore

La percentuale di sostanza secca riscontrata (Figura 9) risulta essere, in media, la medesima sia nelle foglie che nei fusti, rispettivamente pari al 26.6% e al 27%, mentre gli effetti dovuti alle modalità di concimazione e di irrigazione sulla stessa non assumono particolare rilievo.

In relazione ai principali glicosidi steviolici (stevioside e rebaudioside A) gli effetti di concimazione ed irrigazione sulle foglie di stevia non sono risultati statisticamente significativi anche se, almeno apparentemente, il livello 2 di concimazione (N = 100 kg Ha^{-1}, P = 42 kg Ha^{-1}, K = 230 kg Ha^{-1}) sembra determinarne quantitativi leggermente maggiori (Figure 10 e 11); d'altra parte anche la microirrigazione ha contribuito ad incrementare il contenuto di glicosidi steviolici in ciascuna parte della pianta, ma in ogni caso gli incrementi sono sempre stati inferiori ai 5 g kg^{-1} p.f./p.s.. Considerando la pianta nella sua totalità, la microirrigazione ha determinato nella stessa valori di stevioside e di rebaudioside A rispettivamente superiori del 12% e del 13 % rispetto all'aspersione.
Le foglie, che rappresentano la parte commercializzabile della pianta, contengono livelli di stevioside intorno ai 18.6 g kg^{-1} p.f., mentre i livelli di rebaudioside A sono all'incirca pari a 10 g kg^{-1} p.f. (Tabelle 5 e 6).
Per quanto riguarda i fusti, invece, la concimazione sembra non rappresentare un elemento particolarmente influente in relazione all'accumulo di glicosidi steviolici.

In riferimento alla tabella 6, sono stati calcolati gli equivalenti steviolici contenuti nella pianta intera e nelle foglie di stevia (Figura 14) giungendo alla conclusione che circa l'85 % di questi ultimi è rinvenibile nelle foglie (la parte riconosciuta come commerciabile dall'EFSA). La scelta di riportare i diversi poteri dolcificanti di ciascun glicoside steviolico in equivalenti steviolici è utile, ai fini commerciali, in quanto si vuole fornire un'unità di misura univoca utile all'identificazione dell'effettiva dolcezza apprezzabile dalla foglia di stevia. Concretamente, si è scelto lo steviolo come unità alla quale riportare gli altri glicosidi steviolici, utilizzando dei fattori di conversione che rendono comparabili le diverse molecole secondo il loro peso molecolare.

Per quanto concerne gli zuccheri, in particolare glucosio e fruttosio (Tabelle 7 e 8), gli incrementi di valore riscontrati non sono apparsi statisticamente degni di nota, anche se è probabile che il livello di zuccheri totale (Figure 12 e 13) aumenti nelle foglie in relazione all'utilizzo del primo livello di concimazione (N = 50 kg Ha^{-1}, P = 21 kg Ha^{-1}, K = 115 kg Ha^{-1}) in concomitanza con il metodo di irrigazione per aspersione. In particolare, il livello di glucosio accumulato con il primo livello di concimazione è superiore al 25% (Tabella 7) rispetto al secondo livello (N = 75 kg Ha^{-1}, P = 31.5 kg Ha^{-1}, K = 172.5 kg Ha^{-1}). L'effetto derivante dal tipo di irrigazione utilizzata si ripete in egual misura anche nei fusti, nei quali il secondo livello di concimazione è stato quello che ha provocato maggiori concentrazioni di zuccheri.

Prova sperimentale su stevia coltivata a Padova

Il quantitativo di sostanza secca contenuto nelle piante di stevia (Figura 15), coltivate nei campi sperimentali di Padova, è pari a circa il 28.8%, valore leggermente superiore alla percentuale ottenuta a Pojana Maggiore (26.8%); questo piccolo scarto percentuale (2%), può essere dovuto ad una fornitura di acqua meno abbondante e/o costante rispetto a quella impiegata a Pojana Maggiore. In relazione ai differenti livelli di somministrazione di N-P-K forniti alla pianta, nessuno di questi è sembrato influire in maniera rilevante sul contenuto di sostanza secca.

Dalla valutazione fatta sulla presenza di glicosidi steviolici, tenuto conto delle diverse concimazioni di fosforo e potassio, è emerso che non vi è una particolare variazione riguardo al contenuto dei medesimi (Tabelle 9 e 10). D'altra parte, riguardo alla somministrazione di azoto, il livello di concimazione intermedio appare maggiormente produttivo rispetto ai livelli di concimazione superiore e inferiore, per i quali è stata individuata una diminuzione della resa in sostanza secca. Complessivamente, contenuti apparentemente più elevati di glicosidi sarebbero stati ottenuti utilizzando dosi di concime così composte (Figure 16 e 17):

1) N = 150 kg Ha^{-1}, P = 70 kg Ha^{-1}, K = 200 kg Ha^{-1} in riferimento al peso fresco;

2) N = 150 kg Ha^{-1}, P = 23 kg Ha^{-1}, K = 200 kg Ha^{-1} in riferimento al peso secco.

Analogamente, riguardo agli zuccheri totali rilevati (Figure 18 e 19) si evince che la percentuale di glicosidi steviolici, in relazione ai quantitativi di azoto utilizzati, ha subito un medesimo andamento: grandi quantità di fruttosio (17.5 g Kg^{-1} p.s.) sono state rinvenute in seguito al trattamento

effettuato mediante il livello intermedio di azoto (150 kg Ha^{-1}), corrispondenti ad un aumento in percentuale pari al 14.3% rispetto al trattamento eseguito con il livello inferiore (50 kg Ha^{-1}), e al 21.7% rispetto a quello eseguito con il livello superiore (250 kg $Ha^{-1)}$.

5. Conclusioni

Dai risultati ottenuti durante gli studi effettuati a Padova e a Pojana Maggiore è emerso che i diversi livelli di concimazione non hanno influito particolarmente sulla resa in sostanza secca né tantomeno sul contenuto di glicosidi steviolici. D'altra parte la modalità di irrigazione è risultata particolarmente rilevante sulla coltura: la microirrigazione, infatti, sembra favorire l'accumulo di glicosidi steviolici probabilmente perché i volumi d'acqua, limitati e localizzati, tenderebbero a dilavare in minor misura i nutrienti rispetto all'irrigazione per aspersione. Al contrario, l'irrigazione per aspersione sembra favorire l'aumento del contenuto di zuccheri liberi totali presenti nella pianta; ciò potrebbe dipendere dal fatto che l'aspersione avrebbe stimolato un maggior accestimento della pianta (e quindi un aumento di fusti) con conseguente maggior produzione di zuccheri. Sulla base dei dati ottenuti sperimentalmente si può affermare che la percentuale di zuccheri liberi presenti nella pianta intera (glucosio e fruttosio) può essere considerata trascurabile rispetto alla percentuale di glicosidi steviolici.

Confrontando poi la coltivazione di stevia con quella di barbabietola da zucchero (in termini di resa di prodotto dolcificante commercializzabile), si evince che la resa di un ettaro di terreno coltivato a stevia è pari circa alla resa di un ettaro di terreno coltivato a barbabietola da zucchero. Si è giunti a tali considerazioni partendo dal fatto che la resa in prodotto dolcificante da stevia (in equivalenti steviolici) è pari a circa 32 kg Ha^{-1}; sapendo che 1 kg di equivalenti steviolici corrisponde a circa 300 kg di saccarosio, è possibile ottenere la resa equivalente in saccarosio di un ettaro coltivato a stevia, ovvero: (32 * 300) kg Ha^{-1} = 9.600 kg Ha^{-1} ≈ 9,6 t Ha^{-1}. Quindi, sapendo che un ettaro di barbabietola da zucchero (in Italia) ha una resa compresa fra 9 e 10 t Ha^{-1} è facile intuire che tale valore è grosso modo

comparabile con quello in precedenza ottenuto. Motivo per cui, tenendo conto del fatto che il prezzo alla vendita degli estratti di stevia, in proporzione, è di gran lunga maggiore rispetto a quello dello zucchero, risulta alquanto conveniente puntare sullo sviluppo delle produzioni di stevia.

Di conseguenza, la stevia potrebbe rivestire un ruolo di spicco nel comparto dei prodotti dolcificanti, in sostituzione ai dolcificanti di sintesi o addirittura allo zucchero comune. Questa evoluzione potrebbe verosimilmente avvenire qualora la stevia risultasse economicamente vantaggiosa, sia dal punto di vista della produzione che dal punto di vista della lavorazione, rispetto ai suoi principali competitori.

Bibliografia

Abou-Arab, A. E.; Abou-Arab, A. A.; Abu-Salem, M. F. Physicochemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana bertoni plant. Afr. J. Food Sci. 2010, 4, 269−281.

Alvarez, M. (1984). Stevia rebaudiana Bert. estado atual do conhecimento, p. 118. Universitadade Estaudual de Maringa, Maringa.

Alvarez, M., Casaccia, R., and Lopez, G. (1994). ‘‘Produccion de Kae hee. Instituto ageronomica Nacional. SEA Ministerio de Agricultura y Ganaderia,’’ pp. 1–47. Asuncion, Paraguay.

Andolfi, L., Ceccarini, L., and Macchia, M. (2002). Bio-agronomic characteristics of Stevia rebaudiana. Informatore Agrario 58, 48–51.

Barathi, N. (2003). Stevia—The calorie free natural sweetener. Natural Product Radiance 2, 120–122.

Basuki, S. (1990). effects of black plastic mulch and plant density on the growth of weeds and stevia. BIOTROP special publication 38, 107–113.

Bertonha, A., Muniz, A. S., Carneiro, J. W. P., Martins, E. N., Jabur, I. C., and Thomaz, S. I. (1984). ‘‘Estudo de cultivo, reproducao e selecao das Variedades mais productivas de Stevia rebaudiana, en solos do norte de Prana,’’ 2nd ed., p. 103. (mimeo). Maringa, UEM.

Bertoni, M. S. (1905). La Kaa He e-Sa nature et ses proprietes. Anal cient paraguayos 5, 1–14.

Bharani, A., A. Ganguly and K.D. Bhargava, 1995. Salutary effect of Terminalia arjuna in patients with severe refractory heart failure. Intl. J. Cardiol., 49: 191-199.

Bian, Y. M. (1981). Studies on Stevia rebaudiana—a new sweet- tasting plant: Refining stevioside and determination of its concentration [Chinese]. Plant Physiol. Commun. 3, 15–17.

Bondarev, N. I., Sukhanova, M. A., Reshetnyak, O. V., and Nosov, A. M. (2003). Steviol glycoside content in diVerent organs of Stevia rebaudiana and its dynamics during ontogeny. Biologia Plantarum 47, 261–264.

Brandle J. E., Starratt A. N. e Gijzen M. (1998). Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties. London, Ontario, Canada N5V 4T3: Agriculture and Agri-Food Canada, Southern Crop Protection and Food Research Centre, 1391 Sandford St.

Brandle, J. E., and Rosa, N. (1992). Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of Stevia rebaudiana. Can. J. Plant Sci. 72, 1263–1266.

Bridel, M., and Lavieille, R. (1931a). C.R. hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris 192, 1123–1125.

Bridel, M., and Lavieille, R. (1931b). Le principe a saveur sucree du Kaa-he-e (Stevia rebaudiana). Bull. Soc. Chim. Biol. 13, 636–655.

Bridel, M., and Lavieille, R. (1931c). Le principe a saveur sucree du Kaa-he-e (Stevia rebaudiana). J. Pharm. Chem. 14, 99–113, 154–163.

Carneiro, J. W. P. (1990). Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. production of seed. (M.Sc. Thesis), State University of Maringa, Brazil.

Chalapathi, M. V., Thimmegowda, S., and Sridhara, S. (1999c). Vegetative propagation of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) under field conditions. Crop Res. 18, 319–320.

Chalapathi, M. V., Thimmegowda, S., Kumar, N. D., Rao, G. G. E., and Mallikarjuna, K. (2001). Influence of length of cutting and growth regulators on stevia (Stevia rebaudiana Bertoni). Crop Res. 21, 53–56.

Chalapathi, M. V., Thimmegowda, S., Rama Krishna Prama, V. R., and Prasad, T. G. (1997b). Natural non-caloric sweetener stevia (Stevia rebaudiana Bertoni): A future crop of India. Crop Res. 14, 347–350.

Chatsudthipong V., Muanprasat C., 2008. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. Bangkok (Thailand): Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University. Pharmacology &Therapeutics 121 (2009) 41–54.

Chen, K., Chang, T. R., and Chen, S. T. (1978). Studies on the cultivation of stevia and seasonal variation of stevioside. China Gartenbau 24, 34–42.

Choudary, K.A. and N.G. Bandypadhysy, 1999. Preliminary studies on the inorganic constituens of some indigenous hyperglycaemic herbs on oral glucose tolerance test. Ethnopharmacol., 64: 179-184.

Columbus, M. (1997). ‘‘The Cultivation of Stevia, Nature’s Sweetener,’’ p. 4. QMAFRA, Ontario, Canada.

Commissione Europea, 1999. Opinion on Stevia rebaudiana plants and leaves. Scientific Committee on Food. CS/NF/STEV/3 Final Dt. June 17.

Crammer, B., and Ikan, R. (1986). Sweet glycosides from the stevia plant. Chem. Br. 22, 915–917.

Donalisio, M. G., Duarte, F. R., and Souza, C. J. (1982). Estevia (Stevia rebaudiana). Agronoˆmico, Campinas (Brazil), 34, 65–68.

Duke, J. A., and deCellier, J. C. (1993). Stevia rebaudiana (Bert.). In ‘‘CRC Handbook of Alternative Cash Crops’’ (J. Duke, Ed.), pp. 422–424. CRC Press Inc., London.

Dwivedi, R. S. (1999). Unnurtured and untapped sweet non-sacchariferous plant species in India. Current Sci. 76, 1454–1461.

EFSA, 2010. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to food on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive (Parere scientifico del gruppo di esperti scientifici sugli additivi alimentari e sulle fonti di nutrienti aggiunte agli alimenti relativo alla sicurezza dei glicosidi steviolici per gli impieghi proposti come additivo alimentare). The EFSA Journal (2010); 8(4):1537.

EFSA, 2011. Revised exposure assessment for steviol glycosides for the proposed uses as a food additive (Valutazione riveduta dell'esposizione ai glicosidi steviolici per gli impieghi proposti come additivo alimentare). The EFSA Journal (2010); 9(01):1972.

Ermakov, E. I., and Kochetov, A. A. (1996). Specific features in growth and development of stevia plants under various light regimes to regulated conditions. Doklady Rossiitskoi Akademii Sel’Skokhozyaisivennykh Nauk 0, 8.

Felippe, G. M., and Lucas, N. M. C. (1971). Estudo da viabilidade dos frutos de Stevia rebaudiana. Hoehnea 1, 95–106.

Felippe, G. M., and Randi, A. M. (1984). Germination and endogenous growth substances of Stevia rebaudiana Bert. In ‘‘First Brazilian Seminar on Stevia rebaudiana,’’ Brazil, June 25–26, pp. 1.1–1.2.

Filho, L. O. F., Malavolta, E., and Filho, O. F. D. L. (1997b). Symptoms of nutritional disorders in stevia (Stevia rebaudiana). Scientia Agricola 54, 53–61.

Fronza, D., and Folegatti, M. V. (2003). Water consumption of the stevia (Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. Scientia Agricola 60.

Geuns, J. M. C. (2003). Molecules of interest—stevioside. Phytochemistry 64, 913–921.

Ghanta, S.; Banerjee, A.; Poddar, A.; Chattopadhyay, S. Oxidative DNA Damage Preventive Activity and Antioxidant Potential of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, a Natural Sweetener. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 10962−10967.

Goenadi, D. H. (1983). Water tension and fertilization of Stevia rebaudiana on oxic tropudalf soil. Menara Perkebunan 51, 85–90.

Goenadi, D. H. (1985). effect of FYM, NPK, and liquid organic fertilizers of Stevia rebaudiana (Bert.). Menara Perkebunan 53, 29–34.

Goenadi, D. H. (1987). effect of slope position on growth of Stevia rebaudiana in Indonesia. Communications in Plant Science and Analysis 18, 1317–1328.

Goettemoeller, J., and Ching, A. (1999). Seed germination in Stevia rebaudiana. In ‘‘Perspectives on new crops and new uses’’ (J. Janick, Ed.), pp. 510–511. ASHS Press, Alexandria, VA.

Granstrom, T. B., Izumori, K., Leisola, M., Appl.Microbiol. Biotechnol. 2007, 74, 277–281.

Guenther, E. (1949). ‘‘The Essential Oils,’’ Vol. III, pp. 586–640. D van Nostrand Co. Inc., Princeton, NJ.

Gvasaliya, V. P., Kovalenko, N. V., and Garguliya, M. Ch. (1990). Studies on the possibility of growing honey grass in Abkhazia conditions. Subtropocheskie Kultury 5, 149–156.

Hoyle, F. C. (1992). A Review of Four Potential New Crops for Australian Agriculture, p. 34. Department of Agriculture, Perth.

Hutapea, A. M., Toskulkao, C., Buddhasukh, D., Wilairat, P., & Glinsukon, T. (1997). Digestion of stevioside, a natural sweetener, by various digestive enzymes. J Clin Biochem Nutr 23(3), 177−186.

Jia, G. N. (1984). An experiment on the cultivation of Stevia rebaudiana (Bert.). Shanxi Agricultura Science Shanxi Nongye Kexue 1, 20–21.

Jimoh, F.O. And A.T. Olandiji, 2005. Preliminary Studies on Piliostigma thonningii seeds: Proximate analysis, mineral composition and phytochemical screening. African J. Biotechnol., 4: 1439-1442.

Jordan Molero, F. (1984). La propagacio´n de ka’a he’e, Stevia rebaudiana Bertoni. Primer Simposio Nacional de la Stevia (kaa hee) Julio 1983, p. 29. Asunciòn, Paraguay.

Kant, R., Nutr. J. 2005, 4, 5.

Karaköse, H.; Jaiswal, R.; Kuhnert, N. Characterisation and Quantification of Hydrocinnamate Derivatives in Stevia Rebaudiana Leaves by LC-MSn. J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 10143−10150.

Katayama, O., Sumida, T., Hayashi, H., and Mitsuhashi, H. (1976). ‘‘The Practical Application of Stevia and R and D data,’’ p. 747. ISU Co., Japan.

Kaushik, R.; Pradeep, N.; Vamshi, V.; Geetha, M.; Usha, A. Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. J. Food Sci. Technol. 2010, 47, 27−33.

Kawatani, T., Kaneki, Y., and Tanabe, T. (1977). On the cultivation of Kaa-hee (Stevia rebaudiana (Bert.). Japanese J. Tropical Agri. 20, 137–142.

Kennely, E. J. (2002). Sweet and non- sweet constituents of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni. In ‘‘Stevia, the Genus Stevia, Medical and Aromatic Plants- Industrial Profiles’’ (A. D. Kinghorn, Ed.), Vol. 19, pp. 68–85. Taylor and Francis, London and NY.

Kim, I.-S.; Yang, M.; Lee, O.-H.; Kang, S.-N. The antioxidant activity and the bioactive compound content of Stevia rebaudiana water extracts. LWT-Food Sci. Technol. 2011, 44, 1328−1332.

Kinghorn, A. D., and Soejarto, D. D. (1985). Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In (H. Wagner, H. Hikino, and N. R. Farnsworth, Eds.), pp. 1–51. Academic Press, New York.

Kitahata, S., Ishikawa, H., Miyata, T., & Tanaka, O. (1989). Production of rubusoside derivatives by transgalactosylation of various β-galactosidases. Agric Biol Chem 53 (11), 2923−2928.

Korobko, N. V.; Turko, Y. A.; Shokun, V. V.; Chernyak, E. N.; Pokrovskii, L. M.; et al. GC-MS Investigations. II. Lipid Composition of Stevia rebaudiana. Chem. Nat. Compd. 2008, 44, 359−360.

Koyama, E., Kitazawa, K., Ohori, Y., Izawa, O., Kakegawa, K., Fujino, A., et al. (2003). In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. Food Chem Toxicol 41(3), 359−374.

Krupski, E., and Fischer, H. N. (1950). J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 39, 433–436.

Kudo, M. (1974). Stevia rebaudiana (Bert.). Science and Cultura 34, 2.

Langston, R. G., and Leopold, A. C. (1954). Photoperiodic responses of pepper mint. Proc. Am. Soc. Horti. Sci. 63, 347–352.

Lee, J. I., Kang, K. H., and Lee, E. U. (1979). Studies on the new sweetening source plant stevia (Stevia rebaudiana) in Korea. I. effects of dates of transplanting, taking leaf cuttings and sowing on the growth characteristics and dry leaf yields. Research reports of the OYce of Rural Development (Crop Suwon) 21, 171–179.

Lee, J. I., Kang, K. H., Park, H. W., Ham, Y. S., and Park, C. H. (1980). Studies on the new sweetening source plant, Stevia rebaudiana in Korea. II. effects of fertilizer rates and planting density on dry leaf yields and various agronomic characteristics of Stevia rebaudiana. Research Reports of the OYce of Rural Development (Crop Suwon) 22, 138–144.

Lester, T. (1999). Stevia rebaudiana. Sweet leaf. The Australian New Crops Newsletter 11, 1.

Levine, A. S., Kotz, C.M., Gosnell, B. A.,Am. J. Clin. Nutr. 2003, 78, 834S–842S.

Lewis, W. H. 1992. Early uses of Stevia rebaudiana (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. Econ. Bot. 46: 336–337.

Lobov, S. V., Kasai, R., Ohtani, K., Tanaka, O., & Yamasaki, K. (1991). Enzymic production of sweet stevioside derivatives: transglucosylation by glucosidases. Agric Biol Chem 55(12), 2959−2965.

Metivier, J., and Viana, A. M. (1979a). The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble protiens, sugars and stevioside in leaves of Stevia rebaudiana. J. Experimental Bot. 30, 1211–1222.

Metivier, J., and Viana, A. M. (1979b). Changes in levels of total soluble proteins and sugars during leaf ontogeny in Stevia rebaudiana. Ann. Bot. 45, 469–474.

Miyagawa, H., Fujikowa, N., Kohda, H., Yamasaki, K., Taniguchi, K., and Tanaka, R. (1986). Studies on the tissue culture of Stevia rebaudiana and its components: (II). Induction of shoot primordia. Planta Medica 4, 321–324.

Mizukami, H., Shiba, K., and Ohashi, H. (1983). Effect of temperature on growth and stevioside formation of Stevia rebaudiana. Shoyakugaku Zasshi 37, 175–179.

Monteiro, R. (1986). Taxonomia e bologia da reproducao de Stevia rebaudiana. Campinas. Dissertacan (Mestrado), p. 104. Instituto de Biologia, Universitadade Estaudual de Maringa.

Monteiro, W. R., Castro, M. D. R., Viveiros, S. C. M., and Mahlberg, P. G. (2001). Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of Stevia rebaudiana, Asteraceae. Revista Basileira de Botanica 24, 349–357.

Oddone, B. (1997). ‘‘How to Grow Stevia. Technical Manual.’’ Guarani Botanicals, Pawtucket, CT.

Parsons, P. (2003). Stevia—too good to be approved. Organic NZ 62, 26.

Pol, J., Hohnova, B., Hyotylainen, T., J. Chromatogr. A, 2007. 1150, 85–92.

Qing F., Zhimou G., Xiuli Z., Yanfang L., Xinmiao L., 2012. Comprehensive characterization of Stevia Rebaudiana using two-dimensional reversed-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction liquid chromatography. Shanghai (Cina): School of Pharmacy, East China University of Science and Technology,

Shanghai; Dalian (Cina): Key Lab of Separation Science for Analytical Chemistry, Key Lab of Natural Medicine Liaoning Province, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences.

Ramesh K., Singh Virendra e Megeji Nima W. (2006). Cultivation of Stevia [Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni]: a Comprehensive Review. Palampur (India): Natural Plant Products Division, Institute of Himalayan Bioresource Tecnology (CSIR), IHBT Pub. No. 0512.

Randi, A. M. (1980). Germinac¸a˜o de Stevia rebaudiana Bert. (Masters Thesis), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Randi, A. M., and Felippe, G. M. (1981). Efeito da temperatura, luz e reguladores de crescimento na germinaça˜o de Stevia rebaudiana Bert. Ciencia e Cultura 33, 404–411.

Rank A. H. e Midmore D. J. (2006). Stevia, an intense, natural sweetener. Australian Government: Rural Industries Research and Development Corporation.

Rocha, R. F., and Valio, I. F. M. (1972). Note previo sobre floracao em Sevia rebaudiana. Cinera e cultura 24(Suppl), 331.

Sakaguchi, M., and Kan, T. (1982). As pesquisas japonesas com Stevia rebaudiana (Bert) Bertoni e o estevio sideo. Ciencia e Cultura (Sao Oaulo) 34, 235–248.

Samah N. A., Hisham A. D. A. and Rahim S. A., 2012. Determination of Stevioside and Rebaudioside A in Stevia Rebaudiana Leaves via preparative High Performance Liquid Chromatography (prep-HPLC). Malesia: Department of Industrial Chemistry Faculty of Industrial Sciences & Technology Universiti Malaysia. International Journal of Chemical and Environmental Engineering, June 2012, MURJPR-332.

Savita, S. M.; Sheela, K.; Sunanda, S.; Shankar, A. G.; Ramakrishna, P. *Stevia rebaudiana* - A functional Component for Food Industry. J. Hum. Ecol. 2004, 15, 261−264.

Schmeling, A. (1967). Natural non calorie Edulcorante. Research Centre of Stevia XXIX, 5.

Schneider, G. and J. Wolfling, 2004. Synthetic cardenolides and related compounds. Current Organic Chemistry, 8, No. 14.

Sheu, B.W., Tamai, F., andMotoda, Y. (1987). effects of boron on the growth, yield and contents of stevioside and rebaudiosideAof Stevia rebaudiana. J.Agricultural Sci. (Japan), 31, 265–272.

Shibata, H., Sawa, Y., Oka, T., Sonoke, S., Kim, K. K., &Yoshioka, M. (1995). Steviol and steviol-glycoside: glucosyltransferase activities in Stevia rebaudiana Bertoni — purification and partial characterization. Arch Biochem Biophys 321(2), 390−396.

Shock, C. C. (1982). Experimental cultivation of Rebaudis Stevia in California. Agronomy Progress Report 122.

Shuping, C., and Shizhen, S. (1995). Study on storage technique of Stevia rebaudiana seed. Acta Agronomica Sinica 21, 102–105.

Slamet, I. H., and Tahardi, S. (1988). The effect of shading and nitrogen fertilisation on the flowering of Stevia rebaudiana. Menara Perkebunan 56, 34–37.

Soejarto, D. D., Compadre, C. M., Medon, P. J., Kamath, S. K., and Kinghorn, A. D. (1983). Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting Stevia species. Econ. Bot. 37, 71–79.

Son, R. O. F., Malavolta, E., De Sena, J. O. A., and Sheep, J. W. P. (1997). Uptake and accumulation of nutrients in stevia (Stevia rebaudiana). II. Macronutruients. Scientia Agricola 54, 1.

Starrat, A. N., Kirby, C. W., Pocs, R., and Brandle, J. E. (2002). Rebaudioside F a diterpene glycoside from Stevia rebaudiana. Phtyochemistry 59, 367–370.

Sumida, T. (1968). Reports on Stevia rebaudiana Bertoni M. introduced from Brazil as a new sweetness resource in Japan. Misc. Pub. Hokkaido Natl. Exp. Sta. 2: 69–83.

Sumida, T. (1980). Studies on Stevia rebaudiana Bertoni as a possible new crop for sweetening resource in Japan. J. Central Agricultural Exp. Stn. 31, 1–71.

Sunk, T. (1975). Studies on Stevia rebaudiana like Edulcorante. Japan J. Crop Sci.

Tadhani, M.; Subhash, R. Preliminary Studies on Stevia rebaudiana Leaves: Proximal Composition, Mineral Analysis and Phytochemical Screening. J. Med. Sci. 2006, 6, 321−326.

Taiariol, D. R. (2004). Characterization of the rebaudiana Stevia Bert. http://www.monografias.com/trabajos13 /Stevia /stevia.html.

Takahashi, L., Melges, E., and Carneiro, J. W. P. (1996). Germination performance of seeds of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni under diVerent temperatures. Revista Brasileira de Sementes 18, 6–9.

Tateo, F., Sanchez, E., Bononi, M. L., and Lubian, E. (1999). Stevioside content of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni grown in East Paraguay. Italian J. Food Sci. 11, 265–269.

Thomas, S. C. L. (2000). ‘‘Medicinal Plants- Culture, Utilization and Phytopharmacology,’’ p. 517. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Basel.

Tona, L., K. Kambu, K. Mesia, K. Cimanga, S. Apers, T. Bruyne, L. Pieters, J. Totte and A.J. Vlietinck, 1999. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. Phytomedicine, 6: 59-66

Truong, T. T., and Valicek, P. (1999). Verification of growth and stevioside content of stevia plants propogated by vegetative and generative method. Agricultura Tropica et Subtropica 32, 79–84.

Utumi, M. M., Monnerat, P. H., Pereira, P. R. G., Fontes, P. C. R., and Godinho, V.de.P. C. (1999). Macronutrient deficiencies in Stevia rebaudiana: Visual symptoms and effects on growth, chemical composition and stevioside production. Pesquisa Agropecuria Brasiliera

Valio, I. F. M., and Rocha, R. F. (1966). effect of photoperiod and growth regulators on growth and flowering of Stevia rebaudiana Bertoni. Jap. J. Crop Sci. 46, 243–248.

Viana, A. M. (1981). Analysis of Stevia rebaudiana Bert. for stevioside during photoperiod of 16 and 18 hours. First Brazilian seminar on Stevia rebaudiana, Brazil, June 25–26, p. 1.1.

Weihrauch, M. R., Diehl, V., Ann. Oncol. 2004, 15, 1460–1465.

Wingard, R. E., Jr., Brown, J. P., Enderlin, F. E., Dale, J. A., Hale, R. L., & Seitz, C. T. (1980). Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. Experientia 36(5), 519−520.

Wölwer-Rieck U., 2012. The Leaves of Stevia rebaudiana (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. Bonn (Germany): Department of Nutrition and Food Sciences , Food Chemistry /Bioanalytics, Rheinische Friedrich - Wilhelms-Universitä t Bonn , Endenicher Allee 11-13, 53115. Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Wood, H. B., Jr., Allerton, R., Diehl, H. W., &Fletcher, H. G., Jr. (1955). Stevioside. I. The structure of the glucose moieties. J Org Chem 20, 875−883.

Yamamoto, K., Yoshikawa, K., & Okada, S. (1994). Effective production of glycosylsteviosides by α-1,6 transglucosylation of dextrin dextranase. Biosci Biotechnol Biochem 58(9), 1657−1661.

Yoshizawa, S., T. Horiuchi, H. Fujiki, T. Yoshida, T. Okuda and T. Sugimura, 1987. Antitumor promoting activity of (-)-Epigalloacatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. Phytother. Res., 1: 44-77.

Zubenko, V. F., Rogovskii, S. V., Chudnoskii, B. D., and Shtokal, P. P. (1991). Effect of leafiness of cuttings and day length on rooting and the ransplant growth of Stevia rebaudiana. Fiziologiya I Biokhimiya Kul'tumyk h Rastenii 23, 407–411.

Il-Suk Kim, Mira Yang, Ok-Hwan Lee, Suk-Nam Kang, 2011. LWT - Food Science and Technology 44 (2011) 1328 e 1332: The antioxidant activity and the bioactive compound content of Stevia rebaudiana. Department of Animal Resources Technology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Gyeongnam, South Korea; Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, South Korea.

Aneta,W., Jan, O., & Renata, C. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry, 105, 940e949.

Duh, P. D., Tu, Y. Y., & Yen, G. C. (1999). Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (Chrysanthemum morifolium Ramat). Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 32, 269e277.

Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., *et al.* (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3954 e 3962.

Taiz L. e Zeiger E., 2002. Fisiologia vegetale (seconda edizione), traduzione di Maffei M., Editore Piccin-Nuova Libraria.

Decreti legislativi

- 2008: Legge 354 del 31.12.2008. Gazzetta ufficiale, pag. 16.

- 2011: Regolamento (UE) N. 1131/2011 della Commissione Europea. Modifica dell'allegato II del regolamento (CE) n. 1333/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i glicosidi steviolici. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 295/205, 12 novembre.

34, 1039–1043.

TABELLE E FIGURE

	Tadhani *et al.*, 2006.	Savita *et al.*, 2004.	Abou-Arab *et al.*, 2010.	Wölwer-Rieck		Kaushik *et al.*, 2010.	
				Praguay	Spain	Estate	Stagione dei Monsoni
Umidità (%)		7	5.37	7.2	8.8	7.7	8.6
Ceneri (%)	13.12	11	7.41	7.7	8.1	8.4	9.5
Proteine (%)	20.42	10	11.41	15.5	12.1	12.0	12.9
Carboidrati totali (%)	35.20	52	61.93				
Fruttosio (%)				1.4	1.2		
Glucosio (%)				0.95	0.63		
Lipidi (%)	4.34	3	3.73	5.0	3.6	2.7	3.7
Fibra grezza (%)		18	15.52	12.1	9.7		
Calcio (mg/100 g)	1500	464.4	17.7			722	808
Aminoacidi essenziali totali (g/100 g)			7.7				
Aminoacidi non essenziali totali (g/100 g)			3.7				
Acido ossalico (mg/100 g)		2295					
Forforo (mg/100 g)	350	11.4					
Ferro (mg/100 g)	36.3	55.3	5.89			31.1	31.3
Sodio (mg/100 g)	160	190	14.93			32.7	63.4
Potassio (mg/100 g)	2510	1800	21.15			839	730.3
Magnesio (mg/100 g)	500		3.26				
Manganese (mg/100 g)	9.8		2.89				
Molibdeno (mg/100 g)	0.1						
Selenio (mg/100 g)	0.06						
Zinco (mg/100 g)	6.4		1.26				
Rame (mg/100 g)	1.0		0.73				
Cobalto (mg/100 g)	0.03						

Tabella 1. Composizione nutrizionale di foglie secche di Stevia (g/100 g o mg/100 g).

	Tadhani *et al.*, 2006.*	Korobko *et al.*, 2008.*
Acido palmitico (C 16:0)	27.51	2.11
Acido palmitoleico (C 16:1)	1.27	
Acido stearico (C 18:0)	1.18	2.03
Acido oleico (C 18:1)	4.36	
Acido linoleico (C 18:21)	12.40	9.32
Acido linolenico (C 18:3)	21.59	24.95

Tabella 2. Profilo di acidi grassi (g/100 g) su olio estratto da foglie si Stevia.

** tutti i valori sono calcolati su substrati di umidità pari a zero per 100 g di prodotto.*

		Ovest		
ASPERSIONE		4-1	5-1	6-1
		5-2	6-2	4-2
		6-3	4-3	5-3
		4-4	5-4	6-4
	Sud			Nord
MICROIRRIGAZIONE		1-1	2-1	3-1
		2-2	3-2	1-2
		3-3	1-3	2-3
		1-4	2-4	3-4
		Est		

Tabella 3. Divisione delle parcelle per la coltivazione della stevia a Pojana Maggiore. Il primo numero corrisponde alla tesi (in particolare 1 nella tesi aspersione corrisponde al 4 nella tesi microirrigazione, 2 nella tesi aspersione corrisponde al 5 nella tesi microirrigazione, 3 nella tesi aspersione corrisponde al 6 nella tesi microirrigazione). Il secondo numero corrisponde invece alla ripetizione.

							Urea 46% (kg/parcella)	**Nitrato ammonico 27% (kg/parcella)**	
Tesi	**Irrigazione**	**Fattore**	**N (kg ha^{-1})**	**$P_2 0_5$ (kg ha^{-1})**	**K_2O (kg ha^{-1})**	**Totale**	**Pre-trapianto**	**Post-trapianto**	**N. Piante**
1	M	1	50	21	115	0,41	0,21	0,35	168
2	M	1,5	75	31,5	172,5	0,62	0,31	0,53	168
3	M	2	100	42	230	0,83	0,42	0,70	168
4	A	1	50	21	115	0,41	0,21	0,35	168
5	A	1,5	75	31,5	172,5	0,62	0,31	0,53	168
6	A	2	100	42	230	0,83	0,42	0,70	168

Tabella 4. Schema delle concimazioni della stevia a Pojana Maggiore. M = microirrigazione; A = aspersione.

		N (kg Ha^{-1})	Urea (kg Ha^{-1})
DOSI DI CONCIME	**N1**	50	108.7
	N2	150	326.7
	N3	250	543.5
		K (kg Ha^{-1})	**Solfato di potassio (kg Ha^{-1})**
	K1	120	240
	K2	200	400
	K3	280	560
		P (kg Ha^{-1})	**Perfosfato (kg Ha^{-1})**
	P1	23	50
	P2	70	152

Tabella 5. Schema delle concimazioni della stevia a Padova.

Nome comune	Formula	PM (g/mol)	Fattore di conversione
Steviolo	$C_{20}H_{30}O_3$	318.45	1.00
Stevioside	$C_{38}H_{60}O_{18}$	804.87	0.40
Rebaudioside A	$C_{44}H_{70}O_{23}$	967.01	0.33

Tabella 6. *S*teviolo e glicosidi steviolici più abbondanti in stevia rebaudiana, con le rispettive formule molecolari, pesi molecolari (PM) e fattori di conversione per calcolare gli equivalenti steviolici.

			Stevioside	Rebaudioside A	Glucosio	Fruttosio
Parte			**g kg $^{-1}$ p.s.**			
Foglie	concimazione	1	18,9	9,56	3,04	6,85
		1,5	17,5	10,3	2,28	6,70
		2	19,5	10,0	2,90	6,62
	irrigazione	M	19,8	10,6	2,54	6,58
		A	17,5	9,29	2,95	6,87
Significatività			n.s. n.s.	n.s. n.s.	n.s. n.s.	n.s. n.s.
Fusti	concimazione	1	3,91	2,42	1,82	6,64
		1,5	3,93	2,76	1,77	7,54
		2	4,51	2,78	2,02	7,26
	irrigazione	M	4,90	3,08 a	1,76	6,81
		A	3,33	2,22 b	1,99	7,49
Significatività			n.s. n.s.	n.s. *	n.s. n.s.	n.s. n.s.
Pianta intera	concimazione	1	12,3	6,45	2,52	6,76
		1,5	11,5	6,96	2,05	7,06
		2	12,7	6,70	2,53	6,94
	irrigazione	M	13,0 a	7,15	2,18	6,70
		A	11,5 b	6,26	2,54	7,14
Significatività			n.s. *	n.s. n.s.	n.s. n.s.	n.s. n.s.

Tabella 7. Contenuto (espresso su peso fresco) dei principali glicosidi steviolici e zuccheri in foglie, fusti e pianta intera, in relazione alla concimazione ed irrigazione della stevia coltivata a Pojana Maggiore.

*n.s. sta per "non significativo" , * sta per "significativo per P ≤ 0.05, ** sta per significativo per P ≤ 0.01. I valori senza alcuna lettera in comune differiscono statisticamente per P ≤ 0.05 secondo il Test HSD di Tukey.*

			Stevioside	Rebaudioside A	Glucosio	Fruttosio
Parte			**g kg $^{-1}$ p.s.**			
Foglie	concimazione	1	70,3	35,6	11,3	25,5
		1,5	66,4	39,0	8,68	25,4
		2	73,4	37,6	10,9	24,9
	irrigazione	M	74,2	39,8	9,48	24,6
		A	65,9	35,0	11,1	25,9
Significatività			n.s. n.s.	n.s. n.s.	n.s. n.s.	n.s. n.s.
Fusti	concimazione	1	14,5	9,01	6,77	24,6
		1,5	14,4	10,2	6,46	27,4
		2	16,5	10,2	7,43	26,7
	irrigazione	M	18,1 a	11,4 a	6,54	25,3
		A	12,1 b	8,11 b	7,23	27,2
Significatività			n.s. *	n.s. *	n.s. n.s.	n.s. n.s.
Pianta intera	concimazione	1	46,0	24,1	2,52	6,76
		1,5	42,1	26,0	2,05	7,06
		2	47,4	24,9	2,53	6,94
	irrigazione	M	48,4 a	26,7	2,18	6,70
		A	42,6 b	23,2	2,55	7,14
Significatività			n.s. *	n.s. n.s.	n.s. n.s.	n.s. n.s.

Tabella 8. Contenuto (espresso su peso secco) dei principali glicosidi steviolici e i zuccheri in foglie, fusti e pianta intera, in relazione alla concimazione ed irrigazione della stevia coltivata a Pojana Maggiore.

*n.s. sta per "non significativo" , * sta per "significativo per P ≤ 0.05, ** sta per significativo per P ≤ 0.01. I valori senza alcuna lettera in comune differiscono statisticamente per P ≤ 0.05 secondo il Test HSD di Tukey.*

Dosi di concime (Kg ha^{-1})	Stevioside (g kg $^{-1}$ p.f.)	Rebaudioside A (g kg $^{-1}$ p.f.)	Glucosio (g kg $^{-1}$ p.f.)	Fruttosio (g kg $^{-1}$ p.f.)
N 50	0,33	0,22	0,55	4,37 ab
N 150	0,78	0,55	0,63	5,03 a
N 250	1,05	0,68	0,56	3,88 b
P 23	0,70	0,51	0,55	4,23
P 70	0,74	0,46	0,61	4,63
K 120	0,69	0,45	0,55	4,39
K 200	0,72	0,53	0,59	4,66
K 280	0,76	0,47	0,59	4,31
Significatività	n.s. n.s. n.s.	n.s. n.s. n.s.	n.s. n.s. n.s.	* n.s. n.s.

Tabella 9. Contenuto (espresso su peso fresco) dei principali glicosidi steviolici e zuccheri in relazione alla concimazione ed irrigazione della stevia coltivata a Padova.

*n.s. sta per "non significativo" , * sta per "significativo per P ≤ 0.05, ** sta per significativo per P ≤ 0.01. I valori senza alcuna lettera in comune differiscono statisticamente per P ≤ 0.05 secondo il Test HSD di Tukey.*

Dosi di concime (Kg ha^{-1})	Stevioside (g kg $^{-1}$ p.f.)	Rebaudioside A (g kg $^{-1}$ p.f.)	Glucosio (g kg $^{-1}$ p.f.)	Fruttosio (g kg $^{-1}$ p.f.)
N 50	32,9	22,1	1,87	15,0 ab
N 150	39,0	27,5	2,16	17,5 a
N 250	34,9	22,7	1,99	13,7 b
P 23	34,7	24,9	1,93	15,0
P 70	36,5	23,2	2,09	15,7
K 120	35,2	23,0	1,89	15,1
K 200	36,3	25,9	2,07	16,3
K 280	34,9	22,6	2,02	14,9
Significatività	n.s. n.s. n.s.	n.s. n.s. n.s.	n.s. n.s. n.s.	* n.s. n.s.

Tabella 10. Contenuto (espresso su peso secco) dei principali glicosidi steviolici e zuccheri in relazione alla concimazione ed irrigazione della stevia coltivata a Padova.

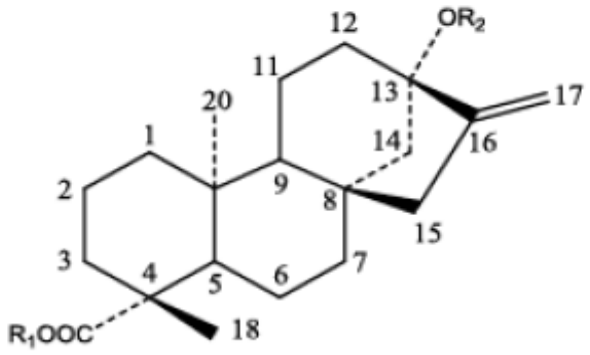
*n.s. sta per "non significativo" , * sta per "significativo per P ≤ 0.05, ** sta per significativo per P ≤ 0.01. I valori senza alcuna lettera in comune differiscono statisticamente per P ≤ 0.05 secondo il Test HSD di Tukey.*

Figura 1. Sistema radicale di stevia *rebaudiana*.

Figura 2. Disposizione fogliare su germogli di stevia *rebaudiana*.

Figura 3. Disposizione fiorale su formazioni a corimbo di stevia *rebaudiana*.

Figura 4. Semi di stevia *rebaudiana*.



Compounds	R_1	R_2
Steviol (ST)	H	H
Steviolbioside (SB)	H	β-Glc- β-Glc(2-1)
Stevioside (STV)	β-Glc	β-Glc- β-Glc(2-1)
Rebaudioside A (RA)	β-Glc	β-Glc- β-Glc(2-1)β-Glc(3-1)
Rebaudioside B (RB)	H	β-Glc- β-Glc(2-1)β-Glc(3-1)
Rebaudioside C (RC)	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2-1)β-Glc(3-1)
Rebaudioside D (RD)	β-Glc–β-Glc(2-1)	β-Glc–β-Glc(2-1)β-Glc(3-1)
Rebaudioside E (RE)	β-Glc–β-Glc(2-1)	β-Glc- β-Glc(2-1)
Rebaudioside F (RF)	β-Glc	β-Glc–β-Xyl(2-1)β-Glc(3-1)
Dulcoside A (DU)	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2-1)

Figura 5. Struttura dei glicosidi steviolici in stevia rebaudiana Bertoni (Qing *et al.*, 2012).
Glc = glucosio, Rha = ramnosio, Xyl = xylosio.

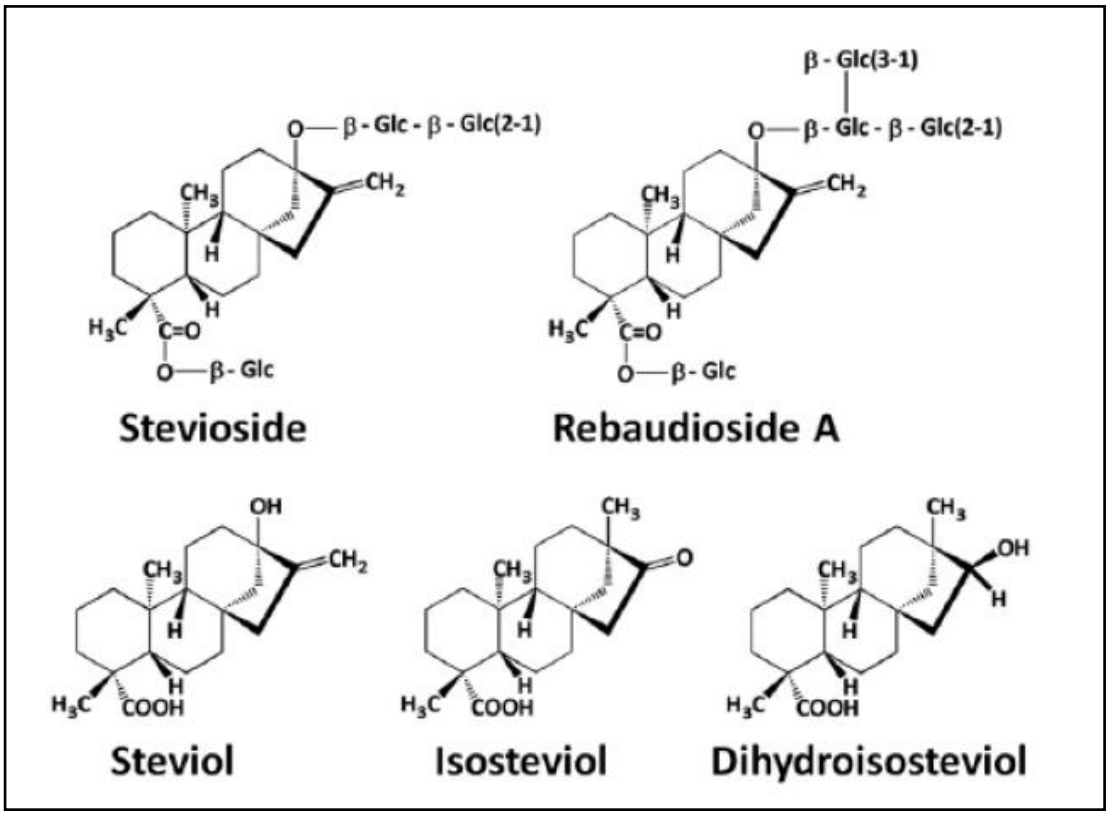


Figura 6. Struttura chimica di alcuni glicosidi steviolici (Chatsudthipong e Muanprsat, 2008).

							Rif. pianta
x	x	x	x	x	x	x	1
x	x	x	x	x	x	x	2
x	x	x	x	x	x	x	3
x	x	x	x	x	x	x	4
x	x	x	x	x	x	x	5
x	x	x	x	x	x	x	6
x	x	x	x	x	x	x	7
x	x	x	x	x	x	x	8
x	x	x	x	x	x	x	9
x	x	x	x	x	x	x	10
x	x	x	x	x	x	x	11
x	x	x	x	x	x	x	12
x	x	x	x	x	x	x	13
x	x	x	x	x	x	x	14
x	x	x	x	x	x	x	15
x	x	x	x	x	x	x	16
x	x	x	x	x	x	x	17
x	x	x	x	x	x	x	18
x	x	x	x	x	x	x	19
x	x	x	x	x	x	x	20
x	x	x	x	x	x	x	21
x	x	x	x	x	x	x	22
x	x	x	x	x	x	x	23
x	x	x	x	x	x	x	24

Figura 7. Area di saggio del campo prova a Pojana Maggiore (micro-parcella) evidenziata in grigio scuro. La parcella di rilievo, entro la quale sono scelte le piante oggetto dei rilievi, è evidenziata da bordi mentre il bordo del campo è colorato in bianco. Le x rappresentano le parcelle.

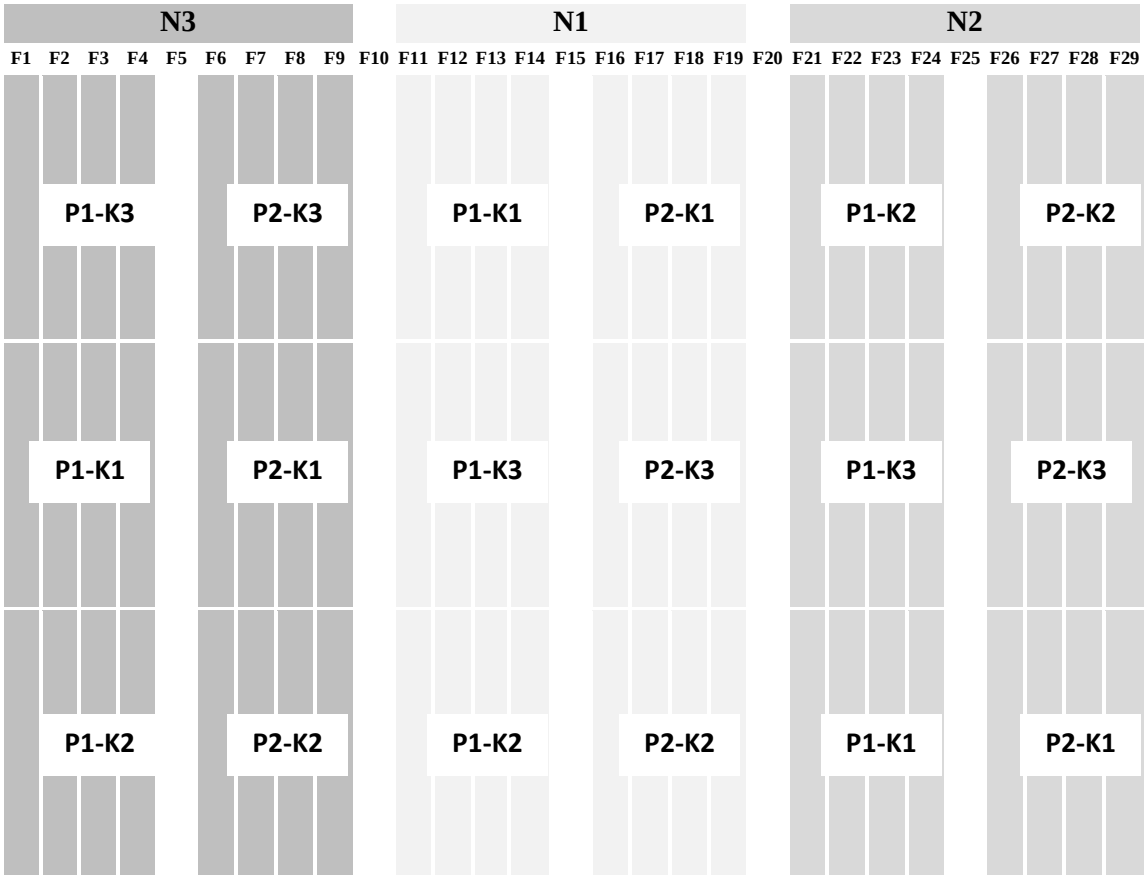


Figura 8. Rappresentazione dello schema sperimentale adottato a Padova in riferimento al blocco 3. Ogni parcella ha dimensioni 8 x 2.47 m.

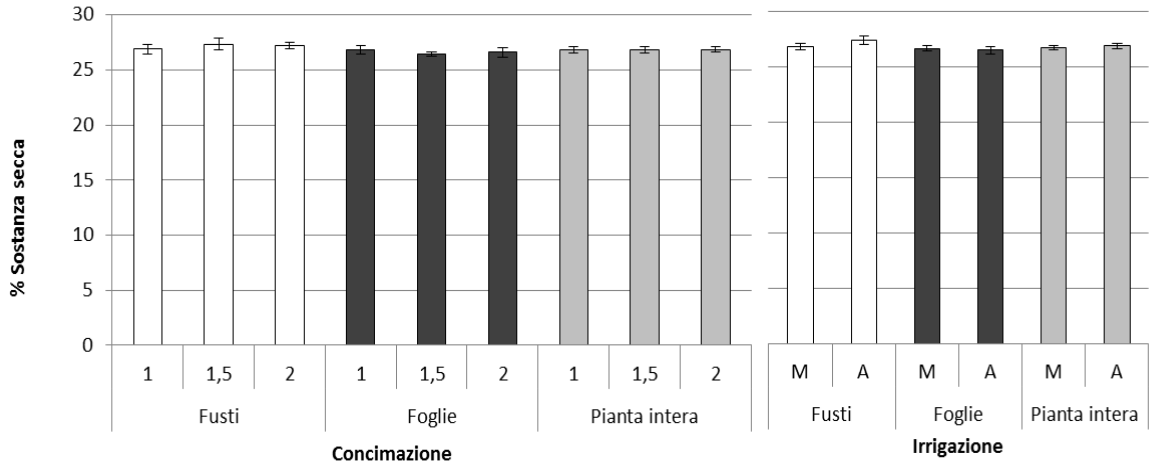


Figura 9. Effetto delle modalità di concimazione ed irrigazione sul contenuto di sostanza secca (%) in fusti, foglie e pianta intera della stevia coltivata a Pojana Maggiore.

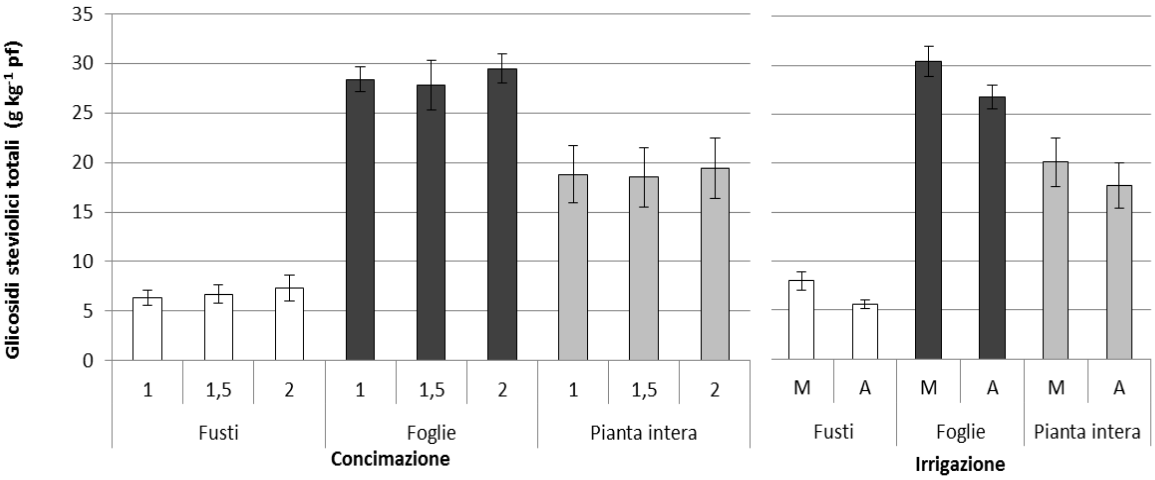


Figura 10. Effetto delle modalità di concimazione ed irrigazione sul contenuto di glicosidi steviolici totali (espresso in peso fresco) in fusti, foglie e pianta intera della stevia coltivata a Pojana Maggiore.

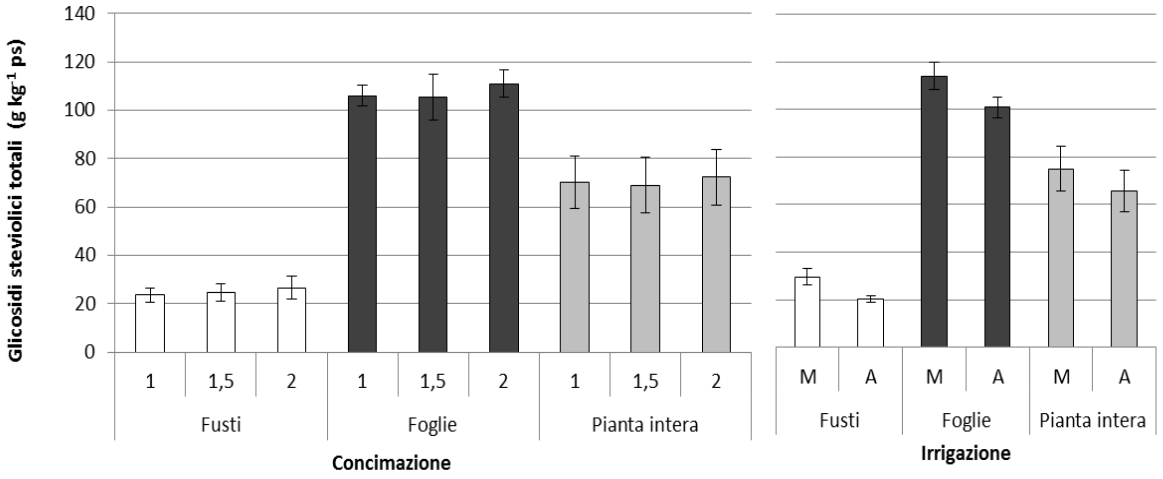


Figura 11. Effetto delle modalità di concimazione ed irrigazione sul contenuto di glicosidi steviolici totali (espresso in peso secco) in fusti, foglie e pianta intera della stevia coltivata a Pojana Maggiore.

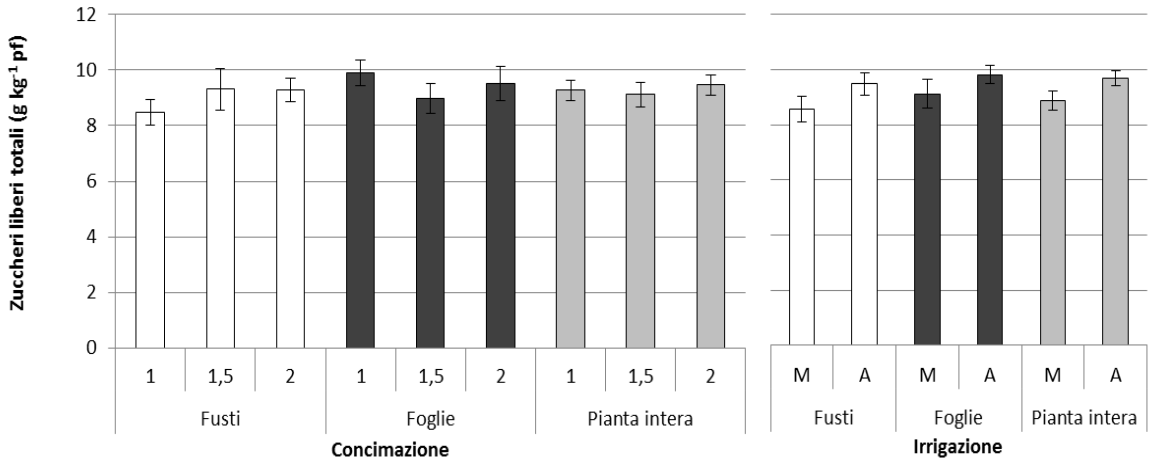


Figura 12. Effetto delle modalità di concimazione ed irrigazione sul contenuto di zuccheri liberi totali (espresso in peso fresco) in fusti, foglie e pianta intera della stevia coltivata a Pojana Maggiore.

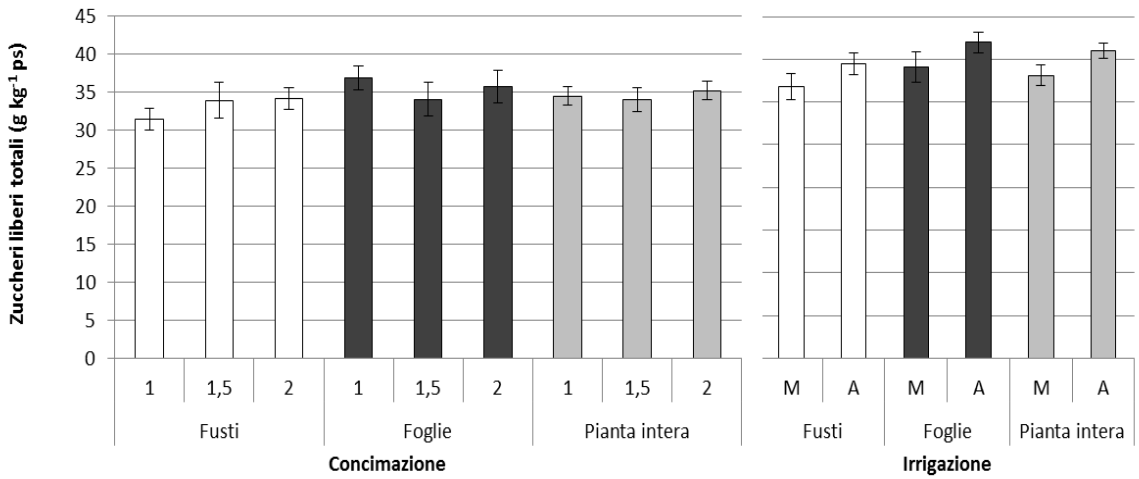


Figura 13. Effetto delle modalità di concimazione ed irrigazione sul contenuto di zuccheri liberi totali (espresso in peso secco) in fusti, foglie e pianta intera della stevia coltivata a Pojana Maggiore.

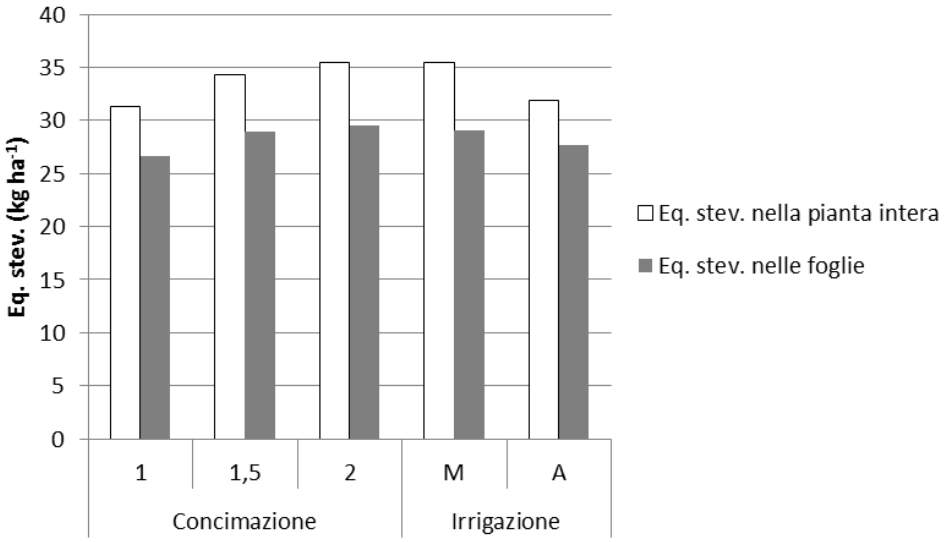


Figura 14. Equivalenti steviolici (kg ha^{-1}) nella pianta intera e nelle foglie di stevia coltivata a Pojana Maggiore.

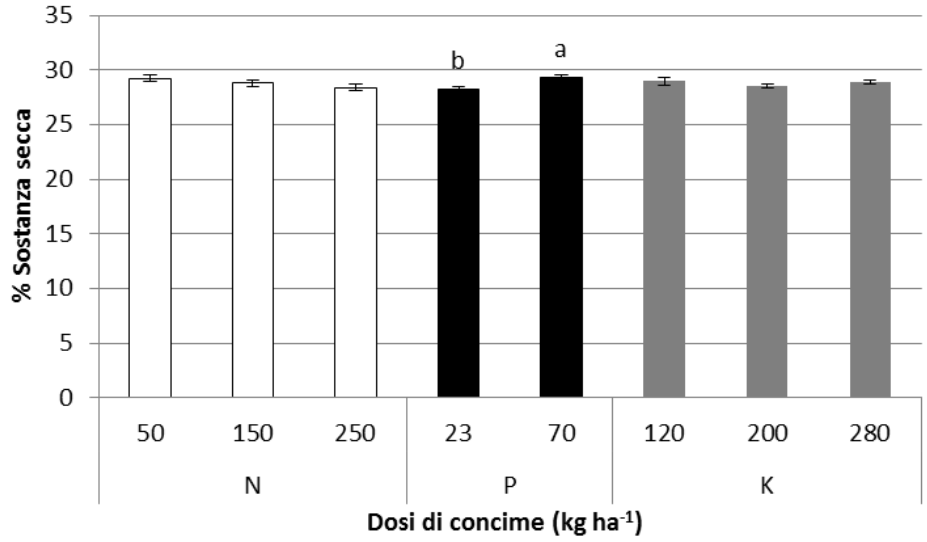


Figura 15. Effetto delle dosi di concime di N-P-K sul contenuto di sostanza secca (%) in stevia coltivata a Padova.

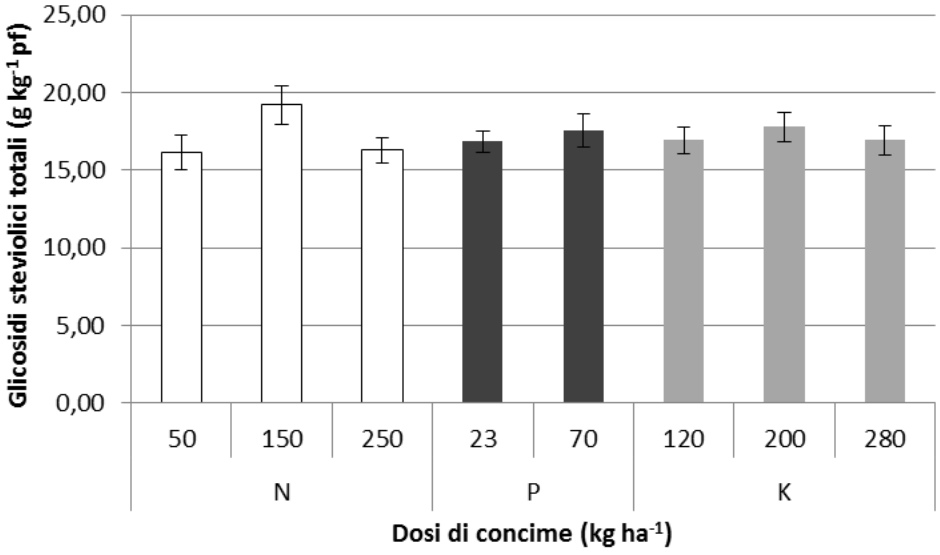


Figura 16. Effetto delle dosi di concime N-P-K sul contenuto di glicosidi steviolici totali (espresso in peso fresco) in stevia coltivata a Padova.

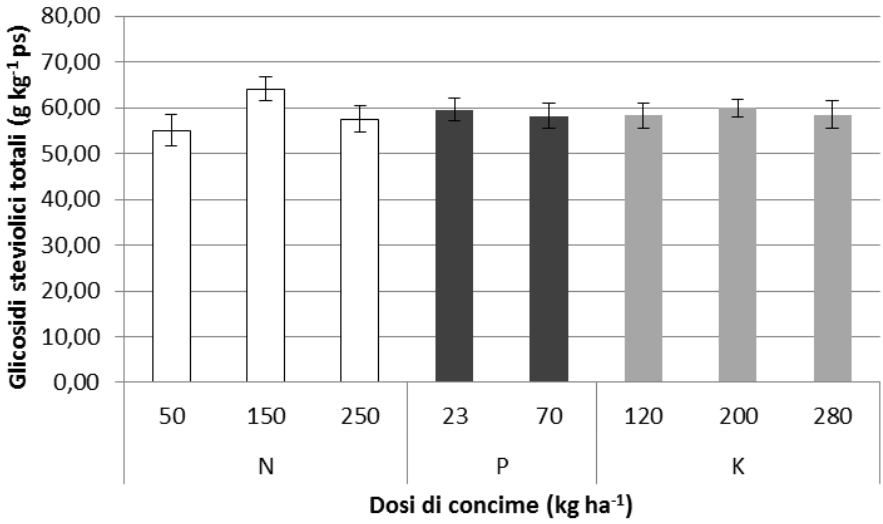


Figura 17. Effetto delle dosi di concime N-P-K sul contenuto di glicosidi steviolici totali (espresso in peso secco) in stevia coltivata a Padova.

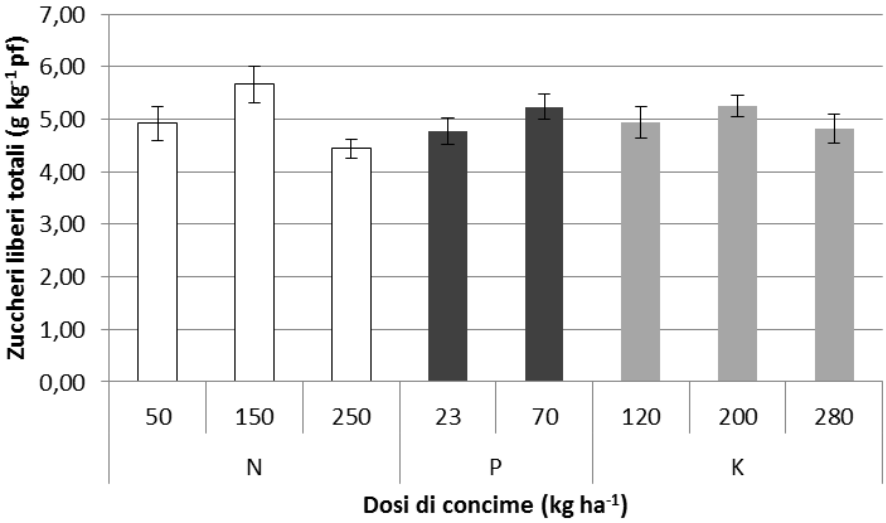


Figura 18. Effetto delle dosi di concime N-P-K sul contenuto di zuccheri liberi totali (espresso in peso fresco) in stevia coltivata a Padova.

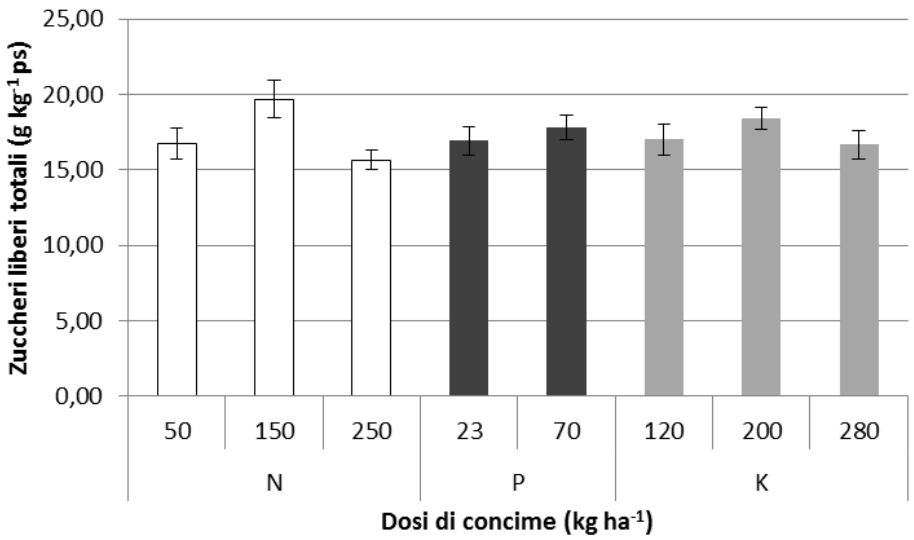


Figura 19. Effetto delle dosi di concime N-P-K sul contenuto di zuccheri liberi totali (espresso in peso secco) in stevia coltivata a Padova.