



INSTITUTO POLITÉCNICO  
DE VIANA DO CASTELO

Maria da Glória Areias dos Santos

Adaptação da *Stevia rebaudiana* Bertoni em modo de produção  
biológico em Ponte de Lima

Mestrado em Agricultura Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de  
Professora Isabel de Maria C. G. Mourão  
Professor Luis Miguel C. M. de Brito

Novembro de 2015



Este documento é da exclusiva responsabilidade do autor



## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus Pais e restante família pelo seu apoio incondicional ao longo de toda a minha vida pessoal, académica e profissional, sem o amor deles tudo seria muito difícil.

À Professora Doutora Isabel Mourão, minha orientadora, pela capacidade humana de receber os alunos no primeiro dia de aulas e torná-los de forma imediata uma equipa coesa que se manterá ao longo de todo o mestrado. Agradeço-lhe também pela sua disponibilidade, compreensão e apoio incondicional para a concretização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Miguel Brito pela sua pronta ajuda, apoio e sábias sugestões na análise de resultados.

Ao José Sousa, ao Jorge Barbosa e à Lia Ferreira, agradeço a oportunidade de realização do presente trabalho na Biodiversus, e pela criação de todas as condições para a realização deste trabalho com disponibilização de todo o tipo de recursos materiais para o avanço do estudo nas melhores condições.

Ao Eng.º Virgílio, à Suzy e restante equipa dos Serviços Analíticos ESAPL, pela amizade e carinho que me demonstraram e pelo seu profissionalismo e preciosa ajuda na realização de todos os trabalhos laboratoriais, bem como na obtenção dos valores analíticos.

A toda a equipa de colaboradores da Biodiversus, Maria, Natália, Prazeres, Afonso e Vítor por toda a amizade, companheirismo, colaboração e auxílio nas atividades práticas, bem como toda a partilha de conhecimentos ao longo deste trabalho e ao longo dos 10 meses de estágio.

Ao Prof. Doutor Ângelo Rodrigues da ESA-IPB pelos preciosos conselhos e dicas para “entrar” de forma rápida e eficaz no mundo da Stevia.

E por último, aos colegas de Mestrado do ano letivo 2013/2015 pelo apoio e convívio.

## RESUMO

O atual interesse da cultura da stevia baseia-se num mercado emergente de produtos adoçantes relacionado com o número crescente de diabéticos e obesos por todo mundo. Em 2008, o Comité Misto de Peritos em Aditivos Alimentares (FAO/OMS) estabeleceu que os glicosídeos de esteviol são seguros para o consumo humano. A produção biológica assume um interesse crescente da necessidade de uma alimentação com menores impactos ambientais, livre de produtos químicos de síntese e de transgénicos. Aliando estes dois fatores ao facto de haver em Portugal a pertinência da criação de empresas geradoras de postos de trabalho e não havendo a tradição do cultivo de stevia, que é uma planta subtropical, torna-se necessário estudar o potencial de adaptação desta planta, visando a sua produção para o mercado nacional e internacional. O presente trabalho teve como principal objetivo o estudo da adaptação da produção biológica de stevia, no concelho de Ponte de Lima e, de modo mais geral, às condições edafo-climáticas da região Noroeste de Portugal.

A cultura de *Stevia rebaudiana* Bertonii, cultivar Criolla, foi instalada na empresa Biodiversus em estufa e ao ar livre, em solos argilosos de textura medianamente pesada. Avaliou-se também o comportamento das plantas sujeitas a três colheitas para consumo em fresco (F) e a uma única colheita destinada à secagem das folhas (S). O desenho experimental utilizado foi o de split-plot com 4 tratamentos e 3 repetições. Os grandes talhões incluíram os seguintes 4 tratamentos: 2 sistemas de produção (E: estufa e A: ar livre) e 2 tipos de colheita (F e S). Os pequenos talhões corresponderam a 2 tipos de fertilização (f1: fertilização orgânica de fundo e f2: fertilização de fundo e de cobertura 97 dias após a plantação, DAP). O número de hastes por planta, o peso fresco e seco das hastes cortadas foram avaliados 44, 92, 112 e 127 DAP nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco e 44 e 127 DAP nas plantas destinadas a secagem. Determinou-se ainda a matéria seca. A altura das plantas de stevia, que na plantação era de aproximadamente 10 cm, foi monitorizada nas mesmas datas e ainda 71 DAP.

Os efeitos da fertilização não causaram diferenças significativas entre os tratamentos, em nenhum dos parâmetros analisados no âmbito do crescimento das plantas (44 a 127 DAP), o que se poderá explicar pela aplicação tardia da fertilização de cobertura 97 DAP. A altura média do conjunto das plantas na estufa ( $52,1 \text{ cm planta}^{-1}$ ) foi superior à altura média do conjunto das plantas produzidas ao ar livre ( $47,4 \text{ cm planta}^{-1}$ ) o que se poderá explicar pelo maior valor da temperatura do ar dentro da estufa. Este efeito poderá também estar relacionado com o maior número de hastes nas plantas ao ar livre em 44 DAP ( $8,6 \text{ hastes planta}^{-1}$ ), em comparação com as plantas produzidas em estufa ( $5,8 \text{ hastes planta}^{-1}$ ). No entanto, o número médio de hastes por planta foi idêntico para todos os tratamentos das plantas produzidas em estufa e ao ar livre (média  $7,3 \text{ hastes planta}^{-1}$ ). Apesar da altura média das plantas produzidas na estufa ter sido superior à das plantas produzidas ao ar livre, não foi significativa a diferença entre o peso médio fresco ( $776,1 \text{ g planta}^{-1}$ ) e seco das plantas na estufa e o peso fresco ( $597,0 \text{ g planta}^{-1}$ ) e seco das plantas produzidas ao ar livre. As plantas para consumo em fresco também apresentaram uma

altura média superior em comparação com as plantas destinadas à secagem, mas o peso fresco e seco total médio foi idêntico.

A matéria seca média das hastes cortadas foi significativamente superior nas plantas produzidas ao ar livre (20,5%) em comparação com as plantas produzidas na estufa (18,8%), mas o teor médio em ácido ascórbico foi idêntico (em média 9,2 mg g<sup>-1</sup> MS). Para o tipo de colheita a matéria seca média das folhas das plantas para consumo em fresco (20,2%) foi superior e o teor médio de ácido ascórbico foi inferior (8,5 mg g<sup>-1</sup> MS), em comparação com as plantas para secagem (19,1% e 10,0 mg g<sup>-1</sup> MS).

**Palavras-Chave:** condições edafoclimáticas, produtividade, glicosídeos de esteviol

## ABSTRACT

The current interest of stevia production is based on an emerging market for sweeteners related products with the increasing number of diabetic and obese worldwide. In 2008, the Expert Joint Committee of Food Additives (FAO/WHO) established that steviol glycosides are safe for human consumption. Organic production is growing interest because of the need to produce food with less environmental impact, free of synthetic chemicals and transgenic plants. Combining these two factors and the fact that there in Portugal the relevance of creating companies that generate jobs and that there is no tradition of stevia cultivation, which is a subtropical plant, it is necessary to study the potential for adaptation of this plant in order to produce it for the domestic and international markets. This work aimed to study the adaptation of the organic production of stevia in Ponte de Lima and, more generally, to the soil and climatic conditions of the North West region of Portugal.

The *Stevia rebaudiana* Bertoni cv. Criolla crop, was installed in Biodiversus farm in greenhouse and outdoors, in heavy clay soils of medium texture. It also assessed the behaviour of the plants subjected to three harvests for fresh consumption (F) and a single harvest for leaves drying (S). The experimental design used was a split-plot with four treatments and three repetitions. The large plots included the following four treatments: production systems 2 (E: Greenhouse and A: outdoors) and the 2 types of harvests (F and S). Small plots corresponded to two types of fertilization (f1: organic fertilization before planting and f2: organic fertilization before planting and at 97 days after planting, DAP). The number of stems per plant, fresh and dry weight of the harvested stems were evaluated 44, 92, 112 and 127 DAP for plants harvested for fresh consumption and 44 and 127 DAP for plants aiming drying of the leaves. It has been also determined the dry matter and the contents of leaves on steviol glycosides. The height of the stevia plant, which was approximately 10 cm at planting, was monitored in the same dates as above and also at 71 DAP.

The effects of fertilization did not cause significant differences between treatments in any of the parameters analyzed in the context of plant growth (44-127 DAP), which could be explained by the late application of topdressing 97 DAP. The average height of all the plants in the greenhouse (52.1 cm plant<sup>-1</sup>) was higher than the average height of all the outdoor plants (47.4 cm plant<sup>-1</sup>) what can be explained by the higher air temperature in the greenhouse. This effect may also be related to the greatest number of stems in plants outdoors on 44 DAP (8.6 stems plant<sup>-1</sup>) compared to plants grown in greenhouse (5.8 stems plant<sup>-1</sup>). However, the average number of stems per plant was similar for all treatments of plants grown in greenhouses and outdoors (average 7.3 stems plant<sup>-1</sup>). Although the average height of the plants produced in the greenhouse was higher than that of plants outdoors, there was no significant difference between the average fresh weight (776.1 g plant<sup>-1</sup>) and dry weight of the plants in the greenhouse and fresh weight (597.0 g plant<sup>-1</sup>) and dry weight of the outdoors plants. Plants for fresh consumption also



showed a higher mean plant height compared to plants for drying of the leaves, but the total fresh and dry weights were similar.

The mean dry weight of stems was significantly higher in plants produced outdoors (20.5%) compared to plants grown in greenhouse (18.8%), but the average ascorbic acid content was similar (average 9.2 mg g<sup>-1</sup> DM). For the type of crop, the mean leaves dry weight of the plants for fresh consumption (20.2%) was higher and the mean content of ascorbic acid was lower (8.5 mg g<sup>-1</sup> DM), compared to the plants for drying (19.1% e 10.0 mg g<sup>-1</sup> DM).

**Keywords:** soil and climate conditions, yield, steviol glycosides.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AB – Agricultura Biológica

Ca - Cálcio

CAS N° - Identificador numérico único atribuído pelo Chemical Abstracts Service

CFA - Cultivar Criolla, colheita para fresco

CSA - Cultivar Criolla, colheita para fresco

CE – Comissão Europeia

CFE - Cultivar Criolla, colheita para fresco

DDA – Dose Diária Aceitável

DRAEDM - Direção Regional de Agricultura do Entre Douro e Minho

EU – União europeia

CSE - Cultivar Criolla, colheita para fresco

ESA PL – Escola Superior Agrária de Ponte de Lima

ESA IPB – Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

g – Grama

°C – Grau centígrado

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico

JECFA - Comité Misto de Peritos em Aditivos Alimentares da FAO/OMS

Lh<sup>-1</sup> – Litro por hora

MO – Matéria orgânica

MPa – Mega Pascal

Mg - Magnésio

mg – Miligrama

mL – Mililitro

μL – Microlitro

MPB – Modo de Produção Biológica

NOEL - Nível de efeito não observável

OMS – Organização Mundial de Saúde

pH – Potencial de Hidrogénio

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Pentóxido de fósforo

Kg – Quilograma

kcal g<sup>-1</sup> – Quilocaloria por grama

K<sub>2</sub>O – Óxido de potássio

SIG – Sistema de Informação Geográfica

USDA – Unit State Department of Agriculture

USA – Unit State of America

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
RESUMO .....	ii
ABSTRACT.....	iv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vi
1 Introdução .....	1
1.1 Origem e história da stevia.....	1
1.2 Caracterização da espécie .....	3
1.2.1 Morfologia e descrição botânica e taxonómica.....	3
1.2.2 Cultivares da stevia e patentes de plantas.....	5
1.3 Composição e propriedades nutricionais.....	7
1.3.1 Composição .....	7
1.3.2 Propriedades nutricionais e nutracêuticas.....	10
1.3.3 Constituintes fitoquímicos, características químicas, capacidade edulcorante e estabilidade.....	12
1.3.4 Utilização de stevia.....	14
1.4 Propagação da planta.....	15
1.5 Cultivo de stevia em modo de produção biológico - vantagens.....	17
1.6 Segurança alimentar da stevia: legislação e organismos internacionais .....	19
1.7 Mercados - oferta e procura de stevia .....	19
1.7.1 Principais países produtores .....	19
1.7.2 Mercado global e principais regiões .....	20
1.8 Interesse atual da cultura da stevia em Portugal .....	21
1.9 Objetivos do trabalho.....	21
2 Material e Métodos.....	23
2.1 Localização do ensaio.....	23
2.2 Caracterização do solo.....	24
2.3 Caracterização climática.....	25

2.4	Condições ambientais .....	26
2.5	Material vegetal.....	27
2.6	Desenho experimental .....	27
2.7	Preparação do Solo.....	27
2.8	Fertilização .....	28
2.9	Instalação da cultura .....	28
2.10	Rega.....	29
2.11	Controlo de infestantes, pragas e doenças .....	29
2.12	Poda e técnicas culturais.....	29
2.13	Avaliação da produtividade e das características de qualidade .....	30
2.14	Caraterização do teor de ácido ascórbico por HPLC .....	31
2.15	Cronograma de operações culturais.....	32
3	Resultados.....	34
3.1	Crescimento das plantas.....	34
3.1.1	Altura e número de hastes .....	34
3.1.2	Peso das hastes na colheita.....	38
3.2	Qualidade das hastes.....	40
3.2.1	Matéria seca das hastes .....	40
3.2.2	Teor em ácido ascórbico .....	42
3.3	Condições ambientais .....	44
4	Discussão e conclusões .....	45
4.1	Desenvolvimento e crescimento das plantas .....	45
4.2	Qualidade das hastes.....	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
	ANEXOS.....	51

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Origem e história da stevia

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, à frente designada simplesmente por stevia, é uma planta originária da zona fronteiriça entre o Paraguai e o nordeste do Brasil. Os primeiros indícios da existência desta planta remontam à sua utilização pelos Guarani, uma tribo indígena que lhe chamava Kaá-heé (erva doce) (Lewis, 1992). É uma planta com uso ancestral como edulcorante e como planta medicinal (Shock, 1982).

A primeira descrição botânica da planta stevia é atribuída ao botânico suíço Moisés Santiago Bertoni em 1887, detalhando o seu sabor doce. O primeiro nome a ser-lhe atribuído foi *Eupatorium rebaudianum* Bert. em honra do químico paraguaio Ovídio Rebaudi, o primeiro a estudar os componentes doces das suas folhas. Mais tarde, o nome foi mudado para o atual e a planta começou a ser recomendada não só para a consumo alimentar, mas também para fins medicinais devido aos efeitos particulares que lhe foram atribuídos (Bertoni, 1905).

Em 1900 o químico paraguaio Ovídio Rebaudi conseguiu isolar dois compostos ativos. Entre 1908 e 1910, alguns cientistas alemães, incluindo Rasennack e Karl Dietrich realizaram as primeiras análises químicas, isolaram e cristalizaram duas substâncias da componente doce da folha, que denominaram de *eupatrina* e *rebaudiana* (Marín, 2004).

Já no ano de 1921, a pedido de Moisés Bertoni o cristal denominado *eupatorino* foi designado pela União Internacional de Química de esteviosídeo devido ao género da planta. Mais tarde, em 1931, os químicos franceses Bridel e Lavielle cristalizaram o esteviosídeo com 6% de rendimento e determinaram que o seu poder adoçante era cerca de 300 vezes maior do que o açúcar de cana e retificaram a fórmula da estrutura química molecular, passando a  $C_{38}H_{60}O_{18}$ . Também levantaram a hipótese de que o esteviosídeo não é assimilado pelo corpo, sendo eliminado na sua forma original.

Posteriormente, os compostos doces foram renomeados de *esteviosídeo* e *rebaudiosídeo*, que são 200 a 300 vezes mais doces que a sacarose, sendo estáveis ao calor e não fermentando (Landázuri et al., 2008).

Em 1943, as primeiras sementes foram exportados para a Reino Unido, onde foram cultivadas sem sucesso. Em 1968 foram exportadas para o Japão e a partir daí começou a

sensibilização, o cultivo e a propagação de plantas em todo o mundo, particularmente para o Sudeste Asiático (Lewis, 1992).

Em 1967 inicia-se a investigação da pesquisa da stevia em Kosakoka, Japão, resultando na síntese de rebaudiosídeo (1969). No seguimento desse estudo, o Dr. Derek Bonton (Prémio Nobel de Química) expõe um trabalho sobre a stevia no Imperial College of Science and Technology, em Londres.

No início dos anos setenta, mais especificamente em 1971, o Ministério da Agricultura e Produção Aquática do Japão iniciou o cultivo experimental da stevia e o professor Haku Miura da universidade de Hokaido inicia a sua investigação e análise da planta (Carrascal, s/ data).

Em 2004, o Comité Misto de Peritos em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA) concluiu que o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A contidos na stevia não são genotóxicos e fazem uma recomendação com a designação “temporária”, que a quantidade de ingestão de dose diária deverá ser 0-2 mg/kg de massa corporal para os glicosídeos de esteviol (WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 54).

Em 2008, a JECFA concluiu que os dados dos novos estudos foram suficientes para permitir que a designação “temporário” fosse removida, e estabeleceram uma nova DDA para os glicosídeos de esteviol de 0-4 mg/kg de peso corporal/dia expresso em teor de esteviol.

Em 2011, o Regulamento (UE) nº 1131/2011 da Comissão, de 11 de Novembro de 2011 no que se refere aos glicosídeos de esteviol, no seu ponto 2 estabelece “A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (a seguir designada «Autoridade») avaliou a segurança dos glicosídeos de esteviol, extraídos das folhas da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni, como adoçante e emitiu o seu parecer em 10 de Março de 2010. A Autoridade definiu uma Dose Diária Admissível (DDA) para os glicosídeos de esteviol, expressa em equivalentes de esteviol, de 4 mg/kg de peso corporal/dia. As previsões mais prudentes da exposição aos glicosídeos de esteviol, nos adultos e em crianças, sugerem ser provável que a DDA seja ultrapassada se cumpridos os teores máximos de utilização propostos”.

## **1.2 Caracterização da espécie**

### **1.2.1 Morfologia e descrição botânica e taxonômica**

#### **Morfologia**

A stevia (Fig. 1.3) pertence à família das Asteráceas. É uma planta herbácea de ciclo perene, caule ereto, sublenhoso e pubescente. Durante o seu desenvolvimento inicial não possui ramificações, tornando-se multicaule depois do primeiro ciclo vegetativo, chegando a produzir até 20 caules em três a quatro anos. Pode alcançar até 90 cm de altura no seu habitat natural e nos trópicos pode chegar a ter alturas superiores a 100 cm. É uma planta de raiz pivotante, filiforme, e não profunda, distribuindo-se próxima da superfície do solo (Vélez & Zapata, 2006).

As folhas são elípticas, ovais ou lanceoladas e serreadas; quando jovens apresentam disposição oposta, e alternadas quando as plantas atingem a sua maturação fisiológica, prévia à floração. A folha é o órgão que tem mais conteúdo em edulcorante (Vélez & Zapata, 2006). A flor é hermafrodita, pequena e esbranquiçada; tem corola tubular, pentalobulada, em pequenos capítulos terminais ou axilares agrupados em panículas corimbosas (Shock, 1982). Forma pequenas flores esbranquiçadas (15 a 17 mm), tendo 2-6 flores que estão dispostas em panículas soltas (Fig. 1.4). As sementes estão contidas em aquênios (fruto) delgados com cerca de 3 mm de comprimento (Abdullateef & Osman, 2012; Pande & Gupta, 2013), que pode ser claro (estéril) ou escuro (fértil) e é disseminado pelo vento (Gattoni, 1945) (Fig. 1.5).

É uma planta auto incompatível, pelo que a polinização é entomófila; é do tipo esporofítico e classificada como apomítica obrigatória (Monteiro, 1982).

É classificada como uma planta de dias longos, situando o fotoperíodo crítico de 12 a 13 horas segundo o ecótipo (Pande & Gupta, 2013). Apresenta flores de Janeiro a Março no Hemisfério Sul e de Setembro a Dezembro no Hemisfério Norte. A planta tem aproximadamente 1 mês para atravessar todas as fases de desenvolvimento dos estágios florais e produzir todas as flores (Fig. 1.4) (Yadav et al., 2011). As sementes férteis são geralmente de cor escura e as sementes estéreis são geralmente de cor mais clara (Pande & Gupta, 2013) (Fig. 1.5).



Figura 1.3 – Planta de stevia.



Figura 1.4 - Diferentes estágios da abertura da flor (Yadav et al., 2011).



Figura 1.5 – Fruto da stevia, aquênio com cerca de 3 mm de comprimento que pode ser (a) estéril (claro) ou (b) fértil (escuro).



## Caracterização botânica e classificação taxonômica

Existem cerca de 230 espécies do género, mas apenas a stevia apresenta uma essência doce, enquanto as outras espécies apresentam outro tipo de interesse bioquímico (Yadav et al., 2011). A classificação taxonômica encontra-se no Quadro 1.6.

Quadro 1.6 - Classificação Taxonômica da stevia (Fonte: USDA).

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>Sub-reino</b>	Tracheobionta
<b>Divisão</b>	Magnoliopyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordem</b>	Asterales
<b>Família</b>	Asteraceae
<b>Género</b>	<i>Stevia</i>
<b>Espécie</b>	<i>Stevia rebaudiana</i>
<b>Nomes comuns</b>	Ka'á He'é, Erva-doce, Stevia, etc.

### 1.2.2 Cultivares da stevia e patentes de plantas

Existem cerca de 90 cultivares de stevia desenvolvidas em todo o mundo, dependendo das diferentes exigências climáticas (Singh et al., 2005) e da sua composição em teores de glicosídeos de esteviol que estão presentes na planta.

O registo de patentes de plantas de stevia prende-se com o facto das empresas extratoras e refinadoras dos glicosídeos de esteviol procurarem obter plantas com um determinado tipo de composição em glicosídeos de esteviol. Tal como se pode verificar nas reivindicações de invento das várias patentes nos Quadros 1.7 e 1.8.

Geralmente, os viveiristas e os produtores das plantas de stevia selecionam as variedades com vista à obtenção de bons preços de mercado. Os fatores que podem influenciar os preços são os teores em determinados glicosídeos de esteviol, nomeadamente, Rebaudiosídeo A, Rebaudiosídeo C e Esteviosídeo.

**Nome comum de algumas cultivares:**

Criolla, Eirete I, Eirete II, Morita I, Morita II, Morita III, Brazil Zairai, Suweon 2, Suweon 11, Yunri, Yunbing, Zongping, K1, K2, K3, BPP72, SM4, Ramonskaya, Slastena, Madhuguna, Madhuguni, etc.

Quadro 1.7 - Lista de algumas patentes de cultivares de stevia. (Adaptado de Yadav, 2010)

Patente nº	Ano	Inventor	País	Título
6.255.557	2001	Brandle, J.	USA	Stevia rebaudiana com alteração da composição dos glicosídeos de esteviol
PCT-WO99/49724	1999	Brandle, J.	USA	Stevia rebaudiana com alteração da composição dos glicosídeos de esteviol
6031157	1998	Morita, T. and Yucheng, B.	USA	Cultivar de Stevia rebaudiana Bertoni
PP10,564	1998	Marsolais, A. A.; Brandle, J. and Sys, E. A.	USA	Denominação da planta Stevia 'RSIT 94-751
PP10,562	1998	Sys, E. A.; Marsolais, A. A. and Brandle, J.	USA	Denominação da planta Stevia 'RSIT 94-1306
PP10,563	1998	Brandle, J.; Sys, E. A. and Marsolais, A. A	USA	Denominação da planta Stevia 'RSIT 95-166-13
5.972.120	1999		USA	Extração de compostos doces a partir da Stevia rebaudiana Bertoni
CN1985575	2006	Wang, Q		Método de cultivo de nova cultivar híbrida via reprodução sistemática de clones da planta stevia rebaudiana.
JP-59034848;	1984a, b	Morita	Japão	
JP-60160823	1985	Morita	Japão	
JP-61202667	1986	Morita	Japão	
JP-62096025	1987	Nakazato, T	Japão	
JP-63173531	1988	Nakazato, T	Japão	
EPA0154235	1985	Stevia co. Inc.	Europa	
JP-2242622	1990	Sanyo Kokusaku Pulp Co.	Japão	Novo triploide de Stevia rebaudiana Bertoni- contendo diterpenóide doce.

Quadro 1.8 - Lista de algumas patentes de cultivares de stevia. (Adaptado de Google Patents)

Patente nº	Data de apresentação	Data de publicação	Requerente	Título
US7884265	2 Mar 2006	8 Fev 2011	Toyoshige Morita	Stevia rebaudiana Bertoni com um alto conteúdo de Rebaudiosídeo A comparado com o esteviosídeo, e o método para a extração do adoçante a partir da planta ou das suas folhas secas.
US20110023192	21 Jan 2009	27 Jan 2011	Toyoshige Morita	Nova cultivar de Stevia e método de produção de adoçante.
EP1856967A1	2 Mar 2006	21 Nov 2007	Morita Kagaku Kogyo Co., Ltd.	Adoçante de stevia
WO2012088612A1	3 Jan 2012	5 Jul 2012	Glg Life Tech Corporation	Planta com altos teores de rebaudiosídeo A e métodos de produção dos mesmos e suas utilizações.

### 1.3 Composição e propriedades nutricionais

#### 1.3.1 Composição

O sabor doce da stevia tem origem nos seus glicosídeos de esteviol (código de alimento: INS 960, classe funcional Adoçantes, *Codex Alimentarius*). Além do seu sabor doce proveniente dos glicosídeos de esteviol, esta planta é uma fonte de sais minerais, vitaminas e aminoácidos, além de ácidos gordos contidos nos seus óleos essenciais (Quadro 1.1).

Os teores de nutrientes e glicosídeos da planta vão variando em função da cultivar, do local de instalação da cultura e do modo como esta é cultivada. Mondaca (2012), no seu artigo de revisão sublinha este facto ao comparar diversos estudos tal como consta nos Quadros 1.2 a 1.4.

Embora seja usual só se utilizar as folhas da planta para consumo em fresco ou na obtenção de produtos manipulados, e alguns autores considerarem que “as folhas são a parte económica da planta” (Ramesh et al., 2006), Kim, et al. (2011) ao estudarem as quantidades de vitaminas hidrossolúveis nos extractos da folha stevia e dos caules,

observaram que o conteúdo de ácido fólico, vitamina C e vitamina B2 no extracto da folha foi significativamente maior do que os valores do extracto do caule. No extracto da folha, o ácido fólico foi encontrado como sendo o composto principal, seguido de vitamina C. No extracto do caule, vitamina C era o composto principal, seguida da vitamina B (Quadro 1.3).

Quadro 1.1 - Lista de glicosídeos de esteviol, vitaminas, sais minerais, aminoácidos e ácidos gordos contidos nas folhas de stevia.

Glicosídeos de esteviol (1)	Vitaminas (2)	Sais minerais (3)	Aminoácidos (4)	Ácidos gordos (5)
Esteviol	Vitamina C	Cálcio	Cisteína	Ácido palmítico
Esteviolbiosídeo	Vitamina B2	Fósforo	Fenilalanina	Ácido palmitoleico
Esteviosídeo	Vitamina B6	Sódio	Histidina	Ácido estereático
Rebaudiosídeo A	Ácido fólico	Potássio	Isoleucina	Ácido oleico
Rebaudiosídeo B	Niacina	Ferro	Leucina	Ácido linoleico
Rebaudiosídeo C (dulcosídeo B)	Tiamina	Magnésio	Lisina	Ácido linoleico
Rebaudiosídeo D		Zinco	Metionina	
Rebaudiosídeo E			Tirosina	
Rebaudiosídeo F			Trionina	
Rubusosídeo				
Dulcosídeo A				

Fontes:

- (1) [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/68/Steviol\\_glycosides.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/68/Steviol_glycosides.pdf)
- (2) Adaptado de Kim et al. (2011)
- (3) Adaptado de Mondaca et al. (2012)
- (4) Adaptado do relatório da *Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation* (WHO, 2007)
- (5) Tadhani & Subhash, 2006

Quadro 1.2 - Conteúdo em minerais (mg 100 g<sup>-1</sup>) de folha de stevia seca segundo o trabalho de vários autores (Adaptado de Mondaca et al., 2012).

Minerais	Referências					
	Mishra et al. (2010)	Goyal et al. (2010)	Serio (2010)	Tadhani and Subhash (2006a)	Kaushik et al. (2010)	Abou-Arab et al. (2010)
Cálcio	464.4	544	600	1550	722	17.7
Fósforo	11.4	318	318	350	ND	ND
Sódio	190	89.2	ND	160	32.7	14.93
Potássio	1800	1780	1800	2510	839	21.15
Ferro	55.3	3.9	3.9	36.3	31.1	5.89
Magnésio	349	349	500	ND	ND	3.26
Zinco	1.5	1.5	ND	6.39	ND	1.26

ND, Não determinado

Quadro 1.3 - Vitaminas hidrossolúveis do extrato de folhas e de caules da stevia (mg 100 g<sup>-1</sup> base seca do extrato) (Kim et al., 2011)

<b>Vitamina</b>	<b>Folhas</b>	<b>Caules</b>
Vitamina C	14.98 ± 0.07	1.64 ± 0.02
Vitamina B2	0.43 ± 0.02	0.23 ± 0.02
Vitamina B6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Ácido fólico	52.18 ± 0.21	0.09 ± 0.01
Niacina	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Tiamina	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Quadro 1.4 - Valores da quantidade de glicosídeos nas folhas de stevia obtidos por alguns estudos, através de análises químicas.

<b>Glicosídeos</b>	<b>Conteúdos, % do peso das folhas secas</b>		
	<b>Gardana et al. (2010)</b>	<b>Goyal et al. (2010)</b>	<b>Kinghorn and Soejarto (1985)</b>
Esteviosídeo	5.8 ± 1.3	9.1	5–10
Rebaudiosídeo A	1.8 ± 1.2	3.8	2–4
Rebaudiosídeo C	1.3 ± 1.4	0.6	1–2
Dulcosídeo A	ND	0.3	0.4–0.7

ND, Não determinado

### 1.3.2 Propriedades nutricionais e nutracêuticas

A stevia produz uma variedade de adoçantes de baixo teor calórico no seu tecido foliar. Tem de valor energético 2.7 kcal g<sup>-1</sup> (Savita e al., 2004), fazendo com que o seu uso como adoçante possa ser uma mais-valia para restringir ou controlar a ingestão de calorias na dieta (Mondaca et al., 2011). A sua inclusão na dieta diária também pode ser uma fonte de nutrientes, vitaminas, sais minerais, etc.

É uma planta a partir da qual se podem obter produtos com diferentes modos de apresentação, nomeadamente folhas frescas, folhas secas, extratos sólidos e líquido concentrado. Apresentando-se no mercado de várias formas, pode-se eleger o produto segundo a quantidade de poder adoçante que se deseje ou a aplicação a que se destine. Além disso, os seus componentes podem ter propriedades nutracêuticas benéficas para a

saúde. O seu consumo por pessoas com diabetes tipo II é seguro, tal como o indicam diversos estudos (JECFA, 2008).

Os benefícios associados à sua folha são principalmente devido à sua composição nutricional (Quadro 1), que é uma boa fonte de hidratos de carbono, proteínas e fibra bruta, promove o bem-estar e reduz o risco de certas doenças.

Braz de Oliveira et al. (2011) isolaram nas raízes e folhas, inulina do tipo frutooligossacarídeos, um polissacarídeo vegetal que ocorre naturalmente, com propriedades funcionais importantes relacionados com prebióticos, fibras dietéticas, metabolismo lipídico e controlo da diabetes.

Segundo Gardana et al. (2003) no seu artigo de revisão bibliográfica citando vários estudos, as substâncias adoçantes extraídas das folhas da stevia podem exercer efeitos benéficos sobre a saúde humana, incluindo anti-hipertensivo, anti-hiperglicémico, antioxidante, não-carcinogénico, anti-rotavírus humanos, influenciar o metabolismo da glicose e a função renal. Além disso, os glicosídeos de esteviol possuem valiosas propriedades biológicas. O consumo regular destes compostos diminui o teor de açúcar, colesterol no sangue, melhora a regeneração celular e a coagulação do sangue, suprime o crescimento neoplásico e fortalece os vasos sanguíneos e apresentam potenciais aplicações como terapêutica antidiarreica.

Muitos glicosídeos de plantas, nas quais se inclui a stevia, têm demonstrado atividade na prevenção do cancro, bem como antidiabética, anti-obesidade, efeito antibacteriano ou antineoplásico (Bernal et al., 2011).

### **1.3.3 Constituintes fitoquímicos, características químicas, capacidade edulcorante e estabilidade**

As plantas medicinais são de grande importância para a saúde dos indivíduos e comunidades. O valor medicinal das plantas reside no facto de algumas substâncias químicas produzirem uma ação fisiológica definitiva no corpo humano. O mais importante destes componentes bioactivos das plantas são os alcalóides, taninos e polifenóis (Edeoga, et.al, 2005).

A stevia é rica em terpenos e flavonoides. Os fitoquímicos presentes na planta são austroinullin, b-caroteno, dulcosídeo, niacina, óxidos Rebaudi, riboflavina, esteviol, esteviosídeo e tiamina (Jayaraman, et al. 2008).

Produz uma variedade de compostos adoçantes de baixo teor calórico no seu tecido foliar que vão variando entre si a sua capacidade adoçante. Daí, as diferenças entre os vários glicosídeos de esteviol (Quadro 1.5) são devido ao número e arranjo das moléculas de glicose (R1 e R2) ligadas ao núcleo central esteviol como se pode verificar no exemplo da Fig. 1.1 e 1.2.

A doçura de qualquer um dos compostos de stevia é maior do que da sacarose: rebaudiosídeo A (250-450 vezes); rebaudiosídeo B (300-350 vezes); rebaudiosídeo C (50-120 vezes); rebaudiosídeo D (250-450 vezes); rebaudiosídeo E (150-300 vezes); dulcosídeo (50-120 vezes) e esteviolbiosídeo (100-125 vezes). Em média, a doçura dos glicosídeos de esteviol é 250-300 vezes maior do que a da sacarose, com baixa solubilidade em água e pontos de fusão elevados (Crammer & Ikan, 1987).

Com base nos resultados de estudos de estabilidade térmica e hidrolítica sobre os glicosídeos de esteviol e considerando vários resumos da literatura sobre a estabilidade do esteviosídeo e rebaudiosídeo A, no 68º relatório a JECFA concordou que os glicosídeos de esteviol são termicamente e hidroliticamente suficientemente estáveis para o uso em alimentos, incluindo bebidas ácidas, em condições normais de processamento e de armazenamento.



Quadro 1.5 - Glicosídeos de esteviol contidos nas folhas de stevia, CAS N° e grupos glicose e hidrogénio substituintes R1 e R2 (Adaptado de JECFA/FAO)

	Nome do composto	C.A.S. N°	R1	R2
1	Esteviol	471-80-7	H	H
2	Esteviolbiosídeo	41093-60-1	H	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
3	Esteviosídeo	57817-89-7	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
4	Rebaudiosídeo A	58543-16-1	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
5	Rebaudiosídeo B	58543-17-2	H	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
6	Rebaudiosídeo C (dulcosídeo B)	63550-99-2	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
7	Rebaudiosídeo D	63279-13-0	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
8	Rebaudiosídeo E	63279-14-1	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
9	Rebaudiosídeo F	438045-89-7	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Xyl(2 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
10	Rubusosídeo	63849-39-4	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc
11	Dulcosídeo A	64432-06-0	$\beta$ -Glc	<i>Glc</i> $\beta$ - <i>Glc</i> - $\alpha$ - <i>Rha</i> (2 $\rightarrow$ 1)

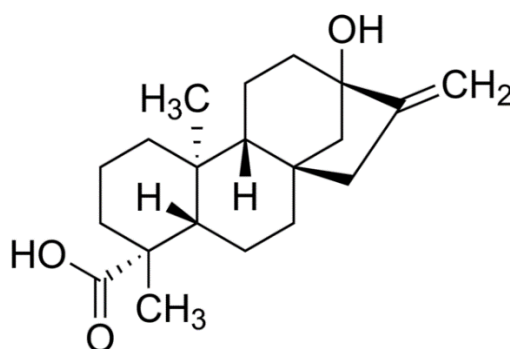


Figura 1.1 - Estrutura molecular do esteviol (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>, (4 $\alpha$ )-13-Hydroxykaur-16-en-18-oic acid, ent-13-Hydroxykauran-16-en-19-oic acid).

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/>.

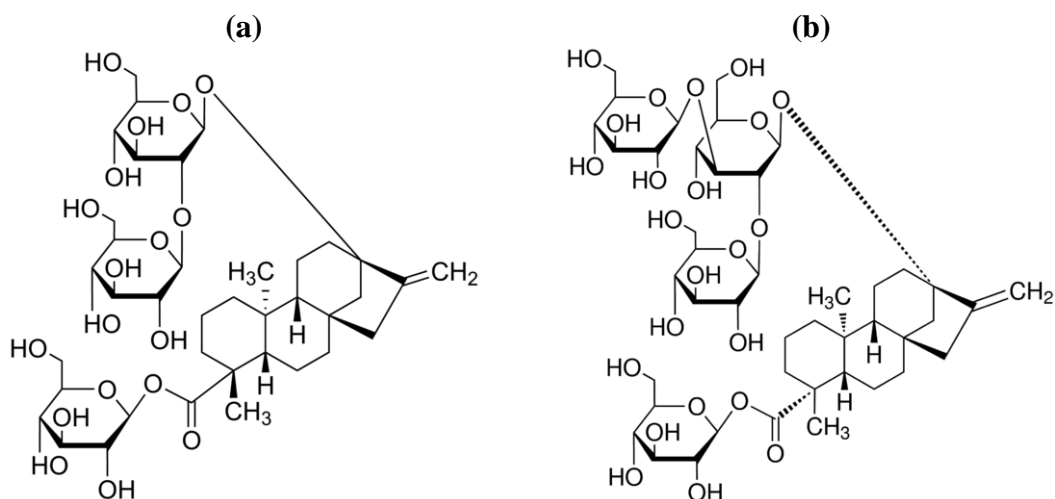


Figura 1.2 - Estrutura molecular (a) do Esteviosídeo ( $C_{38}H_{60}O_{18}$ , (4 $\alpha$ )-13-[(2-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)oxy]kaur-16-en-18-oic acid  $\beta$ -D-glucopyranosyl ester); (b) do Rebaudiosídeo A ( $C_{44}H_{70}O_{23}$ , (4 $\alpha$ )-13-[(2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-oxy]kaur-6-en-8-oic acid  $\beta$ -D-glucopyranosyl ester), contidos na planta stevia. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/>.

### 1.3.4 Utilização de stevia

As folhas de stevia têm propriedades funcionais e sensoriais superiores aos de muitos outros adoçantes (Mondaca et al., 2012) e pode ser consumida sob a forma de folhas frescas, folhas secas, estratos em pó e como concentrado líquido.

Para Singh et al. (2005), a stevia, com base nas suas várias qualidades, encontrou a sua utilização para os seguintes fins: adoçante de mesa, para chá, café, refrigerantes, sumos de fruta, gelados, iogurtes, bolos, biscoitos, tortas, etc.

## **1.4 Propagação da planta**

A stevia é uma planta que pode ser propagada através de todos os sistemas habitualmente usados na propagação de outras plantas (Carrascal, s/ data). Esta propagação pode ser seminal ou vegetativa por estacas de caule e micropropagação (Brandle et al., 1998).

Devido à grande heterogeneidade das plantas obtidas a partir da propagação por sementes, a propagação vegetativa por estacas tem sido muito utilizada, pois perpetua as características da planta progenitora. A cultura de tecidos por micropropagação também pode ser usada (Landázuri et al., 2009).

### **Propagação seminal (sexual)**

Segundo Landázuri et al. (2009), a stevia reproduz-se sexualmente através de aquênios, observando-se uma alta heterogeneidade nas plantas resultantes, devido principalmente à polinização cruzada. Grande parte dos aquênios são estéreis, são muito leves e dispersam-se facilmente com o vento. A colheita das sementes é lenta e difícil, devido ao estado das flores não ser uniforme, o que afeta a maturação da semente. A percentagem de germinação das sementes varia entre os 10 e 38%. Para estes autores, a propagação por meio de aquênios é útil para o melhoramento genético, mas não o é para o cultivo comercial.

### **Propagação por estacaria de caules e micropropagação**

A propagação por estacas é o método mais conveniente para ser usado à escala comercial. Por isso, é importante ter uma plantação mãe que forneça o material vegetativo inicial (Landázuri et al., 2009). Para o estabelecimento correto e eficaz da plantação das plantas mãe deve ser feita uma seleção de plantas que apresentem as características desejáveis, tais como vigor, rusticidade, produtividade e resistência a pragas e doenças. A gestão desta plantação é semelhante à gestão das plantações comerciais, mantendo plantas de boa saúde nutricional e fitossanitária, sobretudo livres de doenças fúngicas que podem afetar significativamente a plantação (Landázuri et al., 2009).

Segundo Shock (1982), a propagação de stevia é geralmente feita por estacas de caule, que enraízam com facilidade. Algumas cultivares praticamente não produzem sementes viáveis e a propagação vegetativa é a única via para a sua multiplicação.

A cultura de tecidos é outro dos métodos de propagação vegetativa que permite plantações mais uniformes, além de se obter uma rápida multiplicação clonal (Yang, 1979 y 1981 in

Landázuri et al., 2009). As vantagens da micropropagação em comparação com os sistemas convencionais são o incremento acelerado do número de plantas, a diminuição do tempo de multiplicação, um maior número de plantas por superfície utilizada, o maior controlo da sanidade e a possibilidade de multiplicar rapidamente espécies em vias de extinção (Ayerbe, 1990).

## **1.5 Cultivo de stevia em modo de produção biológico - vantagens**

### **Definição Europeia de Agricultura Biológica**

A Comissão Europeia aprovou e publicou o regulamento (CE) N° 834/07, de 28 de Junho para o modo produção biológico (MPB) dos produtos agrícolas, com a respetiva indicação nos produtos agrícolas e géneros alimentícios, mediante a norma publicada no regulamento, que definiu o âmbito geral da produção biológica, o seu logótipo e o sistema de rotulagem comuns a todos os países da UE.

Com base nesta regulamentação foi formulada a definição de Agricultura Biológica (AB) pela Direção Geral para a Agricultura e Desenvolvimento Rural da Comissão Europeia:

*“De uma forma simples, a AB é um sistema agrícola que procura fornecer-lhe a si, consumidor, alimentos frescos, saborosos e autênticos e ao mesmo tempo respeitar os ciclos de vida naturais.”*

Diz, ainda, que para que se possam alcançar estes resultados, a AB:

*“Baseia-se numa série de objetivos e princípios bem como em práticas comuns desenvolvidas para minimizar o impacto humano sobre o ambiente e assegurar que o sistema agrícola funcione da forma mais natural possível”.*

### **Definição do IFOAM de Agricultura Biológica**

Para o IFOAM a Agricultura Biológica é *“um sistema de gestão de produção holístico, que promove e melhora a saúde do ecossistema agrícola, incluindo a biodiversidade, os ciclos biológicos e a atividade biológica do solo. Dá ênfase ao uso de práticas de gestão em detrimento de “utilização de produtos não agrícolas, tendo em conta que as condições regionais requerem sistemas adaptados localmente”.* Para que isso seja feito *“... utiliza, sempre que possível, métodos agronómicos, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, para cumprir qualquer função específica dentro do sistema ”* (FAO / WHO Codex Alimentarius Commission, 1999).

### **Vantagens do cultivo em Modo Produção Biológica**

As vantagens da AB e da transformação dos seus produtos estão baseadas num conjunto de princípios e ideias que, segundo uma compilação de Rodrigues (2010) se baseiam nos seguintes princípios, e passo a citar: *“Produzir alimentos de elevada qualidade nutritiva e em quantidade suficiente; interagir de um modo construtivo e vivificante com os sistemas naturais e os ciclos; promover os ciclos biológicos no sistema agrícola,*

*envolvendo microrganismos, fauna e flora do solo, plantas e animais; manter e melhorar a longo prazo a fertilidade dos solos; promover o uso saudável e cuidadoso da água, recursos hídricos e toda a vida naquela existente; ajudar na conservação do solo e da água; usar, tanto quanto possível, recursos renováveis em sistemas agrícolas organizados localmente; ajudar na conservação do solo e da água; usar, tanto quanto possível, recursos renováveis em sistemas agrícolas organizados localmente; trabalhar, tanto quanto possível, num sistema fechado relativamente à matéria orgânica e elementos minerais nutrientes; trabalhar, tanto quanto possível, com materiais e substâncias que possam ser reutilizadas ou recicladas, quer na exploração agrícola quer noutra local; dar a todos os animais de criação condições de vida que lhes permitam realizar os aspetos básicos do seu comportamento inato; minimizar todas as formas de poluição que possam resultar da prática agrícola; manter a diversidade genética do sistema agrícola e meio envolvente, incluindo a proteção das plantas e dos habitat da vida selvagem; permitir a todos envolvidos na produção e transformação, em agricultura biológica, uma qualidade de vida em conformidade com a Carta dos Direitos Humanos das Nações Unidas, de modo a responder às suas necessidades básicas e a obterem adequados retorno e satisfação na sua atividade, incluindo um ambiente seguro de trabalho; considerar, de um modo amplo, o impacto social e ecológico do sistema agrícola; produzir produtos não alimentares, não oriundos de recursos renováveis, que possam ser totalmente biodegradáveis; encorajar associações de agricultura biológica a funcionarem de acordo com princípios democráticos e de divisão de poderes; ir no sentido de toda uma cadeia de produção em agricultura biológica, a qual seja justa socialmente e responsável ecologicamente”.*

A Agricultura Biológica deve sustentar e melhorar a saúde do solo, da planta, do animal e do Homem como um todo. Este princípio indica que a saúde dos indivíduos e das comunidades não pode ser separada da saúde dos ecossistemas. Solos saudáveis produzem culturas saudáveis que alimentam e fomentam a saúde dos animais e das pessoas. Por isso, a AB produz alimentos e fibras ambientalmente, social e economicamente sã e sustentável. É um sistema de produção que evita ou exclui a quase totalidade dos produtos de síntese como adubos, pesticidas, reguladores de crescimento e aditivos alimentares para animais (Ferreira, 2012).

Para que este modo de produção seja praticável na máxima extensão a AB recorre a práticas agrícolas específicas, como por exemplo: (i) rotações de culturas; (ii)

reaproveitamento de resíduos das culturas; (iii) estrumes de animais; (iv) incorporação de adubos verdes e resíduos orgânicos da exploração agrícola; (v) leguminosas (fundamentalmente para incorporação de azoto no solo); (vi) luta biológica contra pragas e doenças. Todas estas práticas visam, além de nutrir as plantas, manter a produtividade do solo, controlar insetos, ervas infestantes e outros inimigos das culturas (Ferreira, 2012).

## **1.6 Segurança alimentar da stevia: legislação e organismos internacionais**

O Comité Misto de Peritos em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA), na sua sexagésima terceira reunião, concluiu que o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A não são genotóxicos *in vitro* ou *in vivo* e que a genotoxicidade do esteviol e alguns de seus derivados são oxidativos *in vitro* não sendo expresso *in vivo*. Recomendam, temporariamente, que a quantidade de ingestão de dose diária deverá ser 0-2 mg/kg de massa corporal para os glicosídeos de esteviol, expresso como esteviol, com base no NOEL para esteviosídeo foi de 970 mg/kg por peso corporal/dia. Este comité recomendou, no seu relatório final, que fossem realizados mais estudos de segurança alimentar (WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 54).

O JECFA, na sua sexagésima nona reunião, avaliou diversos estudos do metabolismo e toxicocinética com animais, estudos de toxicidade em animais de laboratório, estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* e estudos humanos com administração única ou repetida dos glicosídeos de esteviol. Analisou a segurança dos glicosídeos de esteviol (em 2000, 2005, 2006, 2007 e 2009) e estabeleceu uma DDA para os glicosídeos de esteviol, expressos em equivalentes de esteviol, de 4 mg/kg de massa corporal/dia (EFSA Journal 2010;8 (4):1537).

## **1.7 Mercados - oferta e procura de stevia**

### **1.7.1 Principais países produtores**

Entre os principais produtores de stevia a nível mundial estão o Japão, China, Coreia, Taiwan, Tailândia, Indonésia, Laos, Malásia e Filipinas. Estes países representam 95% da produção mundial. Cabe destacar que o Japão é o país com maior quantidade de fábricas processadoras e extractoras de esteviosídeo. Na América a stevia é cultivada principalmente no Paraguai, Brasil, Argentina, Colômbia, Peru e cultivos muito pequenos no Equador (Landázuri et al., 2009).

## 1.7.2 Mercado global e principais regiões

Segundo o relatório da consultora Zenith Internacional - “Mercado Global de stevia 2014”, a rápida ascensão da stevia como adoçante natural continuou inabalável em relação ao ano transato. Um novo estudo da consultoria estima que as vendas mundiais de stevia são definidas para um aumento de 14% em 2014 para as 4.670 toneladas, tendo o seu valor de mercado global atingido os \$336 milhões (Fig. 1.5).

Ainda, segundo este relatório “Os consumidores estão cada vez mais a analisar o conteúdo dos produtos alimentares e das bebidas, e começam a evitar os adoçantes artificiais, além do facto de a stevia ter uma proveniência natural e ser quase zero calorias posicionam-na numa posição de nítida vantagem. Numa análise prospetiva, a Zenith prevê que o mercado global de stevia chegará às 7.150 toneladas em 2017, o equivalente a \$578 milhões. Atualmente, a europa encontra-se em quarto lugar com 11% da quota do mercado global de stevia (Fig. 1.6).

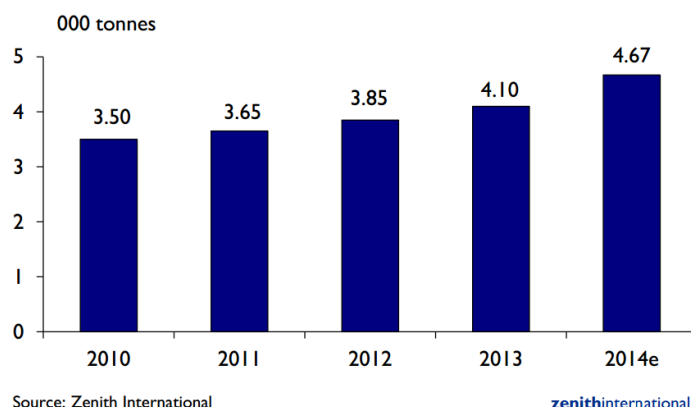


Figura 1.5 - Crescimento do mercado global de stevia. Fonte: Zenith International.

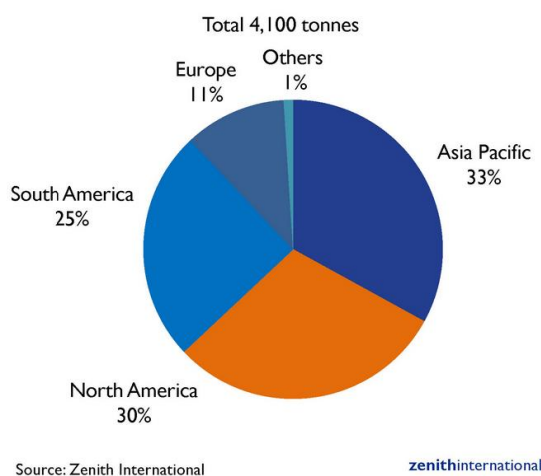


Figura 1.6 - Mercado global stevia por região em 2013. Fonte: Zenith International.



## **1.8 Interesse atual da cultura da stevia em Portugal**

Para Arora et al. (2010), a stevia pode ser um substituto natural do açúcar e pode ser muito eficaz no combate de alguns problemas de saúde a nível mundial, nomeadamente diabetes e obesidade. Devido a essa característica, a stevia é um produto em franca expansão, como mostram vários relatórios de estudos de mercado. Conjuntamente com este facto, o mercado dos produtos de Agricultura Biológica também estão em franca expansão. Aliando estes dois fatores ao facto de haver em Portugal a pertinência da criação de empresas geradoras de postos de trabalho e não havendo a tradição do cultivo de stevia, torna-se necessário estudar o potencial de adaptação desta planta, visando no futuro a produção para o mercado nacional e para exportação.

Num estudo de revisão citando vários autores, Mondaca et al. (2012) concluiu que, de todas as espécies vegetais que apresentam potencial para produzir adoçantes naturais, a planta stevia é a que tem atraído maior interesse económico e científico relativamente às características e propriedades terapêuticas das suas folhas. E, comparativamente com outros adoçantes, as suas folhas têm propriedades funcionais e sensoriais superiores às de muitos outros adoçantes. Além disso, é evidente na consulta dos relatórios de algumas agências como a CBI, Agência do Ministério dos Negócios Estrangeiros da Holanda para o desenvolvimento das relações exteriores, de 2014, que “A stevia é um novo produto na Europa” e “Vários fabricantes de alimentos e bebidas estão a desenvolver rapidamente novos produtos com stevia e a reformular produtos já existentes”. E, ainda, “A necessidade do fornecimento de stevia estar a crescer fortemente e esses fabricantes darem as boas-vindas aos fornecedores que possam ajudá-los a beneficiar de todas as oportunidades que a stevia tem para oferecer”. Dados do último relatório da consultora Zenith International apontam para o mercado global de stevia ter aumentado 14% em 2014, e faz uma análise prospetiva que indica um aumento do seu consumo nos próximos anos.

## **1.9 Objetivos do trabalho**

O atual interesse da cultura da stevia baseia-se num mercado emergente de produtos adoçantes relacionado com vários alertas da OMS para o número crescente de diabéticos e obesos por todo mundo. A produção em modo de produção biológico assume um interesse crescente da necessidade de uma alimentação com menores impactos ambientais, livre de produtos químicos de síntese e de transgénicos.

O presente trabalho teve como principal objetivo o estudo da adaptação da cultura da stevia em MPB no concelho de Ponte de Lima e, de modo mais geral, às condições edafo-climáticas da região Noroeste de Portugal. A cultura foi instalada na empresa Biodiversus em estufa e ao ar livre, tendo-se avaliado o comportamento da planta à colheita escalonada para o mercado em fresco e à colheita da planta destinada à secagem.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Localização do ensaio

O ensaio foi conduzido numa estufa e ao ar livre, na empresa Biodiversus, Lda., na freguesia de Arcozelo, concelho de Ponte de Lima, distrito de Viana do Castelo. As coordenadas geográficas do local são: 41°47'37.59" N, 8°34'58.12" O, e altitude aproximada de 50 m. A empresa tem solos com boa aptidão agrícola e localiza-se a cerca de 1,8 km das margens do rio Lima, sendo contígua às ribeiras da Granja e de Tondel.

A exploração agrícola é composta por terrenos planos ou com inclinação reduzida, em socalcos com orientação de encosta sul-sudeste e norte-noroeste. O local onde se instalou o ensaio tinha uma exposição solar sul-sudeste, facultando uma boa exposição solar (Fig. 2.1).



Figura 2.1 - Fotografia satélite da localização da empresa Biodiversus, Lda., freguesia de Arcozelo, concelho de Ponte de Lima e respetiva orientação geográfica.

## 2.2 Caraterização do solo

Os solos são argilosos de textura medianamente pesada (Quadros 2.1 e 2.2), bastante férteis, tornando-os num dos principais recursos naturais da região.

No período de tempo que mediou entre a aplicação da fertilização orgânica de fundo (24/04/2015) e a segunda recolha de solo para análise (30/04/2015, Quadro 2.4), o talhão ao ar livre foi sujeito a um período de precipitação muito elevada.

Quadro 2.1 - Caraterísticas do solo onde se instalou a cultura de stevia ao ar livre. A colheita 1 refere-se ao solo antes da fertilização e colheita 2 após a fertilização orgânica de fundo.

Nº colheita	Data da colheita	Textura	pH (H <sub>2</sub> O)	MO (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> K <sub>2</sub> O Ca Mg			
					(µg g <sup>-1</sup> )			
1	13/03/2015	Mediana	5,8	3,4	55	172	892	104
2	30/04/2015	Medianamente pesada	6,1	3,0	69	239	827	87

Quadro 2.2 - Caraterísticas do solo onde se instalou a cultura de stevia na estufa. A colheita 1 refere-se ao solo antes da fertilização e colheita 2 após a fertilização orgânica de fundo.

Nº colheita	Data da colheita	Textura	pH (H <sub>2</sub> O)	MO (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> K <sub>2</sub> O Ca Mg			
					(µg g <sup>-1</sup> )			
1	24/04/2015	Medianamente pesada	6,9	2,6	227	69	2910	266
2	24/04/2015	Medianamente pesada	6,6	2,4	251	115	2971	299

### 2.3 Caracterização climática

Segundo a Carta de Solos e Aptidão da Terra da DRAEDM, o tipo de zona climática predominante no concelho de Ponte de Lima com altitudes inferiores a 250 metros é o “Terra Temperada Quente Litoral (QI)”, encontrando-se associada às zonas localizadas junto dos principais cursos de água. Esta zona pode apresentar uma considerável amplitude nos valores de precipitação, que variam entre um mínimo de 1200 mm e um máximo de 2400 mm. Apresenta índices de insolação médios e altos (83,82%) nas áreas planas ou com declives pouco acentuados, associados geralmente a altitudes inferiores a 200 metros.

A temperatura mínima média mensal do ar oscila entre 5,02°C no mês de janeiro e um máximo de 30,26°C no mês de agosto, e a temperatura média mensal entre 9,12°C e 23,22°C (Fig. 2.2). A média da precipitação mensal para o período considerado oscilou entre os 26 mm no mês de julho e os 231 mm no mês de dezembro (Fig. 2.3). A humidade relativa média mensal variou aproximadamente entre 70% e 90% (Fig. 2.4).

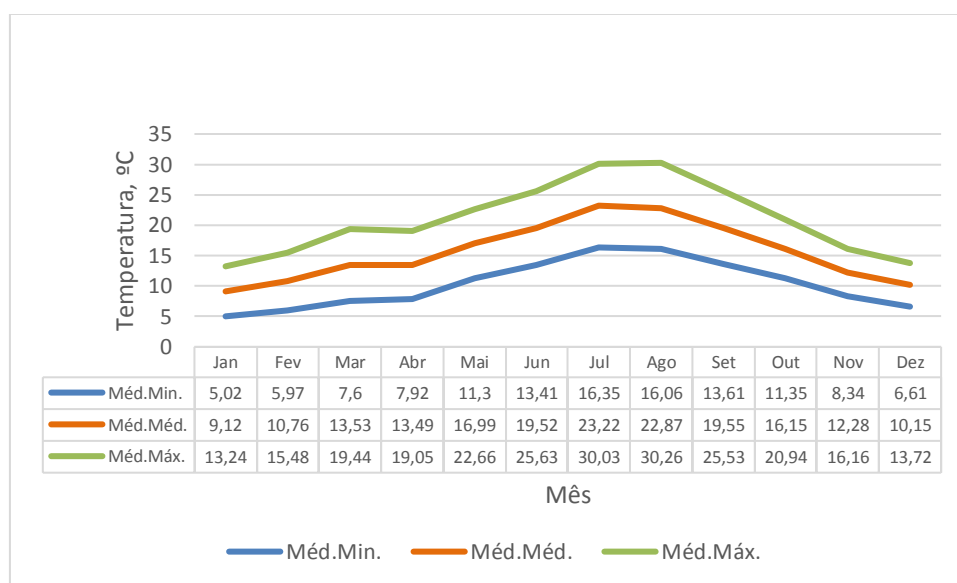


Figura 2.2 - Variação mensal da temperatura (°C) mínima, média e máxima no período entre 1989-1998, na Estação meteorológica de Valinha, concelho de Monção.

Fonte: - SIG, CM Ponte de Lima.

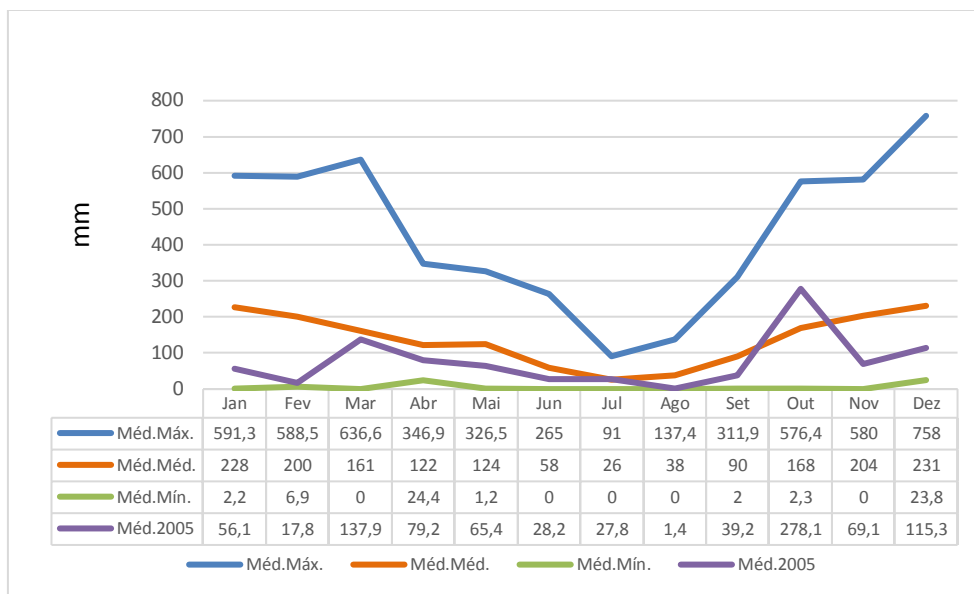


Figura 2.3 - Precipitação mensal do concelho de ponte de Lima, na Estação Udográfica de Ponte de Lima, para o período compreendido entre 1995 e 2005.

Fonte: SIG, CM Ponte de Lima.

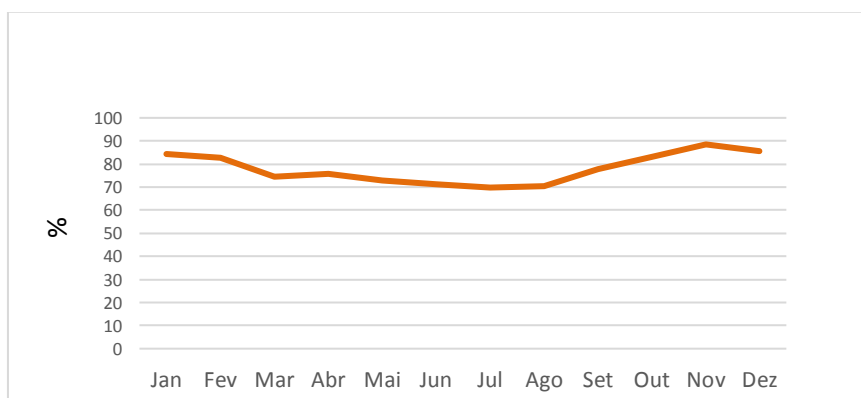


Figura 2.4 - Variação Mensal da Humidade Relativa no período entre 1989-1998.

Fonte: SIG, CM Ponte de Lima.

## 2.4 Condições ambientais

Durante todo o período experimental, de 28 de Abril a 2 de Setembro de 2015, foram registadas as temperaturas horárias ao ar livre e na estufa. A temperatura do ar foi monitorizada a 50 cm de altura e a temperatura do solo a 10 cm de profundidade, através da colocação de termístores (tipo TM1, Delta-T Devices), ligados a um registador de dados (Delta- T Devices) (anexo 8).

## 2.5 Material vegetal

Para a realização do ensaio utilizaram-se plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, cultivar *Criolla*, obtidas através de propagação seminal, da empresa Agristevia S.L – Murcia, Espanha, com o número de lote JSAS-1501015. As plantas chegaram do viveiro com aproximadamente 5 pares de folhas e 10 cm de altura (Anexo 3).

## 2.6 Desenho experimental

O desenho experimental utilizado foi o de *split-plot* com 4 tratamentos e 3 repetições. Os grandes talhões incluíram os seguintes 4 tratamentos: 2 sistemas de produção (E: estufa e A: ar livre) e 2 tipos de colheita (F: colheita escalonada para o mercado em fresco e S: colheita única da planta destinada a secagem). Os pequenos talhões corresponderam a 2 tipos de fertilização (f1: fertilização orgânica de fundo e f2: fertilização de fundo e de cobertura). Dos 12 grandes talhões 6 estavam numa estufa e 6 ao ar livre, cada um com 12 plantas, num total de 144 plantas (Fig. 2.5).

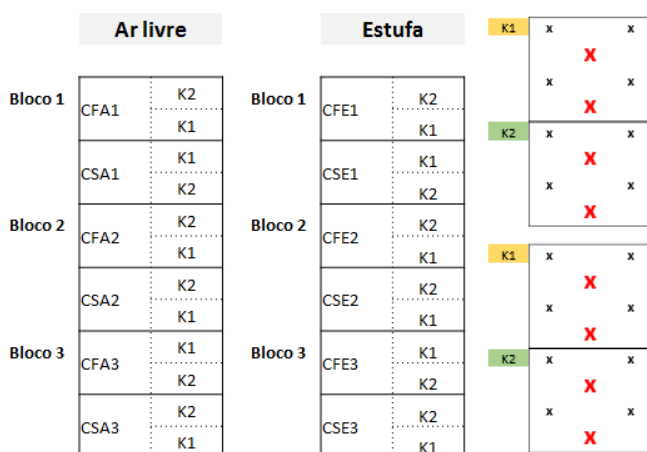


Figura 2.5 - Esquema do desenho experimental do ensaio split-plot da cultura de stevia ao ar livre e em estufa.

## 2.7 Preparação do Solo

Na preparação do solo foi realizada uma lavoura com cavadeira de 6 enxadas e armado um camalhão com 1 m de largura e 25 m de comprimento com cobertura de plástico preto, para evitar o aparecimento de plantas infestantes.

## 2.8 Fertilização

A fertilização de fundo, que antecedeu a plantação, consistiu na aplicação ao solo de Naturgran 5-4-5 e Fertigafsa 0-26,5-0 em ambos os tratamentos f1 e f2, distribuído manualmente. Em data posterior (Quadro 2.4) foi efetuada uma fertilização orgânica de cobertura no tratamento f2, por fertirrega com Organihum Nitro Plus.

## 2.9 Instalação da cultura

A plantação no dia 28/04/2015 foi realizada em camalhão para evitar a asfixia radicular e o encharcamento, uma vez que o solo é argiloso com textura medianamente pesada.

O compasso de plantação foi de 50 cm na linha e 40 cm na entrelinha, com 3 linhas em ‘pé de galo’ e 4 plantas por linha. As plantas das linhas laterais foram usadas como plantas guarda ou de substituição, sendo as da linha central as plantas em estudo, como se encontra na Fig.2.6). Para uma melhor orientação na plantação e nas colheitas foram colocados marcadores no início de cada talhão (Anexo 2).

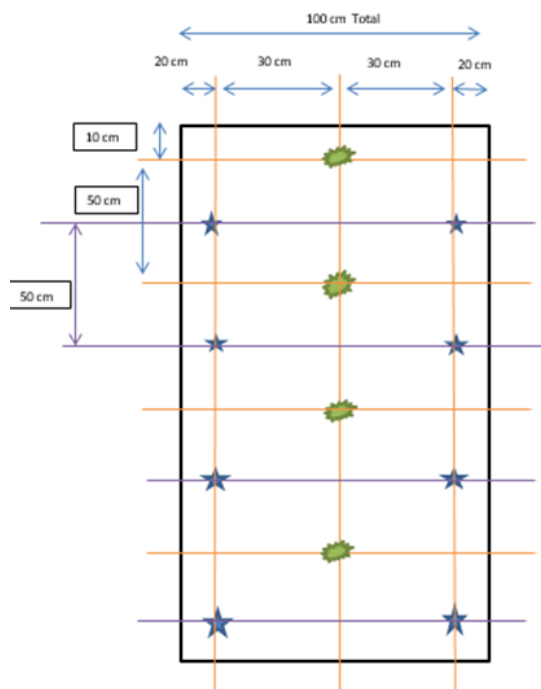


Figura 2.6 – Esquema de plantação da stevia em estufa e ao ar livre.



## **2.10 Rega**

Na rega da cultura recorreu-se a um sistema gota-a-gota com água sob pressão. A exploração agrícola possui um sistema central de rega automática, nas estufas e ao ar livre, com saídas de derivação na direção de cada camalhão. Os gotejadores do tubo gota-a-gota tinham um espaçamento de 0,30 m e um débito de 4 l h<sup>-1</sup>. Após a plantação, foi seguido um plano de rega com base nos dados do estudo de Fronza (2003) e também procurando minimizar as perdas de água por percolação e por evaporação.

## **2.11 Controlo de infestantes, pragas e doenças**

O controlo de plantas infestantes foi realizado manualmente. A única praga que surgiu na cultura foi causada por larvas, em número muito reduzido que não constituiu nível económico de ataque (Anexo 7). Não foram verificadas quaisquer outras pragas ou doenças na cultura.

## **2.12 Poda e técnicas culturais**

Todas as operações de poda e colheita foram realizadas às primeiras horas da manhã, evitando as horas de maior calor para que não existisse o risco de desidratação e/ou secagem do material colhido.

Neste ensaio foi realizada uma só poda, a poda de formação, 44 dias após a plantação (DAP), que consistiu em cortar o ápice ou meristema terminal da planta, deixando quatro pares de folhas com o propósito de estimular a emergência das hastes laterais (Fig. 2.7). Nas plantas que à data da poda apresentavam hastes secundárias, também se optou por cortar estas de maneira a uniformizar a altura da planta e a estimular o aparecimento de hastes terciárias. Quanto maior for o estímulo causado pelo corte da planta, maior será o aparecimento de novas hastes e o número de folhas e por consequência, maior a produtividade da cultura.

As colheitas escalonadas das hastes com objetivo de venda em fresco foi organizada tendo em conta o número médio de hastes por planta e o número de semanas em que a planta é produtiva. Uma vez que a planta no primeiro ano de produção apresenta um baixo número de hastes (3-16 hastes por planta), optou-se por colher 2 hastes por colheita, e as hastes cortadas acima do 4º nó para fomentar o crescimento de novas hastes passíveis de serem cortadas nas colheitas seguintes.

Na 4ª colheita o número de hastes colhidas oscilou entre 4 e 11 hastes/planta ao ar livre e entre 6 e 13 hastes/planta na estufa. O final das colheitas foi determinado pelo facto das plantas estarem a entrar na fase de floração que identifica o fim de ciclo produtivo.

Nas plantas destinadas à secagem a colheita da totalidade das hastes foi realizada quando 10% das plantas estavam em floração, pois é a fase que corresponde à presença de um maior teor de glicosídeos de Esteviol nas folhas.

Na 4ª colheita as hastes foram cortadas de modo a que as plantas ficassem com cerca de 10 cm de altura, a fim de evitar o ataque de doenças ou pragas e para que as plantas pudessem ainda produzir hastes para colheita de sementes, até ao final do Outono.

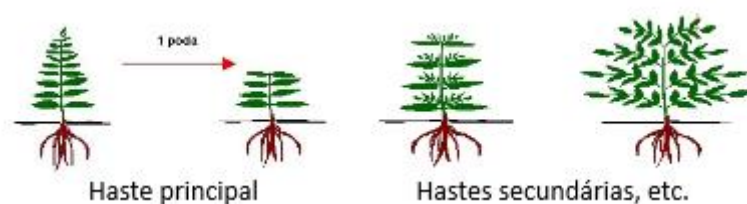


Figura 2.7 - Esquema da poda de formação. Fonte: (Jaramillo, 2011).

### 2.13 Avaliação da produtividade e das características de qualidade

O número de hastes por planta, o peso fresco e seco das hastes cortadas foram avaliados 44, 92, 112 e 127 DAP nas plantas destinadas a colheitas regulares para consumo em fresco e 44 e 127 DAP nas plantas destinadas a secagem. Determinou-se ainda a matéria seca, e os teores das folhas em glicosídeos de esteviol.

A altura das plantas de stevia que na plantação era de aproximadamente 10 cm foi monitorizada nas mesmas datas e ainda 71 DAP.

## 2.14 Caracterização do teor de ácido ascórbico por HPLC

Na Fig. 2.8 encontra-se o esquema de preparação das amostra e sequenciação de procedimentos.

### Reagentes:

- Água MiliQ
- Ácido Sulfúrico pa
- Standars Ácido Ascórbico
- Metanol pa

### Soluções de trabalho:

- Metanol a 50 % em água MiliQ
- Fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 M
- Padrões diluídos em Metanol a 50 % em água MiliQ

### Condições de Cromatografia (jasco HPLC):

- Control Method: glicosideos steviol
- User Name Virgilio Peixoto
- Date Modified 23-07-2015 17:05:32
- Colum: C18

### Description:

- Method Time 60,0 [min]
- Injection Mode Normal
- Number of Flushes 1
- Sample Preload Time 1,5 [min]
- Injection Delay Time 0,0 [min]

### Pump #1:

- Initial Condition
- Pump Mode Iso1
- Flow 0,200 [mL/min]
- Max. Pressure 25,0 [MPa]
- Min. Pressure 0,0 [MPa]

### Solvents:

- A 100,0 [%] H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005M
- B 0,0 [%]
- C 0,0 [%]
- D 0,0 [%]

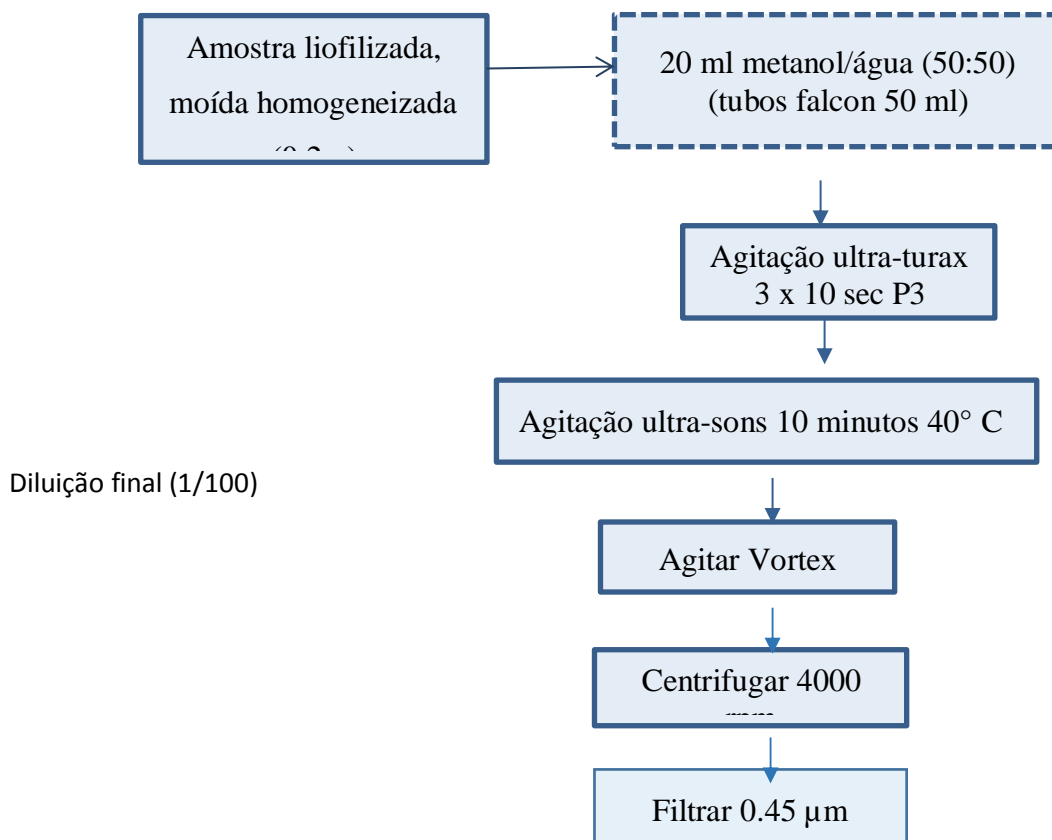
### Column Oven:

- Initial Condition
- Temperature 30,0 [deg C]
- Column Position A

#### PDA Detector:

- Lamp Mode D2+W
- Slit Width 4 [nm]
- Wavelength Range 200 - 650 [nm]
- Wavelength Interval 4,0 [nm]
- Wavelength Accumulation 4,0 [nm]
- Sampling 10 [points/sec]
- Response STD
- Baseline Correction On
- Autozero On
- [ ]

#### Preparação de Amostra:



#### 2.15 Cronograma de operações culturais

No Quadro 2.4 encontra-se o cronograma das operações efetuadas no decorrer do ensaio.

Quadro 2.4 - Cronograma das operações durante o ensaio da cultura de stevia.

<b>Operação</b>	<b>Data</b>
Análises de solo Ar livre antes da fertilização	10/03/2015
Análises de solo Estufa antes da fertilização	24/04/2015
Análise de solo Estufa após fertilização	24/04/2015
Análise de solo Ar livre após fertilização	30/04/2015
Plantação da stevia na estufa e ao ar livre	28/04/2015
Início recolha de dados Temperatura	28/04/2015
Início da rega Estufa	28/04/2015
Limpeza de infestantes	19/05/2015
Início da rega Ar livre	23/05/2015
Substituição de plantas inviáveis	03/06/2015
Substituição de plantas mortas ou danificadas	09/06/2015
Poda de formação - despona e 1ª colheita	11/06/2015
Limpeza de infestantes	17/06/2015
Avaliação do crescimento das plantas após poda	08/07/2015
2ª Colheita para Fresco	29/07/2015
2ª Fertilização em K2	03/08/2015
3ª Colheita para Fresco	18/08/2015
4ª Colheita para Fresco	02/09/2015
Colheita 127 DAP	02/09/2015
Final da recolha de dados temperatura	02/09/2015

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Crescimento das plantas

##### 3.1.1 Altura e número de hastes

Os efeitos da fertilização não causaram diferenças significativas entre os tratamentos, em nenhum dos parâmetros analisados no âmbito do crescimento das plantas.

A altura das plantas de stevia na plantação era de aproximadamente 10 cm e foi monitorizada 44, 71, 92, 112 e 127 dias após a plantação (DAP) nas plantas destinadas a colheitas regulares para consumo em fresco e 44, 71 e 127 nas plantas destinadas a secagem. Para as primeiras, a altura das plantas variou de um valor médio de 22,0 a 83,2 cm planta<sup>-1</sup> e, para as segundas, de 21,0 a 91,4 cm planta<sup>-1</sup> (Fig. 3.1).

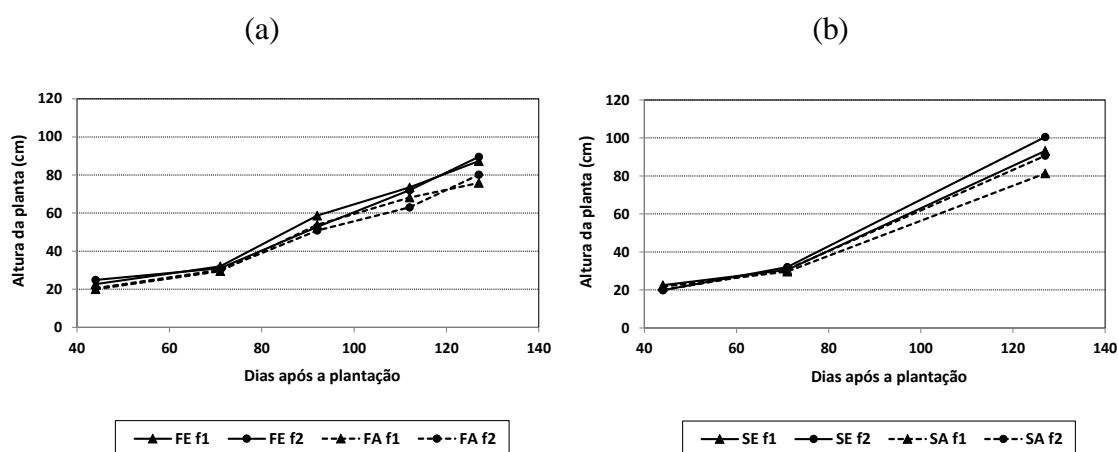


Figure 3.1 – Altura das plantas de stevia (cm planta<sup>-1</sup>) a partir da poda de formação até à última colheita do ensaio (respetivamente 44 e 127 dias após a plantação), nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) e a colheitas para secagem (S), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A), com fertilização de fundo (f1) e com fertilização de fundo e de cobertura (f2).

A altura das plantas no momento da poda de formação (44 DAP) foi significativamente mais alta nas plantas destinadas a consumo em fresco produzidas em estufa (23,8 cm planta<sup>-1</sup>) em comparação com as plantas produzidas ao ar livre (20,3 cm planta<sup>-1</sup>). Nas plantas destinadas a secagem produzidas na estufa e ao ar livre, a altura das plantas foi idêntica entre si e idêntica aos restantes tratamentos (Fig. 3.2 a). Na última colheita, que correspondeu à quarta colheita nas plantas destinadas a consumo em fresco (F) e a primeira colheita nas plantas destinadas a secagem (S), ocorreu um resultado semelhante,

tendo sido a altura das plantas S produzidas na estufa significativamente superior à altura das plantas F produzidas ao ar livre (Fig. 3.2 b). A altura média do conjunto das plantas na estufa foi de 52,1 cm planta<sup>-1</sup>, superior ( $p < 0,05$ ) à altura média do conjunto das plantas produzidas ao ar livre, de 47,4 cm planta<sup>-1</sup>.

A altura média do conjunto das plantas sujeitas a três colheitas (F, 51,8 cm planta<sup>-1</sup>) foi também superior à altura média do conjunto das plantas para secagem com uma única colheita (47,7 cm planta<sup>-1</sup>).

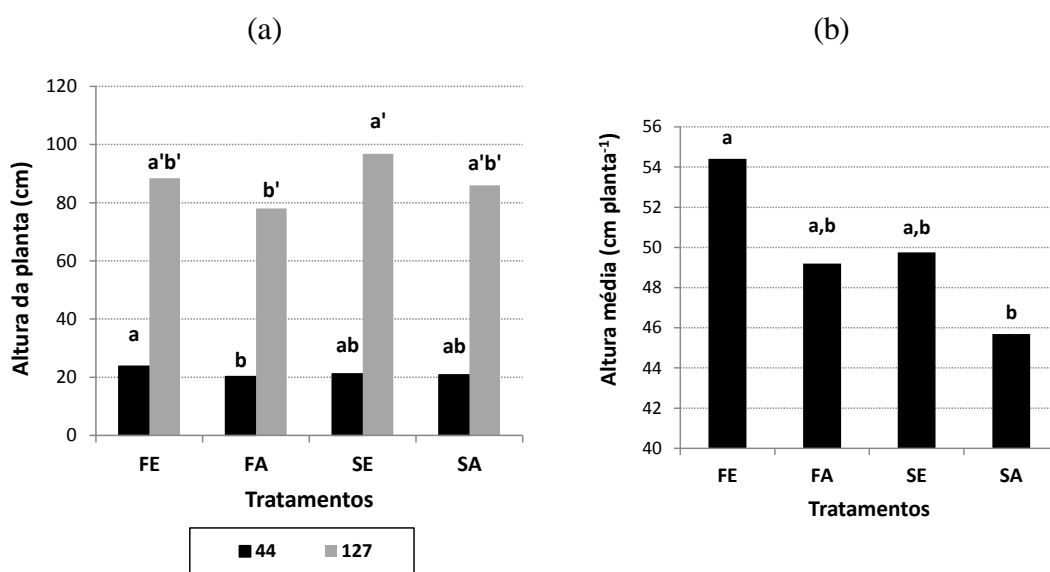


Figure 3.2 – (a) Altura das plantas de stevia (cm planta<sup>-1</sup>) na poda de formação e na última colheita do ensaio (respetivamente 44 e 127 dias após a plantação) e (b) altura média das plantas (cm planta<sup>-1</sup>), nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) e a colheitas para secagem (S), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

O número de hastes por planta desde a poda de formação até à última colheita do ensaio, para todos os tratamentos variou entre 3,0 e 10,0 hastes planta<sup>-1</sup> (Fig.3.3). O número de hastes por planta 44 DAP foi significativamente superior nas plantas produzidas ao ar livre em comparação com as plantas produzidas em estufa, mas apenas nas plantas destinadas a consumo em fresco (Fig.3.3 a). Nas plantas destinadas a secagem o maior número de hastes nas plantas produzidas ao ar livre foi superior mas não foi significativamente diferente do número de hastes das plantas produzidas em estufa (Fig.3.4 a). No entanto, o conjunto das plantas produzidas ao ar livre apresentaram um

número superior ( $p < 0,03$ ) de hastes por planta 44 DAP, em média 8,6 hastes planta<sup>-1</sup>, em comparação com as plantas produzidas em estufa (5,8 hastes planta<sup>-1</sup>) (Fig.3.4 b).

Na colheita final 127 DAP, o número de hastes das plantas para secagem produzidas em estufa foi idêntico ao das plantas produzidas ao ar livre, mas foi superior ao das plantas destinadas a consumo em fresco produzidas em estufa e ao ar livre. Considerando o conjunto das plantas produzidas em estufa e das plantas produzidas ao ar livre, o número de hastes por planta foi semelhante nesta colheita (Fig.3.4 b).

O número médio de hastes por planta foi idêntico para todos tratamentos das plantas produzidas em estufa e ao ar livre, em média 7,3 hastes planta<sup>-1</sup> (Fig. 3.5 a). No entanto, considerando as plantas produzidas em estufa e ao ar livre em conjunto, o número médio de hastes nas plantas sujeitas a três colheitas (F) foi inferior (7,0 hastes planta<sup>-1</sup>) em comparação com as plantas para secagem (7,5 hastes planta<sup>-1</sup>) (Fig. 3.5 b).

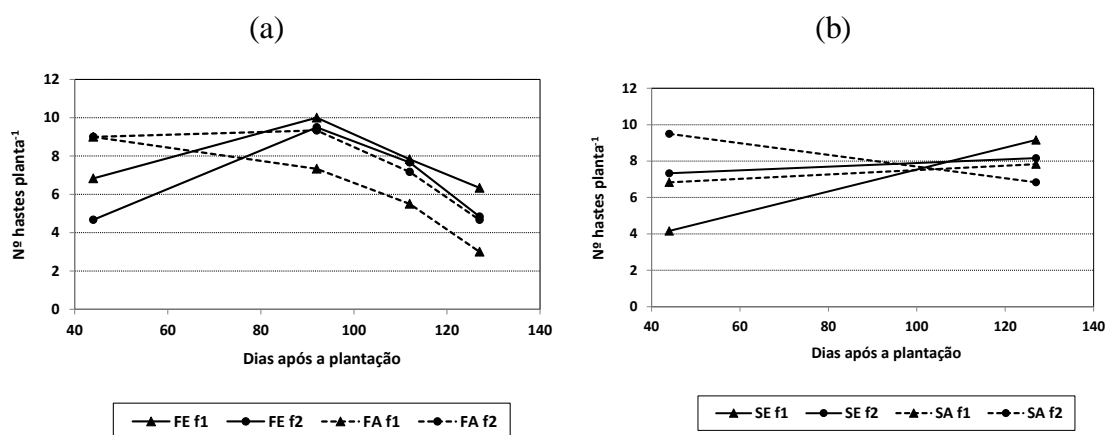


Figure 3.3 – Número de hastes planta<sup>-1</sup> a partir da poda de formação até à última colheita do ensaio (respetivamente 44 e 127 dias após a plantação), nas plantas destinadas a (a) colheitas para consumo em fresco (F) e a (b) colheitas para secagem (S), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A), com fertilização de fundo (f1) e com fertilização de fundo e de cobertura (f2).



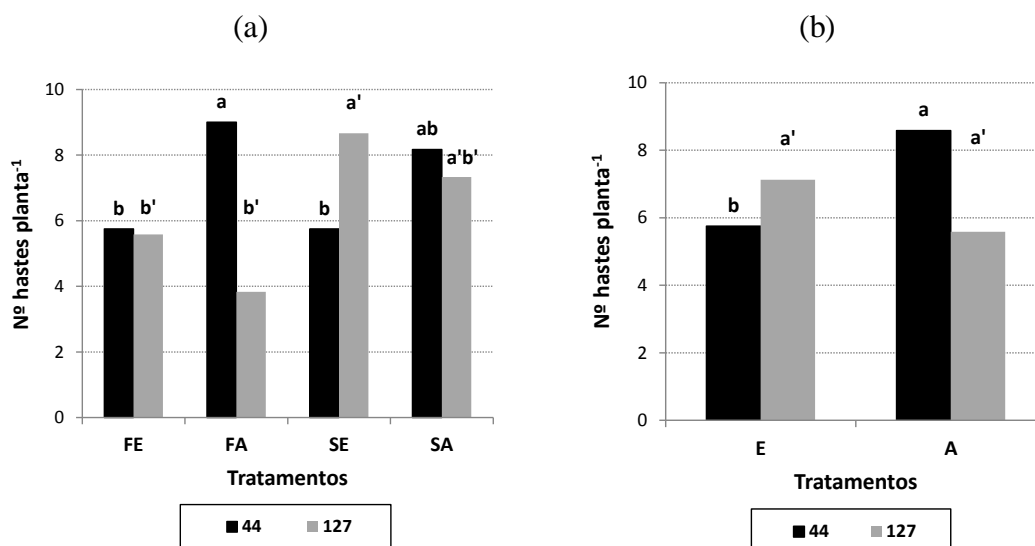


Figure 3.4 – (a) Número de hastes planta $^{-1}$  na poda de formação e na última colheita do ensaio (respetivamente 44 e 127 dias após a plantação) nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) e a colheitas para secagem (S), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A); (b) número de hastes planta $^{-1}$  para o conjunto das plantas produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

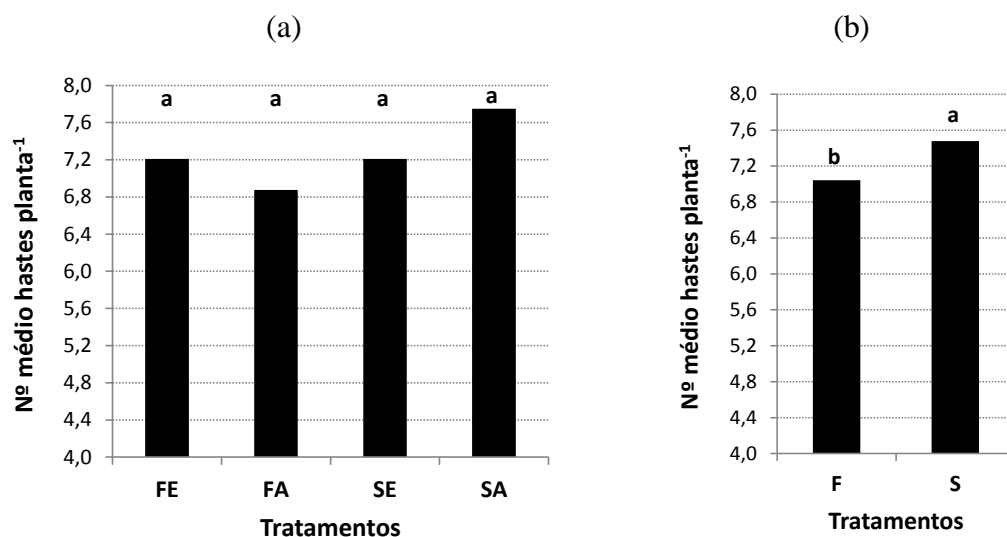


Figure 3.5 – Número médio de hastes planta $^{-1}$  (a) nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) e a colheitas para secagem (S), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A); (b) nas plantas F e S considerando as plantas produzidas em estufa e ao ar livre em conjunto. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2 Peso das hastes na colheita

O peso fresco das hastes cortadas nas plantas destinadas a colheitas regulares para consumo em fresco, em 83 dias, variou de um valor médio de 15,7 g planta<sup>-1</sup> (na poda de formação, 44 DAP) a um valor acumulado médio de 630,7 g planta<sup>-1</sup> (na última colheita, 127 DAP) (fig. 3.6 a). A variação do peso seco médio foi, respetivamente, de 2,4 g planta<sup>-1</sup> a 134,7 g planta<sup>-1</sup> (fig. 3.6 b).

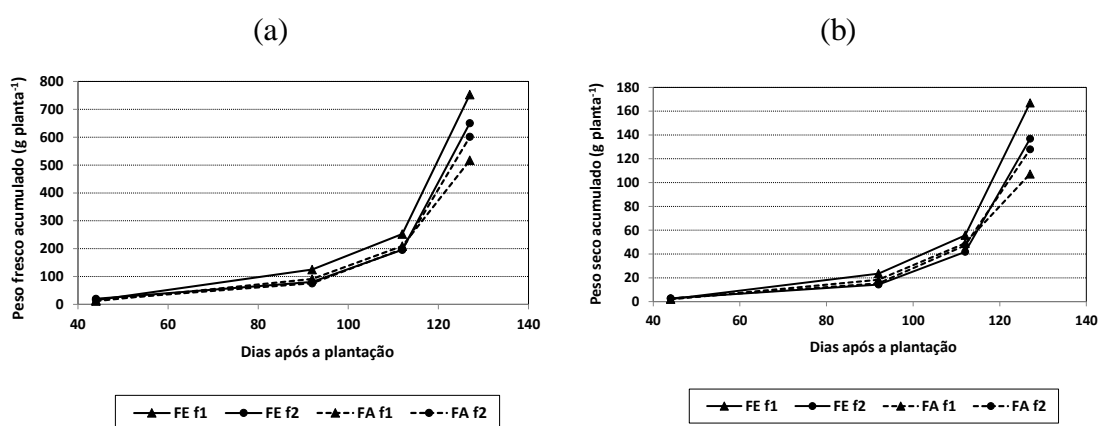


Figure 3.6 – (a) Peso fresco (g planta<sup>-1</sup>) e (b) peso seco (g planta<sup>-1</sup>) acumulados, das hastes cortadas a partir da poda de formação até à última colheita do ensaio (respetivamente 44 e 127 dias após a plantação), nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A), com fertilização de fundo (f1) e com fertilização de fundo e de cobertura (f2).

Para os dois tipos de colheita em estudo (consumo em fresco e secagem) a maior altura média das plantas produzidas em estufa em comparação com as plantas produzidas ao ar livre, para um número médio de hastes por planta idêntico, não se revelou também significativo no peso fresco e seco das hastes cortadas. O peso fresco e seco total das hastes cortadas foi semelhante nas plantas produzidas em estufa e ao ar livre (Fig. 3.7 a; 3.8 a). Em estufa, o peso fresco médio foi de 776,1 g planta<sup>-1</sup> e o peso seco médio de 167,3 g planta<sup>-1</sup> e, nas plantas produzidas ao ar livre, estes pesos foram, respetivamente, de 597,0 g planta<sup>-1</sup> e 132,2 g planta<sup>-1</sup> (Fig. 3.7 b; 3.8 b). De igual modo, considerando as plantas produzidas em estufa e ao ar livre em conjunto, o peso fresco e seco total médio nas plantas sujeitas a três colheitas (F) foi idêntico ao das plantas sujeitas a uma colheita (S), em média 624,4 g planta<sup>-1</sup> e 132,0 g planta<sup>-1</sup>, respetivamente.

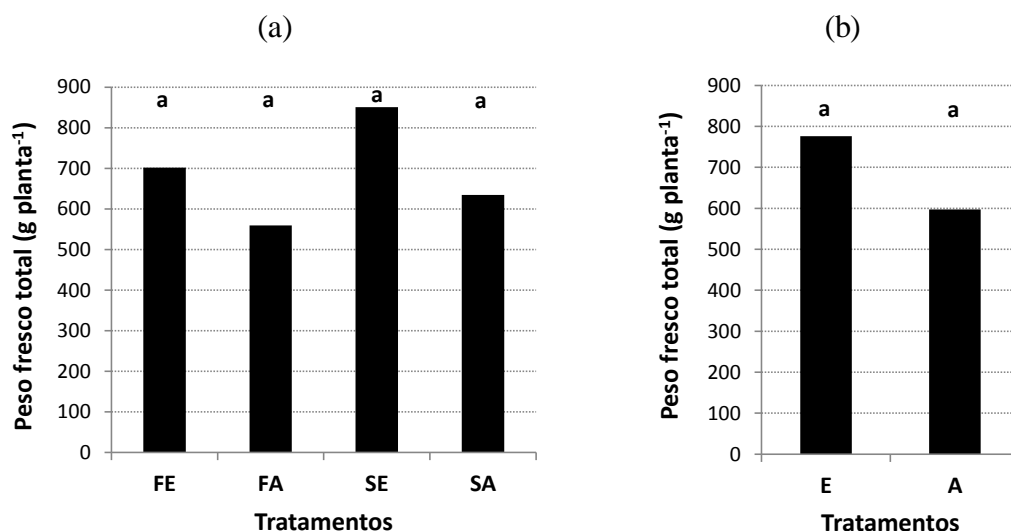


Figure 3.7 – Peso fresco total das hastes cortadas ( $\text{g planta}^{-1}$ ) (a) nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) e a colheita para secagem (S), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A); (b) nas plantas E e A considerando os tipos de colheita em conjunto (F e S). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

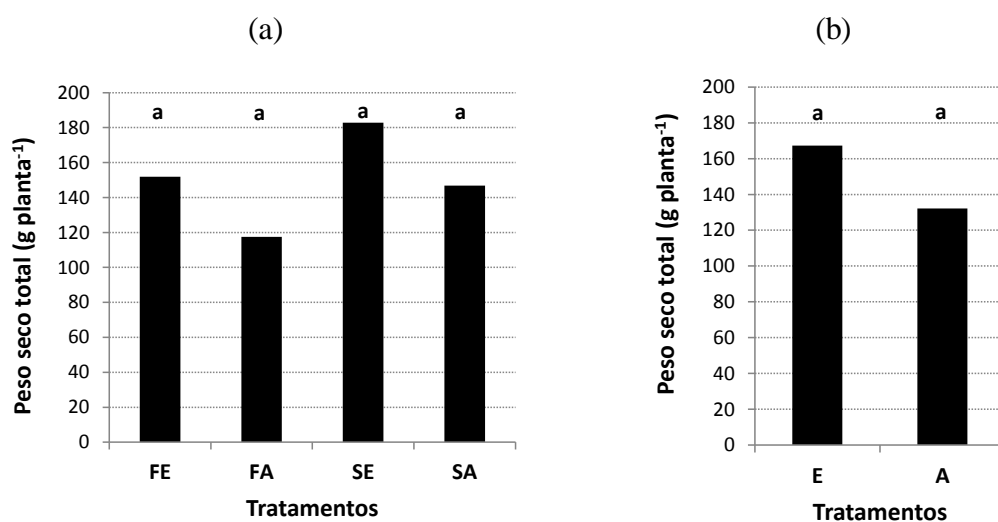


Figure 3.8 – Peso seco total das hastes cortadas ( $\text{g planta}^{-1}$ ) (a) nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) e a colheita para secagem (S), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A); (b) nas plantas E e A considerando os tipos de colheita em conjunto (F e S). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

## 3.2 Qualidade das hastes

### 3.2.1 Matéria seca das hastes

A matéria seca das hastes cortadas nas plantas destinadas a colheitas regulares para consumo em fresco aumentou desde a poda de formação (44 DAP) até à terceira colheita (112 DAP) e diminuiu na última colheita (127 DAP) (Fig. 3.9).

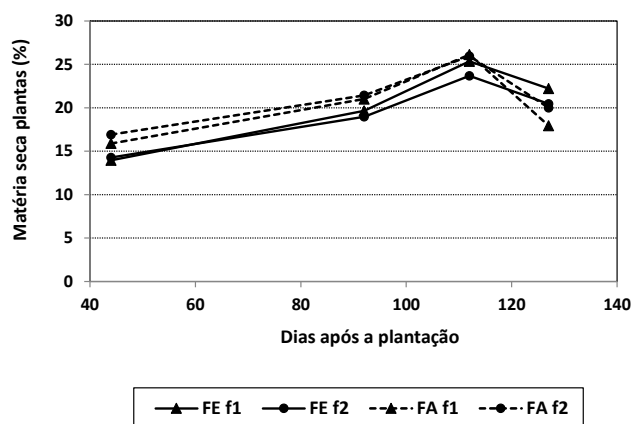


Figure 3.9 – Matéria seca das hastes cortadas (%) a partir da poda de formação até à última colheita do ensaio (respetivamente 44 e 127 dias após a plantação), nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A), com fertilização de fundo (f1) e com fertilização de fundo e de cobertura (f2).

A matéria seca das hastes cortadas na altura da poda de formação (44 DAP) foi significativamente superior nas plantas produzidas ao ar livre em comparação com as plantas produzidas em estufa, para ambos os tratamentos das plantas destinadas a consumo em fresco e para secagem (Fig.3.10 a). No entanto, na colheita final 127 DAP, a matéria seca das hastes cortadas foi inferior ( $p < 0,05$ ) nas plantas destinadas a consumo em fresco produzidas ao ar livre (19,0%), em comparação com os restantes tratamentos que apresentaram uma matéria seca das hastes semelhante, em média 22,0% (Fig. 3.10 a).

A matéria seca média das hastes cortadas foi o único parâmetro de avaliação da qualidade onde a interação entre a fertilização (de fundo, f1 e de fundo mais de cobertura, f2) e o tipo de colheita (para consumo em fresco, F e para secagem, S) e local de produção (em estufa, E e ao ar livre, A), foi significativa. As plantas produzidas na estufa (SE) apenas com fertilização de fundo tiveram uma menor percentagem de matéria seca das hastes em

comparação com plantas que tiveram a fertilização de fundo e de cobertura (Fig. 3.10 b) e o oposto ocorreu com as plantas FE. Nas plantas produzidas ao ar livre não ocorreram diferenças na matéria seca média das hastes para os dois tipos de fertilização e o valor foi semelhante a FE f1 (Fig. 3.10 b).

A matéria seca média das hastes cortadas foi significativamente superior nas plantas produzidas ao ar livre (20,5%) em comparação com as plantas produzidas na estufa (18,8%) e foi também superior nas plantas para consumo em fresco (20,2%) em comparação com as plantas para secagem (19,1%) (Fig. 3.11).

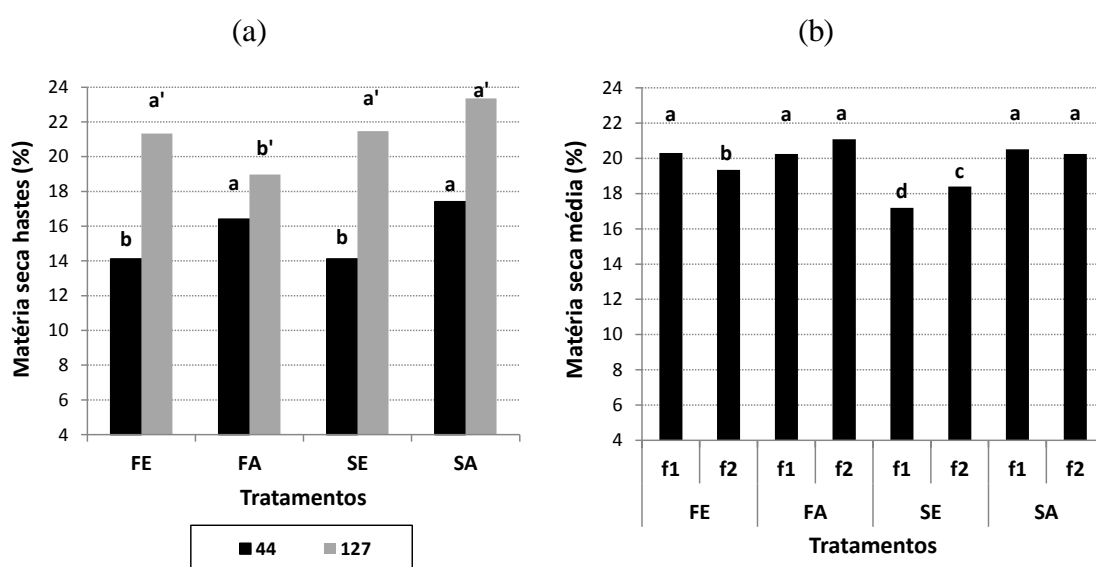


Figure 3.10 – (a) Matéria seca das hastes cortadas (%) na poda de formação e na última colheita do ensaio (respetivamente 44 e 127 dias após a plantação) e (b) matéria seca média das hastes cortadas (%), nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) e a colheitas para secagem (S), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A), com fertilização de fundo (f1) e com fertilização de fundo e de cobertura (f2). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

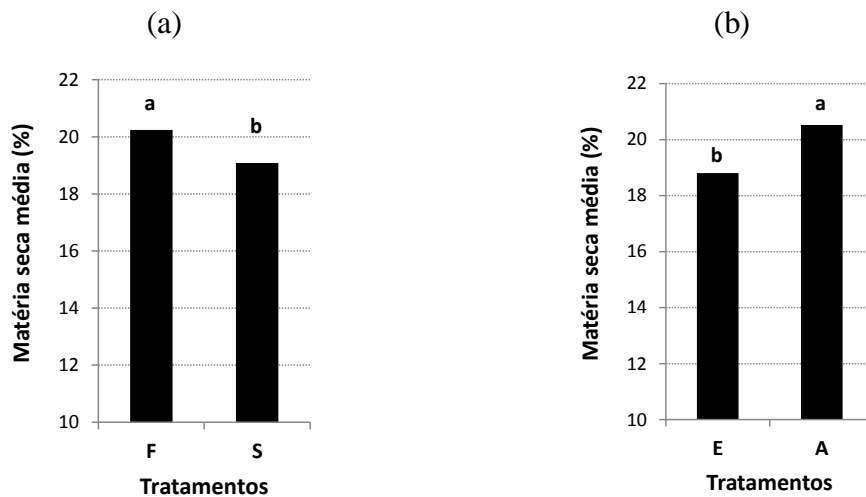


Figure 3.11 – Matéria seca média das hastes cortadas (%) (a) para todas as plantas em conjunto destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) e a colheitas para secagem (S) e (b) para todas as plantas em conjunto, produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Teor em ácido ascórbico

O teor em ácido ascórbico das folhas nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco variou de  $6,7 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$  a  $11,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ , no período de 92 a 127 DAP (Fig. 3.16 a). Para estas plantas, o teor médio de ácido ascórbico nas folhas foi idêntico para as plantas produzidas em estufa e ao livre e para os dois níveis de fertilização, em média  $8,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$  (Fig. 3.16 b).

O teor em ácido ascórbico das folhas 127 DAP, na última colheita para as plantas destinadas a consumo em fresco, foi igual ao teor nas folhas das plantas de colheita única para secagem, produzidas em estufa e ao ar livre ( $10,0 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Fig. 3.17 a). Considerando o teor médio de ácido ascórbico das folhas das plantas para consumo em fresco e das folhas das plantas para secagem na colheita única, o teor em ácido ascórbico foi também igual ( $9,2 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ) nas plantas produzidas em estufa e ao ar livre. No entanto, foi significativamente inferior ( $8,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ) para o conjunto das plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco em comparação com o conjunto das plantas destinadas a secagem ( $10,0 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Fig. 3.17 b).

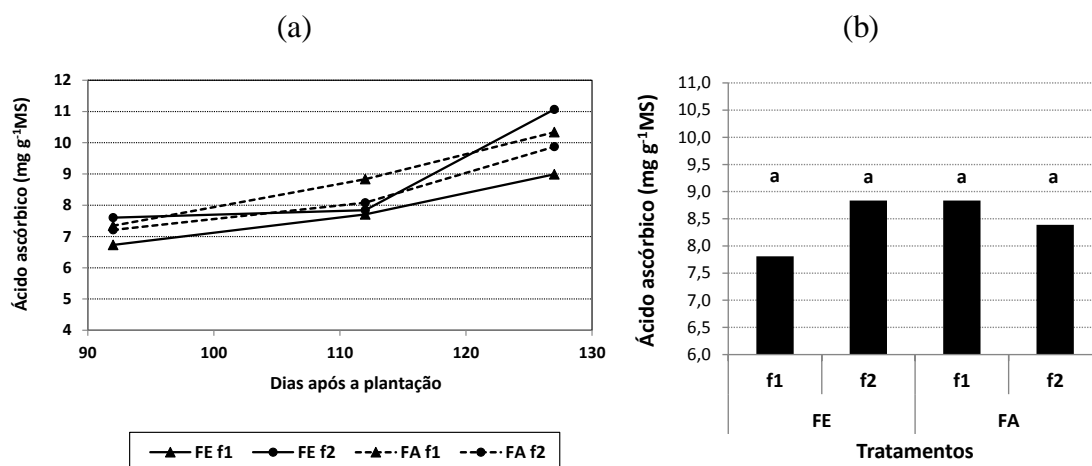


Figure 3.16 – (a) Teor em ácido ascórbico das folhas ( $\text{mg g}^{-1}$  MS), da segunda até à última colheita do ensaio (respetivamente 92 e 127 dias após a plantação) e (b) teor médio de ácido ascórbico das folhas ( $\text{mg g}^{-1}$  MS), nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A), com fertilização de fundo (f1) e com fertilização de fundo e de cobertura (f2). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

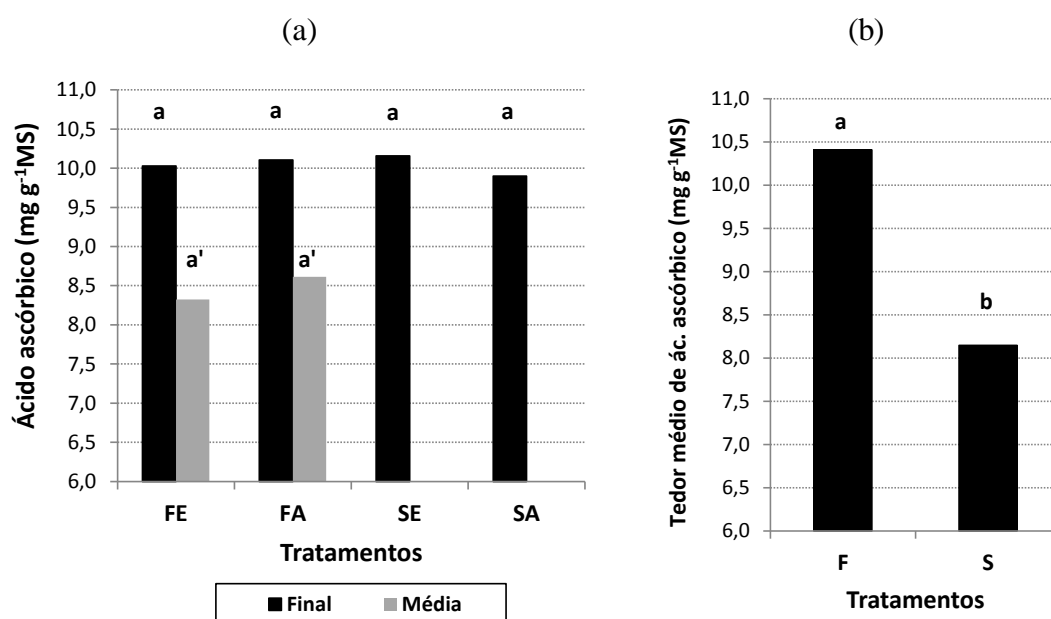


Figure 3.17 – Teor em ácido ascórbico das folhas ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) na última colheita do ensaio (127 dias após a plantação), nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) e a colheitas para secagem (S), produzidas em estufa (E) e ao ar livre (A); e teor médio em ácido ascórbico ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) nas plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco (F). (b) Teor médio em ácido ascórbico das folhas ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) para todas as plantas em conjunto destinadas a colheitas para consumo em fresco (F) e a colheitas para secagem (S). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Condições ambientais

A temperatura média diária do ar, a temperatura média máxima e a temperatura média mínima do ar foram, respetivamente, 20,0°C, 25,7°C e 12,6°C ao ar livre, sendo os valores na estufa muito similares, de 20,5°C, 26,3°C e 12,9°C, respetivamente, devido à própria estrutura da estufa acima descrita (Fig. 3.18).

A temperatura média diária do solo, a temperatura média máxima e a temperatura média mínima do solo foram ao ar livre, respetivamente, 20,6°C, 24,0°C e 13,3°C, enquanto na estufa apresentaram valores superiores, respetivamente 23,8°C, 29,0°C e 15,4°C (Fig. 3.19).

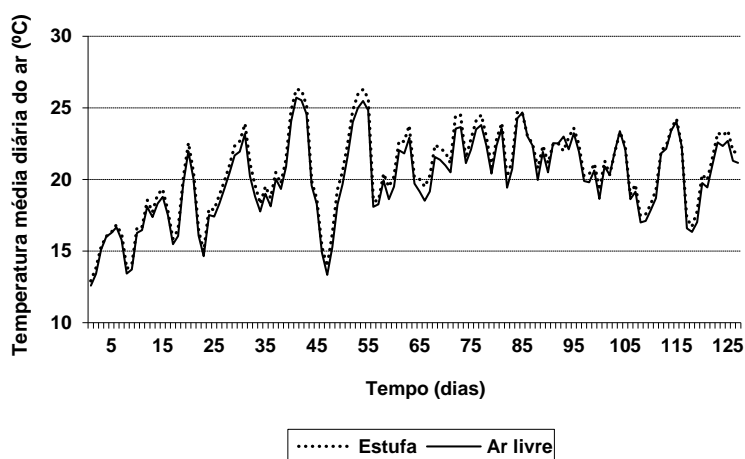


Figura 3.18 - Temperatura média diária do ar ao ar livre e na estufa (50 cm de altura), durante o período experimental, de 28 de Abril a 2 de Setembro de 2015.

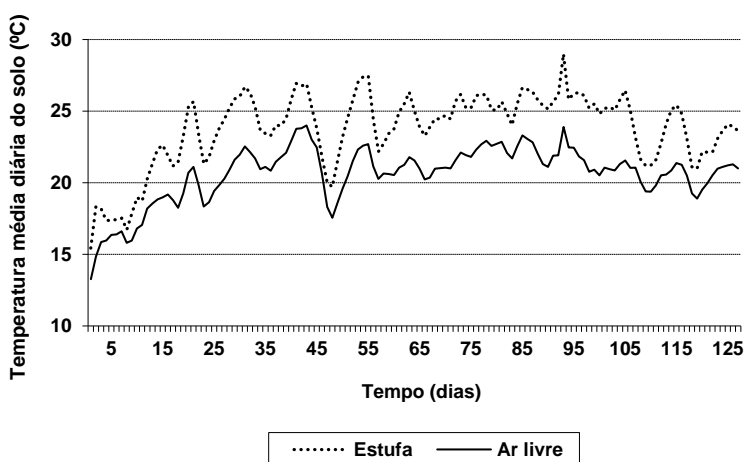




Figura 3.19 - Temperatura média diária do solo ao ar livre e na estufa (10 cm de profundidade), durante o período experimental, de 28 de Abril a 2 de Setembro de 2015.

## **4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

### **4.1 Desenvolvimento e crescimento das plantas**

#### **Efeito da fertilização**

Os efeitos da fertilização não causaram diferenças significativas entre os tratamentos, em nenhum dos parâmetros analisados no âmbito do crescimento das plantas, de 44 a 127 DAP, o que se poderá explicar pela aplicação tardia do fertilizante orgânico 97 DAP.

#### **Efeito do local de plantação**

A altura média do conjunto das plantas na estufa (52,1 cm planta<sup>-1</sup>) foi superior à altura média do conjunto das plantas produzidas ao ar livre (47,4 cm planta<sup>-1</sup>) o que se poderá explicar pelo maior valor da temperatura dentro da estufa. Este efeito poderá também estar relacionado com o maior número de hastes nas plantas ao ar livre em 44 DAP (8,6 hastes planta<sup>-1</sup>), em comparação com as plantas produzidas em estufa (5,8 hastes planta<sup>-1</sup>). No entanto, o número médio de hastes por planta foi idêntico para todos tratamentos das plantas produzidas em estufa e ao ar livre (média 7,3 hastes planta<sup>-1</sup>).

Apesar da altura média das plantas produzidas na estufa ter sido superior à das plantas produzidas ao ar livre, a diferença entre o peso médio fresco (776,1 g planta<sup>-1</sup>) e seco das plantas na estufa e o peso das plantas produzidas ao ar livre (597,0 g planta<sup>-1</sup>), não foi significativa.

#### **Efeito do tipo de colheita**

Considerando as plantas produzidas em estufa e ao ar livre em conjunto, a altura média do conjunto das plantas sujeitas a três colheitas (51,8 cm planta<sup>-1</sup>) foi superior em comparação com a altura média do conjunto das plantas para secagem (47,7 cm planta<sup>-1</sup>), tendo sido o número médio de hastes inferior nas primeiras plantas (7,0 hastes planta<sup>-1</sup>) em comparação com as segundas (7,5 hastes planta<sup>-1</sup>). Este resultado poderá ser explicado pelo resultado do estímulo do corte nas plantas, que terá induzido a um maior crescimento das plantas em altura, embora tenha induzido a uma menor ramificação.

Apesar da altura média ter sido superior nas plantas para consumo em fresco, sujeitas a três colheitas, em comparação com as plantas destinadas à secagem, o peso fresco e seco total médio foi idêntico (média do peso fresco 624,4 g planta<sup>-1</sup>).

### **Efeito das condições ambientais**

A altura média do conjunto das plantas na estufa (52,1 cm planta<sup>-1</sup>) foi superior à altura média do conjunto das plantas produzidas ao ar livre (47,4 cm planta<sup>-1</sup>) o que se poderá explicar pelo maior valor da temperatura do solo na estufa.

## **4.2 Qualidade das hastes**

### **Efeito da fertilização**

A matéria seca média das hastes foi o único parâmetro de avaliação da qualidade onde a interação entre a fertilização (de fundo, e de fundo mais de cobertura) e o tipo de colheita e local de produção, foi significativa. Para as plantas produzidas na estufa, as plantas para secagem e apenas com a fertilização de fundo tiveram uma menor percentagem de matéria seca das hastes, em comparação com plantas que tiveram a fertilização de fundo e de cobertura. No entanto, o oposto ocorreu com as plantas para consumo em fresco e produzidas na estufa. Para as plantas produzidas ao ar livre não ocorreram diferenças na matéria seca média das hastes para os dois tipos de fertilização.

### **Efeito do local de plantação**

A matéria seca média das hastes cortadas foi significativamente superior nas plantas produzidas ao ar livre (20,5%) em comparação com as plantas produzidas na estufa (18,8%).

O teor médio de ácido ascórbico nas folhas das plantas para consumo em fresco foi idêntico para o conjunto das plantas produzidas em estufa e ao livre (em média 8,5 mg g<sup>-1</sup> MS).

Considerando o teor médio das folhas das plantas para consumo em fresco e o teor das folhas das plantas para secagem, a composição da matéria seca das folhas em ácido ascórbico foi igual (9,2 mg g<sup>-1</sup> MS) nas plantas produzidas em estufa e ao ar livre.

### **Efeito do tipo de colheita**

Considerando as plantas produzidas em estufa e ao ar livre em conjunto, a matéria seca média das folhas do conjunto das plantas sujeitas a três colheitas para consumo em fresco

(20,2%) foi superior, em comparação com a matéria seca média do conjunto das plantas para secagem (19,1%).

O teor médio de ácido ascórbico das folhas foi igualmente inferior (8,5 mg g<sup>-1</sup> MS) para o conjunto das plantas destinadas a colheitas para consumo em fresco em comparação com o conjunto das plantas destinadas a secagem (10,0 mg g<sup>-1</sup> MS).

### **Efeito das condições ambientais**

Para as plantas produzidas ao ar livre e em estufa ocorreram diferenças significativas no teor médio de ácido ascórbico (em média 8,1 mg g<sup>-1</sup> MS e 10,4 mg g<sup>-1</sup> MS).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Arab, A., Abou-Arab, A., & Abu-Salem, M. F., 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 4, 269–281.
- Arora, E.; Khajuria, V.; Kumar, S.; Gillani, Z.; Sadiq, S. & Tandon, V., 2010 - Stevia: A Promising Herbal Sweeteners. *JK SCIENCE*. Volume 12. No. 4. p. 212-213.
- Ayerbe, L., 1990. Cultivo In vitro de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 66-67, 98-99, 112-117, 128-133.
- Bernal, J., Mendiola, J., Ibáñez, E., & Cifuentes, A., 2011. Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 758–774.
- Bertoni, Moisés., 1905. Anales Científicos Paraguayos - LE KAÁ HE-É - Sa nature et ses propriétés. N°5, Série I, Asunción, Paraguai
- Braz de Oliveira, A. J., Correia Gonçalves, R. A., Cantuaria Chierrito, T. P., Müller dos Santos, M., Mera de Souza, L., Gorin, P. A. J., et al., 2011. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Food Chemistry*, 129, 305–311.
- Brito, M., 2007. Capítulo 3. Fertilidade do Solo, Compostagem e Fertilização. In: Mourão, I., Manual de Horticultura no Modo de Produção Biológico, Projeto nº 747. Escola Superior Agrária de Ponte de Lima / IPVC, pp 53 – 86.
- Carrascal. R. H., s/ data., Manual de cultivo de la stevia para agricultores., Asociación Española de *Stevia rebaudiana*. 38pp
- CBI, 2014. Stevia in Europe, Product Factsheet  
<http://www.cbi.eu/sites/default/files/study/product-factsheet-stevia-natural-flavours-europe-natural-colours-flavours-thickeners-2014.pdf> (Acesso 20/02/2015)
- Crammer, B., & Ikan, R., 1986. Sweet glycosides from the Stevia plant. *Chemistry in Britain*, 22, 915–917
- Chemical CAS Database with Global Chemical,  
<http://www.chemnet.com/cas/> (Acesso 16/02/2015)
- Courelas, João P. C., 2013. Avaliação da Adaptação da Espécie *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni às Condições Mediterrânicas, Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora. 92pp
- DRAEDM, 2005. Atlas Agroclimatológico do Entre Douro e Minho, Relatório Final, Projecto POCTI/GEO/14260/1998, 286 pp  
<http://www.cost734.eu/reports-and-presentations/atlas-agroclimatologico-do-entre-douro-e-minho>
- Edeoga, H., Okwu, D., & Mbaebie, B., 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4, 685–688.
- FAO, 2007, Steviol Glycosides., Chemical and Technical Assesment, Page 8 (8)  
[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/68/Steviol\\_glycosides.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/68/Steviol_glycosides.pdf) (Acesso 14/02/2015)

- Ferreira, J. (Coord.), 2009. As bases da agricultura biológica, Tomo I – Produção Vegetal, Edibio, Edições, Lda., 510 pp.
- Ferreira, J., 2012. Guia de Fatores de Produção para Agricultura Biológica 2012/2013 – Fertilizantes, Produtos Fitofarmacêuticos, Organismos Auxiliares, Sementes e Plantas - 4ª edição., AGROSANUS., 48pp
- Fronza, D. and Folegatti, M. V. 2003. Water Consumption of the Stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. Sci. Agric. 60: 15\_18.
- Gardana, C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., & Pietta, P., 2003. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. Journal of Agricultural Food Chemistry, 51, 6618–6622.
- Gattoni, L. A. 1945. Caa-Jhee A wild shrub native to Paraguay (*Stevia rebaudiana* Bert.) September. Typed Material. STICA, Paraguay.
- Google Patents - <http://www.google.com/patents/> (Acesso 28/02/2015)
- Jayaraman, S., Manoharan, M., & Illanchezian, S., 2008. In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7, 1143–1149.
- JEFCA, 2006. Safety evaluation of certain food additives / prepared by the sixty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 666 pp.
- Kim, I., Yang, M., Lee, O., & Kang, S., 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. LWT – Food Science and Technology, 44, 1328 – 1332. (tabela de vitaminas).
- Landázuri, Pablo A. A. & Tigrero, Juan O. S. (Editores), 2009. *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal., Escuela Politécnica del Ejército (publicador), 34 pp.
- Lewis, 2012. Notes on Economics Plants  
<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02866633> (Acesso 15/02/2015)
- Marín W. 2004. Sondeo de mercado de la Estevia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia.
- Mondaca, R.L., Gálvez, A.V., Bravo, L. Z., Hen, K. A., 2011. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Journal Food Chemistry, 132, 1121–1132.
- Mourão, I., 2007. Capítulo 1. A Agricultura Biológica e a Segurança Alimentar. In: Mourão, I., Manual de Horticultura no Modo de Produção Biológico, Projeto nº 747. Escola Superior Agrária de Ponte de Lima / IPVC, pp 1 – 18.
- Município de Ponte de Lima, 2012. Plano Municipal de Defesa da Floresta Contra Incêndios, Caderno I – Diagnóstico, 72pp.  
[http://sig.cm-pontedelima.pt/WebSIG/PMDFCI/CADERNO\\_I\\_Informacao\\_de\\_base.pdf](http://sig.cm-pontedelima.pt/WebSIG/PMDFCI/CADERNO_I_Informacao_de_base.pdf)
- Pande, S. S. & Gupta, P., 2013. Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. Volume 5. No. 1. p. 26-33.
- Pérez, Tomás Martínez., 2002. La hierba dulce – Historia, Usos y Cultivo da la *Stevia Rebaudiana* Bertoni.

- <http://www.librosenred.com/libros/lahierbadulcehistoriausosycultivodelasteviarebaudianabertoni.html> (Acesso 15/02/2015)
- Ramesh, et al., 2006. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: a comprehensive review. *Adv. Agron.* 89, 137– 77.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)89003-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113(05)89003-0).
- Rodrigues, R., 2010. Agricultura Biológica vs Agricultura Convencional., IPVC.  
[http://www.ci.esapl.pt/off/apontamentos\\_maiores23/tema\\_agriculturabiologica.pdf](http://www.ci.esapl.pt/off/apontamentos_maiores23/tema_agriculturabiologica.pdf)
- Savita, S., Sheela, K., Sunanda, S., Shankar, A., & Ramakrishna, P. (2004). Stevia rebaudiana – A functional component for food industry. *Journal of Human Ecology*, 15, 261–264
- Shock, Clinton C. 1982. Experimental Cultivation of Rebaudi's Stevia in California. *Agronomy Prog No.* 122. Univ, of California, Davis., 9pp.
- Singh, S., & Rao, G. (2005). Stevia: The herbal sugar of 21st Century. *Sugar Tech*, 71, 17–24.
- Tadhani, M., & Subhash, R. (2006). Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: Proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *Journal of Medical Sciences*, 6, 321–326.
- USDA, 2015, Natural Resources Conservation Service  
<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=STRE2> (Acesso 14/02/2015)
- Vélez, A. T. & Zapata, M. H. (2006) - Generalidades del cultivo. *Tecnología para el cultivo de la stevia*. 104 pp.
- Yadav, A. K.; Singh, S.; Dhyani, D. & Ahuja, P. S. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*. Volume. 91. 27 pp.

## **ANEXOS**

## Anexo 1: As flores e sementes de stevia



Fig1: Inflorescência



Fig2: Botão floral



Fig3: Flores



Fig4: Flores semi-secas



Fig.5: Flores secas



Fig.5: Aquênios: a) inférteis (tom claro), b) férteis (tom escuro)



## Anexo 2: Instalação da cultura da stevia em estufa e ao ar livre



Fig. 1: Instalação na Estufa



Fig. 2: Instalação ao Ar livre



Fig. 3: Pormenor da instalação

### Anexo 3: Fases de crescimento



Fig.1: À chegada do viveiro



Fig.2: 21 dias após a plantação



Fig.3: 44 dias após a plantação



Fig.4: 97 dias após plantação ao Ar livre



Fig.5: 97 dias após a plantação em Estufa.

#### Anexo 4: Pragas da cultura da stevia (larva mineira)



Fig. 1: Orifício de entrada da larva



Fig.2: Canal interior do caule



Fig. 3: Larva

## Anexo 5: Instalação do Datalogger e respetivos termístores

Canal (sonda termopar)	Local
6	Ar da estufa
7	Ar da estufa (repetição)
8	Solo - estufa
9	Ar livre
10	Solo - ar livre

