

Efecto de cuatro niveles de nutrición mineral sobre la fenología y concentración de steviósidos en *Stevia rebaudiana*.

2015

Karla R. Jiménez Sánchez



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

Efecto de cuatro niveles de nutrición mineral sobre la fenología y concentración de steviósidos en *Stevia rebaudiana*.

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

Ingeniero Agroindustrial

PRESENTA:

Karla Rubí Jiménez Sánchez

DIRIGIDA POR:

M. en C. Adán Mercado Luna

C.U. Santiago de Querétaro, Qro., Noviembre de 2015



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Agroindustrial

“Efecto de cuatro niveles de nutrición mineral sobre la fenología y concentración de steviósidos en *Stevia rebaudiana*”.

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

Ingeniero Agroindustrial

PRESENTA:

Karla Rubí Jiménez Sánchez

DIRIGIDO POR:

M. en C. Adán Mercado Luna

SINODALES

M. en C. Adán Mercado Luna
Presidente

Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Secretario

Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Vocal

Firma

M. en C. Oscar Alatorre Jácome
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre, 2015.
México

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el contenido de steviósido en hojas y la fenología de *Stevia rebaudiana*, con cuatro diferentes concentraciones de solución nutritiva Steiner: 0%,100%,75%,50% y 25% para determinar el mejor nivel de nutrición mineral. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Las variables evaluadas: altura de la planta (AP), peso fresco (PF) y peso seco foliar (PS), índice de clorofila (IC), contenido de steviósidos (CS), índice de contenido de flavonoides (CFI) e índice de contenido de fenoles (CFe). Las variables AP e IC se midieron a los 47, 54, 61 y 68 días después de trasplante (ddt), mientras que el PF de la hoja se midió al 68 ddt y el PS al 69 ddt. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba de medias (Tukey) ($p < 0.05$). El mejor tratamiento para AP mostro ser el de 75% para los 47 ddt, mientras que el tratamiento del 100% resultó mejor para los 54, 61 y 68 ddt; entre los tratamientos T1, T2, T3 y T4 no existe diferencia significativa excepto para el tratamiento T0. Para las variables PF y PS, el tratamiento del 50% fue el que mostró mejores resultados; para la variable IC el tratamiento del 100% mostró mejores resultados para los días 47 y 54 ddt, mientras que el testigo tuvo mejores resultados para los días 61 y 68 ddt; en cuanto a la variable CS, el testigo fue el que presento los mayores valores encontrando una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos. Para la variable CFI no se encontró diferencia significativa en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 excepto en el T0, el tratamiento del 50% mostro la mayor cantidad de estos compuestos; para el CFe, el tratamiento del 50% obtuvo los mejores valores sin embargo no se observaron diferencias significativas entre tratamientos excepto con el testigo el cual obtuvo los menores valores. Basados en los resultados anteriores se puede deducir que la fertilización mineral tiene influencia en la morfología de la planta pero no así en la producción de glucósidos sin embargo favorece a la producción de metabolitos secundarios; la producción de glucósidos puede estar ligada a otros factores que no se evaluaron en este trabajo.

(Palabras clave: stevia, glucósidos, fertilización, metabolitos secundarios).

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the content of stevioside in leaves and phenology *Stevia rebaudiana* with four different concentrations of nutrient solution Steiner: 0 %, 100 %, 75 %, 50 % and 25 % to determine the best level of nutrition mineral. A completely randomized design was used. The variables evaluated: plant height (AP), fresh weight (PF) and leaf dry weight (PS), chlorophyll index (IC), content of stevioside (CS), content of flavonoids (CFI) and phenol content (CFe). The AP and IC variables were measured at 47, 54, 61 and 68 days after transplanting (dat), while the PF of leaf was measured at 68 dat and the PS at 69 dat. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) with a test (Tukey) ($p < 0.05$). The best treatment for the AP showed to be 75 % to 47 dat, while treatment was 100% better for the 54, 61 and 68 dat: between T1, T2, T3 and T4 treatments there aren't significant difference except for the treatment T0. For PF and PS variables the treatment of 50% showed better results: for IC variable the treatment of 100 % showed better results for the days 47 and 54 dat, while the control had better results for 61 and 68 days dat: regarding variable CS , the control was presented the highest values that found a significant difference to other treatments. For CFI variable was not found significant difference between treatments T1, T2, T3 and T4 except with T0, the 50% treatment showed the highest amount of these compounds: for the Cfe variable, the treatment of 50% achieved the best values however was not observed significant difference between treatments except for the control which obtained the lowest values. Based on the above results it can be deduced that mineral fertilization influences the morphology of the plant but not in the production of glycosides, but favors the production of secondary metabolites: the production of glycosides may be linked to other factors that were not evaluated in this work.

(Key words: stevia, glycosides, fertilization, secondary metabolites)

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mi familia, a mi padre Javier Jiménez Rodríguez y a mi madre Esther Sánchez Vargas, que siempre creyeron en mí y me apoyaron para cumplir mis sueños. Les agradezco infinitamente todos los sacrificios que hicieron para que yo pudiera alcanzar mis objetivos, el apoyo incondicional que me brindaron y me siguen brindando, mi mejor manera de compensarlos es demostrándoles que sí se pudo, que todos sus esfuerzos valieron la pena, hoy les puedo decir orgullosa ¡lo logramos!, sí pudimos. Los amo.

También está dedicado a mi primo Alex, que aunque ya no está con nosotros nunca lo voy a olvidar. Gracias por apoyarme siempre en lo que hacía, por estar conmigo en los desvelos y en las situaciones más difíciles; tú siempre lograste dibujar una sonrisa en mi rostro aún cuando el cansancio y la desesperación no me dejaban continuar. Siempre vivirás en mi corazón Negrito.

Otra persona a la que está dedicado este trabajo es a Mario, uno de mis más grandes motores de impulso en la vida. Gracias por tus palabras de aliento que me ayudaron cuando parecía que las cosas no tenían fin; te agradezco por haber llegado a mi vida y estar conmigo en el camino que sigo para alcanzar mis sueños, aún cuando éste es tan intrincado y complicado.

Por último quiero dedicar el trabajo a todas las personas de mi familia que me apoyaron durante el arduo camino de la licenciatura, gracias por contribuir a que alcanzará mi objetivo.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios por darme la oportunidad de llegar a esta etapa de mi vida; gracias por darme paciencia, fuerza, constancia y sobre todo sabiduría para alcanzar mis sueños.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Ingeniería Campus Amazcala por brindarme las herramientas para construir mi formación académica. Así mismo agradezco a mi asesor el M. en C. Adán Mercado Luna por su apoyo y tiempo dedicado en la realización de este proyecto, gracias por sus atinados comentarios y por su gran amistad. Al Dr. Ramón Gerardo Guevara González, a la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez y al M. en C. Oscar Alatorre Jácome por el tiempo que me brindaron para la revisión y mejora de la tesis, gracias por sus observaciones y comentarios.

A todas las personas del Campus que me brindaron su amistad, especialmente a la señora Celia que siempre estuvo cuando la necesitaba, gracias por aguantarme todo el tiempo que le di lata. Quiero también hacer un agradecimiento especial a Charly quien se colaboró conmigo en los invernaderos, que ponía todo su empeño en la realización de su trabajo y al mismo tiempo en los conocimientos que me transmitía; más que un compañero de trabajo es un gran amigo, el cual me enseñó cuestiones técnicas de algunos cultivos pero lo más importante me dejó una enseñanza de vida: nunca dejes de luchar, eres un guerrero Charly, mis respetos por siempre. También quiero agradecer al vigilante Don Marco, una persona muy alegre y llena de valores, el cual me alentó en los momentos más difíciles, gracias por ser un gran amigo.

A mis compañeros de generación Ale, Belén y Alberto por todas sus enseñanzas y conocimientos que compartieron conmigo, gracias por todos los momentos que pasamos juntos pero sobre todo gracias por su amistad.

Quiero agradecer especialmente a Fani y Roberta, más que compañeras grandes amigas las cuales estuvieron conmigo en la realización de este proyecto, gracias por ayudarme a lograrlo aún cuando todo se tornó complicado. Son unas grandes mujeres, las quiero muchísimo.

INDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	x
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Origen y distribución	3
2.2. Descripción botánica	3
2.3. Clasificación taxonómica	4
2.4. Valor nutricional y medicinal de <i>Stevia rebaudiana</i>	5
2.5. Importancia económica	6
2.6. Requerimientos del cultivo	7
2.7. Manejo del cultivo	8
2.8. Metabolismo primario	10
2.8.1. Edulcorantes	10
2.8.2. Steviósido	12
2.9. Metabolismo secundario	13
2.9.1. Fenoles	14
2.9.2. Flavonoides	15
2.10. Fertilización	16
2.10.1. Solución nutritiva (SN) Steiner	17
2.10.2. Conductividad eléctrica de la SN	17
2.11. La SN en la producción de stevia	18

III.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	21
3.1.	Objetivo General	21
3.2.	Objetivos Específicos	21
3.3.	Hipótesis	21
IV.	METODOLOGIA	22
4.1.	Descripción del área de estudio	22
4.2.	Localización del proyecto	23
4.3.	Diseño experimental	23
4.4.	Implementación del cultivo	25
4.4.1.	Material vegetal	25
4.4.2.	Cuidado de la plántula	26
4.4.3.	Acondicionamiento del sustrato	26
4.4.4.	Preparación de la solución nutritiva (SN)	27
4.5.	Trasplante de <i>S. rebaudiana</i> a macetas	30
4.6.	Riego de las plantas con la SN Steiner	31
4.7.	Monitoreo de temperatura, humedad relativa y radiación	32
4.8.	Variables medidas	32
4.8.1.	Altura de la planta	32
4.8.2.	Peso fresco foliar	33
4.8.3.	Peso seco foliar	34
4.8.4.	Índice de clorofila en hojas	34
4.8.5.	Concentración de steviósido	35
4.9.	Cuantificación de compuestos antioxidantes	37
4.9.1.	Extracción metanólica	37
4.9.2.	Determinación de flavonoides	37
4.9.3.	Determinación de fenoles totales	37
4.10.	Análisis estadístico	38
V.	RESULTADOS Y DISCUSION	39
5.1.	Altura de la planta de stevia	39
5.2.	Peso fresco foliar de la planta a los 68 ddt	41
5.3.	Peso seco foliar de la planta a los 69 ddt	42

5.4. Índice de clorofila en hojas de stevia	44
5.5. Contenido de steviósidos en hojas de stevia	47
5.6. Contenido de flavonoides en hojas de stevia	48
5.7. Contenido de fenoles totales en hojas de stevia	49
V. CONCLUSIONES	53
LITERATURA CITADA	54
BIBLIOGRAFÍA	58

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
2.1	Análisis de hojas secas de <i>Stevia</i> (g 100 g ⁻¹ base en peso seco)	5
2.2	Composición de aminoácidos en hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	6
4.1	Tratamientos ensayados para evaluar el efecto de la concentración de la Solución Nutritiva de Steiner (1984) en la producción de <i>S. rebaudiana</i>	24
4.2	Distribución de tratamientos dentro del invernadero	24
4.3	Concentración de nutrimentos en la solución nutritiva Steiner (1984), aporte de nutrientes por el agua empleada, cantidad aplicada y cantidad realmente utilizada en la SN, en todos los casos, expresada en mg L ⁻¹ o en ppm	28
4.4	Composición química en g/m ³ (ppm) de los diferentes niveles de la solución nutritiva Steiner	29
4.5	Conductividad eléctrica (CE) y presión osmótica (PO) de las cuatro concentraciones de la solución nutritiva de Steiner (1984) evaluadas en el presente trabajo	30
4.6	Distribución de compuestos para curva de calibración	38
5.1	Análisis estadístico de la comparación de medias de la altura de la planta (en cm) a los 47, 54, 61 y 68 ddt	39
5.2	Análisis estadístico de la comparación del peso fresco foliar (en g) a los 68 ddt	42
5.3	Análisis estadístico de la comparación del peso seco foliar (en g)	43
5.4	Análisis estadístico de la comparación de índice de clorofila en hojas de stevia (en unidades SPAD) a los 47, 54, 61 y 68 ddt	45
5.5	Análisis estadístico de la comparación de índice de steviósidos en hojas de stevia (en g/mol)	47
5.6	Análisis estadístico de la comparación de índice de flavonoides en hojas de stevia (en μM/g tejido seco)	49
5.7	Análisis estadístico de la comparación de índice de fenoles en hojas de stevia (en μM/g tejido seco)	50
5.8	Comparación de medias de la altura de la planta (AP), peso fresco foliar (PF), peso seco foliar (PS), índice de	52

clorofila (IC), contenido de steviósidos en hojas (CS), contenido de flavonoides en hojas (CFI) y contenido de fenoles totales en hojas (CFe) en plantas de stevia, por efecto de la concentración (T1-100%, T2-75%, T3-50%, T4-25%, T0-test 0%) de la solución nutritiva Steiner (TS). Mediciones realizadas a diferentes ddt

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Planta de <i>Stevia rebaudiana</i>	3
2.2	Síntesis de edulcorantes de stevia usando la ruta del ácido giberélico	11
2.3	Estructura básica del steviósido, $C_{38}H_{60}O_{18}$	13
2.4	Estructura básica del fenol, C_6H_6O .	14
2.5	Estructura básica de los flavonoides	16
4.1	Ubicación del lugar donde se llevo a cabo el experimento	22
4.2	Invernadero donde se llevo a cabo el proyecto	23
4.3	Distribución de las plantas dentro del invernadero	25
4.4	Plantas de stevia de 10 cm de altura	26
4.5	Cálculo de la SN Steiner	27
4.6	Preparación de la SN Steiner a las diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%)	28
4.7	Pesaje de fertilizantes	29
4.8	Trasplante de stevia	31
4.9	Riego de plantas de stevia	31
4.10	Sensor electrónico WatchDog	32
4.11	Medición de altura de las plantas	33
4.12	Hojas de las plantas de stevia	33
4.13	Pesaje de las hojas frescas de stevia	34
4.14	Medidor SPAD de clorofila	35
4.15	Diagrama de flujo para la extracción de steviósido	36
5.1	Comparación de medias de las diferentes concentraciones de SN Steiner para los muestreos a los 47, 54, 61 y 68 ddt en plantas de stevia para la variable altura de la planta	40
5.2	Comparación de las medias de la altura de plantas de stevia entre los diferentes tratamientos para los diferentes días de muestreo (47, 54, 61 y 68 ddt)	40
5.3	Comparación de las medias de los diferentes tratamientos para la variable altura en el día 68 después de trasplante	41
5.4	Comparación de las medias para la variable peso fresco foliar de los diferentes tratamientos en el día 68 después de trasplante	42
5.5	Comparación de las medias para la variable peso seco foliar de los diferentes tratamientos en el día 69 después de trasplante	44
5.6	Comparación de medias de las diferentes concentraciones de SN Steiner para los muestreos a los 47, 54, 61 y 68 ddt	45

	en plantas de stevia para la variable clorofila en hojas	
5.7	Comparación de la cantidad de clorofila en hojas de plantas de stevia entre los diferentes tratamientos para los diferentes días de muestreo (47, 54, 61 y 68 ddt)	46
5.8	Comparación de las medias de los diferentes tratamientos para la variable clorofila en el día 68 después de trasplante	46
5.9	Comparación de las medias para la variable contenido de steviósidos en hojas de stevia de los diferentes tratamientos; el índice de steviósidos se expresa en g/mol	48
5.10	Comparación de las medias para la variable contenido de flavonoides en hojas de stevia de los diferentes tratamientos; los resultados son expresados en $\mu\text{M/g}$ tejido seco	49
5.11	Comparación de las medias para la variable contenido de fenoles totales en hojas de stevia de los diferentes tratamientos; los resultados son expresados en $\mu\text{M/g}$ tejido seco	51

I. INTRODUCCION

El uso de plantas medicinales ha sido, desde tiempo atrás, una práctica tradicional en distintas partes del mundo, el cual ha pasado de generación en generación. Con el actual ritmo de vida se ha incrementado el número de personas con enfermedades como diabetes y sobrepeso, por lo cual es necesario recurrir al uso de la medicina herbácea para contrarrestar algunos efectos que dichas enfermedades provocan. Entre las especies de uso medicinal que brindan beneficios a la salud destaca la *Stevia rebaudiana* Bertoni por su alto poder edulcorante sin aportar calorías.

La *Stevia rebaudiana*, también llamada hierba dulce o Ka'a-He'e, es una herbácea perenne de la familia de las Asteraceae y de la región de Amambay en el noreste de Paraguay y sus colindancias con Brasil y Argentina; era usada por el grupo indígena Tupi-Guarani, para endulzar bebidas y mezclarla con otras plantas medicinales.

La stevia es una planta que ha incrementado en importancia debido a que, en su forma natural, es 15 veces más dulce que el azúcar de mesa y el extracto alcanza de 100 a 300 veces más (Ramírez, 2011).

La planta de stevia tiene un gran potencial para posicionarse dentro de los sustitutos de azúcar, debido a la necesidad de usar edulcorantes que no sean sintéticos como el aspartame, sacarinas o ciclamatos, ya que además de su muy alto poder edulcorante y que no aporta calorías, tiene otras funciones benéficas en la salud, como regular la presión arterial, ser digestiva, diurética y antiácida, ayuda a eliminar las toxinas, además de ser antimicrobiana y antioxidante (Kim y col., 2011).

Además, los estudios el tema de la nutrición mineral en stevia son escasos en el mundo (Ramesh y col., 2006), y la nutrición juega un papel definitivo en la síntesis de estas moléculas edulcorantes (Jarma, 2012; Das y col., 2007).

La presente investigación pretendió contribuir al desarrollo de conocimiento en el área de la nutrición mineral de la stevia, ya que se carece de información suficiente sobre aspectos técnicos del manejo nutricional del cultivo bajo condiciones de invernadero, con el objetivo de apoyar la producción de dicha planta en México y con ello al desarrollo de productos endulzados con stevia.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Origen y distribución.

La *Stevia rebaudiana*, conocida en inglés como “stevia”, es un género que se distribuye a través de México, desde el sur de estados Unidos hasta Argentina y las tierras altas de Brasil, teniendo presencia también en los Estados de Centroamérica y los Andes de Sudamérica. A este género pertenecen hierbas y arbustos que crecen principalmente entre las altitudes de 500-3500 metros sobre el nivel del mar (Soejarto, 2002).

La *S. rebaudiana* es un arbusto frondoso y ramificado (Figura 2.1) nativo de la región de Amambay en el noreste de Paraguay y sus colindancias con Brasil y Argentina (Soejarto, 2002; Brandle y Telmer, 2007), entre las latitudes 22° y 25° sur, y 55° y 57° oeste (Soejarto, 2002), donde fue empleada por mucho tiempo en preparaciones de alimentos y tés por los indígenas nativos (Dacome y col., 2005).



Figura 2.1. Planta de *Stevia rebaudiana*

2.2. Descripción botánica.

El género *Stevia* pertenece a la familia *Asteraceae*, en este género están consideradas cerca de 230 especies de hierbas y arbustos que crecen hasta un metro de altura (Mishra y col., 2010), de las cuales sólo las especies *S. rebaudiana* y *S. phlebophylla* producen glucósidos steviol (Lemus-Mondaca y col., 2012; Brandle y Telmer, 2007), aunque *S. rebaudiana* (Bertoni) es la de mayor importancia económica.

La *S. rebaudiana* es una hierba perenne de un metro de altura con tallos quebradizos, un extenso sistema radicular y pequeñas hojas elípticas. Las hojas son sésiles, de 3-4 cm de longitud, alargado-lanceoladas o en forma de espátulas con la punta roma, margen serrado del centro hacia la punta y abajo entera. El haz de la hoja es ligeramente pubescente granular. El tallo es leñoso y en la parte inferior es ligeramente pubescente. Los rizomas son raíces ligeramente ramificadas. Las flores son pentámeras, pequeñas y blancas con una “garganta” de color púrpura pálido; son compuestas rodeadas de un involucro de epicáliz. Los capítulos son indeterminados, irregulares y cimas simpodiales (tipo candelabro). Los diminutos floretes blancos nacen en pequeños corimbos de 2-6 floretes dispuestos en panículas desatadas. El fruto es un aquenio fusiforme con cinco nervaduras (Lemus-Mondaca et al., 2012).

2.3. Clasificación taxonómica.

Según (Yadav y col., 2011) la clasificación taxonómica de la *S. rebaudiana* es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Grupo: Monochlamydae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Eupatorieae

Género: *Stevia*

Especie: *rebaudiana*

2.4. Valor nutricional y medicinal de *Stevia rebaudiana*.

Lemus-Mondaca y col., (2012) señalan que las hojas de *S. rebaudiana* presentan beneficios debido a su composición nutrimental, ya que contienen carbohidratos, proteínas y fibra cruda, los cuales promueven el bienestar y reducen el riesgo de algunas enfermedades (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Análisis de hojas secas de *Stevia* (g 100 g⁻¹ base en peso seco).

Componente	Referencias						
	Mishra y col. (2010)	Goyal y col. (2010)	Serio (2010)	Savita y col. (2004)	Abou-Arab y col. (2010)	Tadhani y Subhash (2006)	Kaushik y col. (2010)
Humedad	7	4.65	ND	7	5.37	ND	7.7
Proteína	10	11.2	11.2	9.8	11.40	20.4	12
Grasa	3	1.9	5.6	2.5	3.73	4.34	2.7
Ceniza	11	6.3	ND	10.5	7.41	13.1	8.4
Carbohidratos	52	ND	53	52	61.9	35.2	ND
Fibra cruda	18	15.2	15	18.5	15.5	ND	ND

ND, No determinado

Fuente: Lemus-Mondaca y col., 2010

Además en las hojas de stevia se encuentran seis ácidos grasos, los cuales son: ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico, estos últimos dos considerados como ácidos grasos esenciales (Lemus-Mondaca y col., 2012).

De nueve a diecisiete aminoácidos han sido identificados en las hojas de stevia (Cuadro 2.2), por lo que éstas pueden ser utilizadas en productos que promuevan la salud (Lemus-Mondaca y col., 2012).

Lemus-Mondaca y col. (2012) señalan que la presencia de importantes productos secundarios vegetales en las hojas de stevia, tales como el ácido

oxálico y los taninos, contribuyen a su valor medicinal ya que le confieren actividad antioxidante y propiedades inmunológicas.

Cuadro 2.2. Composición de aminoácidos en hojas de *Stevia rebaudiana*.

Aminoácido esencial g 100 g⁻¹ m.s.		Aminoácido no esencial g 100 g⁻¹ m.s.	
Arginina^a	0.45	Aspartato	0.37
Lisina	0.70	Serina	0.46
Histidina	1.13	Glutamina	0.43
Fenilalanina	0.77	Prolina	0.17
Leucina	0.98	Glicina	0.25
Metionina	1.45	Alanina	0.56
Valina	0.64	Cistina ^b	0.40
Treonina	1.13	Tirosina ^b	1.08
Isoleucina	0.42		
Total	7.67	Total	3.72

^a No es considerado como aminoácido indispensable

^b Considerados indispensables bajo situaciones específicas

Fuente: Abou-Arab y col. (2010) en Lemus-Mondaca y col., (2012).

El interés en *S. rebaudiana* se ha enfocado en su poder edulcorante y bajo contenido calórico. Pero trabajos realizados en la planta sugieren que, aparte del dulzor, los esteviósidos y sus compuestos relacionados, los cuales incluyen rebaudiósido A, steviol e isosteviol, tienen beneficios terapéuticos, anti-hiperglicémicos, anti-hipertensión, anti-inflamatorios, anti-tumores, anti-diarrea, diurético y acciones inmunoreguladoras (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

2.5. Importancia económica.

La *S. rebaudiana* tiene importancia económica radica en que la planta contiene diterpenoides glucósidos ent-kaurenos y éstos son dulces, principalmente steviósido (110-270 veces más dulce que el azúcar) y rebaudiósido A (180-400 veces más dulce que el azúcar), este último de mayor valor comercial (Jarma y col., 2010).

Debido a su intensa dulzura y su alto poder edulcorante, los glucósidos de steviol han sido de gran interés científico y comercial, en la actualidad se usan

ampliamente en muchos países de todo el mundo en productos alimenticios y suplementos dietéticos (Brandle y Telmer, 2007).

En el año 2008, se estimó que la *Stevia* tuvo una representación económica de un mil trescientos millones de dólares y se espera que para el año 2015 alcance 8.2 millones de dólares (Instituto Boliviano de Comercio Exterior, 2011).

En el reporte del 2009 de la industria mundial de la *Stevia*, KnowGenix indica que la preferencia por sector industrial que emplea dicha planta es de 40% para bebidas, 28% para alimentos, 12% farmacéuticos, 12% lácteos y 8% otras aplicaciones.

Se estimó que en el año 2009 se cultivaron 21, 750 ha en Asia, 2, 220 ha en Sudamérica, 130 ha en América del Norte, 190 ha en África y Oceanía y 50 ha en Europa. Los principales productores de *Stevia* en ese mismo año fueron China (20, 000 ha), Paraguay (1, 700 ha), India (600 ha), Tailandia (350 ha), Taiwán (350 ha) e Indonesia (300 ha); además su cultivo fue introducido en Argentina, Colombia, Brasil, México, Canadá, Estados Unidos, España, Grecia, Japón, Sudáfrica, Kenia, Egipto y Australia (Ministerio de Industria y Comercio Paraguay, 2011).

2.6. Requerimientos del cultivo.

Ramírez (2011) sugiere las condiciones más favorables para el cultivo de *stevia* son las siguientes:

a) Precipitación. La exigencia de humedad de esta especie es alta y de manera continua. De ahí que la distribución natural de este cultivo se observe en zonas donde las precipitaciones medias anuales son altas (1,400 mm a 1,600 mm) y por lo regular uniformes entre 100 a 120 mm mensuales.

b) Temperatura. La *stevia* es una especie originaria de la zona subtropical, semi-húmeda con temperaturas extremas de - 6 a 43°C, con promedio de 24 °C, no obstante se reporta que prospera muy bien entre los 24 y 28°C.

c) Altitud. El rango óptimo de altura sobre el nivel del mar en el cual se adapta y desarrolla la Stevia está entre los 0 a los 600 msnm.

d) Humedad. La *S. rebaudiana* requiere un porcentaje de humedad relativa menor del 85%. Este factor influye directamente sobre la temperatura del aire y del suelo y sobre el contenido del vapor de agua en el ambiente; además es un factor determinante en la incidencia de enfermedades.

e) Luminosidad. Los fotoperiodos largos aumentan la longitud de los entrenudos, el área foliar el peso seco y aceleran la aparición de las hojas. La materia seca se reduce a la mitad con fotoperiodos de días cortos. El fotoperiodo crítico para el desarrollo de la stevia es de 13 horas, pero existe una gran variabilidad genética entre ecotipos.

2.7. Manejo del cultivo.

De acuerdo con Ramírez (2011), el manejo del cultivo de *S. rebaudiana* se muestra a continuación:

a) Suelo. Los suelos ideales son los areno-arcillosos, francos y franco-arenosos, con una proporción regular de humus. Se adapta bien a suelos con buen drenaje, no así en lugares con exceso de humedad. Prospera bien en suelos de pH ácido, pero crece bien entre 6.5 a 7.5, siempre que no sean salinos.

b) Fertilización. Se recomienda la siguiente fórmula para fertilizar la Stevia: 180 kg/ha de nitrógeno(N), 60 kg/ha de potasio (K) y 92 kg/ha de fósforo (P).

c) Riego. La stevia presenta una limitada profundidad y escaso radio de expansión alcanzado por el sistema radicular, por lo cual el riego es fundamental para el cultivo ya que esta no tolera largos periodos de sequía, es decir, exige que

el suelo tenga un adecuado nivel de humedad para asegurar el buen desarrollo de las plantas.

La necesidad hídrica del cultivo es de 5 mm diarios aplicados en intervalos de 3 días. El riego se debe suspender 15 días antes de la cosecha para no afectar la concentración de glucósidos en la hoja.

d) Trasplante. Se puede realizar el trasplante en cualquier época del año, siempre y cuando se cuente con un sistema de riego. Para asegurar el éxito del trasplante es recomendable iniciar las plantaciones, en los meses en que se inician las lluvias, ya que esto y la temperatura disminuyen la mortandad de los esquejes.

e) Densidad. En este cultivo las altas densidades, reducen el desarrollo de ramas laterales y merman el rendimiento de peso seco por planta, aumentando el número de plantas muertas en la cosecha causando dificultad en la producción de la misma, se recomienda las siguientes densidades: 25 X 25 cm y 30 X 30 cm en marco real.

Sin embargo se debe tomar en cuenta diversos factores como el clima, la humedad relativa, la luminosidad, la fertilidad del suelo, entre otros.

f) Cosecha. El número de cortes que se deben realizar depende de los períodos de floración. El lapso de tiempo entre cada cosecha oscila entre 50 y 60 días. La cosecha debe hacerse cuando se presente un máximo del 5% de botones florales, pues esto afecta la calidad del producto final. Se hace un corte parejo de todas las plantas, procurando que queden 2 o 3 pares de hojas.

g) Secado de hojas. Las ramas y hojas cortadas deben colocarse sobre una malla media sombra o plástico sin encimar, dejar al sol hasta el atardecer y en caso de que el secado no se complete se deben recoger y guardar bajo techo, al día siguiente sacar al sol hasta completar el secado. Una vez secas las hojas deben separarse de los tallos mediante una horquilla o con golpes con un palo.

h) Embolsado. En bolsas de plástico limpias se colocan las hojas secas y se colocan en un lugar seco procurando evitar hacer contacto con el suelo.

i) Rendimiento. En el primer año el rendimiento es de 1,200 kilogramos por hectárea de hoja seca, posteriormente puede mejorar de 1,500 a 2,000 en el segundo año y de 3,000 a 4,000 a partir del tercer año. Lemus-Mondaca y col., (2012) señalan que las hojas de *S. rebaudiana* presentan beneficios terapéuticos tales como prevención de cáncer, anti-hiperglucémicos, anti-hipertensivos, anti-inflamatorios, diuréticos, etc.

2.8. Metabolismo primario.

El conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de sustancias simples, o para degradar las complejas y obtener otras más simples se denomina metabolismo (Ávalos García y Pérez-Urria, 2009).

El metabolismo primario se encuentra presente en todos los seres vivos y en él se sintetizan los metabolitos primarios, dichos compuestos son muy abundantes en la naturaleza, son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta; se encuentran presentes en grandes cantidades, son de fácil extracción y su explotación es relativamente barata y conducen a la síntesis de los metabolitos secundarios. Entre ellos se encuentran aminoácidos proteicos, proteínas, carbohidratos (azúcares), lípidos, ácidos grasos, algunos ácidos carboxílicos, etc. (Petiard y Bariaud-Fontanel, 1987).

2.8.1. Edulcorantes.

Los edulcorantes, en su mayoría concentrados en las hojas, son sintetizados, al menos en los estados iniciales, usando la misma ruta del ácido giberélico a partir del mevalonato (Figura 2.2). Varios autores han indicado que la diferencia radica que en stevia, el kaureno, precursor de dichas hormonas, se convierte en steviol en el retículo endoplásmico.

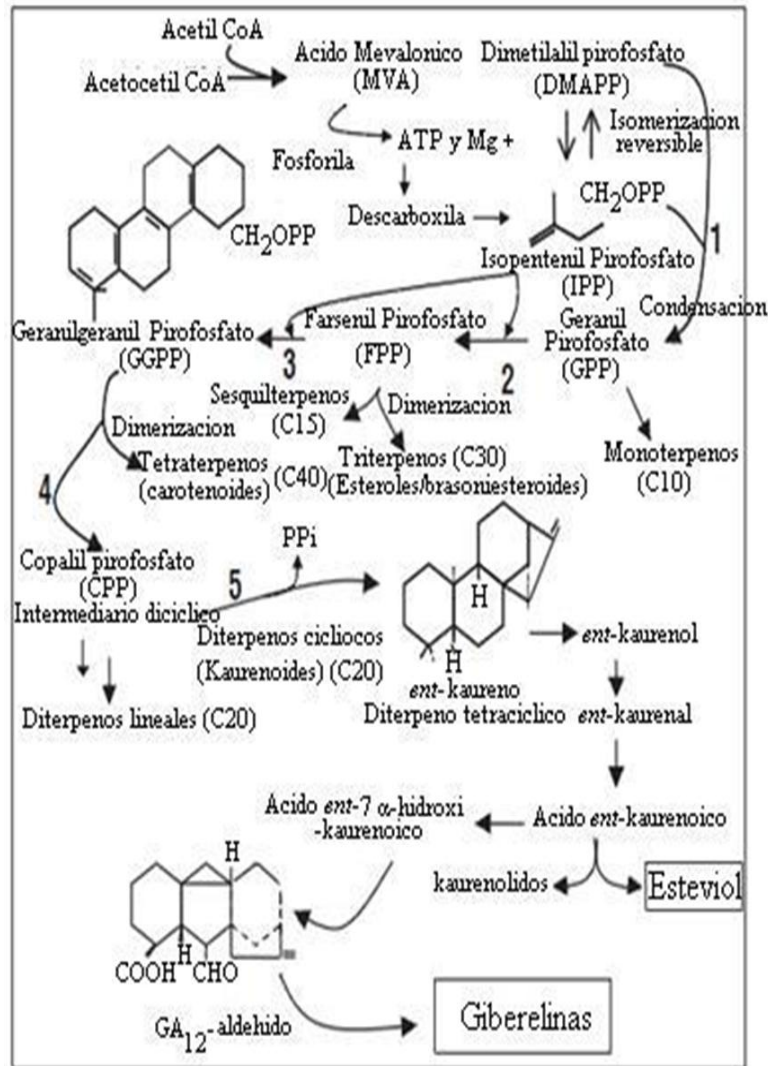


Figura 2.2. Síntesis de edulcorantes de stevia usando la ruta del ácido giberélico.

El estudio de las rutas metabólicas en stevia ha probado que los glucósidos de steviol son diterpenoides, los cuales comparten una ruta de biosíntesis similar a la formación de ácido giberélico, el primer paso en la ruta es la síntesis de aglicón de esteviol (Brandle y Telmer, 2007).

El edulcorante, cuyos dos glucósidos principales son el steviósido (110-270 veces más dulce que el azúcar) y rebaudiósido A (180-400 veces más dulce que el azúcar), este último de mayor valor comercial cuya

diferencia radica solamente en la presencia de una glucosa, es un polvo cristalino blanco; llamada una “molécula noble”, debido a que es 100% natural, no tiene calorías, las hojas se pueden utilizar en su estado natural y solo se requieren cantidades pequeñas (Jarma y col., 2010).

Entre los glucósidos dipéptenicos de la stevia, el steviósido es el componente principal, constituyendo cerca del 85% de los edulcorantes totales, y rebaudiósido A, en menor proporción es el componente más dulce (Jiménez y col., 2010).

2.8.2. Steviósido.

El steviósido es un edulcorante natural que no contiene calorías y un material médico complementario, el cual ha recibido mucha atención en tiempos recientes. Es el principal glucósido dulce en stevia, y ha sido reportado ser de 250 a 300 veces más dulce que la sacarosa (Crammer e Ikan, 1986). El contenido de steviósido de hojas secas en *S. rebaudiana* varía ampliamente, de 5-22% del peso seco en las hojas, dependiendo del cultivo así como las condiciones de crecimiento (Kim y Dubois, 1991). El steviósido también ha sido encontrado en las flores de stevia en bajas concentraciones [0.9% (w/w)] (Darise y col., 1983).

La estructura del steviósido ($C_{38}H_{60}O_{18}$) (Figura 2.3) consiste de un glucósido con un glicosilo y un residuo de sophorosyl unidos a un aglicono de steviol, el cual tiene un esqueleto cyclopentanonhydrophenanthrene.

El steviósido y los extractos de las hojas de *S. rebaudiana* están disponibles comercialmente y son usados en países como Estados Unidos, Europa, Japón y varios países de América del Sur como un edulcorante en una variedad de alimentos y bebidas, principalmente dirigidos a personas con diabetes. Aunque la popularidad de este edulcorante ha aumentado en los últimos años y está presente en diversos productos, la aceptabilidad es limitada debido a su sabor metálico y regusto amargo que presenta.

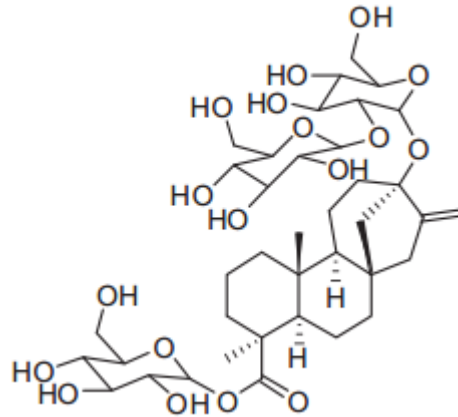


Figura 2.3. Estructura básica del steviósido, C₃₈H₆₀O₁₈.

2.9. Metabolismo secundario.

El metabolismo secundario se deriva del metabolismo primario pero su distribución en la naturaleza está más restringida, aunque es generalmente aceptado que este metabolismo está involucrado en la relación del organismo con su medio ambiente (Verpoorte, 2000).

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Como parte de la protección química, una estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios, en contra de herbívoros o con actividad antioxidante.

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no sólo tiene una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones como, el consumo por herbívoros, el ataque de microorganismos como hongos, virus y bacterias, la competencia por el espacio, la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico.

La síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos sólo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. Este aumento en los niveles de metabolitos

secundarios, es importante para la supervivencia de las plantas, ya que su síntesis se deriva del metabolismo primario y porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta.

Los metabolitos secundarios se dividen en nitrogenados y no nitrogenados. Los que contiene nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los no nitrogenados se dividen en terpenoides, flavonoides, poliacetilenos, policetidos y fenilpropanoides. Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato (Sepúlveda y col., 2004).

2.9.1. Fenoles.

Son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilo unido (s) a un anillo aromático. El fenol es la estructura sobre la cual se basa todo el grupo, siendo el benceno el anillo aromático (Figura 2.4) (Vermerris y Nicholson, 2006). Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se localizan en toda la planta y varían en concentración a lo largo del ciclo vegetativo.

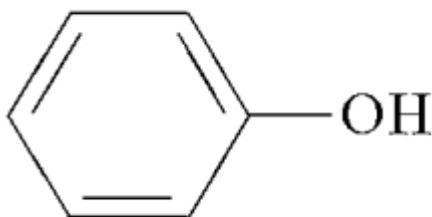


Figura 2.4. Estructura básica del fenol, C_6H_6O .

Los compuestos fenólicos se caracterizan por encontrarse en forma de ésteres o glucósidos y no como compuestos libres (Vermerris y Nicholson, 2006).

Los compuestos y funciones de los ácidos fenólicos han sido objeto de numerosos estudios agrícolas, químicos, biológicos y médicos. Estos

compuestos forman un grupo diverso y de gran difusión que incluye los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011). Los compuestos fenólicos en los vegetales tienen diferente estructura molecular y se caracterizan por anillos aromáticos hidroxilados (Mandal y col., 2010). En muchas plantas, estos compuestos se polimerizan en moléculas más grandes tales como las proantocianidinas y ligninas. Por otra parte, los ácidos fenólicos pueden surgir en las plantas alimenticias como glicósidos o ésteres con otros compuestos naturales como los esteroides, alcoholes, glucósidos y ácidos hidroxigrasos (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011).

Estos compuestos participan en diversas funciones tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente (Paladino y Zuritz, 2011).

2.9.2. Flavonoides.

Son derivados fenólicos sintetizados en grandes cantidades por las plantas a través de la vía de los poliprenoides, siendo la fenilalanina el compuesto de arranque. Son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2 fenil venzo y pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano (Paladino y Zuritz, 2011). Todos los flavonoides comparten el esqueleto estructural C₆-C₃-C₆ básico, que consta de dos anillos aromáticos C₆ (A y B) y un anillo heterocíclico (C) que contiene un átomo de oxígeno (Figura 2.5) (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011).

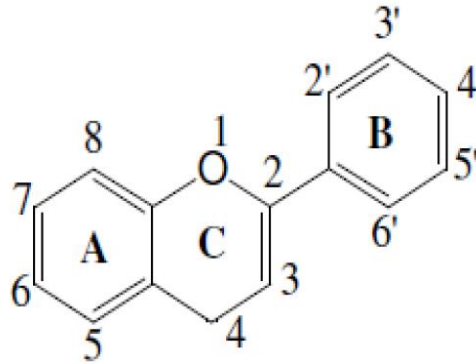


Figura 2.5. Estructura básica de los flavonoides.

Fuente: Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011.

La mayoría de los flavonoides están presentes en nuestra vida diaria (Manach y col., 2004). A la fecha, se han aislado e identificado alrededor de 6000 compuestos flavonoides y muchos son comunes en las plantas superiores (Tolonen y col., 2002; Austin y Noel, 2003). Los glucósidos son los compuestos flavonoides que a menudo se acumulan en las vacuolas de las células vegetales.

La importancia de los flavonoides radica en la respuesta antimicrobiana que tienen a una amplia gama de microorganismos y a su capacidad antioxidante (Ciocan y Bara, 2007). Figuran entre los principales metabolitos secundarios de las plantas y se encuentran distribuidos en todas las partes de las mismas: hojas, tallos, flores y frutos, ya sea como moléculas libres o como O-glucósidos (Cala, 2011).

2.10. Fertilización.

Para mantener un sano crecimiento de las plantas es necesario que éstas contengan un amplio rango de nutrientes, los cuales se absorben en forma de elementos nutritivos en ciertas proporciones. Es importante que los nutrientes se mantengan balanceados para satisfacer las necesidades individuales de los cultivos (Graetz, 2008).

En condiciones de baja fertilidad natural, el suelo no proporciona los nutrientes suficientes para lograr un rendimiento satisfactorio de los cultivos, por lo tanto es necesario suplementar las deficiencias de nutrientes propios del suelo suministrando fertilizantes (Graetz, 2008). Los fertilizantes son los elementos nutritivos que se suministran a las plantas para complementar las necesidades nutricionales para su crecimiento y de su desarrollo óptimo (López, 2006).

2.10.1. Solución nutritiva (SN) Steiner.

La solución nutritiva (SN) universal Steiner se basa en las relaciones mutuas entre aniones de nitrato, fosfato y sulfato (60:5:35) y la relación entre cationes de potasio, calcio y magnesio (35:45:20), así como la relación de concentración total de iones; cuando se respetan dichas relaciones se pueden generar diferentes fórmulas en las que se obtienen valores de presión osmótica y pH distintos a 0.7 atm. y 6.5 respectivamente, indicados en la SN.

Steiner (1984) señaló que dentro del rango de dichas relaciones mutuas es posible el adecuado desarrollo de cualquier cultivo. La SN Steiner se compone de 12, 1 y 7 meq L⁻¹ nitrato (NO₃⁻), fosfato (H₂PO₄⁻) y sulfato (SO₄²⁻) respectivamente, y de 7, 9 y 4 meq L⁻¹ de potasio (K⁺), calcio (Ca²⁺) y magnesio (Mg²⁺) respectivamente.

2.10.2. Conductividad eléctrica de la SN.

La CE de la SN es una medida de la concentración total de sales disueltas y es a menudo referida como la salinidad. Aunque es fácil de medir, la CE no entrega información acerca de las concentraciones de los nutrientes presentes en forma individual. No obstante, se utiliza ampliamente para seguir el estado de los nutrientes totales de los suelos o de la SN. Una baja CE indica un estado nutricional bajo, e indica que se debe aplicar más de la disolución concentrada. Por lo contrario, una salinidad alta podría deberse a altos niveles de nutrientes (Urrestarazu, 2004).

La CE de la SN es función directamente proporcional de la concentración total de solutos (CTS). La CTS, depende de la concentración de iones en el agua y de las sales que se agregan a la SN (Alcántar y Trejo-Téllez, 2007). Existen relaciones empíricas mediante las cuales se calcula la concentración total de sales. La más utilizada es: $CTS = 640 \cdot CE$ (CE en $dS\ m^{-1}$ a $25\ ^\circ C$) en $mg\ L^{-1}$.

2.11. La SN en la producción de stevia.

La nutrición de las plantas y las condiciones climáticas juegan un papel importante en el crecimiento y metabolitos secundarios de Stevia, sin embargo, la dosis nutricional está fuertemente regido por las propiedades del suelo y las condiciones climáticas de la región de cultivo (Pal y col., 2015).

(Das y col., 2007) explican que se ha reportado al steviósido como el principal constituyente de la Stevia y que éste es altamente dependiente de las prácticas de cultivo, así como de las tecnologías de cultivo modernas. De acuerdo con Zubiarte (2007), la stevia no es muy exigente en macro y micronutrientes, y recomienda que los suelos sean abonados con materia orgánica para evitar el uso de fertilizantes sintéticos. Sin embargo, al ser un cultivo anual sus requerimientos nutricionales son moderados (Brandle y col., 1998).

Patil (2010) evaluó 4 tratamientos en plantas de stevia, los cuales fueron: tratamiento 1: NPK (18:18:10, 3 g/planta); tratamiento 2: superfosfato + PSB (bacteria fósforo solubilizantes) (2:1, 4 g/planta); tratamiento 3: NPK + vermicomposta (1:3, 5 g/planta) y tratamiento 4: vermicomposta (7 g/planta), reportando que el mejor tratamiento en la altura, área foliar, clorofila, contenido de proteína y carbohidratos fue con la combinación de fertilizantes químicos (NPK) y vermicomposta.

Jarma y col. (2012) determinaron el efecto de las deficiencias nutricionales de N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Cu y Zn sobre la concentración de glucósidos totales de la hoja de stevia y, en particular, del rebaudiósido A (RebA), para lo cual se evaluaron 11 tratamientos (incluido el testigo) denominados como sigue: T1 (testigo experimental TE), T2 (-N), T3 (-K), T4 (-Ca), T5 (-Mg), T6 (-P), T7 (-S), T8

(-Fe), T9 (-B), T10 (-Cu), T11 (-Zn). Como solución nutritiva, se usó la solución madre de Johnson, adaptada por De Lima y Malavolta, en 1997. Encontraron que para la cantidad de glucósidos no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) cuando se indujeron las deficiencias nutricionales, pero la concentración del rebaudiósido A (RebA) se redujo significativamente ($p \leq 0.05$) respecto al TE, cuando se indujeron deficiencias de P, S, K y Cu, pero que las deficiencias de N, Ca, Mg, Fe, B y Zn, al parecer, no causan decrementos importantes en este glucósido.

Ma y Shi (2011) evaluaron 5 niveles de potasio (0, 60, 90, 120 y 150 kg K_2O/ha) y determinaron el contenido de clorofila, la actividad radicular, la actividad NR, la actividad de la invertasa, la actividad SOD (enzima antioxidativa), el contenido de MDA (malondialdehído) de la stevia rebaudiana. Encontraron que la fertilización con potasio aumentó la tasa fotosintética, las actividades de nitrato reductasa, actividad invertasa, actividad radicular, resistencia al estrés y contenido de MDA, especialmente bajo la cantidad adecuada de potasio (120 kg de K_2O/ha). Se sugiere que el potasio promueve el estado de la planta y provoca peroxidación lipídica.

Pal y col., (2015) evaluaron 18 tratamientos para determinar el efecto de la interacción de la ecología del cultivo y la nutrición de las plantas en el crecimiento y metabolitos secundarios de stevia; los tratamientos consistieron en la combinación de tres niveles de N: ($N_1=30 \text{ kg ha}^{-1}$, $N_2=60 \text{ kg ha}^{-1}$ y $N_3=90 \text{ kg ha}^{-1}$), dos niveles de P: ($P_1=20 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ y $P_2=40 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$) y tres niveles de K: ($K_1=20 \text{ kg K}_2\text{O ha}^{-1}$, $K_2=40 \text{ kg K}_2\text{O ha}^{-1}$ y $K_3=60 \text{ kg K}_2\text{O ha}^{-1}$), los cuales fueron evaluados en tres sitios experimentales (seleccionados por la variabilidad de sus condiciones agroclimáticas y las características del suelo): CSIR-Institute of Himalayan Bioresource Technology (CSIR-IHBT), Palampur; Regional Horticultural Research Station (RHRS), Jachh and Agronomy research farm of Punjab Agricultural University (PAU), Ludhiana.

Se evaluaron algunos aspectos morfológicos de la planta como número de ramas, índice de área foliar, peso específico de la hoja, peso seco de la hoja y del tallo, índice de cosecha; también se analizaron el contenido de clorofila de en la hoja y la acumulación de metabolitos secundarios en la misma y los glucósidos de

steviol. Dentro de los principales resultados encontraron que, por la técnica de PCA (análisis de componentes principales), que las aplicaciones de 90 kg N, 40 kg P₂O₅ y 40 kg K₂O ha⁻¹ son las mejores condiciones nutricionales en términos de rendimiento de hoja seca para CSIR-IHBT y RHRS. La variabilidad espacial también ejerció un efecto considerable en el rendimiento de la hoja y el contenido de steviósido en hojas. De las tres localidades, CSIR-IHBT fue encontrado el más adecuado para el rendimiento de hoja seca y la acumulación de metabolitos secundarios en la hoja.

Salgado (2013) evaluó los efectos de cuatro concentraciones de nitratos (NO₃⁻: 12, 9, 6 y 3 meq L⁻¹) con cuatro repeticiones cada una sobre la producción de biomasa, la concentración foliar y requerimiento de nitrógeno (N) en plantas de stevia en hidroponía. Las variables evaluadas fueron: número de tallos, altura de la planta, diámetro del tallo, peso fresco y seco de tallos y hojas, área foliar, lectura SPAD y concentración de N en la planta, en hojas recientemente maduras y en el total de hojas. Encontró que el tratamiento con 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻ originó las mejores respuestas en las variables evaluadas; con este se logró la mayor altura de la planta a los 75 ddt y más número de tallos en los tres muestreos realizados; se produjo el mayor peso fresco y seco (total, de hojas y de tallo) y área foliar a los 30 y 60 ddt. Una lectura SPAD de 40 se asoció a la mayor acumulación de peso seco de hoja a los 30 ddt, a los 60 ddt fue de 54, y a los 75 ddt fue de 57; la concentración de N en hojas recientemente maduras cuando la planta alcanzó mayor peso seco total fue de 3.4% de N a los 30 ddt, 3.5% a los 60 ddt y 3.0% a los 75 ddt.

III. OBJETIVOS E HIPOTESIS

3.1. Objetivo General.

Evaluar el contenido de steviósido en hojas y la fenología de *Stevia rebaudiana*, con cuatro diferentes concentraciones de solución nutritiva Steiner para determinar el mejor nivel de nutrición mineral.

3.2. Objetivos Específicos.

1. Determinar cuál concentración de nutrimentos de la solución universal de Steiner incrementa el contenido de esteviósidos en la hoja de *Stevia rebaudiana*.
2. Evaluar el efecto de las cuatro concentraciones de la solución nutritiva Steiner en la fenología y rendimiento del cultivo de *Stevia rebaudiana*.

3.3. Hipótesis.

La concentración de la solución nutritiva de Steiner afecta el contenido de steviósidos en *Stevia rebaudiana* e influye en su fenología y rendimiento.

IV. METODOLOGIA

4.1 Descripción del área de estudio.

El experimento se desarrolló en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala. El poblado de Amazcala pertenece al municipio El Marqués, Qro. (Figura 4.1) el cual se localiza en el sector Suroeste del estado, entre los 20° 31' y 20° 58' de latitud Norte. Su longitud se encuentra entre los 100° 09' y los 100° 24' del Oeste, a 1850 m sobre el nivel del mar. Colinda al Oeste con el municipio de Querétaro, al Norte con el estado de Guanajuato, al Este con el municipio de Colón y al Sur con los municipios de Huimilpan y Pedro Escobedo. La temperatura media oscila entre 18 y 24 °C, con un clima predominante subtropical, templado-semiseco (INEGI, 2005).



Figura 4.1. Ubicación del lugar donde se llevo a cabo el experimento.

4.2. Localización del proyecto.

El experimento se llevó a cabo en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala, con una elevación de 1,850 msnm. La investigación se desarrolló en un invernadero de 528 m² (9.6x55) tipo gótico, con cubierta plástica de polietileno de 800 galgas de espesor en el techo y en las paredes recubrimiento de placa policarbonato transparente, con ventilación cenital (Figura 4.2).



Figura 4.2. Invernadero donde se llevo a cabo el proyecto.

4.3. Diseño experimental.

Para la presente investigación se estableció un diseño completamente al azar con tres repeticiones de la unidad experimental (seis plantas), contando con cuatro tratamientos (Cuadro 4.1) que fueron los niveles de concentración de la solución nutritiva Steiner (100, 75, 50 y 25%) (Cuadro 4.2), teniendo 72 plantas más seis del testigo, lo que dio un total de 78 plantas, las cuales quedaron acomodadas dentro del invernadero como se muestra en la Figura 4.3.

Cuadro 4.1. Tratamientos ensayados para evaluar el efecto de la concentración de la Solución Nutritiva de Steiner (1984) en la producción de *S. rebaudiana*.

Tratamientos	SN Steiner (%)	CE (dS m ⁻¹)	Repeticiones
1	100	2.50	3
2	75	1.88	3
3	50	1.58	3
4	25	1.04	3

SN = Solución Nutritiva

CE = Conductividad Eléctrica

Cuadro 4.2. Distribución de tratamientos dentro del invernadero.

T1R2	T3R3	T4R2
T3R1	T2R1	T2R3
T4R3	T4R1	T2R2
T1R3	T3R2	T1R1

T = Tratamiento R = Repetición



Figura 4.3. Distribución de las plantas dentro del invernadero.

4.4. Implementación de cultivo.

4.4.1. Material vegetal.

El material vegetal se obtuvo de estacas de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II provenientes de la agroindustria STEVIA MAYA. Al momento de su llegada, las plantas tenían aproximadamente 10 cm de altura (Figura 4.4).



Figura 4.4. Plantas de stevia de 10 cm de altura.

4.4.2. Cuidado de la plántula.

Un manejo eficiente de plántula depende de que se puedan mantener las condiciones óptimas de humedad, oxígeno, temperatura y luminosidad en la etapa de desarrollo de las mismas.

Como primer paso dentro del cuidado de las plántulas, éstas se procedieron a pasar a charolas de 128 cavidades en las cuales se les agregó una cantidad suficiente de peat moss para rellenar la cavidad. Después se pusieron las plantas en condiciones óptimas dentro de la cámara de germinación. Se regaron a demanda sólo con agua.

También se monitoreo la sanidad de la planta, previniendo las plagas y enfermedades evitando su incidencia mediante las buenas prácticas de manejo y de ser necesario, aplicar productos preventivos, preferentemente biológicos u orgánicos.

4.4.3. Acondicionamiento del sustrato.

Se utilizó fibra de coco como sustrato, el cual se puso en macetas color negro de seis pulgadas; después de que se llenaron las macetas se realizó un

lavado del sustrato para quitar las posibles sales que la fibra de coco pudiera contener.

4.4.4. Preparación de la solución nutritiva (SN).

Steiner (1984) elaboró una solución nutritiva universal, que se distingue por sus relaciones mutuas entre aniones y cationes, expresadas en por ciento del total de meq L⁻¹. Este autor indica que el uso de su SN demanda únicamente que se determine la presión osmótica requerida para un cultivo en particular, en una cierta época del año. Las relaciones mutuas entre los iones en porcentaje del total de meq L⁻¹ es de 60:5:35 para NO₃⁻: H₂PO₄⁻: SO₄²⁻ y 35:45:20 para K⁺: Ca²⁺: Mg²⁺. Para la preparación de la SN Steiner, se realizaron cálculos para aportar la cantidad necesaria de cada elemento (Figura 4.5), teniendo en cuenta el aporte que nos brinda el agua usada en el riego.



Figura 4.5. Cálculo de la SN Steiner.

La concentración de nutrientes en mg L⁻¹ o en partes por millón (ppm) se expresa en el Cuadro 4.3

Cuadro 4.3. Concentración de nutrimentos en la solución nutritiva Steiner (1984), aporte de nutrientes por el agua empleada, cantidad aplicada y cantidad realmente utilizada en la SN, en todos los casos, expresada en mg L⁻¹ o en ppm.

Elemento	SN Steiner	Aporte del agua	Por aplicar	Aplicado
Nitrógeno (N)	168	1.9	166.1	166.1
Fósforo (P)	31	0	31	31
Potasio (K)	273	2.73	270.27	270.27
Calcio (Ca)	180	11.8	168.2	168.2
Magnesio (Mg)	48	0.24	47.62	47.7
Azufre (S)	110	3	107	106.6
Fierro (Fe)	3	0	3	3
Manganeso (Mn)	1.97	0	1.97	1.97
Boro (B)	0.44	0	0.44	0.44
Zinc (Zn)	0.11	0	0.11	0.11
Cobre (Cu)	0.02	0	0.02	0.02

Teniendo la concentración del 100% de la SN, se realizó el cálculo para los otros tratamientos (75, 50 y 25%) y se prepararon en distintos contenedores (Figura 4.6). Se pesó la cantidad de fertilizantes necesaria para obtener el aporte de cada elemento nutritivo de la solución Steiner (Figura 4.7), para el pesaje se utilizó una balanza granataria marca OHAUS, con una precisión de 0.1 g.



Figura 4.6. Preparación de la SN Steiner a las diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25%).



Figura 4.7. Pesaje de fertilizantes.

La cantidad de fertilizantes aplicada por cada 1000 litros de agua para cada tratamiento (100, 75, 50, y 25% de concentración) se muestra en el Cuadro 4.4.

Cuadro 4.4. Composición química en g/m^3 (ppm) de los diferentes niveles de la solución nutritiva Steiner.

Fertilizante (fórmula química)	T1 100%	T2 75%	T3 50%	T4 25%
Ca (NO ₃) ₂	848.064	636.048	424.032	212.016
MgSO ₄ + 7H ₂ O	430.163	322.622	215.081	107.541
KNO ₃	281.161	210.871	140.581	70.290
KH ₂ PO ₄	125.916	94.437	62.958	31.479
K ₂ SO ₄	554.878	416.158	277.439	138.719
Fe-EDTA 13.2%	22.725	17.043	11.362	5.681
Mn-EDTA 13%	15.153	11.364	7.576	3.788
Zn-EDTA 14%	0.785	0.588	0.392	0.196
Cu-EDTA 14	0.142	0.106	0.071	0.035
H ₃ BO ₃ 17.5%	2.514	1.885	1.257	0.628
C.E. (dS m ⁻¹)	2.5	1.88	1.58	1.04
pH	5.94	6.06	5.83	5.98

T = Tratamiento

Según Alcántar y col., (2007), la presión osmótica (PO) de la solución nutritiva se puede calcular con base en la CE utilizando la siguiente relación empírica: $\text{PO (bares)} = 0.36 \text{ CE (CE en dS m}^{-1}\text{)}$, aunque comúnmente la PO se

expresa en Megapascales (MPa). Para realizar la conversión se multiplica por (0.1). Las PO's iniciales de cada tratamiento se muestran en el Cuadro 4.5

Cuadro 4.5. Conductividad eléctrica (CE) y presión osmótica (PO) de las cuatro concentraciones de la solución nutritiva de Steiner (1984) evaluadas en el presente trabajo.

Tratamiento	SN Steiner (%)	CE (dS m ⁻¹)	PO (bar)	PO (MPa)
1	100	2.50	0.9000	0.09000
2	75	1.88	0.6768	0.06768
3	50	1.58	0.5688	0.05688
4	25	1.04	0.3744	0.03744

4.5. Trasplante de *S. rebaudiana* a macetas.

El establecimiento de las plantas de *Stevia* se realizó cuando la planta contaba con una altura promedio de 15 cm; esto se llevó a cabo el día 7 de diciembre. Se recomienda realizar el trasplante por la tarde para evitar que las plantas sufran estrés durante el día (donde existen condiciones de alta radiación solar).

Se extrajo cuidadosamente la plántula de la charola de germinación y se hicieron agujeros en el sustrato (fibra de coco) de las macetas, posteriormente se introdujeron las plantas en las macetas y se regaron con agua para su etapa de adaptación (Figura 4.8).



Figura 4.8. Trasplante de stevia.

4.6. Riego de las plantas con la SN Steiner.

Las plantas se regaron de forma manual aplicando 500 ml. de la SN correspondiente a cada tratamiento durante 68 días después del trasplante (Figura 4.9), los riegos se hicieron dos veces por semana y se hicieron por la mañana para evitar daños por exceso de temperatura en horas más tarde.

Los riegos se hicieron de tal forma que la SN no tocara las hojas de las plantas, evitando así daños por sol o salinidad y que pudiera tener un efecto sobre la concentración de azúcares.



Figura 4.9. Riego de plantas de stevia.

4.7. Monitoreo de temperatura, humedad relativa y radiación.

Como variable complementaria del sistema se monitoreó la temperatura (°C) y humedad relativa (%) del clima dentro del invernadero. Se utilizó un sensor electrónico WatchDog Serie 400 (Figura 4.10). El sensor es un registrador de datos característicos de cuatro canales con una capacidad de 15,000 mediciones (3,750 por canal), el cual cuenta con sensor plug-in para descargar a una computadora para su análisis. Las mediciones se tomaron a intervalos de 10 minutos durante 30 días.



Figura 4.10. Sensor electrónico WatchDog

4.8. Variables medidas.

4.8.1. Altura de la planta.

Se evaluó el promedio de la altura de la planta usando una cinta métrica. Se midió la planta desde la base del tallo al inicio del sustrato hasta la hoja más alta (Figura 4.11). Todas las mediciones se realizaron a las 3:00 p.m. para que no hubiera diferencia por la hora de medición.



Figura 4.11. Medición de altura de las plantas.

4.8.2. Peso fresco foliar.

Esta medición se llevó a cabo en el laboratorio del Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, a los 89 días después del trasplante (ddt) que fue el momento de la cosecha. Primeramente se tomaron tres plantas de *S. rebaudiana* por cada repetición sumando un total de nueve muestras por tratamiento y se separaron las hojas de los tallos (Figura 4.12), las cuales fueron pesadas individualmente con una balanza analítica marca Precisa modelo XB 220A, con capacidad máxima de 220 g y una precisión de 0.001 g (Figura 4.13).



Figura 4.12. Hojas de las plantas de stevia.



Figura 4.13. Pesaje de las hojas frescas de stevia.

4.8.3. Peso seco foliar.

Se determinó el peso seco en el laboratorio del Campus Amazcala. Se pesaron todas las hojas secas de cada muestra, las cuales fueron pesadas con una balanza analítica marca Precisa, con capacidad máxima de 220 g y 0.001 g de precisión. Para el secado de las hojas, éstas se introdujeron en bolsas de papel rotuladas y fueron depositadas en una estufa marca con circulación forzada de aire durante 24 hrs. a 60 °C.

4.8.4. Índice de clorofila en hojas.

Los valores SPAD se basan en el principio de que parte de la luz que llega a la hoja es absorbida por la clorofila y el resto que se refleja entra en contacto con la celda detectora del SPAD-502 y es convertida en una señal eléctrica. La cantidad de luz captada por la celda es inversamente proporcional a la cantidad de luz utilizada por la clorofila, la señal es procesada, y la absorbancia es cuantificada en valores dimensionales que van de 0 a 199, por lo que las unidades

SPAD serán siempre las mismas de acuerdo con el tono verde de las hojas (Krugh, y col., 1994).

Por lo que a partir de unidades "SPAD" se puede estimar los contenidos de clorofila y nitrógeno total de las plantas (Rodríguez y col., 1998), en este sentido, se efectuaron lecturas indirectas de clorofila en las 78 plantas de muestreo, las cuales se realizaron de manera semanal al mediodía, ya que es cuando la radiación solar incide en las plantas de manera perpendicular y hay un menor sombreado.

Se utilizó un equipo SPAD 502 Chlorophyll meter Minolta (Figura 4.14) por medio de absorbencia de luz de la hoja a 650nm y 940nm, en una escala de 0.0 a 99.9. El método es de tipo no destructivo, ya que no provoca daños en la hoja, además es rápido y sencillo.



Figura 4.14. Medidor SPAD de clorofila.

4.8.5. Concentración de steviósido.

Se evaluó la concentración de esteviósido obtenido de las muestras de las diferentes unidades experimentales utilizando la técnica de Vázquez-Baxcajay y col., 2014, la cual se muestra en la Figura 4.15.

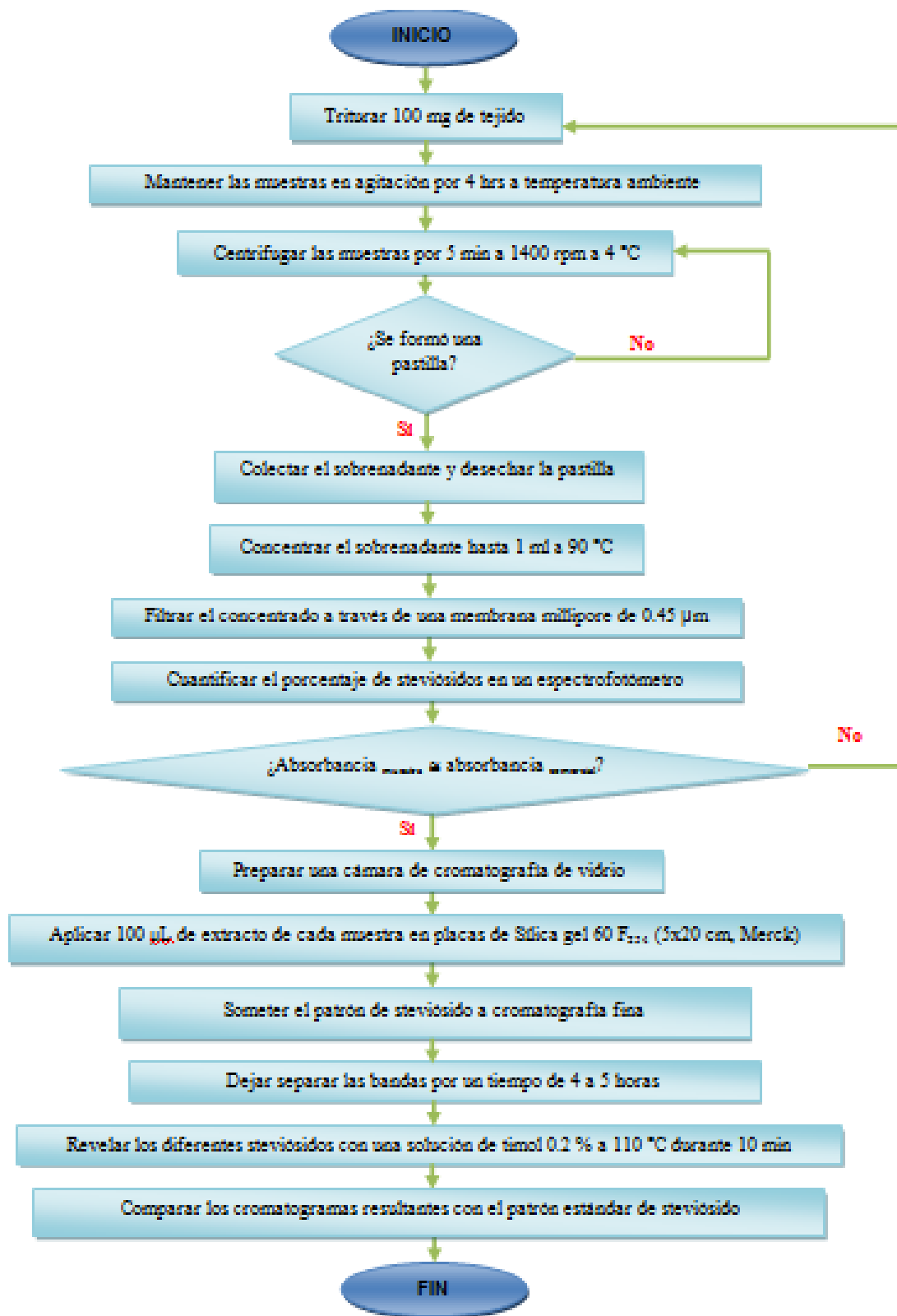


Figura 4.15. Diagrama de flujo para la extracción de steviósido.

4.9. Cuantificación de compuestos antioxidantes.

4.9.1. Extracción metanólica.

La extracción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cardador-Martínez y col., (2002); se colocaron 200 mg de muestra en un matraz de 50 mL y se adicionaron 10 mL de metanol. Se cubrió la muestra con papel aluminio y se agitó durante 24 hrs. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min, desechando la pastilla formada, quedando el sobrenadante.

4.9.2. Determinación de flavonoides.

La determinación de los flavonoides totales se realizó siguiendo la metodología descrita por Oomah y col., (2005). Se realizó una curva de calibración para la cual se colocaron 50 µl de cada una de las concentraciones (50, 25, 10, 2.5 y 1 µg/mL de rutina) por triplicado. Se adicionaron 180 µl de agua destilada, y se incorporaron 20 µl de solución 2-aminoetildifenil borato 1%. El blanco se realizó con 230 µl de metanol y 20 µl de 2-aminoetildifenilborato 1%, se midió en espectrofotómetro MULTISKAN ASCENT a una absorbancia de 404 nm. Para la cuantificación de las muestras se tomaron 50 µl del extracto metanólico de la muestra (sobrenadante), se adicionaron 180 µl de metanol, se adicionaron 20 µl de solución 2-aminoetildifenilborato al 1%, se midió la absorbancia de 404 nm en espectrofotómetro MULTISKAN ASCENT. Los resultados son interpolados a la curva del estándar y fueron expresados como mg equivalentes de rutina por gramos de muestra fresca. Las pruebas se realizaron por triplicado al igual que el blanco.

4.9.3. Determinación de fenoles totales.

Se realizó una curva de calibración para la cual se prepararon las siguientes soluciones. La solución de Na₂CO₃ al 20%, se pesaron 5 g de carbonato de sodio y se disolvió en 20 mL de agua destilada, se sónico hasta disolver completamente y se aforó a 25 mL. Para la solución de ácido gálico 0.1 mg/mL, se tomaron 10 mg de ácido gálico y se aforo a 10 mL con agua destilada.

De esta solución se tomó 1 mL y se aforo con 10 mL de agua destilada. Se rotularon los tubos y se le adiciono a cada tubo la cantidad necesaria de la sustancia de acuerdo al Cuadro 4.6 y se agito en vortex, se dejaron reposar 2 horas en la oscuridad para posteriormente leer en un espectrofotómetro marca Molecular Devices modelo Spectra Max 190 a 760nm.

Cuadro 4.6. Distribución de compuestos para curva de calibración.

Tubo	Solución ácido gálico (ul)	Agua destilada (ul)	Folin	Na₂CO₃
0	0	500	250	1250
1	20	480	250	1250
2	40	460	250	1250
3	60	440	250	1250
4	80	420	250	1250
5	100	400	250	1250
6	120	380	250	1250
7	140	360	250	1250
8	160	340	250	1250

Para la cuantificación de fenoles totales se tomaron 40 µL del extracto metanólico y se adicionaron 460 µL de agua destilada, 250 µL de folin y 1250 µL de Na₂CO₃. Se dejo reposar por 2 horas en oscuridad para posteriormente hacer la lectura en espectrofotómetro marca Molecular Devices modelo Spectra Max 190 a 760nm. Las lecturas se hicieron por triplicado.

4.10. Análisis estadístico.

Los datos adquiridos de las variables medidas se vaciaron a un programa estadístico Origin Pro versión 8.0. Para el análisis se utilizó estadística descriptiva, presentando los resultados como promedios y una desviación estándar. Para las comparaciones entre tratamientos se utilizo análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, con una prueba de pos hoc, prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Altura de la planta de stevia.

Para la variable altura de la planta el análisis estadístico no mostró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para los tratamientos T1, T2, T3 y T4 con respecto al testigo, en ninguno de los 4 muestreos realizados (47, 54, 61 y 68 ddt). Sin embargo, el mejor tratamiento para altura de la planta a los 47 ddt fue el de 75% de concentración, y el tratamiento del 100% resultó mejor para los 54, 61 y 68 ddt, como se puede ver en el Cuadro 5.1 y la Figura 5.1.

Cuadro 5.1. Análisis estadístico de la comparación de medias de la altura de la planta (en cm) a los 47, 54, 61 y 68 ddt.

Tratamiento	ddt			
	47	54	61	68
100%	16.07±0.393 a	17.04±0.436 a	17.44±0.405 a	18.58±0.414 a
75%	16.50±0.604 a	16.69±0.733 a	17.21±0.686 a	18.45±0.785 a
50%	16.03±0.370 a	16.50±0.386 a	16.76±0.424 a	17.89±0.434 a
25%	16.01±0.490 a	16.33±0.550 a	17.32±0.553 a	18.58±0.634 a
0%	12.50±0.591 b	12.83±0.976 b	13.53±0.939 b	14.25±1.143 b

Se muestran los resultados obtenidos de las mediciones de altura de la planta como la media \pm el error. Letras distintas en la misma columna y muestreo indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); ddt: días después de trasplante.

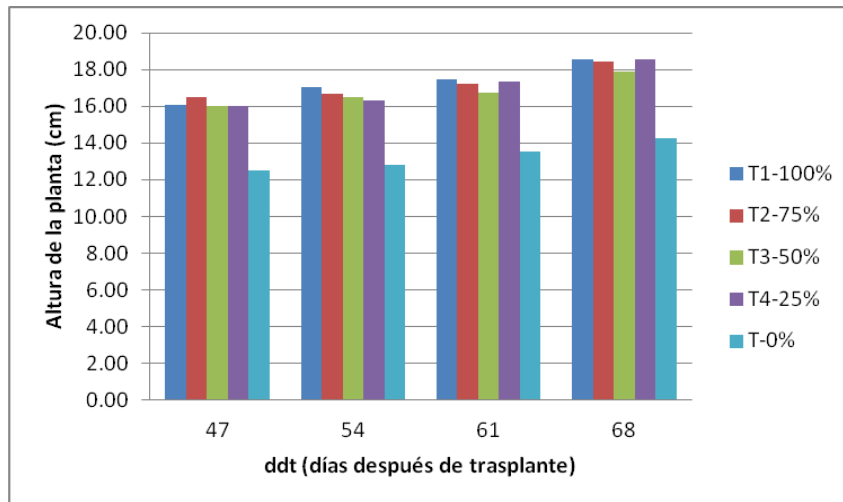


Figura 5.1. Comparación de medias de las diferentes concentraciones de SN Steiner para los muestreos a los 47, 54, 61 y 68 ddt en plantas de stevia para la variable altura de la planta.

En la figura 5.2 se puede observar que para todos los tratamientos (0, 25, 50, 75 y 100% de concentración), en los diferentes días de muestreo se tiene una tendencia creciente, es decir, conforme fue aumentando el día de muestreo, para cada tratamiento, la altura de la planta fue aumentando, lo cual coincide con la etapa fenológica de la planta, entre más edad tenía la planta mayor altura se observó.

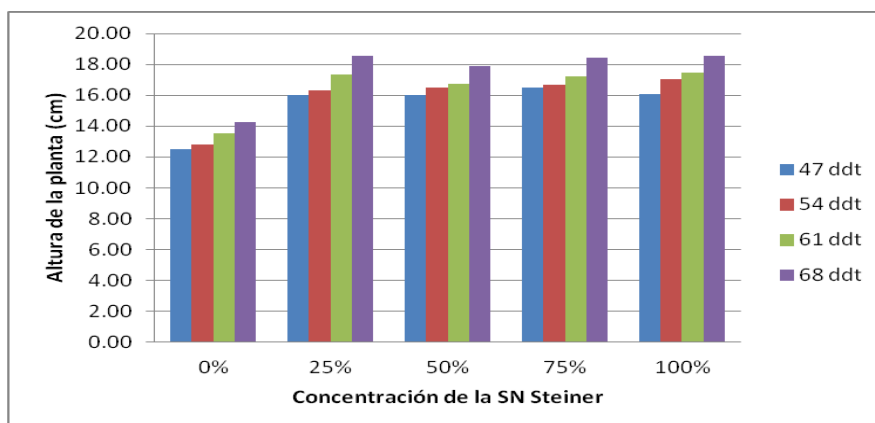


Figura 5.2. Comparación de las medias de la altura de plantas de stevia entre los diferentes tratamientos para los diferentes días de muestreo (47, 54, 61 y 68 ddt).

En la figura 5.3 se pueden observar los diferentes tratamientos para el día 68 ddt, se puede observar que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, sin embargo todos los tratamientos superaron al testigo, siendo mejores los tratamientos de 100 y 25%, ya que mostraron mayor altura que el resto.

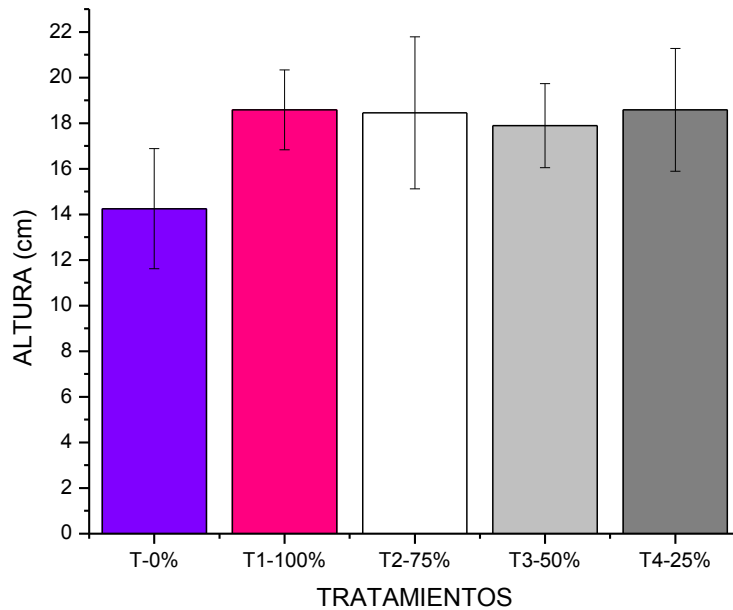


Figura 5.3. Comparación de las medias de los diferentes tratamientos para la variable altura en el día 68 después de trasplante.

5.2. Peso fresco foliar de la planta a los 68 ddt.

Para el experimento de peso fresco foliar hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para el tratamiento del 25% respecto a lo demás tratamientos para el muestreo del 68 ddt, también el testigo mostró diferencia significativa respecto a los tratamientos de 50, 75 y 100% para la misma fecha de muestreo. En el cuadro 5.2 y la figura 5.4 se puede observar que el mejor tratamiento para el peso fresco foliar fue el de 50%; sin embargo, todos los tratamientos mostraron mayor peso fresco foliar respecto al testigo.

Cuadro 5.2. Análisis estadístico de la comparación del peso fresco foliar (en g) a los 68 ddt.

Parámetro	TRATAMIENTOS				
	T1-100%	T2-75%	T3-50%	T4-25%	T0-0%
Min.	15.484	18.310	18.327	12.718	12.560
Max.	25.905	25.510	25.510	18.135	19.983
Media±SEM	21.06±0.968 a	21.41±0.653 a	21.70±0.705 a	16.08±0.542 b	15.71±1.566 b
Desv. Std.	3.247	2.191	2.365	1.819	3.835
C.V.	15.417	10.233	10.903	11.316	24.405

Se muestran los resultados obtenidos de los pesajes de las hojas frescas de stevia; se muestran los mínimos (Min.) y máximos (Max.), la desviación estándar (Desv. Std.), el coeficiente de variación (C.V.) y la media ± el error (Media±SEM). Letras distintas en el mismo renglón de la media indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

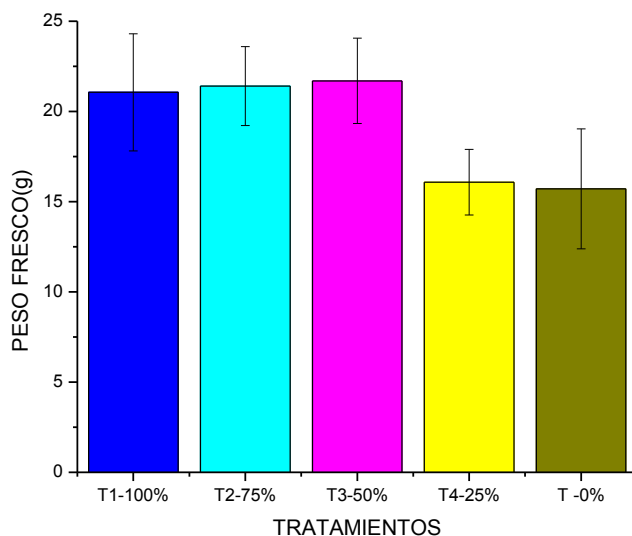


Figura 5.4. Comparación de las medias para la variable peso fresco foliar de los diferentes tratamientos en el día 68 después de trasplante.

5.3. Peso seco foliar de la planta a los 69 ddt.

En el experimento de la variable peso seco foliar hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para el tratamiento del 25% respecto a lo demás tratamientos para el

muestreo del 68 ddt, además el testigo mostró diferencia significativa respecto a todos los tratamientos (25, 50, 75 y 100%) para la misma fecha de muestreo. El cuadro 5.3 y la figura 5.5 muestran que el tratamiento del 50% tiene mejores resultados para el peso seco, seguido del tratamiento del 75%. Todos los tratamientos superan al testigo, es decir, todos los tratamientos resultaron mejores para esta variable que el testigo. Se puede observar que se tiene la misma tendencia que en la variable peso fresco foliar.

Cuadro 5.3. Análisis estadístico de la comparación del peso seco foliar (en g).

Parámetro	TRATAMIENTOS				
	T1-100%	T2-75%	T3-50%	T4-25%	T0-0%
Min.	2.736	3.645	3.708	2.511	1.976
Max.	4.889	4.286	4.660	3.851	2.059
Media±SEM	3.88±0.210 a	4.09±0.066 a	4.17±0.120 a	3.21±0.154 b	2.02±0.024 c
Desv. Std.	0.630	0.199	0.360	0.461	0.041
C.V.	16.249	4.851	8.625	14.390	2.056

Se muestran los resultados obtenidos de los pesajes de las hojas secas de stevia; se muestran los mínimos (Min.) y máximos (Max.), la desviación estándar (Desv. Std.), el coeficiente de variación (C.V.) y la media ± el error (Media±SEM). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

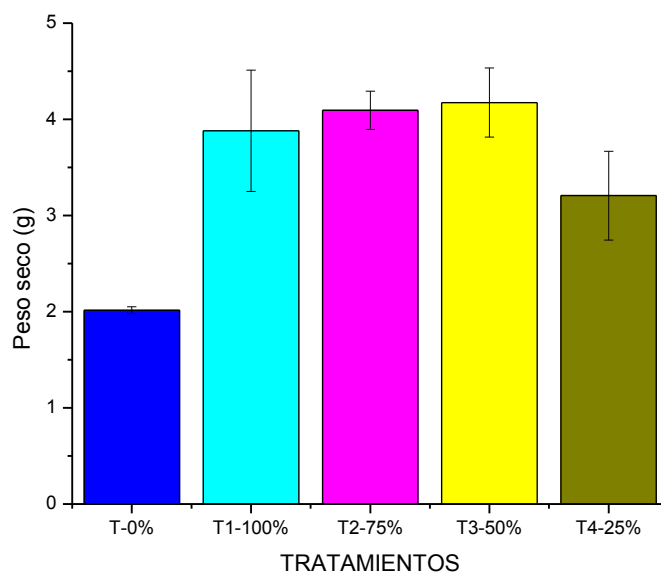


Figura 5.5. Comparación de las medias para la variable peso seco foliar de los diferentes tratamientos en el día 69 después de trasplante.

5.4. Índice de clorofila en hojas de stevia.

El análisis estadístico, para la variable clorofila en hojas de stevia, sólo mostró diferencia significativa para los muestreos de 47 y 54 ddt; para el día 47 el tratamiento del 25% mostró diferencia significativa respecto a los otros tratamientos y el testigo también fue diferente significativamente del resto de los tratamientos; para el muestreo en el día 54 el tratamiento del 100% fue significativamente diferente de los tratamientos del 50 y 25%, el testigo mostró diferencia significativa respecto de todos los tratamientos. Para los días 61 y 68 ddt no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ni tampoco con el testigo. Sin embargo, el tratamiento del 100%, como se puede observar en el Cuadro 5.4 y la Figura 5.6., mostró mejores resultados que los demás tratamientos y el testigo, mientras que para los días 61 y 68 ddt el testigo mostró mayor índice de clorofila que los tratamientos y dentro de los tratamientos el T1-100% mostró mejores resultados que los demás.

Cuadro 5.4. Análisis estadístico de la comparación de índice de clorofila en hojas de stevia (en unidades SPAD) a los 47, 54, 61 y 68 ddt.

Tratamiento	ddt			
	47	54	61	68
100%	38.51±0.993 a	38.98±0.558 a	39.46±0.352 a	40.71±0.528 a
75%	35.73±0.847 a	37.27±0.374 ab	38.50±0.452 a	38.53±0.602 a
50%	36.15±0.766 a	36.15±0.436 b	37.89±0.528 a	39.26±0.601 a
25%	32.53±0.513 b	36.49±0.629 b	38.35±0.417 a	39.15±0.752 a
0%	23.25±1.011 c	32.40±1.484 c	40.40±1.055 a	41.31±0.932 a

Se muestran los resultados obtenidos de las mediciones de altura de la planta como la media \pm el error. Letras distintas en la misma columna y muestreo indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); ddt: días después de trasplante.

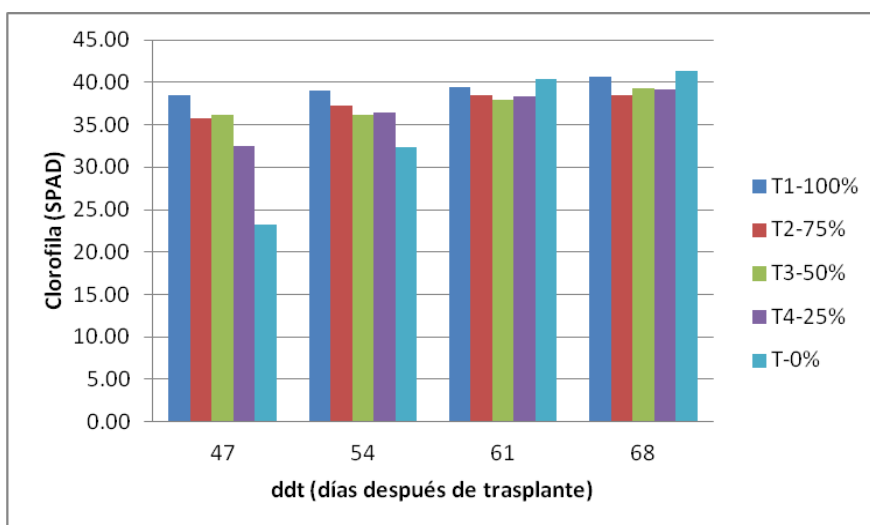


Figura 5.6. Comparación de medias de las diferentes concentraciones de SN Steiner para los muestreos a los 47, 54, 61 y 68 ddt en plantas de stevia para la variable clorofila en hojas.

En la figura 5.7 se puede observar que para todos los tratamientos (0, 25, 50, 75 y 100% de concentración), en los diferentes días de muestreo se tiene una tendencia creciente, es decir, conforme fue aumentando el día de muestreo, para cada tratamiento, la clorofila en las hojas fue aumentando, lo cual coincide con la

etapa fenológica de la planta, entre más edad tenía la planta mayor cantidad de hojas tenía la planta y por lo tanto realizaba mayor fotosíntesis.

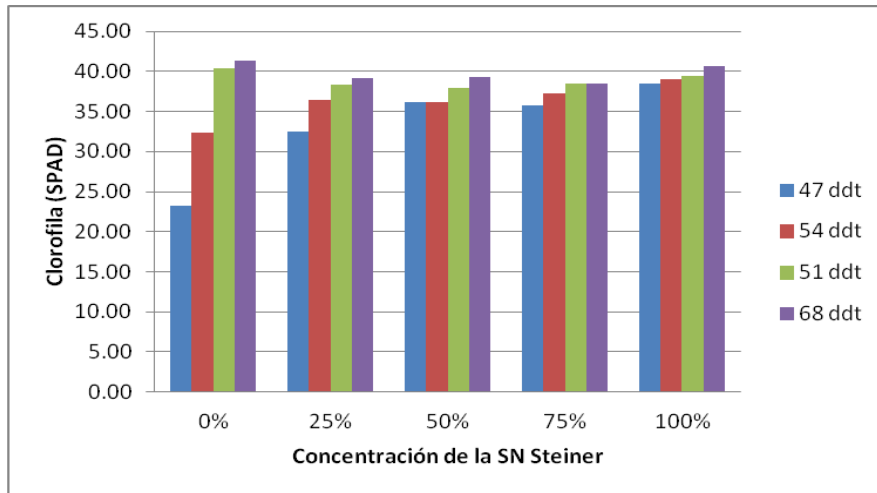


Figura 5.7. Comparación de la cantidad de clorofila en hojas de plantas de stevia entre los diferentes tratamientos para los diferentes días de muestreo (47, 54, 61 y 68 ddt).

En la figura 5.8 se pueden observar los diferentes tratamientos y el testigo para el día 68 ddt, se puede observar que no existe diferencia significativa entre los tratamientos ni con el testigo, el testigo superó a todos los tratamientos, sin embargo dentro de los tratamientos el de 100% fue el mejor ya que mostró mayor clorofila que el resto.

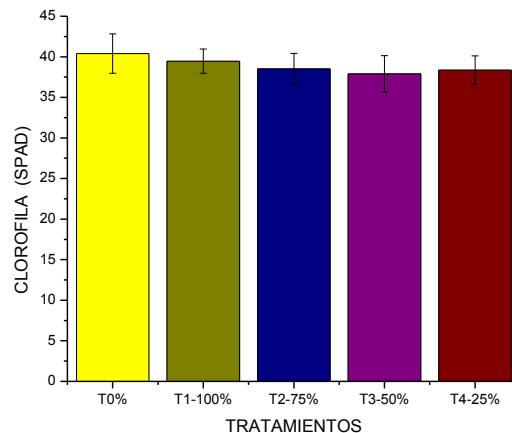


Figura 5.8. Comparación de las medias de los diferentes tratamientos para la variable clorofila en el día 68 después de trasplante.

5.5. Contenido de steviósidos en hojas de stevia.

Para el experimento de contenido de steviósidos en hojas de stevia no hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos pero sí lo hubo respecto al testigo, el cual superó por mucho a todos los tratamientos. Sin embargo, dentro de los tratamientos el que mostró mayor concentración de steviósidos fue el de 75% como se puede observar en el Cuadro 5.5 y la Figura 5.9.

Cuadro 5.5. Análisis estadístico de la comparación de índice de steviósidos en hojas de stevia (en g/mol).

Parámetro	TRATAMIENTOS				
	T1-100%	T2-75%	T3-50%	T4-25%	T0-0%
Min.	1.581	2.183	1.715	0.759	6.815
Max.	4.980	8.257	5.692	5.029	10.699
Media±SEM	3.45±0.390 b	4.16±0.657 b	2.79±0.475 b	2.96±0.461 b	8.99±1.146 a
Desv. Std.	1.170	1.972	1.424	1.384	1.984
C.V.	33.895	47.411	51.144	46.800	22.068

Se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de steviósidos de las hojas de stevia; se muestran los mínimos (Min.) y máximos (Max.), la desviación estándar (Desv. Std.), el coeficiente de variación (C.V.) y la media \pm el error (Media±SEM). Letras distintas en el mismo renglón de la media indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

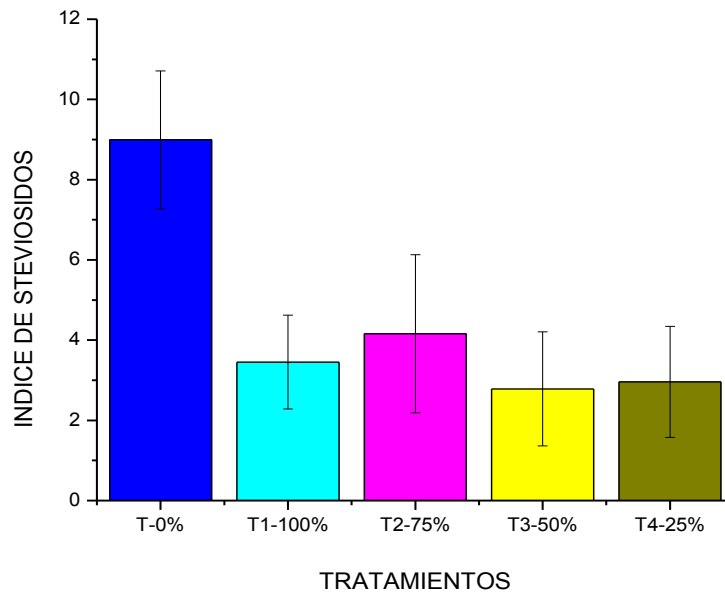


Figura 5.9. Comparación de las medias para la variable contenido de steviósidos en hojas de stevia de los diferentes tratamientos; el índice de steviósidos se expresa en g/mol.

5.6. Contenido de flavonoides en hojas de stevia.

Para el experimento de contenido de flavonoides en hojas de stevia no hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos pero sí lo hubo respecto al testigo, el cual estuvo por debajo en la cantidad de flavonoides. Sin embargo, aunque entre los tratamientos no hubo diferencia significativa, el que mostró mayor concentración de flavonoides fue el de 50% como se puede observar en el Cuadro 5.6 y la Figura 5.10.

Cuadro 5.6. Análisis estadístico de la comparación de índice de flavonoides en hojas de stevia (en $\mu\text{M/g}$ tejido seco).

Parámetro	TRATAMIENTOS				
	T1-100%	T2-75%	T3-50%	T4-25%	T0-0%
Min.	15.210	14.805	16.226	15.954	8.307
Max.	16.329	16.674	16.643	16.608	13.274
Media \pm SEM	15.68 \pm 0.336 a	15.77 \pm 0.541 a	16.42 \pm 0.122 a	16.36 \pm 0.206 a	10.06 \pm 1.611 b
Desv. Std.	0.583	0.936	0.211	0.356	2.790
C.V.	3.716	5.936	1.284	2.176	27.740

Se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides en las hojas de stevia; se muestran los mínimos (Min.) y máximos (Max.), la desviación estándar (Desv. Std.), el coeficiente de variación (C.V.) y la media \pm el error (Media \pm SEM). Letras distintas en el mismo renglón de la media indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

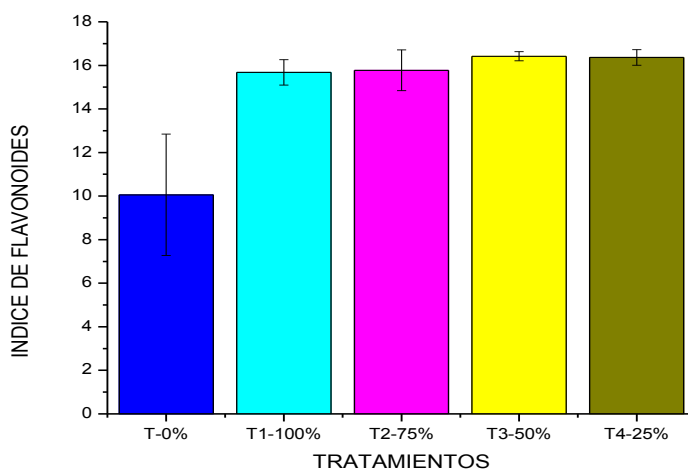


Figura 5.10. Comparación de las medias para la variable contenido de flavonoides en hojas de stevia de los diferentes tratamientos; los resultados son expresados en $\mu\text{M/g}$ tejido seco.

5.7. Contenido de fenoles totales en hojas de stevia.

Para el experimento de contenido de fenoles en hojas de stevia no hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos, sin embargo, el testigo sí mostró diferencia significativa respecto de los tratamientos de 25, 50 y 75%.

Dentro de los tratamientos el que mostró mayor cantidad de fenoles en las hojas fue el de 50% como se puede observar en el Cuadro 5.7 y la Figura 5.11.

Cuadro 5.7. Análisis estadístico de la comparación de índice de fenoles en hojas de stevia (en $\mu\text{M/g}$ tejido seco).

Parámetro	TRATAMIENTOS				
	T1-100%	T2-75%	T3-50%	T4-25%	T0-0%
Min.	4.349	6.086	7.161	5.147	1.316
Max.	6.809	7.331	10.953	8.956	2.697
Media\pmSEM	5.20 \pm 0.807 ab	6.64 \pm 0.366 a	8.57 \pm 1.199 a	7.49 \pm 1.185 a	1.80 \pm 0.451 b
Desv. Std.	1.398	0.634	2.076	2.053	0.781
C.V.	26.902	9.548	24.227	27.398	43.471

Se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de fenoles totales en las hojas de stevia; se muestran los mínimos (Min.) y máximos (Max.), la desviación estándar (Desv. Std.), el coeficiente de variación (C.V.) y la media \pm el error (Media \pm SEM). Letras distintas en el mismo renglón de la media indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

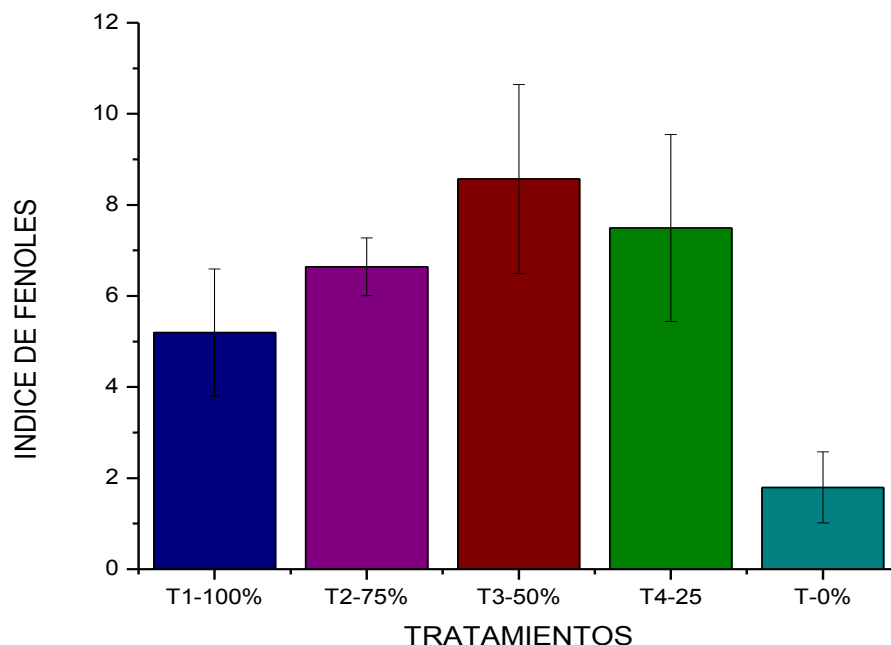


Figura 5.11. Comparación de las medias para la variable contenido de fenoles totales en hojas de stevia de los diferentes tratamientos; los resultados son expresados en $\mu\text{M/g}$ tejido seco.

La aplicación del T3, mostró la mejor respuesta para las variables PF y PS seco foliar ya que con este tratamiento se obtuvo un mayor peso; también fue el mejor tratamiento para el contenido de flavonoides y fenoles totales mostrando una mayor acumulación de dichos compuestos. Sin embargo, para la variable altura de la planta resultó el tratamiento menos efectivo superando sólo al testigo, para esta variable el T1= 100% fue el que tuvo mayor AP en el día 68 después de trasplante. Para las variables IC y CS el testigo es el que mostró mejores resultados, ya que superó a todos los tratamientos aplicados, dentro de los tratamientos el de 100% y 75% fueron los que mostraron mejores resultados para dichas variables respectivamente, pero en la variable IC no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ni con el testigo a diferencia del contenido de steviósidos donde el testigo es significativamente diferente a todos los tratamientos. El Cuadro 5.8 muestra los diferentes tratamientos y sus resultados obtenidos para las diferentes variables medidas.

Cuadro 5.8. Comparación de medias de la altura de la planta (AP), peso fresco foliar (PF), peso seco foliar (PS), índice de clorofila (IC), contenido de steviósidos en hojas (CS), contenido de flavonoides en hojas (CFI) y contenido de fenoles totales en hojas (CFe) en plantas de stevia, por efecto de la concentración (T1-100%, T2-75%, T3-50%, T4-25%, T0-test 0%) de la solución nutritiva Steiner (TS). Mediciones realizadas a diferentes ddt.

TS	AP	PF	PS	IC	CS	CFI	CFe
T1	18.58±0.414 a	21.06±0.968 a	3.88±0.210 a	40.71±0.528 a	3.45±0.390 b	15.68±0.336 a	5.20±0.807 ab
T2	18.45±0.785 a	21.41±0.653 a	4.09±0.066 a	38.53±0.602 a	4.16±0.657 b	15.77±0.541 a	6.64±0.366 a
T3	17.89±0.434 a	21.70±0.705 a	4.17±0.120 a	39.26±0.601 a	2.79±0.475 b	16.42±0.122 a	8.57±1.199 a
T4	18.58±0.634 a	16.08±0.542 b	3.21±0.154 b	39.15±0.752 a	2.96±0.461 b	16.36±0.206 a	7.49±1.185 a
T0	14.25±1.143 b	15.71±1.566 b	2.02±0.024 c	41.31±0.932 a	8.99±1.146 a	10.06±1.611 b	1.80±0.451 b

Se muestran los resultados obtenidos de las diferentes variables evaluadas, los resultados se muestran como la media \pm el error (Media \pm SEM). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Jarma y col. (2012) demostraron que la deficiencia nutricional no influye en la cantidad de glucósidos pero la concentración de rebaudiósido se reduce significativamente ante deficiencias de P, S, K y Cu. En la investigación desarrollada se evaluó el contenido de steviósidos y se observó que para las diferentes concentraciones de SN Steiner este glucósido disminuyó considerablemente respecto al testigo, sin embargo la tendencia de dentro de los tratamientos indicó que para menores concentraciones se tiene menos cantidad de steviósido, por lo cual hace falta evaluar el comportamiento de este glucósido ante la deficiencia de ciertos nutrientes en específico.

Pal y col., (2015) demostraron que la nutrición vegetal, regida fuertemente por las características del suelo, y las condiciones climáticas juegan un papel de suma importancia en el crecimiento y producción de metabolitos secundarios en plantas de *Stevia rebaudiana*, en este caso las diferentes aplicaciones de N, P₂O₅ y K₂O y

la variabilidad espacial influyeron en la morfología, acumulación de metabolitos secundarios en la hoja y contenido de steviósido en hojas. En el trabajo desarrollado se pudo demostrar que la aplicación de diferentes concentraciones de SN influye en la morfología y contenido de metabolitos secundarios pero no en el contenido de steviósidos en hoja.

Salgado (2013) mostró que la concentración de 9 meq L^{-1} de NO_3^- ofrece mejores resultados para las variables morfológicas altura de la planta, número de tallos, peso fresco y seco e índice de clorofila, lo cual no coincide con los resultados obtenidos de la presente investigación, ya que la concentración de 50% mostró mejores resultados para el peso fresco y seco, el tratamiento de 100% fue el que presentó mayor altura y para el índice de clorofila el testigo fue el mejor, pero en este último no hubo diferencia significativa.

VI. CONCLUSIONES

La aplicación de la solución nutritiva Steiner influye en la producción de biomasa, ya que se obtiene mayor altura en las plantas, así como un mayor peso foliar de las mismas. Las diferentes concentraciones de SN Steiner no influyeron en la producción de steviósidos, sin embargo se favorece a la producción de metabolitos secundarios (flavonoides y fenoles) en el tejido foliar de la planta, la producción de glucósidos puede estar ligada a otros factores.

LITERATURA CITADA

- Alcántar González, G., & Trejo-Téllez, L. I. (2007). *Nutrición de Cultivos*. México, D. F.: Editorial Mundi-Prensa.
- Austin, M. B., & Noel, J. P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 20(1), 79–110. <http://doi.org/10.1039/b100917f>
- Ávalos García, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>
- Brandle, J. . . , Starratt, a . . , & Gijzen, M. (1998). Stevia rebaudiana : Its agricultural , biological , and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, 78(4), 527–536. <http://doi.org/10.4141/P97-114>
- Brandle, J. E., & Telmer, P. G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68(14), 1855–1863. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.010>
- Cala Molina, M. P. (2011). *Determinación de antioxidantes fenólicos en plantas aromáticas del género Lippia sp. (Familia Verbenaceae) empleando cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia*.
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., & Oomah, B. D. (2002). Antioxidant activity of common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11, 220–233.
- Chatsudhipong, V., & Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(1), 41–54. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.09.007>
- Ciocan, I. D., & Bara, I. I. (2007). Plant products as antimicrobial agents. *Genetică Și Biologie Moleculară*, 8, 151–156.
- Crammer, B., & Ikan, R. (1986). Sweet glycosides from the Stevia plant. *Chemistry in Britain*, 22, 915–917.
- Dacome, A. S., da Silva, C. C., da Costa, C. E. M., Fontana, J. D., Adelman, J., & da Costa, S. C. (2005). Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry*, 40(11), 3587–3594. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.035>
- Darise, M., Kohda, H., Mizutani, K., Kasai, R., & Tanaka, O. (1983). Chemical constituents of flowers of Stevia rebaudiana Bertoni. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 133–135.

- Das, K., Dang, R., Shivananda, T. N., Sekeroglu, N., John, S., Lay, R. P. C., & Nagar, V. (2007). Influence of bio-fertilizers on the biomass yield and nutrient content in *Stevia rebaudiana* Bert. grown in Indian subtropics. *Medicinal Plants Research*, 1(August), 5–8.
- Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697–6703. <http://doi.org/10.5897/JMPR11.1404>
- Graetz, H. A. (2008). Suelos y Fertilización. Manuales para Educación Agropecuaria. México: Editorial Trillas.
- Instituto Boliviano de Comercio Exterior. (2011, April). El Dulce Negocio de la Stevia. 191, pp. 1–19. Bolivia.
- Jarma O., A., Combatt C., E., & Polo S., J. (2012). DEFICIENCIAS NUTRICIONALES EN *Stevia rebaudiana* BERT. GLYCOSIDE CONTENTS DEPENDING ON THE NUTRIENT DEFICIENCIES IN *Stevia rebaudiana* BERT. *U.D.C.A.*, 3, 107–116.
- Jarma, Alfredo de Jesús; Combatt, Enrique Miguel*; Cleves, J. A. (2010). Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión Nutritional aspects and metabolism of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). A review, 28, 199–208.
- Jiménez, T. ., Cabrera, G., Álvarez, E., & Gómez, F. (2010). Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaâ heê) cultivada comercialmente . Estudio preliminar Evaluation of the content of stevioside and rebaudioside A in a population of *Stevia rebaudian*. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 8(1), 47–53.
- Kim, I., Yang, M., Lee, O., & Kang, S. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *Food Science and Technology*, 44, 1328–1332.
- Kim, S.-H., & Dubois, G. E. (1991). Natural high potency sweeteners. In M. S. & P. J.R. (Eds.), *In Handbook of Sweeteners* (pp. 116–185). New York.
- KnowGenix. (2010). *Global Stevia Industry Perceptions Report*. Atlanta, USA.
- Krugh, B., Bichham, L., & Miles, D. (1994). The solid-state chlorophyll meter, a novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll concentrations in seedling leaves. Maize genetics cooperation. *News Letter*, 68(25-27).
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132(3), 1121–1132. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.140>

- López, T. M. (2006). *Horticultura*. (2da ed.). México: Trillas.
- Ma, L., & Shi, Y. (2011). Effects of potassium fertilizer on physiological and biochemical index of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Energy Procedia*, 5, 581–586. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.03.102>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 359–368. <http://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>
- Ministerio de Industria y Comercio Paraguay. (2011). Ministerio de Industria y Comercio Paraguay. Retrieved July 8, 2015, from <http://www.mic.gov.py/mic/site/inicio.php>
- Mishra, P. K., Singht, R., Kumar, U., & Prakash, V. (2010). *Stevia Rebaudiana* - A Magical Sweetener. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*.
- Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., & Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 935–942. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2019>
- Pal, P., Kumar, R., Guleria, V., Mahajan, M., Prasad, R., Pathania, V., ... Ahuja, P. (2015). Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC Plant Biology*, 15(1), 67. <http://doi.org/10.1186/s12870-015-0457-x>
- Paladino, S. C., & Zuritz, C. A. (2011). Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L .) con actividad antioxidante : eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. *Rev. FCA UNCUYO*, 187–199.
- Patil, N. M., Bertoni, V., & America, C. (2010). B lofertilizer E Ffect on G Rowth , P Rotein and C Arbohydrate C Ontent in S Tevia Rebaudiana V Ar B Ertoni. *Recent Research in Science and Technology*, 2(10), 42–44.
- Petiard, V., & Bariaud-Fontanel, A. (1987). El cultivo de células. *Mundo Científico*, 7, 730–736.
- Ramirez, G. (2011). Paquete Tecnológico Estevia (*Stevia rebaudiana*) Establecimiento y mantenimiento. *Programa Estratégico Para El Desarrollo Rural Sutentable de La Región Sur - Sureste de México: Tropico Húmedo 2011*, 0–15.
- Rodríguez Mendoza, Ma. de las Nieves Alcántar González, G., Aguilar Santelises, A., Etchevers Barra, J. D., & Santizó Rincón, J. A. (1998). Estimation of nitrogen and chlorophyll status of tomato with a portable chlorophyll meter.

Terra, 16, 135–141. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1999/MX/MX99018.xml;MX1999A01591>

- Salgado Cordero, L. E. (2013). *Requerimiento de nitrógeno en la producción de Stevia rebaudiana Bertoni en hidroponía e invernadero*. Colegio de Postgraduados. Retrieved from http://trafficlight.bitdefender.com/info?url=http://colposdigital.colpos.mx:8080/js/pui/handle/10521/2133&language=es_ES
- Sepúlveda, G., Porta, H., & Rocha, M. (2004). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355–363.
- Soejarto, D. D. (2002). Stevia. The genus Stevia. In A. D. Kinghorn (Ed.), *Stevia. The genus Stevia* (1ra ed., pp. 18–39). Chicago.
- Tolonen, M., Taipale, M., Viander, B., Pihlava, J.-M., Korhonen, H., & Ryhänen, E.-L. (2002). Plant-derived biomolecules in fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6798–803. <http://doi.org/10.1021/jf0109017>
- Urrestarazu, M., M. Abad, B., Adams., P., J. Gómez, V., T. Moreno, I., Salas, M. del C., ... Varela M, D. L. (2004). *Tratado de cultivo sin suelo* (3a ed.). Mundi-Prensa, 2004.
- Vázquez-Baxcajay, L., Robledo-Paz, A., Muratalla-Lúa, A., & Conde-Martínez, V. (2014). Micropropagación de Stevia rebaudiana Bertoni y detección de steviósidos. *Bioagro*, 26, 49–56.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry* (1st ed.). Springer Netherlands.
- Verpoorte, R. (2000). *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. (R. Verpoorte & A. W. Alfermann, Eds.) (1st ed.). Springer Netherlands.
- 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*, 91(1), 1–27. <http://doi.org/10.4141/cjps10086>
- Zubiate, F. (2007). Manual del Cultivo de la Stevia (Yerba Dulce). Retrieved May 15, 2015, from http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=1337

BIBLIOGRAFÍA

Baderschneider, B. and Winterhalter, P. 2001. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids and lignans from Riesling wine and screening for antioxidante activity. J. Agri. Food Chem. 49: 2788-2798.

Tolonen, M., Taipale, M., Viander, B., Pihlava, J.-M., Korhonen, H., & Ryhänen, E.-L. (2002). Plant-derived biomolecules in fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6798–803.
<http://doi.org/10.1021/jf0109017>