

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

TITULO	Análisis de la incidencia y relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la Stevia rebaudiana B. en condiciones de invernadero en la sabana de Bogotá.		
SUBTITULO			
AUTOR(ES) Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	Moreno Andrade, Alejandro Enrique		
PALABRAS CLAVE (Mínimo 3 y máximo 6)	Edulcorantes		Desarrollo Vegetativo
	Esteviósidos		Control
	Rebaudiósidos		Tratamientos
RESUMEN DEL CONTENIDO (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>El objetivo de este trabajo fue analizar la incidencia y relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la Stevia rebaudiana B. en condiciones de invernadero en la Sabana de Bogotá, con el fin de obtener niveles de esteviósidos y rebaudiósidos adecuados para la comercialización.</p> <p>La metodología incluyó el establecimiento del cultivo bajo condiciones de invernadero utilizando varios tratamientos y un diseño experimental de bloques al azar, se midió peso seco, longitud de tallo y número de hojas por planta.</p> <p>Los resultados obtenidos, permitieron establecer que los factores abióticos como el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo y los nutrientes, determinan el desarrollo y producción de esteviósidos y rebaudiósidos en las plantas, otorgándoles características físicas y químicas particulares en condiciones específicas.</p>		

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

ARCHIVO DE INFORMACIÓN PARA PORTADAS INSTITUCIONALES

Título completo del trabajo: El título tal como aparece en el trabajo de grado

Análisis de la incidencia y relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* B. en condiciones de invernadero en la sabana de Bogotá.

Nombre del autor: Los nombres completos con los dos apellidos (si tienen) del estudiante que presenta el trabajo de grado.

Alejandro Enrique Moreno Andrade

Nombre del director: Nombre de la persona que dirigió el trabajo durante su elaboración.

Ligia Consuelo Sánchez Leal
Jairo Cuervo Andrade

Tipo de trabajo: especificar qué tipo de trabajo es (tesis, monografía, investigación, trabajo de grado, artículo, etc.)

Proyecto de grado para optar por el título de Magister

Facultad y programa: La facultad y el programa académico que cursa el estudiante que presenta el trabajo.

Facultad de ingeniería
Maestría en diseño y gestión de procesos

Resumen: Un resumen del trabajo que no debe exceder las 120 palabras

El objetivo de este trabajo fue analizar la incidencia y relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* B. en condiciones de invernadero en la Sabana de Bogotá, con el fin de obtener niveles de esteviósidos y rebaudiósidos adecuados para la comercialización.

La metodología incluyó el establecimiento del cultivo bajo condiciones de invernadero utilizando varios tratamientos y un diseño experimental de bloques al azar, se midió peso seco, longitud de tallo y número de hojas por planta.

Los resultados obtenidos, permitieron establecer que los factores abióticos como el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo y los nutrientes, determinan el desarrollo y producción de esteviósidos y rebaudiósidos en las plantas, otorgándoles características físicas y químicas particulares en condiciones específicas.

Abstract: el resumen del trabajo en inglés máximo de 120 palabras.

The aim of this study was to analyze the incidence and relationship of environmental factors on vegetative growth of *Stevia rebaudiana* B. under greenhouse conditions in the Sabana de Bogota, in order to obtain levels of stevioside and rebaudioside suitable for commercialization.

The methodology included the establishment of the crop under greenhouse conditions using various treatments and experimental design of randomized blocks was measured dry weight, stem length and number of leaves per plant.

The results obtained, it was established that the abiotic factors like water temperature, light, pH, soil nutrients, determine the development and production of stevioside and rebaudioside in plants, giving and chemical characteristics in terms specific.

Palabras Clave: máximo 10 palabras que identifiquen el trabajo, en minúsculas y separadas por coma.

Edulcorantes , Esteviósidós, Rebaudiósidos, Desarrollo Vegetativo, Control, Tratamientos, Eficiencia, Relaciones Ambientales.

UNIVERSIDAD DE LA SABANA

**FACULTAD DE INGENIERIA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS**

PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TITULO DE MAGISTER

**ANÁLISIS DE LA INCIDENCIA Y RELACIÓN DE LOS FACTORES
AMBIENTALES EN EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LA *Stevia rebaudiana*
B. EN CONDICIONES DE INVERNADERO EN LA SABANA DE BOGOTÁ.**

ALEJANDRO ENRIQUE MORENO ANDRADE

Bogotá, 2012

UNIVERSIDAD DE LA SABANA

**FACULTAD DE INGENIERIA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS**

PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TITULO DE MAGISTER

**ANÁLISIS DE LA INCIDENCIA Y RELACIÓN DE LOS FACTORES
AMBIENTALES EN EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LA *Stevia rebaudiana*
B. EN CONDICIONES DE INVERNADERO EN LA SABANA DE BOGOTÁ.**

ALEJANDRO ENRIQUE MORENO ANDRADE

DIRECTOR

JAIRO CUERVO ANDRADE Ph.D

UNIVERSIDAD NACIONAL

CODIRECTOR

LIGIA CONSUELO SANCHEZ L. MSc.

UNIVERSIDAD DE LA SABANA

Bogotá, 2012

**ANÁLISIS DE LA INCIDENCIA Y RELACIÓN DE LOS FACTORES
AMBIENTALES EN EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LA *Stevia rebaudiana*
B. EN CONDICIONES DE INVERNADERO EN LA SABANA DE BOGOTÁ.**

APROBADA:

JURADOS:

DIRECTOR:

JAIRO CUERVO ANDRADE Ph.D

CODIRECTORA

LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL MSc

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
BOGOTA, 2012**

DEDICATORIA

Como todo en mi vida este trabajo se lo dedico a Dios y a la Mamita del Cielo quienes me han acompañado día tras día regalándome la fuerza para siempre dar el siguiente paso.

A mi princesita María Alejandra que me anima siempre para hacer las cosas mejor.

A Mis Padres Alejandro y Martha por su amor, paciencia, dedicación y apoyo incondicional, sin tanto apoyo no hubiera sido posible. Los Amo

A todos mis hermanitos Adriana, Laura, Camilo, Paula y Martha gracias por estar conmigo siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Jairo Cuervo Andrade por la entrega total no solo en este trabajo sino en cada uno de los proyectos que he tenido la fortuna de acompañarlo aprendiendo cada segundo un poco más, por su amistad, colaboración incondicional, apoyo y confianza. Este reconocimiento no es solo por acompañarme en cada etapa de esta labor sino también por facilitar todos los instrumentos y herramientas que necesité para llevar a buen término esta investigación.

A la Doctora Ligia Consuelo Sánchez por su gran apoyo, amistad, paciencia y confianza; Es lógico que su pasión por educar contagie a quienes únicamente se dedican a enseñar.

A todos los estudiantes vinculados con el trabajo en invernadero y recolección de datos de la facultad de agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por su apoyo y gran colaboración.

Agradezco también a los estudiantes de pregrado de la Facultad de agronomía que colaboraron con sus conocimientos y aportes a la culminación de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
1. Introducción.....	12
2. Descripción del proyecto.....	15
2.1. Planteamiento del problema.....	15
3. Objetivos.....	19
3.1. Objetivo General.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. Marco teórico.....	20
4.1. Generalidades de la <i>Stevia rebaudiana</i> B.....	20
4.1.1. Clasificación taxonómica.....	22
4.1.2. Descripción botánica.....	22
4.1.3. Ecotipos.....	24
4.1.4. Citología.....	24
4.1.5. Clima.....	24
4.1.6. Suelos.....	25
4.1.7. Características agronómicas.....	26
4.1.8. Propagación.....	27
4.1.9. Características físico – químicas	29
4.2. Método para la extracción del esteviósido.....	34
4.3. Relación Planta - Factores Ambientales y posibles modelos de aplicación.....	34
4.3.1. Modelos empíricos.....	35
4.3.2. Modelos de procesos.....	35
4.3.3. Modelos aplicados a los cultivos.....	35
5. Diseño Metodológico.....	37
5.1. Fase 1. Investigación preliminar.....	38
5.2. Fase 2. Direccionamiento estratégico.....	39
5.3. Fase 3. Toma de muestras.....	40
5.3.1. Determinación de las fuentes.....	40
5.3.2. Localización.....	40

5.3.3. Método para recolectar los datos.....	41
5.3.4. Matriz de datos.....	41
5.4. Fase 4. Inspección de campo.....	41
6. Resultados y discusión.....	42
6.1. Fase 1. Investigación preliminar.....	42
6.2. Fase 2. Direccionamiento estratégico.....	60
6.2.1. Estudio de las necesidades de riego en el cultivo de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.).....	60
6.2.2. Identificación y Manejo de las enfermedades predominantes en <i>Stevia rebaudiana</i> B) en los invernaderos de la Universidad Nacional de Colombia.....	63
6.2.3. Respuesta de <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) al estímulo con biofertilizantes.....	65
6.2.4. Estudio de arvenses y análisis de crecimiento de <i>Stevia</i> (<i>Stevia rebaudiana</i> Bert.).....	67
6.3. Estrategias de intervención del cultivo para obtener esteviósidos y rebaudiósidos adecuados para su comercialización.....	70
7. Conclusiones.....	72
8. Recomendaciones.....	74
Bibliografía.....	87

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Fitonutrientes de la <i>Stevia rebaudiana</i>	21
Tabla 2. Clasificación Taxonómica de la <i>Stevia rebaudiana</i>	22
Tabla 3. Estructuras de esteviósido y compuestos relacionados.....	30
Tabla 4. Propiedades físico-químicas del esteviósido.....	33
Tabla 5. Reporte de enfermedades en <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni)	55
Tabla 6. Resultados obtenidos de peso fresco y peso seco con los diferentes tratamientos	61
Tabla 7. Resultados de peso seco y peso fresco con los diferentes fertilizantes.....	65
Tabla 8. Estrategias de intervención para mejorar las condiciones de cultivo de <i>Stevia Rebaudiana</i>	70

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. <i>Stevia rebaudiana</i> B.....	16
Figura 2. Fisonomía de la <i>Stevia rebaudiana</i>	20
Figura 3. Cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i> en suelos areno arcillosos.....	26
Figura 4. Cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i>	27
Figura 5. Estructura del esteviósido.....	30
Figura 6. Síntesis de esteviol partiendo de ent-kaurenato por la hidroxilasa 13- <i>ent</i> -kaurenato.....	32
Figura 7. Transglicosilación de esteviol para formar esteviolmonósido, esteviolbiósido, esteviósido y rebaudiósido A.....	32
Figura 8. Esquema general del diseño metodológico.....	37
Figura 9. Relación entre la materia seca (MS) de hojas y el área foliar verde....	84

RESUMEN

En la actualidad varias especies vegetales han despertado la atención de los diferentes sectores de la sociedad, por sus múltiples beneficios alimenticios, medicinales y ambientales, entre otros, la *Stevia rebaudiana* B una planta que se ha destacado por poseer características edulcorantes para la industria alimenticia y presentar propiedades medicinales para la prevención y el tratamiento de enfermedades como la artrosis, cáncer, arteriosclerosis, alergias, hepatitis crónica, pericarditis, hipertensión, las consecuencias diabéticas como disfunción eréctil, retinopatía diabética y pie diabético; se ha utilizado también para prevenir el ictus¹, apoplejías y la gastroenteritis, también ayuda a eliminar el estreñimiento, nutre el hígado, el páncreas y el bazo, además evita la caries dental.

En la caracterización de los principales compuestos de la planta se han encontrado principios edulcorantes en las hojas denominados Rebaudiósidos A, B, C, D y E, Dulcósidos A y B y otros que parecen ser de menor importancia. El rebaudiósido A, es el que presenta mayor grado de dulzor (aproximadamente 200 - 300 veces más dulce que el azúcar) razón por la cual, la selección de especies para experimentar como edulcorante alternativo especialmente para personas diabéticas y obesas, se hace teniendo en cuenta las plantas que tienen altos contenidos de este componente.

La importancia de este nuevo edulcorante ha hecho que muchos agricultores busquen mejorar la producción de estevia, razón por la cual se han incrementado las investigaciones sobre procesos de producción en vivero, para que las plántulas tengan características físicas y químicas similares, garanticen aumentos significativos en la relación de esteviósidos y rebaudiósidos que en ocasiones puede llegar a ser de 5:1, para ser competitivos en el mercado y estimular su producción.

¹ También denominado "ataque cerebral". "apoplejía" o "accidente cerebro vascular", es una interrupción del suministro de sangre a cualquier parte del cerebro.

El objetivo de este trabajo fue analizar la incidencia y relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* B. en condiciones de invernadero en la Sabana de Bogotá, con el fin de obtener niveles de esteviósidos y rebaudiósidos adecuados para su comercialización, presentar una mejor aceptación en el mercado y ser una opción atractiva de negocio para los campesinos de la región.

La metodología incluyó el establecimiento del cultivo bajo condiciones de invernadero utilizando varios tratamientos y un diseño experimental de bloques al azar, cinco muestreos en 20, 40, 63, 84 y 101 días en los que se midió peso seco, longitud de tallo y número de hojas por planta.

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron establecer que los factores abióticos como el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo y los nutrientes, determinan el desarrollo y producción de esteviósidos y rebaudiósidos en las plantas, otorgándoles características físicas y químicas particulares en condiciones específicas.

En relación a los factores ambientales vs el desarrollo vegetativo se lograron identificar los factores más relevantes solos y combinados que mostraron los mejores rendimientos tanto en su estructura física como en la fisicoquímica.

1. INTRODUCCIÓN

La Sabana de Bogotá está ubicada en el centro geográfico de Colombia, sobre la Cordillera Oriental, en la parte sur del altiplano cundiboyacence, se caracteriza por ser la altiplanicie más extensa de los Andes colombianos y porque es una región donde los principales factores que determinan la distribución de los organismos y ecosistemas como la humedad, temperatura y topografía, confluyen favorablemente para el establecimiento de más de 60 especies vegetales entre hortalizas, granos, tubérculos, cereales, pseudocereales¹, frutales y algunas con propiedades medicinales (Salazar, Ávila y Salcedo 2004), todas con características diferentes, variedad que permite satisfacer una buena cantidad de mercados y garantizar el abastecimiento de la demanda local.

Entre las plantas que han llamado la atención del mundo en general, se encuentra la *Stevia rebaudiana B*, nativa del Paraguay, descubierta en el año 1887 (Daciw 2005) porque posee características edulcorantes en sus hojas 300 veces más dulce que el azúcar de caña pero con la diferencia de que no produce calorías (Bravo, y otros 2009) porque no es un carbohidrato; esta planta, crece espontáneamente en los suelos semiáridos de las laderas de las montañas del noreste paraguayo, en la región de la Cordillera de Amambay.

Factores abióticos como el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo y los nutrientes determinan el desarrollo de las plantas, algunas son muy sensibles a estos factores y una variación puede hacer que el crecimiento sea heterogéneo situación que hace impredecible la producción. La estevia no es la excepción ya que dependiendo de la temperatura, humedad, suelo y brillo solar, entre otros, sus condiciones físicas y químicas varían considerablemente, afectando el tamaño en las hojas, el número de ramas, la altura de la planta y por lo tanto los rendimientos en esteviósidos y rebaudiósido, alcanzando incluso proporciones de

¹ Los pseudocereales son plantas diferentes a las gramíneas: por ejemplo de hojas anchas, que producen semillas (granos) parecidas a las de las gramíneas.

5:1. Por otra parte, la estevia puede tener otro problema que puede limitar la producción y es que a medida que se aumenta el esteviósido se produce un sabor amargo indeseable que lo limita en la industria alimenticia.

La presencia de propiedades endulzantes en la estevia, la convierten en una alternativa al azúcar de caña y otros carbohidratos que no pueden ser consumidos por pacientes diabéticos y obesos, igualmente es una sustancia alternativa para consumir con un sabor agradable al paladar. Sectores de la industria investigan la *Stevia rebaudiana*, como endulzante en la elaboración de mermeladas, helados, repostería, panadería y bebidas, igualmente es de interés en el campo de la salud, la agricultura y la cosmetología.

Algunos estudios como el de Duke (1987), donde se caracterizan los fitonutrientes de la *Stevia rebaudiana* demuestran que su principal principio activo es el esteviósido, un glucósido diterpeno de peso molecular 804.80, con fórmula: $C_{38}H_{60}O_{18}$. A partir de estos resultados las investigaciones, han demostrado que la *Stevia rebaudiana* es un poderoso antioxidante (Hale, 2001; Piojan, 2006 y Pamies, 2007), que además tiene propiedades medicinales para prevenir enfermedades que son consecuencia de la intoxicación del organismo causada por residuos que resultan de los procesos de oxidación, entre ellas obesidad, artrosis, cáncer, arteriosclerosis, diabetes, neutraliza el efecto tóxico de los alimentos contaminados por bacterias evitando la gastroenteritis, ayuda a eliminar el estreñimiento, nutre el hígado, el páncreas y el bazo, además de evita la caries dental. En algunos países esta planta es utilizada en el sector pecuario como alimento para peces y base nutricional para el alimento de cerdos (Rivero y Casadiego 2011) y el sector agrícola como fertilizante para la obtención de frutas más grandes y dulces.

Según lo establecido por (López 2009) en terrenos estériles por sobre explotación con agroquímicos o contaminados con dioxinas, se aplican los residuos de *Stevia* fermentada recuperándolos en pocos años. En el sector de los edulcorantes

naturales es de gran importancia, más aun cuando los endulzantes sintéticos provenientes de la caña están seriamente cuestionados por los efectos a corto y largo plazo que traen para los consumidores.

Las razones expuestas son suficientes para que se haya aumentado la demanda de estevia (Ministerio de Industria y Comercio 2006) que al lado de estudios económicos han demostrado que la tasa de retorno de la inversión es relativamente rápida, por lo tanto es interesante para que los agricultores busquen estrategias que mejoren el cultivo de esta especie. El mayor problema está detectado y es que no es fácil que el total del cultivo de estevia tenga características fisicoquímicas similares y así asegurar la confianza del mercado.

El objetivo de este estudio fue analizar la incidencia y relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* para aumentar la eficiencia del cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana*) mediante la estandarización de los procesos de producción en vivero, con el fin de que las plántulas tengan características físicas y químicas similares y lograr aumentos significativos en la relación de rebaudiósidos y esteviósidos para brindar un producto con bajo contenido calórico que proporcione beneficios para la salud y lograr mejor aceptación del mercado.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La *Stevia rebaudiana* Bertoni, conocida también como “yerba dulce”, es una planta arbustiva originaria del noreste de Paraguay que contiene en sus hojas, principios edulcorantes que han sido reconocidos y utilizados por siglos en las poblaciones nativas que viven en estas zonas (Sumida 1980).

La planta, la describe (Rivero y Casadiego 2011) como un arbusto, que presenta una altura entre 40 y 80 cm. Las hojas, lanceoladas o elípticas y dentadas, son alternas, simples, de color verde oscuro brillante y superficie rugosa, a veces algo vellosas, de hasta 5 cm. de largo por 2 de ancho. Los tallos son pubescentes y rectos, ramificándose sólo después del primer ciclo vegetativo, con tendencia a inclinarse (ver figura 1). Las raíces son en su mayoría superficiales, aunque una sección engrosada se hunde a mayor profundidad, Es dioica, presentando a comienzos de primavera flores pequeñas, tubulares y de color blanco, sin fragancia perceptible, en panículas corimboides² formadas por pequeños capítulos axilares; la estevia tarda más de un mes en producir todas las flores. Los frutos son aquenios³ dotados de un vilano⁴ vellosos que facilita su transporte por el viento.

² Corimbo es un tipo de inflorescencia abierta, racimosa en la que el eje es corto y los pedicelos de las flores son largos y salen a diferentes alturas del eje.

³ Un aquenio es un tipo de fruto seco. Los aquenios son monocarpelados, forman un único carpelo e indehiscentes no se abre al madurar. Contienen una única semilla que llena el hueco del pericarpio, pero no se adhiere a éste; la combinación de fruto y semilla es lo que se considera tal en numerosas especies

⁴ Se denomina vilano o papús al conjunto de pelos simples o plumosos, cerdas o escamas que rodean a las diminutas flores que corona en frutos con ovario ínfero, generalmente de las asteráceas o compuestas.



Figura 1. *Stevia rebaudiana* B. Fuente: *Stevia Sugar*

Aunque a simple vista esta especie no es muy llamativa, las altas concentraciones de esteviósidos hallados en sus hojas que le otorgan principios edulcorantes importantes a la especie, investigaciones desarrollada por científicos franceses como Bridel y Lavielle en 1931, documentado por (R. D. Taiariol 2009) donde cristalizaron el principio edulcorante y determinaron que es 300 veces más dulce que el azúcar obtenida a partir de la caña, además que no posee efectos tóxicos al realizar pruebas de laboratorio con animales. Igualmente, se indicó que el esteviósido es el edulcorante natural no nitrogenado, el más dulce que se ha encontrado hasta ahora en la naturaleza y que está compuesto únicamente de carbono, hidrogeno y oxígeno.

Como lo evidencian (Tamura, Nakamura, y otros 1984), investigadores japoneses de las Universidades de Hiroshima y Hokkaido, identificaron otros principios edulcorantes en las hojas de Stevia tales como, Rebaudiósidos A, B, C, D y E, Dulcósidos A y B y otros de menor importancia. El rebaudiósido A es el que presenta mayor grado de dulzor (aproximadamente 200 - 300 veces más dulce

que la glucosa), por esta razón en el momento de seleccionar los individuos, es necesario elegir las plantas con altos contenidos de este componente.

Simultáneamente, con el sabor dulce que caracteriza a la estevia, también se presenta un sabor secundario persistente, definido como sabor a regaliz-mentol, fácilmente detectable en altas concentraciones que le da una sensación de sabor amargo al paladar. Esta condición organoléptica no ha disminuido el grado de interés por esta especie, los diferentes ensayos desarrollados en países como Japón, Brasil, China, Corea, Tailandia, Taiwán, Israel, y otros, donde se ha implementado el cultivo de manera extensiva, los rendimientos en esteviósido y rebaudiósido, varían de tal forma que van desde proporciones de 1:1, 2:1, 3:1, alcanzando incluso proporciones de 5:1 (López 2009), situación que evidencia cómo en la medida que se aumenta el esteviósido se genera el retrogusto amargo e indeseable en la industria alimenticia, mientras que cuando se aumenta el rebaudiósido A se genera un sabor dulce más puro que no deja esta sensación.

Por otro lado las exigencias de la industria para este producto, van desde la propia variedad hasta requerimientos muy precisos en las condiciones físicas de la planta tales como: deben presentar un buen color, la humedad relativa del producto debe estar entre el 10 a 12% (Marín 2004), presentar un máximo de 5% en tallos, máximo 5% de hojas contaminadas, 5% de hoja con coloración café y es claro que se requieren protocolos de fertilización y almacenamiento, así mismo las exigencias incluye recomendaciones sobre el porcentaje máximo de concentración del esteviósido que es de 13% para no ser castigados con el precio en el mercado y un porcentaje mínimo de concentración de rebaudiósido del 70%⁵.

⁵ Compañía Nacional de Stevia – Antioquia. Huber Londoño.

Ahora bien, los factores abióticos como el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo y los nutrientes, determinan el desarrollo de todas las plantas, otorgándoles características físicas y químicas particulares dependiendo de la cantidad de variación que se aplique a cada uno de los factores antes mencionado.

La estevia no es la excepción ya que dependiendo de la temperatura, humedad, suelo, brillo solar etc., sus condiciones fisicoquímicas varían considerablemente, afectando el tamaño en las hojas, el número de ramas, la altura de la planta y obviamente la proporción de esteviósidos y rebaudiósidos

La presente investigación analizó la incidencia y la relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* para aumentar la eficiencia del cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana*) mediante la estandarización de los procesos de producción en vivero⁶ y lograr que las plántulas tengan características físicas y químicas similares, se obtengan aumentos significativos en la relación de rebaudiósidos y esteviósidos con la finalidad de brindar un producto que tenga mejor aceptación en el mercado y una alternativa de negocio para los campesinos de la región.

⁶ El vivero es un conjunto de instalaciones que tiene como propósito fundamental controlar factores abióticos en pro de aumentar la producción de plantas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la incidencia y relación de los factores ambientales en el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* B. en condiciones de invernadero en la Sabana de Bogotá, con el fin de obtener niveles de esteviósidos y rebaudiósidos adecuados para su comercialización.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer la relación entre el riego y el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* B.
- Determinar la relación entre la fertilización y el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* B.
- Establecer la relación entre la temperatura y el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* B.
- Establecer la relación entre el tipo de cobertura y el desarrollo vegetativo de la *Stevia rebaudiana* B.
- Determinar las estrategias de intervención del cultivo que permitan obtener los niveles de esteviósidos y rebaudiósidos adecuados para su comercialización.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. GENERALIDADES DE LA *Stevia rebaudiana* B.

Stevia rebaudiana es una planta selvática subtropical del alto Paraná (Ver figura 2), nativa del noroeste de la provincia de Misiones, en Paraguay, donde era utilizada por los nativos del lugar como edulcorante y curativa (Hale 2001). En 1899, por primera vez el investigador Moisés Santiago Bertoni obtuvo algunas plantas utilizadas por los indígenas, dentro de las que se encontraba esta planta llamada *ka'a he'ë*, palabra compuesta por las palabras *ka'a* o *caá* (hierba) y *he'ë* o *jé* (dulce), a partir de este momento le dio su clasificación taxonómica, y comenzó el proceso para cultivarla en 1905 (Kohda, y otros 1976).



Figura 2. Fisonomía de la *Stevia rebaudiana* Fuente: Jairo Cuervo, 2011

En la tabla 1 se observan los fitonutrientes de la *Stevia rebaudiana* los cuales fueron descritos por Duke (1987) y demuestran que su principal principio activo es el esteviósido, un glucósido diterpeno de peso molecular 804.80, con fórmula: $C_{38}H_{60}O_{18}$.

Tabla 1 FITONUTRIENTES DE LA *Stevia rebaudiana*

Fitonutriente	Parte de la Planta	Cantidad
Aluminio	Hoja	72 ppm
Ácido ascórbico	Hoja	110 ppm
Ash	Hoja	63.000 ppm
Austroinulin⁷	Todas	
Beta-caroteno	Hoja	75 ppm
Calcio	Hoja	5.440 ppm
Cromo	Hoja	39 ppm
Cobalto	Hoja	25 ppm
Dulcósidos	Todas	
Grasa	Hoja	19.000 ppm
Fibra	Hoja	152.000 ppm
Hierro	Hoja	39 ppm
Kilocalorías	Hoja	2540 / kg
Magnesio	Hoja	3.490 ppm
Manganeso	Hoja	147 ppm
Niacina	Hoja	
Fósforo	Hoja	3.180 ppm
Potasio	Hoja	17.800 ppm
Proteínas	Hoja	112.000 ppm
Rebaudiósidos	Todas	
Riboflavina	Hoja	
Selenio	Hoja	
Silicio	Hoja	132 ppm
Sodio	Hoja	892 ppm
Esteviósido	Todas	
Tiamina	Hoja	
Estaño	Hoja	15 ppm
Agua	Hoja	823.000 ppm
Zinc	Hoja	

Fuente: (FLORES NICOLALDE y LITA DÁVILA 2011)

⁷ Tipo de diterpeno. Algunas giberelinas tienen 19 átomos de carbono; se denominan diterpenos porque perdieron un átomo de carbono durante una reacción de clave.

4.1.1. Clasificación Taxonómica

En la tabla 2 se presenta la clasificación taxonómica de la *Stevia rebaudiana*

Tabla 2. Clasificación Taxonómica de la <i>Stevia rebaudiana</i>	
<i>Súper-reino:</i>	<i>Eukaryota</i>
<i>Reino:</i>	<i>Plantae</i>
<i>Subreino:</i>	<i>Tracheobionta</i>
<i>Súper-división:</i>	<i>Spermatophyta</i>
<i>División:</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Clase:</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Subclase:</i>	<i>Asteridae</i>
<i>Orden:</i>	<i>Asterales</i>
<i>Familia:</i>	<i>Asteraceae</i>
<i>Subfamilia:</i>	<i>Asteroideae</i>
<i>Género:</i>	<i>Stevia</i>
<i>Especie:</i>	<i>S. rebaudiana</i>
<i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>	

Fuente:(Daciw 2005)

4.1.2. Descripción Botánica.

Planta arbustiva de 40 a 80 cm de altura, perteneciente a la familia de las *Asteráceas*, crece en estado silvestre de forma aislada, la raíz es filiforme⁸, es perenne y forma abundante cepa que apenas ramifica y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie; es el único órgano de la planta que no

⁸ Filiforme se refiere a que tienen forma ó apariencia de hilo, fino y alargado.

contiene el esteviósido de acuerdo a lo expuesto por (De Vargas 1980). Se propagan asexualmente por esquejes⁹, preferiblemente en arena gruesa.

El tallo es anual, sub-leñoso, presenta pubescencias, con tendencia a inclinarse y es ramificado. Durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule¹⁰ después del primer ciclo vegetativo, llegando a producir hasta 20 tallos en 3 a 4 años. En su hábitat natural el tallo puede llegar hasta unos 0,90 metros. Aunque (Nuñez 2010) afirma que esta planta en el trópico puede alcanzar hasta 1,50 metros de altura.

Las hojas son elípticas o lanceoladas, pequeñas, simples, presentan disposición opuesta en sus estados juveniles y alternos cerca de floración, con borde dentado, verticilada¹¹, con tricomas. La hoja es el órgano con mayor contenido del edulcorante (Nuñez 2010).

Una planta tarda más de un mes en producir todas sus flores, en Paraguay florece en octubre, diciembre y marzo pero se clasifica como una planta de día corto, situando el fotoperiodo crítico en 12 - 13 horas según el ecotipo. La flor es hermafrodita pequeña y blanquecina, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas (Shock 1982). La polinización es entomófila¹², se dice que la planta es autoincompatible debido a que por lo general es protandria¹³ de tipo esporofítico y clasificada como apomíctica¹⁴.(Monteiro 1982).

El fruto es un aquenio¹⁵, diseminado por el viento. El género *Stevia* tiene más de 100 especies en el continente americano, de donde es originaria, pero *Stevia*

⁹ Esquejes o gajos son fragmentos de plantas separados con finalidad reproductiva. Pueden cortarse fragmentos de tallo e introducirlos en la tierra, para producir raíces.

¹⁰ Presenta varios tallos principales tan cortos que parecen no tenerlos.

¹¹ Conjunto de tres o más hojas, ramas u otros órganos que brotan de un tallo en el mismo nivel.

¹² Flores polinizadas preferentemente por insectos.

¹³ Maduración de las gónadas masculinas antes que las gónadas femeninas en organismos hermafroditas.

¹⁴ Las plantas *apomícticas* producen sus semillas sin que ocurra meiosis ni fertilización, por lo que sus descendientes son genéticamente idénticos a la planta madre.

¹⁵ Fruto seco e indehiscente que proviene de un único carpelo, con una sola semilla y con pericarpio no soldado a ella.

rebaudiana Bert. es la única especie con principios edulcorantes en las hojas (Grashoff 1972).

4.1.3. Ecotipos¹⁶

Se han encontrado 28 ecotipos diferentes para esta especie, (Mitsuhashi, Ueno y Sumita 1975). La diferenciación se realizó principalmente por sus características morfológicas. Al determinar el contenido de esteviósidos estos variaron entre 2,07 y 18,34% algunos ensayos practicados por (Sumida 1980) donde 22 variedades de *Stevia rebaudiana* Bert. fueron estudiadas para correlacionar varias características de la planta teniendo en cuenta la condición genética. Se observaron 11 características morfológicas y 6 características de contenido, de las cuales, solamente el peso seco de hojas mostró una baja correlación con la herencia.

4.1.4. Citología¹⁷

Estudios realizados por (Brucher, 1974), según (D. R. Taiariol 2011), revelaron que la planta es diploide, con 22 cromosomas, estudios de poliploidía¹⁸ identificaron variedades de alta calidad. La poliploidía puede resultar un buen método para obtener aumentos de productividad en términos de masa foliar y contenido de principio activo, reduciendo el área plantada aumentando el rendimiento de los mismos.

4.1.5. Clima

La región de donde es originaria la *Stevia rebaudiana* es un zonas subtropical, semihúmeda, con un promedio de precipitación 1.400 a 1.800 mm que se

¹⁶ Sub-población genéticamente diferenciada, la cual está restringida a un ambiente específico, a un ecosistema establecido o a un hábitat particular y que trabaja con límites de tolerancia a los factores ambientales.

¹⁷ La citología es la rama de la biología que estudia las células en lo que concierne a su estructura, sus funciones y su importancia. Viene del griego *kýtos* (célula).

¹⁸ La poliploidía se define como el fenómeno por el cual se originan células, tejidos u organismos con tres o más juegos completos de cromosomas de la misma o distintas especies o con dos o más genomas de especies distintas.

distribuye regularmente durante todo el año y temperaturas extremas que van desde -6° a 43°C , con promedio de 24°C . Según (Takahashi, Melges y Carneiro 1996) determinaron que la temperatura más apropiada para el desarrollo de la estevia es de 25°C y soporta temperaturas mínimas de 5°C . Según (Sumida 1980), la habilidad para resistir inviernos, aparentemente es determinada por la temperatura del suelo, e identifica que el rango crítico se encuentra entre 0 a 2°C ya que esquejes de 5 centímetros con 10 hojas soportaron temperaturas de -5°C por 70 minutos, lo que implica que las áreas potenciales de producción de la especie podría extenderse a latitudes mayores.

Una de las características ambientales de la planta es que se adapta muy bien a zonas húmedas, pero no a la sequía; (De Vargas 1980) afirma que esto se debe a que el sistema radicular es filiforme y perenne y forma abundante cepa que apenas ramifica y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie.

Algunos otros análisis como los de (Sakaguchi y Tatsuiko 1982) demuestran que la planta se desarrolla mejor donde los días son largos y hay más horas luz, con temperaturas tibias, riesgos mínimos de heladas luego de la brotación y sin períodos de larga sequía. Los fotoperiodos largos aumentan la longitud de los entrenudos, área foliar, peso seco y aceleran la aparición de hojas. La materia seca se reduce a la mitad con fotoperiodos, de días cortos. Azúcares, proteínas y esteviósidos aumentan tanto en valores absolutos como relativos en días largos.

4.1.6. Suelos

La *Stevia rebaudiana* es muy resistente a la variación en la calidad del suelo, (ver figura 3) en su estado natural, la planta crece en suelos tanto de baja fertilidad, ácidos, de tipo arenoso como hasta orgánicos y con alta humedad (Monteiro 1982). Otros investigadores como (Shock 1982), (Marico, y otros 1999) y (Bonilla, Sánchez y Perlaza 2007) recomiendan tierras areno arcillosos – humífera - ferruginosa o simplemente arena humífera. Se desarrolla bien en suelos colorados

del Alto Paraná. La tierra ideal es la areno-arcillosa con regular proporción de humus. Se adapta bien a suelos arcillosos con buen drenaje. Prospera bien en suelos de desmonte, no así en tierras recién desmontada, con mucha materia orgánica, por problemas de enfermedades (Central Cooperativa Nacional, LTDA "Credicoop" 1980). La planta crece naturalmente en suelos de pH 4-5, pero crece bien entre 6.5-7.5 siempre que no sean salinos (Pàmies 2007). En la figura 3 se observa el cultivo en suelos arcillosos bajo cobertura.



Figura 3. Cultivo de *Stevia rebaudiana* en suelos areno arcillosos. Fuente: Jairo Cuervo, 2011

4.1.7. Características agronómicas

La estevia es una especie que en cultivo puede durar entre 5 y 6 años, con 2 o 3 cortes anuales, el promedio a nivel mundial sobre el rendimiento anual de hoja seca oscila entre 1500 y 2500 kg/ha, en zonas secas y alrededor de 4300 kg/ha con riego controlado (Rivero y Casadiego 2011)

En Colombia, se presentan de 3 a 4 cosechas por año, aunque existen ensayos practicados por *Bioestevia S.A.* donde se han establecido hasta 5 cosechas por año generando un rendimiento de hoja seca entre 5500 y 6500 kg/ha disminuyendo el rendimiento para el tercer año.

Según distintos autores la densidad de plantación puede variar entre 20.000 a 150.000 pl/ha, en hileras sencillas, dobles o triples (figura 4). En las plantaciones que presentan altas densidades, se reduce el desarrollo de ramas laterales y el rendimiento en el peso seco por planta, aumentando así el número de plantas muertas luego de la cosecha (Sakaguchi y Tatsuiko 1982). Se estima que la densidad óptima de siembra es de 88.000 pl/ha, cálculo que se obtiene con distancias de 75 cm entre hileras y 15 cm dentro de la misma (Bonilla, Sánchez y Perlaza 2007).



Figura 4. Cultivo de *Stevia rebaudiana*. Fuente: Marco Antonio Sáenz Reyes, 2011

4.1.8. Propagación

Propagación sexual

Se reproduce sexualmente por aquenios, observándose alta heterogeneidad en las poblaciones resultantes. La planta es de polinización cruzada y gran parte de sus aquenios son estériles; son livianos y de fácil dispersión por el viento. La floración no es uniforme, lo mismo que la maduración de la semilla, siendo la recolección lenta y difícil. Para mejorar la calidad de las semillas se recomienda incorporar apiarios en la plantación. El porcentaje de germinación varía entre 10 y 38%. La longevidad de los aquenios es corta y ya a los 4 meses el potencial de

germinación se reduce un 40-70 %, después de 8 meses es casi nulo. Las semillas deben guardarse en condiciones de baja humedad, baja temperatura, preferentemente en la oscuridad y en envases herméticos (De Vargas 1980), (Daciw 2005), (Andolfi, Macchia y Ceccarini 2004) y (D. R. Taiariol 2011).

Propagación vegetativa

Esta especie puede propagarse vegetativamente por separación de estolones o embriones foliares. Este método sólo puede utilizarse para pequeñas plantaciones, ya que el número de mudas producidas es reducido. En la base del tallo, o bajo tierra, en la primavera temprana aparecen pequeños vástagos, muchos con sus respectivas raíces que pueden separarse y plantarse en el lugar definitivo (Jordán 1984).

Otra forma de propagación vegetativa es a través de estacas; método que convenientemente ajustado podría ser usado a escala comercial. De acuerdo a (D. R. Taiariol 2011), diferentes autores evidenciaron respuestas variables al utilizar estacas apicales o subapicales, con diversos sustratos, en distintas épocas del año y al incluir tratamiento rizogénico (De Vargas 1980), (Sumida 1980) y (Shock 1982).

(D. R. Taiariol 2011) Describe que “El cultivo de tejidos es otro método de propagación vegetativa que permite obtener plantaciones más uniformes”, además de la rápida multiplicación clonal. Propone la combinación de macro y micropropagación, las plantas micropropagadas se utilizan como banco de plantas madres y en sólo 3 ciclos de multiplicación (1 de micro y 2 de macropropagación), se lograría a partir de una sola planta, material para cultivar 3 ha (225.000 plantas).

4.1.9. Características Físico - Químicas

En la *Stevia rebaudiana* sus hojas contienen principios edulcorantes que han sido utilizados desde hace varios siglos, no solo por indígenas paraguayos, sino también por comunidades aledañas (Sumida 1980).

En la investigación desarrollada por los científicos franceses Bridel y Lavielle, 1931 cristalizaron el principio edulcorante y determinaron que es 300 veces más dulce que el azúcar y no posee efectos tóxicos al realizar pruebas de laboratorio con animales (R. D. Taiariol 2009). Este fue el inicio para el desarrollo de nuevas investigaciones que lograron establecer que el esteviósido es el edulcorante natural no nitrogenado más dulce que se ha encontrado hasta ahora en la naturaleza y que está compuesto únicamente de carbono, hidrogeno y oxígeno, siendo su fórmula $C_{38} H_{60} O_{18}$.

Más adelante, algunos investigadores del National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, determinaron la estructura química del esteviósido (figura 5), que resultó ser un glucósido diterpénico con un aglycon denominado esteviol (R. D. Taiariol 2009).

Posteriormente investigadores japoneses de las Universidades de Hiroshima y Hokkaido, identificaron otros principios edulcorantes en las hojas de Stevia tales como, Rebaudiósidos A, B, C, D y E, Dulcósidos A y B y otros de menor importancia. El rebaudiósido A es el que presenta mayor grado de dulzor aproximadamente 200 - 300 veces más dulce que la glucosa (Tamura, Nakamura, y otros, Comparison of Stevia plants grown from seeds, cuttings and stem-tip cultures for growth and sweet diterpene glucosides 1984). La Estructura del esteviósido se muestra en la *figura 5*.

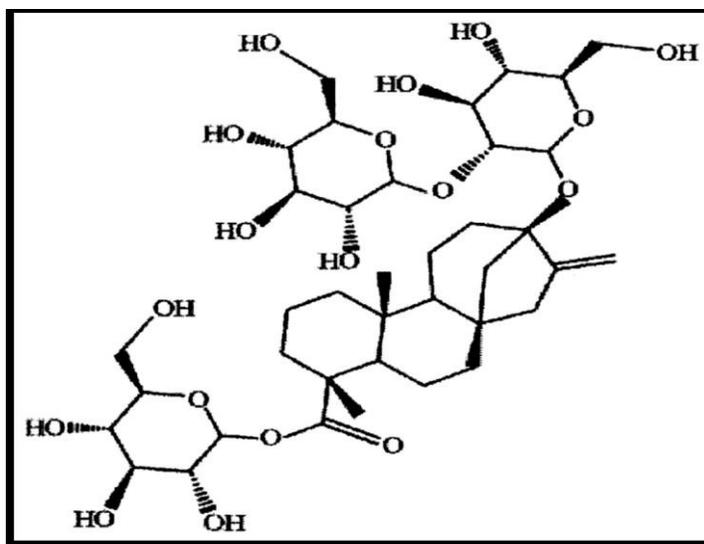


Figura 5. Estructura del esteviosido. Fuente: (Bravo A., y otros 2009)

En la tabla 3, se describe la estructura de esteviosido y compuestos relacionados.

Tabla 3. Estructuras de esteviosido y compuestos relacionados. Fuente: (Estevia, EUSTAS 2006)

	Nombre del Compuesto	R1	R2
1	Esteviol	H	H
2	Steviolbioside	H	β -Glc- β -Glc (2→1)
3	Stevioside	β -Glc	β -Glc- β -Glc (2→1)
4	Rebaudiósido A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc (3→1)
5	Rebaudiósido B	H	β -Glc- β -Glc(2→1)

			β -Glc (3→1)
6	Rebaudiósido C	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2→1) β -Glc (3→1)
7	Rebaudiósido D (Dulcósidos B)	β -Glc- β -Glc (2→1)	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc (3→1)
8	Rebaudiósido E	β -Glc- β -Glc (2→1)	β -Glc- β -Glc (2→1)
9	Rebaudiósido F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2→1) β -Glc (3→1)
10	Dulcósidos A	β -Glc	β -Glc- α -Rha (2→1)

De acuerdo con (EUSTAS, 2006) en los casos del rebaudiósido D y E en R1, están compuestos de 2 β -Glc- β -Glc(2→1), mientras que en los casos de los rebaudiósidos A, B, C, D, E y F en el grupo R2 una unidad adicional de azúcar se añade en el carbón 3 del primer β -Glc. En el rebaudiósido F un β -Glc se sustituye por una unidad - β -Xyl.

De acuerdo con esta misma entidad el esteviósido es un glucósido diterpenoide que es 300 veces más dulce que la sacarosa (solución 0.4 %). Esta es una sustancia 100 % natural y sin calorías. La biosíntesis de esteviol como se muestra en la figura 6, la aglicona de esteviósido, sigue el camino del 2-C-Metil-D-eritritol-4-fosfato, igual como ocurre con todos los terpenoides formados en los tejidos de las plantas. Hasta la formación del ent-kaurenato la síntesis de esteviol es similar al de las giberelinas (hormonas vegetales). En la Estevia está presente una 13-hidroxilasa que hidroxila el *ent*-kaurenato en su posición 13^a para dar lugar a esteviol. Esta es una hidroxilación única y es una desviación de la síntesis de la giberelina en la que el ent-kaurenato se hidroxila primero en la posición 7 α . Ver figura 6.

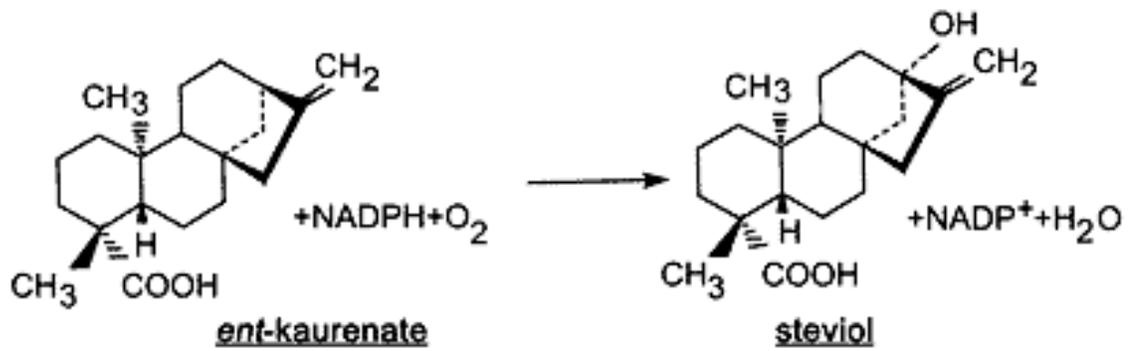


Figura 6. Síntesis de esteviol partiendo de *ent*-kaurenato por la hidroxilasa 13-*ent*-kaurenato Fuente: (Estevia, EUSTAS 2006)

En la figura 7 se puede observar cómo el esteviol formado es inmediatamente transglicosilado para dar lugar a esteviolmonósido, esteviolbíosido, esteviósido y rebaudiósido A.

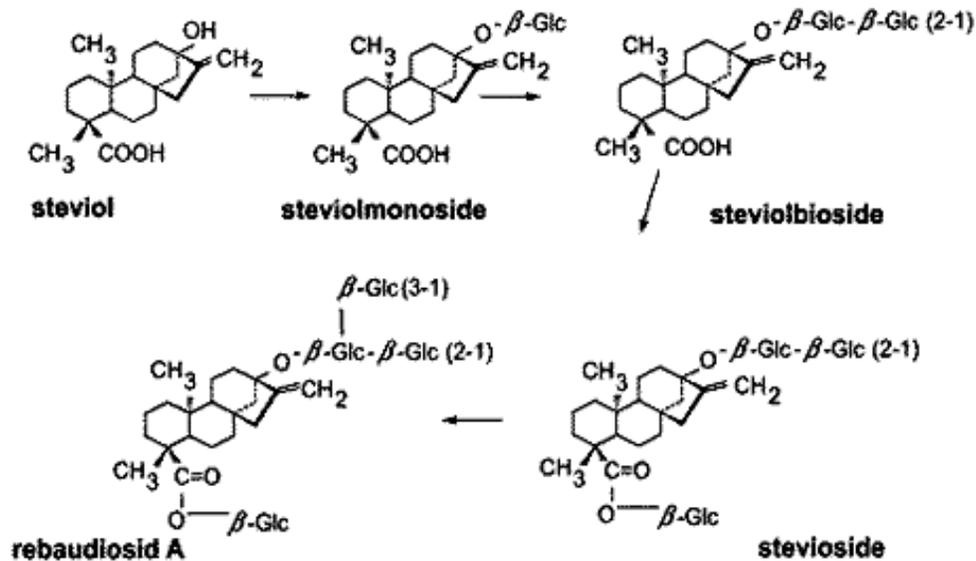


Figura 7. Transglicosilación de esteviol para formar esteviolmonósido, esteviolbíosido, esteviósido y rebaudiósido A. Fuente: (Estevia, EUSTAS 2006)

Según datos de EUSTAS, el contenido de edulcorantes en la hoja seca puede variar el peso de la hoja entre el 4% y el 20% dependiendo de la variedad y cuando se trata de las condiciones del terreno esta variación puede estar en el orden del 10% a 12%.

La rápida y amplia aceptación que ha tenido el esteviósido permitieron la inclusión de estevia en la dieta humana para ser utilizada como edulcorante de mesa, en la elaboración de dulces, bebidas, mermeladas, chicles, en pastelería, confituras, yogures, etc., sin que se hallan documentado efectos colaterales (Landázuri y Tigrero 2009). Algunas de las propiedades físico-químicas del esteviósido que han despertado mayor interés se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Propiedades físico-químicas del esteviósido

PROPIEDAD	CARACTERISTICA
Resistencia al calor	Presenta estabilidad a las temperaturas habituales en el procesado de alimentos. Se funde a 238 ° C.
Alteración del color	Alteración del color: no se observa oscurecimiento, aún en las condiciones más rigurosas de procesado de alimentos.
Solubilidad	Es altamente soluble en agua, alcohol etílico y metílico e insoluble en éter.
Resistencia al pH	Es suficientemente estable entre pH 3 a 9.
Contenido de calorías	No es metabolizado por el organismo, por lo tanto se convierte en no calórico, y es adecuado para usos dietéticos.
Capacidad osmótica	Presenta buenas propiedades osmóticas para la preparación de pikles dulces (Japón).
Fermentabilidad	No es fermentable, ni atacado por las bacterias orales. No es hidrolizable por <i>Aspergillus niger</i> , ni por el fermento seco de levaduras. Se hidroliza con ácido sulfúrico diluido y por diastazas.
Otras propiedades	Dentro de la medicina popular paraguaya se utiliza como hipoglicemiante (Miquel, 1977), digestivo, cardiotónico, diurético, antiácido, entre otros efectos (Jordán Molero, 1984; Yang et al, 1979).

Fuente:(Andolfi, Macchia y Ceccarini, Agronomic-productive Characteristics of Two Genotype of Stevia Rebaudiana in Central Italy 2004)

4.2. Método para la extracción del estevióside¹⁹.

El material vegetal seleccionado se seca, muele y tamiza en malla 200, posteriormente se realiza una extracción acuosa regulando el pH con CaCO_3 por 24 horas con agitación constante. (*Extracto Bruto 1*). Se filtra el extracto obtenido separando las partículas gruesas de las finas (*Extracto 2*), se adiciona $\text{Ca}(\text{OH})_2$ regulando el pH. Se realiza la filtración adecuada del extracto para eliminar impurezas realizando múltiples filtraciones (*Extracto 3*) y luego precipitándolo a un pH de 10 con H_3PO_4 al 2% para eliminar interferentes persistentes (*Extracto 4*). Se procede a la clarificación, usando carbón activado y en otros casos arcilla activada (extracto clarificado) con un pH 7,5 regulando con una temperatura máxima de 45 °C para los procesos en caliente. Finalmente, se purifica usando resinas de intercambio iónico, para su posterior cristalización.

4.3. Relación Planta - Factores Ambientales y posibles modelos de aplicación

La variación en los factores ambientales como la temperatura y la humedad del suelo pueden afectar considerablemente el contenido de nutrientes minerales en las hojas. Estos factores influyen en la disponibilidad y toma de nutrientes por las raíces y por lo tanto se evidencia en la tasa de crecimiento de la planta. Estos efectos son más fuertes en especies anuales de enraizado superficial que en especies perennes de enraizado profundo, debido a que presentan una mayor capacidad de absorción dentro de la zona radicular.

Las relaciones existentes entre las plantas y los factores ambientales se pueden perfilar por medio de modelos que permitan identificar las relaciones. A continuación se consideran para esta simulación los siguientes:

¹⁹ Método tomado de (Bravo A., y otros 2009)

4.3.1. Modelos empíricos

Los modelos matemáticos son herramientas que permiten hacer un pronóstico del comportamiento de algunos seres vivos. En el caso de los modelos aplicados, un modelo empírico por lo general es un modelo matemático simplificado del sistema, puede utilizar fórmulas derivadas empíricamente y casi siempre tiene pocas variables. La mayoría de los modelos de pronóstico de cosecha en función del clima, a nivel mundial son empíricos. Aunque estos modelos son útiles herramientas de análisis, tienen como inconveniente la falta de realismo y generalidad.

4.3.2. Modelos de procesos

Son también llamados simuladores dinámicos, estos permiten recrear todo tipo de contextos, generalmente se trata de ajustar la respuesta del cultivo a los siguientes factores:

- ✓ Meteorológicos, principalmente la disponibilidad de luz, calor y agua.
- ✓ Edáficos, principalmente la disponibilidad de nutrientes y agua, la presencia de elementos tóxicos y las características físicas de los suelos.
- ✓ Biológicos, principalmente insectos, las enfermedades y la competencia con otras plantas.

4.3.3. Modelos aplicados a los cultivos

Según (Dourado, y otros 1998) el desarrollo de modelos de cultivos aplicados se hace desde hace 65 años (Joyce y Kickert, 1987). La revisión muestra que en los últimos años, se han publicado varios de los modelos de cultivos. Peart y Barret (1976) presentan una revisión de los trabajos pioneros en el modelado de los cultivos, y ejemplos detallados de los esfuerzos de desarrollo de la simulación informática que buscan el manejo de los ecosistemas agrícolas.

Sakamoto y LeDuc (1981) presentan un panorama de la evolución histórica de los modelos de cultivos de parámetros meteorológicos. Getz y Gutiérrez (1982) describen unos pocos documentos históricos en el modelado de aplicar la fisiología de las plantas y su impacto en la teoría ecológica, la biología de las poblaciones y en el desarrollo de nuevas técnicas de gestión de recursos y modelos de los agro ecosistemas.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

El diseño metodológico de este estudio se sintetiza en el siguiente diagrama:

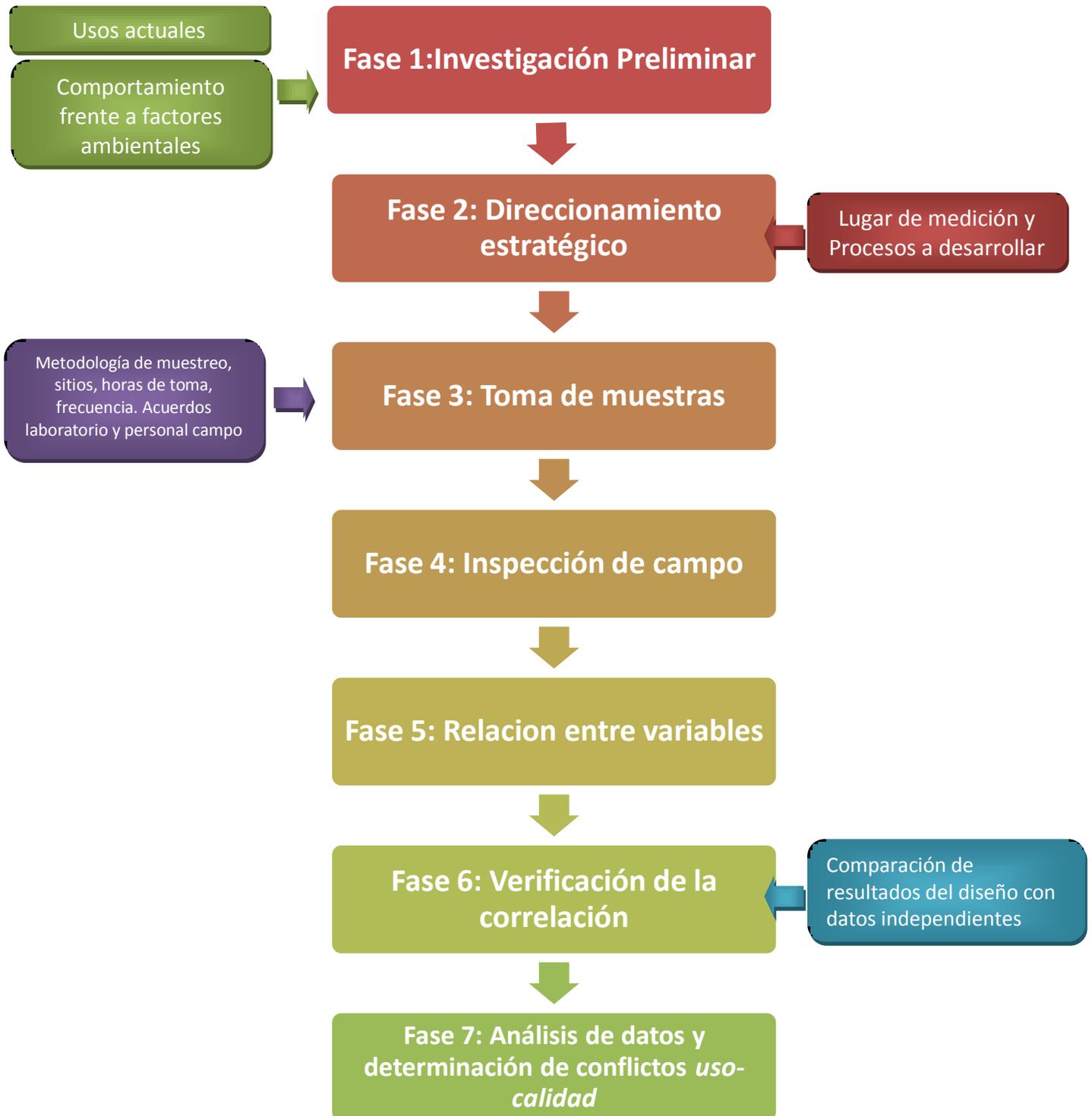


Figura 8. Esquema general del Diseño Metodológico

5.1. Fase 1. Investigación Preliminar

La investigación preliminar se realizó con el fin de determinar los tratamientos y las variables que se debían incluir en los experimentos. La validez de esta etapa la sustenta (Ramírez 2006) porque permite reunir datos de primera mano para contextualizar y delimitar el problema de investigación y así reunir suficiente información para realizar el diseño experimental.

En esta fase se determinaron las posibles relaciones que podían influir en el desarrollo vegetativo y aumentar los rendimientos del sistema de manejo para el cultivo de *Stevia rebaudiana* B. La falta de información llevó al investigador a realizar entrevistas a expertos que incluyeron:

1. Cultivadores de estevia y
2. Especialistas Profesionales en el tema

Los resultados permitieron establecer cuáles deberían ser las variables a considerar para el montaje de los experimentos y que no estaban descritas en investigadores anteriores.

Las preguntas que se diseñaron para la entrevista fueron:

1. ¿Qué características físicas presenta la especie?
2. ¿Cuáles son las características fisicoquímicas que realzan la importancia de la estevia?
3. ¿Cómo se alteran estas características fisicoquímicas?
4. ¿Quiénes están interesados en aprovechar dichas particularidades?
5. ¿La variación en los factores ambientales influyen en el desarrollo fisicoquímico de la planta?

Finalmente este diagnóstico preliminar incluyó una revisión documental para complementar la información y definir las variables a considerar.

El propósito de la investigación preliminar fue buscar información suficiente para determinar el alcance de la investigación, y obviamente reducir costos en dinero y esfuerzos, que son causados en la generación de ensayos para producir los datos susceptibles al análisis.

5.2. Fase 2. Direccionamiento estratégico

El método científico recurre a una secuencia de pasos aceptados y adoptados por la comunidad científica para dar validez a cualquier investigación. De acuerdo a la información preliminar obtenida se especifican los campos de conocimiento en los cuales no se han desarrollado investigaciones, para de esta manera direccionar los ensayos en busca de conseguir la información faltante para que el sistema propuesto sea *completado*, los beneficios de obtener la información faltante relacionan con los aspectos económicos que expresar en términos de dinero, además de algunos beneficios intangibles como los que tienen que ver con la generación de conocimiento disponible para tomar decisiones.

La revisión documental arrojó los aspectos que se debían considerar como variables para la realización del experimento. Los ensayos en vivero realizados en los invernaderos de la Universidad Nacional fueron:

- Evaluación de las necesidades de riego en el cultivo de la *Stevia rebaudiana* Bert.)
- Respuesta de estevia *Stevia rebaudiana* B. al estímulo con biofertilizantes.
- Identificación y manejo de las enfermedades predominantes en estevia (*Stevia rebaudiana* B.)
- Estudio de arvenses y análisis de crecimiento de estevia (*Stevia rebaudiana* B.),

Los diferentes ensayos corresponden a la metodología cuantitativa para comprobar los supuestos teóricos producto de la investigación documental y

análisis de la información. Se utilizarán herramientas estadísticas de acuerdo los resultados numéricos obtenidos en cada uno de los experimentos.

5.3. Fase 3. Toma de muestras

El plan para la recolección de los datos cuantitativos se realizó teniendo en cuenta cuatro aspectos fundamentales.

- Determinación de las fuentes
- Localización
- Método para recolectar los datos
- Matriz de datos.

En la medida que se siga el plan se minimiza la posibilidad de cometer errores al recolectar los datos.

No se puede olvidar que las mediciones de campo deben cumplir con una serie de requisitos para que entreguen la confiabilidad, la validez y la objetividad que se necesita.

5.3.1. Determinación de las fuentes

Las fuentes que se determinaron para el desarrollo del modelo fueron plántulas de *Stevia rebaudiana* variedad Morita II, por su adaptación a las condiciones locales. Los resultados previos arrojaron excelentes análisis de laboratorio, un promedio de 14% de glucósidos totales y 78% de Rebaudiósido A en la hoja.

5.3.2. Localización

Los experimentos se realizaron en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, ubicada a 4° 35' 46.34" N y 74° 4' 39.15" W y a 2640 msnm, en condiciones de invernadero, con temperatura media de 24°C y humedad relativa del 60%, para evaluar la época crítica de competencia de malezas y análisis de crecimiento de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.).

5.3.3. Método para recolectar los datos

Le recolección de datos se realizó en las diferentes fases por el investigador.

5.3.4. Matriz de datos.

El investigador siguió el plan para minimizar los errores al recolectar los datos. A cada ensayo se le diseñó la una matriz con el propósito de tomar los datos de manera ordenada.

5.4. Fase 4. Inspección de campo

La modelación predictiva exige que el modelador participe en la inspección detallada del sitio en el cual se desarrollaran los ensayos de campo, con el fin de conocer el sistema físico que será modelado. La inspección de campo permitió ajustar la toma de datos, para robustecer el modelo.

En la inspección de campo el modelador confirma el nivel de complejidad requerido del modelo y observará los procesos que deberá representar adecuadamente en el modelo tales relaciones entre los diferentes factores ambientales y el desarrollo vegetativo además si es posible realizar registros fotográficos de los diferentes procesos desarrollados.

En este estudio, como se afirmó anteriormente, la inspección de campo permitió ajustar la toma de datos para robustecer el modelo y determinar el nivel de complejidad requerido para el modelo además se observaron detalladamente los procesos que se deben representar en el modelo y precisar las relaciones que deben centrarse entre los diferentes factores ambientales y el desarrollo vegetativo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Fase 1. Investigación Preliminar

A continuación se presentan los resultados de la investigación documental la cual fue realizada de acuerdo con las recomendaciones de cultivadores y expertos logradas a través de las entrevistas. Primero se presenta una descripción de la planta y su actividad edulcorante, el efecto sobre la salud humana en modelos humanos y animales, las características organolépticas, la industrialización y la mejora de la producción; posteriormente, se realiza un recuento sobre los factores ambientales: agua requerida, radiación y temperatura, nutrientes; enfermedades que lo atacan, desarrollo vegetativo y condiciones de cultivo.

Aspectos Generales de la Planta

En esta revisión se presentan los siguientes aspectos: descripción de la planta de estevia, actividad edulcorante, efecto sobre la salud humana, características organolépticas, industrialización y mejora de la producción.

La *Stevia rebaudiana*, no es una especie vegetal muy llamativa por su fisionomía, su real importancia radica en que, en sus hojas, posee sustancias edulcorantes como lo documentan varios investigadores, entre ellos (De Vargas 1980), (Tamura, Nakamura, y otros, Comparison of Stevia plants grown from seeds, cuttings and stem-tip cultures for growth and sweet diterpene glucosides 1984), (Marico, y otros 1999) (Adam 2005), (Daciw 2005) y (Bravo, y otros 2009) entre muchos más. Se han encontrado esteviósidos, rebaudiósido A, B, C, D y E, Dulcósido A y B además de otros de menor importancia. El rebaudiósido A el que presenta el mayor grado de dulzor (aproximadamente 200 - 300 veces más dulce que la glucosa).

Todas estas características físico - químicas ha llevado a muchos científicos interesados en estas propiedades a establecer los efectos toxicológicos de la estevia en la eventual inclusión en la dieta humana; hay varios estudios que respaldan esta información, (Curi, y otros 1986) evaluaron los efectos del extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana*, determinando la tolerancia a la glucosa de 16 voluntarios sanos. Los extractos acuosos de 5 gramos de hojas de Stevia, se administraron a los voluntarios con intervalos regulares de 6 horas, durante 3 días. Los exámenes de laboratorio sobre los niveles de glucosa fueron realizados antes y después de recibir la dosis. Un segundo grupo de 6 voluntarios sanos ingirieron una solución acuosa con arabinosa²⁰ para tener una población base que mostrara resultados que permitieran eliminar los posibles efectos del estrés. Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron establecer que el extracto de *Stevia rebaudiana* generó una mayor tolerancia a la glucosa. El extracto disminuyó significativamente los niveles de glucosa plasmática durante la prueba.

Posteriormente, se generaron algunos cuestionamientos sobre la incidencia de la estevia en fertilidad de los seres humanos, para ello (Melis 1999) desarrolló algunas investigaciones en ratas jóvenes demostrando que la administración crónica durante 60 días del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana*, produjo una disminución en el peso final de los testículos, las vesículas seminales y el epidídimo. Además, se observó una gran disminución en la concentración de espermatozoides del epidídimo. El tratamiento con estevia reveló que la tendencia era disminuir el nivel de testosterona plasmática, probablemente por una supuesta afinidad de los glucósidos del extracto de un receptor de andrógenos. Estos datos permitieron afirmar que los extractos de estevia podría reducir la fertilidad de las ratas macho. Esta investigación prendió las alarmas a

²⁰ La Arabinosa es un azúcar de cinco carbonos con la función de aldehído llamado aldosa. No se metaboliza endógenamente y se elimina por la orina, en consecuencia niveles altos de arabinosa en orina pueden ser un buen indicador de infecciones por Cándidas

nivel mundial, ya que como se describió la *Stevia* se venía utilizando hace mucho tiempo; (Cardello, Da Silva y Damasio 1999) en su estudio propusieron dietas especiales para mitigar muchas enfermedades humanas, especialmente cuando estas dietas requieren cambios en el contenido de hidratos de carbono. Esta situación unida a que la gama de edulcorantes de bajas calorías disponibles para la industria alimentaria se estaba expandiendo con mucha rapidez, se hizo necesario tener un conocimiento exacto de la dulzura relativa de la estevia como alternativa de edulcorante. Este estudio determinó la variación en el dulzor relativo de aspartame (APM), el extracto de la *Stevia rebaudiana* (SRB) y el ciclamato / sacarina - dos partes de ciclamato y una parte de sacarina - (C / S) con el aumento de sus concentraciones, y en punto muerto y el pH ácido de la concentración de equidulce al 10% de sacarosa, con estimación de magnitudes. Los resultados fueron que la dulzura en equivalencia de SRB, en relación con las concentraciones de sacarosa al 20% o superior y de la APM y C/S a la sacarosa concentraciones de 40% o más, no se pudo determinar, debido a que un sabor amargo predominó. La potencia de todos los edulcorantes disminuyó a medida que el nivel de endulzante aumento. En la concentración equidulce de sacarosa a 10%, con pH 7,0 y pH 3,0, la potencia era prácticamente la misma para todos los edulcorantes evaluados.

(Cardello, Da Silva y Damásio 2003) evaluaron las propiedades sensoriales del aspartame, del extracto de hojas de estevia y de la mezcla ciclamato / sacarina (2:1) en soluciones con dulzor equivalente a sacarosa al 10%, a través del análisis descriptivo y del análisis tiempo-intensidad para los gustos dulce y amargo. En el análisis descriptivo se evaluaron los atributos dulzor inicial, dulzor residual, amargo inicial, amargo residual, sabor a regaliz y cuerpo, siempre, utilizando escalas no estructuradas de 9 cm. Los parámetros obtenidos de las curvas tiempo-intensidad, fueron: intensidad máxima, tiempo para alcanzar la intensidad máxima, tiempo correspondiente al punto donde la intensidad máxima comenzaba a declinar, tiempo de duración de la intensidad máxima, área bajo la curva y tiempo total de duración del estímulo. Los resultados obtenidos en los dos tipos

de análisis coincidieron en que, el edulcorante con características más similares a la sacarosa fue el aspartame y el que más se diferenció fue la estevia.

Aunque los estudios demostraban que la *Stevia* poseía características importantes que llamaban la atención del sector industrial, no dejaba de preocupar el hecho que consumirla en grandes cantidades podía afectar el sistema reproductivo del hombre. La investigación realizada por (Chang, y otros 2005) analizó la resistencia a la insulina en las ratas tomando el esteviósido, que es uno de los glucósidos contenidos en las hojas de *Stevia* y se utilizó para detectar el efecto inducido en una dieta que contenía 60% de fructosa. La administración se realizó de manera oral por 90 min disminuyendo las concentraciones de glucosa, otras ratas recibieron comida rica en fructosa durante cuatro semanas. Además la acción de la insulina sobre la tasa de glucosa, se midió con el índice de glucosa-insulina, determinando el producto de las áreas bajo la curva, de glucosa e insulina durante la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal²¹. La administración oral de esteviósido (5,0 mg / kg) en ratas que recibieron cuatro semanas de comida rica en fructosa durante 90 minutos, invirtió el valor del índice de glucosa-insulina, lo que indicó que el esteviósido tenía la capacidad de mejorar la sensibilidad a la insulina. Igualmente se estableció que el tiempo de la pérdida de glucosa en plasma, bajaba la respuesta a la tolbutamida (10,0 mg / kg, IP), lo que permitió también realizar estudios para determinar diferentes niveles de secreción endógena de insulina. Los resultados obtenidos arrojaron que la administración oral repetida de esteviósido retrasó el desarrollo de resistencia a la insulina en las ratas con una dieta alta en fructosa. Por otra parte, aumentó la sensibilidad de insulina por el esteviósido administrado, además se identificó con la disminución de la glucosa plasmática, la acción de la insulina exógena inducida por estreptozotocina - ratas diabéticas (STZ-ratas diabéticas). La administración oral de esteviósido a 0,2 mg / kg tres veces al día en ratas diabéticas STZ durante diez días, aumentó la respuesta a la insulina exógena. En conjunto, está demostrado

²¹ Dentro de la cavidad peritoneal (el área que contiene los órganos abdominales). También se llama IP

que la administración oral de esteviósido mejora la sensibilidad a la insulina, y parece adecuado como un adyuvante para los pacientes diabéticos y / o aquellos que consumen grandes cantidades de fructosa. Además, se determinó que los niveles la administración crónica durante 60 días del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana*, en condiciones comparativamente normales, no produjo alteraciones en el peso final de los testículos, las vesículas seminales y el epidídimo.

Estos resultados abren las posibilidades para elevar el interés de utilizar la *Stevia* en diferentes productos alimenticios (Klepsch 2009); las directivas del Parlamento Europeo mediante la solicitud 94/35/CE y al Consejo encargado de los productos alimenticios en la región (versión consolidada, 1994) solicitan permiso para su producción. Todo este proceso, requirió la aprobación de la EFSA²², el JECFA²³ o la aprobación de la FDA²⁴, e incluyó una solicitud para el régimen excepcional en el territorio de Francia según la directiva 89/107/CEE. Además se amplía la solicitud realizada por Alemania en 2007 para que la estevia sea utilizada como un nuevo alimento o ingrediente alimenticio.

La respuesta a esta solicitud fue la emisión del pliego de condiciones expresado en términos del ingreso al listado de nuevos alimentos, incluidos los estudios toxicológicos y con respecto a la posible utilización del esteviósido por la industria de alimentos: “El esteviósido debe aislarse en un proceso de varias etapas (secado, maceración, precipitación, decoloración y cristalización) además se recomienda que la cosecha las hojas de *Stevia*, se realice en el marco de las especificaciones del JECFA y que estas deben tener una pureza de esteviósido de al menos el 95%”. Aunque la industria publicita las propiedades de la *Stevia rebaudiana*, no siempre el consumidor obtiene el producto que espera debido a la

²² European Food Safety Authority (EFSA)

²³ Aunque oficialmente no forma parte de la estructura de la Comisión del Codex Alimentarius, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, estos, proporciona un asesoramiento científico independiente a la Comisión.

²⁴ Food and Drug Administration (FDA)

cantidad de esteviósidos contenidos por las malas prácticas en el proceso de extracción del esteviósido.

El desarrollo de productos bajos en calorías, especialmente en las bebidas no alcohólicas (Matthias 2010) resalta la importancia de la estevia en comparación con el edulcorante artificial utilizado actualmente. Con el uso del esteviósido se busca fundamentalmente satisfacer las expectativas de gusto de los consumidores porque presenta diferencias fundamentales en comparación con otros edulcorantes de alta intensidad o de azúcar con respecto a los registros de tiempo / perfil de dulzor, en relación con el inicio retrasado de forma significativa del efecto de la dulzura y además de un sabor persistente. El investigador propone que el punto de partida para las estrategias de optimización debe surgir de la composición de los respectivos productos de estevia, así como de su pureza. Estudios realizados por (Kroyer 2010) evalúan la estevia en las bebidas gaseosas y muestra que presenta una alta estabilidad, por lo tanto se establece que hay aplicaciones industriales aceptables considerando estos resultados.

Las características de edulcorante natural (esteviósido) de la estevia según (Volker y Huber 2010) se potencian con su efecto farmacológico benéfico relacionado con su acción sobre el azúcar en la sangre humana y la presión arterial. Es el primer edulcorante natural con propiedades medicinales.

Las restricciones éticas para investigar en modelos animales llevan a (Atteh, Onagbesan, y otros 2011) a estudiar el perfil nutricional de hojas y tallos de *Stevia rebaudiana* y su potencial empleo, en un modelo animal. Las hojas y tallos de estevia tienen 16% y 6,7% de proteína bruta y bajo contenido de grasa (2,6 y 1,1%) respectivamente. La grasa extraída mostró un predominio de ácidos grasos insaturados (65,8% para hojas y 71,4% en tallos). El ácido graso más abundante en la hoja fue el linolénico (36%) y en el tallo, el linoleico (38%). La fibra bruta sobre materia seca sin grasa correspondió al 6,8% para hojas y 45,4% para tallo. El contenido de K de hojas y tallos fue similar, la concentración de Ca, Mg, Fe,

Cu, Zn, Mn fue mayor en las hojas y al contrario para Na. Las pruebas con broilers establecieron que los valores de energía aparente, corregida para N y metabolizable verdadera, fueron 2113, 2098 y 2223 Kcal/kg en hojas, y 1573, 1554 y 1675 Kcal/kg en tallos respectivamente. La retención de proteína foliar y de los tallos por los broilers fue 63 y 65,7% respectivamente. El contenido de esteviósido de las hojas fue 6,5% y el de rebaudiósido A de 2,3%. Los valores correspondientes para los tallos fueron 0,69% y 0,3%. Estos resultados demostraron que las hojas de *Stevia rebaudiana* contienen otros atributos nutricionales además de la alta concentración de glucósidos (esteviósido y rebaudiósido A).

Otras investigaciones tuvieron como objetivo mejorar la calidad de los procesos productivos y la transformación de los productos obtenidos a partir de la Stevia rebaudiana, e incluyeron estudios concernientes al análisis del desarrollo vegetativo con relación a los diferentes factores ambientales. Estos estudios son un modelo específico de intervención del hombre en la naturaleza, con fines de producción de materia prima y alimentos. El investigador los organizó de acuerdo con la importancia que pueden tener estos factores en la producción.

Agua

Cada especie vegetal necesita un riego específico, de hecho, es tan importante la cantidad y frecuencia de agua que se le debe aplicar, como la forma de hacerlo, para poder tener las plantas en buenas condiciones. La determinación de las necesidades de agua de los cultivos es el paso previo para establecer los volúmenes de agua que serán necesarios aportar en el riego, para esto es necesario determinar el coeficiente de cultivo (Kc) que según (Ometto 1981) se describe como las variaciones en la cantidad de agua que las plantas extraen del suelo a medida que se van desarrollando, desde la siembra hasta la recolección. Por esta razón es importante establecer en primera medida la evapotranspiración,

que de acuerdo a lo expresado por (González, Paniagu y Mayeregger 2002) , adjuntando al microlisímetro²⁵ un pluviómetro y un sistema de detección de evapotranspiración potencial es posible determinar los coeficientes del cultivo.

En la investigación efectuada por (González, Paniagu y Mayeregger 2002) se determinó el coeficiente de cultivo (Kc) para la *Stevia rebaudiana* determinado por medio de microlisímetros y se obtuvo valores de evapotranspiración del cultivo de referencia por medio del tanque evaporímetro Clase A. Con estos datos se determinó el valor del Kc en diferentes etapas del desarrollo vegetal. Fueron aplicados 4 niveles de riego por goteo, correspondientes a 60, 80, 100 y 120% del valor observado en el microlisímetro, para verificar el efecto de diferentes cantidades de agua en la productividad del cultivo. Se utilizó además un experimento en fajas, donde se realizó un muestreo dentro de cada nivel de riego. Las variables analizadas fueron altura de plantas, masa verde y masa seca. Las conclusiones fueron que los valores del Kc fueron de 0.25, 0.56 y 0.82 para los periodos comprendidos entre el corte de uniformidad hasta los 20 días después de este; entre los 21 y 46 y entre los 47 y 70 días después de dicho corte, respectivamente; la altura de la planta puede ser utilizada como un estimador de la masa verde y seca del cultivo.

Posteriormente (Diniz y Folegatti 2003), elaboraron un estudio sobre las necesidades de agua de los cultivos de *Stevia rebaudiana* en las diferentes etapas de desarrollo vegetativo para obtener un mejor rendimiento y mejorar el uso de los recursos hídricos. Este estudio se realizó en Italia, con dos microlisímetros con el nivel de agua constante. Se documenta que los datos de evapotranspiración se recogieron diariamente durante el período junio 1º, al 22 de octubre del 2002. La evapotranspiración de referencia se determinó por el método de Penman – Monteith – FAO, durante el mismo período. El nivel del agua en dos microlisímetros se mantuvo a 35 cm de la superficie del suelo. La

²⁵ Microlisímetro dispositivo introducido en el suelo, relleno con el mismo terreno del lugar y con vegetación. Es utilizado para medir la evapotranspiración de referencia (ET_o) o del cultivo (ET_c).

evapotranspiración del cultivo durante todo el ciclo fue de 464 mm. Los valores medios de la evapotranspiración de la fase de mayor consumo, o la etapa final, fueron 5,44 mm/día. Los valores del coeficiente de cultivo fueron 1,45 para la fase inicial, 1,14 a 1,16 para la fase intermedia y final del desarrollo del cultivo. Los rendimientos de las hojas en el cultivo fue 4.369 kg/ha y el contenido de esteviósido de 6,49%.

Radiación y Temperatura

El crecimiento del cultivo de estevia está determinado en primer lugar por la cantidad de radiación solar que puede interceptar y usar durante su ciclo vegetativo. Un exceso de radiación raramente es un problema, siempre que estén disponibles el agua y los nutrientes. Para obtener rendimientos altos, las hojas deberán crecer y cubrir la superficie del suelo tan pronto como sea posible después de la siembra. Si este proceso se demora, la radiación solar se pierde en forma de calor incorporado al suelo desnudo, evaporando la humedad del suelo.

También la temperatura afecta la tasa de desarrollo de la planta a través de sus diferentes etapas de desarrollo vegetativo además de la producción de hojas, tallos y otros componentes. Todos los procesos fisiológicos de la planta ocurren más rápidamente a medida que la temperatura aumenta entre una temperatura base y una temperatura óptima

Basados en estas premisas (Takahashi, Melges y Carneiro 1996) evaluaron el rendimiento de germinación de las semillas de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) bajo el estímulo de tres (3) niveles de temperatura este experimento se realizó en un vivero donde las eras de germinación se encontraban reguladas a los 20, 25 y 30°C; las mediciones se realizaron con intervalos de 12 horas, se combinaron con el modelo de distribución de Weibull acumulativo. Se observó que el mejor desempeño se produjo a 25°C, la germinación fue 101:36, 63,21% del máximo observado, lo que equivale a 90,29%. El rendimiento del modelo ajustado se acercaba a la linealidad de la temperatura de 20 ° y 25 ° C y bastante cerca de la

linealidad de la temperatura de 30 ° C y en este caso, el último parámetro tuvo un rendimiento asimétrico e inestable.

Posteriormente, Jarma *et al.* (2006), evaluaron el efecto de cuatro niveles de radiación incidente sobre el crecimiento de *Stevia rebaudiana* bajo condiciones climáticas del valle del Sinú (Colombia). Se realizó por medio de un diseño completamente al azar con arreglo factorial, en el que los factores fueron niveles de radiación incidente (19%, 24%, 56% y 100%) y genotipos de estevia ('Morita 1' y 'Morita 2'). En los resultados se pudo observar que 'Morita 2' expuesta a 100% de radiación incidente, presentó la máxima tasa absoluta de crecimiento (TAC), dicho efecto se le atribuyó a la ventaja genética de esta variedad que le permitió realizar mayor fotosíntesis. La tasa relativa de crecimiento (TRC) para los niveles sombreados (19% y 24%), fue alta en ambos genotipos al inicio del ciclo; una vez terminada esta etapa, las radiaciones altas generaron mayores incrementos en la TRC. La mayor tasa de asimilación neta (TAN) la presentó 'Morita 2' expuesta a 100% de radiación incidente, sugiriendo mayor eficiencia en la producción diaria de biomasa por cada centímetro cuadrado de superficie foliar.

Basándose en estos resultados (Jarma Orozco, Cardona Ayala y Alarcón 2009) examinaron las temperaturas y luz como los dos factores más importantes que regulan el crecimiento y la síntesis de muchos metabolitos secundarios en plantas; además la *Stevia rebaudiana* se caracteriza por poseer glucósidos de diterpeno que pueden ser hasta 300 veces más dulces que la sacarosa, sintetizados en la misma ruta de las giberelinas, por lo que factores como luz y temperaturas, que afectan la síntesis de la hormona, también tienen un efecto importante sobre la síntesis de los glucósidos. La investigación se realizó en Montería-Córdoba, durante tres épocas de siembra entre 2007 y 2008 (E1, E2 y E3), para determinar el efecto de la Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA) y las temperaturas máximas (T_{max}) y mínimas (T_{min}), sobre la concentración de los principales glucósidos (GT) de los genotipos Morita 1 (M1) y Morita 2 (M2). Para el estudio se utilizó un arreglo factorial de 3 (épocas) x 2 (genotipos) con 12

repeticiones bajo un diseño experimental completamente al azar. Se observó que los genotipos variaron en función de la época de siembra; los efectos de la RFA y las temperaturas indicaron que existe una correlación positiva ($p \leq 0.05$) entre estos y la síntesis de GT para M1; en M2 la RFA también afectó positivamente la concentración de GT, pero no las temperaturas. Los aumentos en la concentración de GT fueron determinados por aumentos del esteviósido (St) pero no del rebaudiósido A.

Nutrientes

Para su nutrición, las plantas toman a través de sus raíces, los minerales disueltos en el agua del suelo, y a través de sus hojas obtienen dióxido de carbono (CO_2) de la atmósfera. Estos componentes son transformados en alimentos para la planta. (Utumi, y otros 1999) examinaron la deficiencia de macro nutrientes en la *Stevia rebaudiana*, estableciendo cuales son los síntomas visuales, los efectos sobre la composición química, crecimiento, y la producción de esteviósido. Dicha investigación estableció que las características físicas varían de la siguiente manera, cuando las hojas presentan coloración amarillentas es debido a la disminución en presencia de Nitrógeno (-N), cuando las hojas se tornan de color verde oscuro se debe a la disminución del fosforo (-P), las hojas con clorosis²⁶, bronceado y necrosis, la relacionan con altos niveles de potasio (K), cuando existe necrosis apical, con disminución del calcio (-Ca), cuando se presenta clorosis y necrosis, en forma "V" invertida, la relacionan con la deficiencia de magnesio (Mg) y hojas jóvenes de color verde pálido mientras que las hojas viejas se mantiene de color verde oscuro, se le atañe a la disminución del azufre (-S). Las deficiencias de N, K y Mg redujeron el crecimiento de las hojas, mientras que la deficiencia de Mg hizo que se presentara un menor desarrollo de las raíces. Las carencias de N, P y K disminuyó la proporción de materia seca de tallos y raíces.

²⁶ Clorosis, condición fisiológica anormal en la que follaje produce insuficiente clorofila. Cuando esto ocurre, la coloración de las hojas se tornan verde pálido, amarillo ó amarillo blanquecina

Todas las deficiencias, se reflejaron en la disminución de la absorción de los otros nutrientes, con excepción de Ca, aunque cuando se presentó deficiencia en el Ca disminuyó la absorción de únicamente del potasio K. Todas las insuficiencias, con excepción del fósforo (P) disminuyeron la concentración de esteviosido.

Algunas investigaciones desarrolladas por (Bonilla, Sánchez y Perlaza 2007) permitieron la evaluación de métodos de propagación, fertilización nitrogenada y fenología de estevia en condiciones propias del Valle del Cauca (Colombia). Se evaluó si las estacas apicales y basales de *Stevia rebaudiana* se desarrollaban en tres sustratos de enraizamiento (carbonilla-arena, carbonilla-compost y arena-compost) y tres fuentes de nitrógeno (urea 46%N, compost 1.5%N y gallinaza 1% N). Se obtuvo como resultado que el método de propagación que se desarrolló de mejor manera fue la estaca apical en sustrato carbonilla-arena con la relación 1:1; las fuentes de nitrógeno no presentaron diferencias significativas en la acumulación de materia seca de las hojas.

Investigaciones en las que se evaluó la respuesta de la *Stevia rebaudiana* a la aplicación foliar de algunos fitoestimulantes orgánicos como la de (Pincha y Suquilanda Valdivieso 2008) en la que aplicaron: abono de frutas²⁷, purín de hierbas²⁸ y Newfol Plus²⁹ en tres dosis baja, media, y alta; más un testigo con una fertilización base, con un diseño de Bloques completamente al azar, con un arreglo factorial 3 x 3 + 1 y análisis de experimentos en serie, con cuatro repeticiones. Las variables evaluadas fueron: altura de planta, incidencia de plagas, rendimiento, capacidad de regeneración y análisis económico. Los principales resultados establecieron que: el fitoestimulante que obtuvo mejor

²⁷ Preparado que resulta de la maceración y prensado de frutas maduras y melaza.

²⁸ Líquido obtenido a través de la fermentación de hierbas, restos vegetales y/o estiércol.

²⁹ Formulacion especialmente diseñada para uso foliar y radicular, proviene de la hidrólisis enzimática de órganos y tejidos animales que tienen como base principal los aminoácidos (todos ellos de tipo L), nucleótidos, péptidos y polinucleótidos de bajo peso molecular y principios inmediatos.

respuesta en todas las variables fue purín de Hierbas. La dosis media (2.5ml/litro) alcanzó mejores resultados para altura de planta con 27.27cm, y rendimiento de materia seca con 3.44 tm/ha. Los resultados de la capacidad de regeneración del cultivo de estevia se obtuvieron en el tratamiento f2d3 (Purín de Hierbas + dosis alta, 3.0ml/litro) con 25.37 brotes/planta. No existió incidencia significativa de plagas en el cultivo de estevia. El análisis económico estableció que la mejor respuesta fue para la interacción purín de hierbas con la dosis media (2.5ml/litro).

Enfermedades y plagas

Las plantas son atacadas por muchas plagas, insectos y microorganismos (infecciones bacterianas o víricas además de las producidas por el ataque de hongos, que suponen el 95% de las enfermedades).pero también pueden enfermarse por carencia de alguna vitamina. (Urango y Campo Arana 2010) Identificaron las enfermedades predominantes en Estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) y albahaca (*Ocimum basilicum* lin) en san Isidro Córdoba (Colombia). Se efectuaron ensayos durante cuatro meses describiendo los síntomas e identificando los diferentes agentes causales. En la estevia se presentó la muerte de plantas encontrándose asociada con los hongos *Sclerotium* sp³⁰, *Fusarium* sp³¹ y el Nematodo *Pratylenchus* sp³². En el follaje se encontraron Manchas foliares ocasionadas por *Alternaria* sp³³. En el estudio se concluyó que las enfermedades más limitantes son las producidas por hongos. En la tabla se presentan las enfermedades de *Stevia rebaudiana* (Bertoni).

³⁰ Hongo que vive en el suelo. La incidencia de la misma ocurre principalmente durante la época de lluvia y en siembras establecidas bajo riego en zonas de altas temperaturas. En el cultivo enfermo se observa una pudrición del sistema radicular y cuello de la planta, que se extiende por el tallo.

³¹ Hongo que coloniza los conductos xilemáticos de la planta; bloqueando y tapando los vasos, lo que determina la aparición de síntomas de marchitamiento de hoja, amarilleo y eventualmente necrosis y muerte total de la planta.

³² Endoparásitos migratorios que colonizan los tejidos del cortex de la raíz y el rizoma, en cuyos tejidos se nutren y multiplican.

³³ Hongo ascomiceto. Agente activo de la descomposición. Las esporas se distribuyen de una en una, o en largas cadenas, y pueden crecer en colonias visibles, de color negro o gris.

Tabla 5. Reporte de enfermedades en *Stevia rebaudiana* (Bertoni)

Enfermedad	Patógeno	Ataca	Referencia
Pudrición del cuello	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Raíz, Tallos y Hojas	Canadá (Chang <i>et al</i> , 1997). Paraguay (Orrego, 2001). Jarma <i>et al.</i> , 2008
Tizón - Marchitamiento	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Raíz, Tallos y Hojas	Egipto (Hilal y Baiuomy, 2006) India (Kamalakkanan <i>et al</i> , 2006). Paraguay (Orrego, 2001). Tamayo, 2006 Jarma <i>et al.</i> , 2008
Pudrición de la raíz - Marchitamiento	<i>Rhizoctonia sp</i>	Raíz y Tallo	Paraguay (Orrego, 2001). Alvarado A. y Ochoa L., 2008
Pudrición de la raíz - Marchitamiento	<i>Rhizoctonia solani</i>	Raíz y Tallo	Egipto (Hilal y Baiuomy, 2006) Tamayo, 2006
Marchitamiento Muerte descendente	<i>Fusarium sp.</i>	Raíz y Tallo	Ecuador (Landazuri y Tigrero, 2009) Paraguay (Orrego, 2001). Campos, 2008 Jarma <i>et al.</i> , 2008 , Alvarado A. y Ochoa L., 2008 y Silvia <i>et al</i> , 2007
Pudrición de la raíz causada	<i>F. oxysporum</i>	Tallo	Egipto (Hilal y Baiuomy, 2006)
Pudrición de la raíz causada	<i>F. semitectum</i>	Raíz	Egipto (Hilal y Baiuomy, 2006)
Machan foliar Manchas necróticas	<i>Alternaria steviae</i>	Hojas y Tallos	Egipto (Hilal y Baiuomy, 2006), Japón (Ishiba C., Yokoyama T. y Tani T., 1982) India (Maiti C.K. <i>et.al</i> , 2006) Paraguay (Orrego, 2001).
Machan foliar Manchas necróticas	<i>Alternaria sp.</i>	Hojas y Tallos	Jarma <i>et al.</i> , 2008
Moho gris	<i>Botrytis cinérea</i>	Tallo	Egipto (Hilal y Baiuomy, 2006), Italia, Ucrania, Japón (Garibaldi <i>et al.</i> , 2008), Paraguay (Orrego, 2001). Jarma <i>et al.</i> , 2008
Podredumbre carbonosa	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Raíz y Tallo	Egipto (Hilal y Baiuomy, 2006)
Machan foliar	<i>Cercospora sp.</i>	Hojas	Ecuador (Landazuri y Tigrero, 2009) Jarma <i>et al.</i> , 2008
Manchas necróticas	<i>Septoria sp.</i>	Hojas	Ecuador (Landazuri y Tigrero, 2009) Japón, Canada (Ishiba C., Yokoyama T. y Tani T., 1982) Paraguay (Orrego, 2001). Campos, 2008 y Alvarado A. y Ochoa L., 2008
Chancros	<i>Botryodiplodia sp</i>	Tallo	Paraguay (Orrego, 2001).
Chancros	<i>Phlyctaena sp.</i>	Tallo	Paraguay (Orrego, 2001).
Chancros	<i>Phomopsis sp.</i>	Tallo	Paraguay (Casaccia J. & Álvarez E. 2006), (Orrego, 2001)
Chancros Antracnosis	<i>Colletotrichum sp.</i>	Tallo	Ecuador (Landazuri y Tigrero, 2009) Paraguay (Orrego, 2001). Jarma <i>et al.</i> , 2008 Alvarado A. y Ochoa L., 2008
Chancros	<i>Curvularia sp.</i>	Tallo	Paraguay (Orrego, 2001). Campos, 2008 Jarma <i>et al.</i> , 2008
Pudrición oscura Aborto	<i>Aspergillus. Sp.</i>	Flores	Paraguay (Orrego, 2001).
Pudrición oscura Aborto	<i>Cladosporium sp.</i>	Flores	Paraguay (Orrego, 2001).
Cenicilla	<i>Oidium sp.</i>	Hojas	Tamayo, 2006

Fuente: (Cuervo, Parra Cortes y Rivera Sandoval 2010)

Desarrollo Vegetativo

El desarrollo vegetativo se determina por conjunto de crecimiento y diferenciación celular de las plantas que está regulado por la acción de diversos compuestos, dentro de los que se destacan carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y hormonas. El proceso de crecimiento y diferenciación se alterna durante todas las etapas de vida de la planta, desde el desarrollo del embrión, pasando por la etapa juvenil hasta la planta adulta en donde continuamente se están diferenciando apéndices tales como hojas, flores y frutos. Las investigaciones anteriores han establecido la importancia de las fitohormonas, en el proceso de desarrollo vegetal, al inducir respuestas fisiológicas específicas y rápidas del desarrollo cuando se introducen en plantas. El efecto de varios de los otros compuestos como azúcares, lípidos y vitaminas en el desarrollo vegetal es menos directo, por lo que no tienen alta capacidad para modificar procesos de manera inmediata (García 2004).

Con el propósito de establecer un línea base y la ruta a seguir en el mejoramiento genético de estevia, (Brandle, y otros 1974) desarrollaron las etiquetas de secuencias expresadas (EST)³⁴, ya que las hojas producen altas concentraciones de diterpeno y debe ser una fuente rica de las transcripciones de la síntesis diterpeno. Con el fin de crear un recurso para el descubrimiento de genes y aumentar la comprensión de la biosíntesis de esteviol glucósidos, se secuenciaron 5548 TER de una hoja de *Stevia rebaudiana* biblioteca de la DNA.

Tecnologías ecológicamente racionales implicadas en la síntesis diterpeno se identificaron mediante secuencias publicadas como sondas electrónicas. Una parte significativa de la EST eran específicas para el estándar de las vías metabólicas de la hoja, la energía y el metabolismo primario representaba el

³⁴ Etiquetas de secuencia expresada ó *expressed sequence tags* son pequeños segmentos secuenciados a partir de los extremos de clones de ADN complementario (ADNc). Una EST se obtiene mediante una sola secuenciación automática y parcial de uno de los cientos de clones seleccionados al azar de una genoteca de ADNc. Las EST sirven para descubrir genes desconocidos, mapear un genoma o identificar las regiones codificantes de éste. Véase physical map.

17,6% y 13,1% de las transcripciones totales, respectivamente. Metabolismo de diterpeno en *Stevia rebaudiana* está representado por el 1,1% del total de las transcripciones. Este estudio identificó genes candidatos para el 70% de los pasos conocidos en la vía glucósido estevioli.

En estudios posteriores, (Tamura, Nakamura, y otros 1984) se examinaron los glucósidos en la estevia, propagada por esqueje³⁵ comparada, con plantas testigo propagada por semillas. Como resultado se obtuvo que no existieron diferencias significativas entre los dos grupos tanto en el crecimiento como en la composición química. En cuanto a los contenidos de glucósidos, la diferencia no fue significativamente apreciable. Estos resultados sugieren que la propagación clonal por esquejes es el método eficaz para la obtención de una población de plantas uniformes.

(Ferreira y Handro 1988) describen un método para producir y mantener las suspensiones de *Stevia rebaudiana* y la regeneración de plantas a partir de callos derivados de suspensiones celulares³⁶. Las colección de suspensiones de células que se había mantenido durante 3 años se sembraron en agar LS basal medio con BA (0,5 mg / l) +2,4 D (0,5 mg / l) para formar callos. Los callos originarios en su mayoría de 2n suspensiones celulares cuando se transfieren a un medio con K (2,0 mg / l) + ANA (0,02 mg / l) fueron capaces de formar brotes, siendo este el mejor de los tratamientos ya que permitió desarrollar características en las plantas tales como, la variación en la capacidad de enraizamiento, vigor, los caracteres morfológicos y el número de cromosomas similares en las plantas regeneradas

Con el propósito de entender el proceso del sistema reproductivo de la *Stevia rebaudiana* B. (Nublea, Manara y Lopes 1989) estudiaron tres genotipos,

³⁵ Fragmentos de plantas separados con una finalidad reproductiva. Pueden cortarse fragmentos de tallo e introducirlos en la tierra, para producir raíces.

³⁶ Técnica basada en colocar un fragmento de planta en un recipiente ayudado con soluciones nutritivas artificiales y hormonas vegetales; para propagarla en condiciones o en un medio estéril, es decir en un medio libre de microorganismos (limpio).

sometido a tres tratamientos diferentes: el aislamiento total de la planta, el aislamiento y las flores de polinización abierta. El experimento se desarrolló mediante un diseño de bloques al azar con tres repeticiones y 12 plantas por parcela. El mayor porcentaje de aquenios claros (alrededor del 83%) fue obtenido para los tres genotipos en cualquier tratamiento. El porcentaje de semillas negras con embriones varió para diferentes genotipos (entre 8,0 y 38,8%). El análisis mostró que se trataba de semillas de especies autógamias.

(Akita, y otros 1994) describen el procedimiento para la propagación masiva de brotes múltiples de la *Stevia rebaudiana*. Estas agrupaciones fueron cultivadas en un bioreactor de 500 litros para obtener brotes. Un total de 64,6 Kg de brotes fueron propagados a partir de 460g de los primordios inoculados. Estos brotes se aclimataron fácilmente en el suelo.

Posteriormente (Andolfi, Macchia y Ceccarini 2004) evaluaron el potencial productivo de dos genotipos diferentes *Stevia rebaudiana* (B1 y B2) y las características de la producción de la planta obtenida a través de diferentes métodos de cultivo, en el centro de Italia. En el período comprendido entre el 1992-1999 la producción de las hojas de los dos genotipos no registró diferencias significativas entre los dos métodos de propagación empleado en relación con la producción de la hoja. La cantidad de hojas producidas a partir de una sola cosecha fue menor como consecuencia de dos cortes y la micro propagación plantas produjo una mayor cantidad de hojas que las de corte. La relación hoja-madre se convirtió en un parámetro característico morfológicos y de producción de la planta. La *Stevia rebaudiana* parece especialmente adecuado para el establecimiento del cultivo en la Italia central. Además proponen desarrollar programas de mejoramiento genético para garantizar una óptima producción de *Stevia rebaudiana*.

Algunas investigaciones desarrolladas por (Ladygin, y otros 2008) sugieren que la acumulación de los glicósidos tanto *in vivo* como *in vitro* se relaciona con el grado de desarrollo del sistema de membranas de los cloroplastos y el contenido de pigmentos fotosintéticos. Los cloroplastos de las plantas *in vitro*, a diferencia de las de las plantas *in situ*, eran de muy escasa sistema de membranas. Se demostró que las hojas de las plantas *in vivo* acumulaban una mayor cantidad de pigmentos que las hojas de las plantas *in vitro*. El tejido callo crecido en la oscuridad únicamente contenía trazas de los pigmentos. Las hojas de la planta *in situ* y las plantas *in vitro* no mostraron ninguna diferencia significativa en la tasa fotosintética.

(Ibrahim, y otros 2008) establecieron un protocolo para la propagación de la *Stevia rebaudiana* a través de esquejes como alternativa para la agricultura egipcia, con el fin de maximizar la eficiencia de propagación de plantas.

Cultivo

No se puede desconocer que la interacción amigable del hombre con su entorno natural es fundamental para un desarrollo armónico y sostenible de las comunidades rurales y que para ello la agricultura orgánica se constituye en una herramienta importante. La agricultura ecológica brinda a los productores la emancipación de tecnologías rígidas, en muchos casos no adaptables a los sistemas productivos y les brinda mecanismos de autogestión y de investigación participativa mediante diálogos de saberes entre el técnico agropecuario ecológico, que en este caso no es el sabio de la producción, y los productores (García 2004).

La recopilación de los resultados de estudios anteriores en todas partes del mundo llevaron a que (Rodríguez, y otros 2007) establecieran el comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* B, en La Habana, Cuba. La investigación se llevo a cabo mediante dos fechas de siembra: diciembre 2000 y enero 2001. Se

evaluaron tres cosechas en cada una de las fechas de siembra y se demostró que en la primera fecha se duplicaron los rendimientos. Además que los agentes patógenos que la afectaron eran *Alternaria sp.* y los insectos *Agromyza sp.*, además de pequeñas afectaciones por crisomélidos durante la fase vegetativa. Para el control de estos agentes nocivos se probaron extractos acuosos al 30% y 50% de follaje de *Carica papaya L.* contra el hongo y extractos acuosos de Tabaquina® (*Nicotiana tabacum L.*) al 30 y 50% para los insectos; se comprobó que las dosis mayores ejercieron mejor control sobre estas plagas.

(Jarma 2008) plantea que el sector rural del Caribe colombiano, presenta escasez de alternativas rentables de producción agrícola. Desarrolla un estado del arte desde que se iniciaron las primeras investigaciones con estevia, hace siete años en aspectos como ecofisiología, nutrición, fitopatología, entre otros. El investigador afirma que los resultados indican que la estevia puede cultivarse con éxito en esta región del país. Adicionalmente, muchas de las labores que demanda su producción la convierten en un sistema altamente generador de empleo rural, además de los beneficios que su uso trae a la salud.

6.2. Fase 2. Direccionamiento estratégico

Como resultado de la primera fase, la investigación documental permitió establecer que los ensayos en vivero que debían realizarse eran:

6.2.1. Estudio de las necesidades de riego en el cultivo de la *Stevia rebaudiana* Bert.)

En la información preliminar en Colombia, no se reportan trabajos sobre mediciones del consumo de agua por cultivo como tampoco la determinación de la frecuencia, duración y eficiencia de los riegos.

Esta fase se desarrolló en el invernadero 9 nave 2 de la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá durante los meses

comprendidos entre Septiembre y Noviembre de 2010; a una altitud de 2556 msnm, temperatura promedio de 26.7°C y 4.5 hora de Brillo solar, con la colaboración de estudiantes de pregrado de Agronomía de la Universidad Nacional.

En cuanto al establecimiento del ensayo el suelo previamente secado por 24 horas a 70°C se dispuso en materas, posteriormente se llevó a saturación con agua lluvia (peso específico alrededor de 1g/cm³) por 15 minutos midiéndose su peso, pasadas 24 horas se midió nuevamente su peso en capacidad de campo y al 70% de este se trasplantó. En 12 materas el suelo se cubrió con pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y las restantes 12 sin alguna cobertura. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro tratamientos cada uno con tres repeticiones.

A todas las plantas se les deshojó y contó en fresco su número de Hojas (NDH) y obtuvo su Peso fresco en hoja (PFH) empleando una balanza digital marca precisa® con 0.01 gramos de precisión. La parte radical de cada una de las plantas fue disectada del tallo y pesada en fresco en la misma balanza. El área foliar se determinó consiguiendo a través de la medición en fresco del área de cada una de las hojas que conformaban las plantas seleccionadas, empleando para ello un planímetro marca Li-Cor® modelo 3100.

Los resultados con relación a peso seco y peso fresco en todos los tratamientos con cobertura se presentan en la tabla 6

Tabla 6. Resultados obtenidos de peso fresco y peso seco con los diferentes tratamientos. Moreno, 2012

ESTEVIA (<i>Stevia rebaudiana</i>)						
Variedad: Morita II						
Lugar: Invernaderos Universidad Nacional						

Item	Inv.	Nave	Cama	Tratamiento	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)
1	9	2	8	Cobertura Plástica Negra	220	43,32
2	9	2	9	Cobertura Plástica Negra	210	42,42
3	9	2	8	Cobertura Plástica Negra	330	63,97
4	9	2	8	Cobertura Plástica Negra	540	105,35
5	9	2	7	Cobertura Plástica Negra	60	14,64
6	9	2	7	Cobertura Plástico Negro Plata	160	42,16
7	9	2	8	Cobertura Plástico Negro Plata	80	19,94
8	9	2	8	Cobertura Plástico Negro Plata	100	26,72
9	9	2	7	Cobertura Plástico Negro Plata	90	22,96
10	9	2	10	Cobertura Plástico Negro Plata	110	27,59
11	9	2	9	Cobertura Plástico Negro Plata	90	22,25
12	9	2	9	Cobertura Plástico Negro Plata	60	14,29
13	9	2	9	Cobertura Plástico Negro Plata	160	39,79
14	9	2	9	Cobertura Plástico Negro Plata	120	30,63
15	9	2	10	Cobertura Plástico Negro Plata	80	21,58
16	9	2	10	Cobertura Plástico Negro Plata	110	28,37
17	9	2	10	Cobertura Plástico Negro Plata	70	17,66
18	9	2	8	Cobertura Vegetal	200	40,33
19	9	2	7	Cobertura Vegetal	160	33,98
20	9	2	10	Cobertura Vegetal	140	28,75
21	9	2	10	Cobertura Vegetal	180	35,53
22	9	2	10	Cobertura Vegetal	70	13,89
23	9	2	10	Cobertura Vegetal	180	37,74
24	9	2	8	Cobertura Vegetal	120	23,13
25	9	2	7	Cobertura Vegetal	260	51,53
26	9	2	8	Cobertura Vegetal	100	22,61
27	9	2	8	Cobertura Vegetal	200	38,16

Aunque el número de hojas presenta diferencias entre tratamientos con y sin cobertura, estas no son estadísticamente significativas. La tendencia es marcada hacia un menor número de hojas en las plantas con cobertura a medida que se aumentan las frecuencias de riego; esta variable no es determinante en la respuesta del cultivo a diferentes láminas de riego.

Comparando los tratamientos sin cobertura y con cobertura se evidenció mayor peso fresco en hoja en el tratamiento sin cobertura. Aunque no mostró diferencias significativas debido a la frecuencia de riego.

En cuanto al Peso Fresco en Raíz (PFR), según el análisis de varianza se evidencia el efecto de interacción Frecuencia*cobertura lo que indica que, el efecto de la frecuencia de riego depende de la presencia o ausencia de cobertura, es decir, se observa como la frecuencia de riego muestra el mayor peso fresco en raíz cuando hay cobertura, ya que sin cobertura no se evidenció diferencia alguna.

Para el peso seco en Hoja (PSH) no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para esta variable, a pesar de observarse un mayor peso seco al aumentar las frecuencias de riego sin variación marcada entre los tratamientos.

El Peso seco en raíz (PSR) tampoco evidenció diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para la variable del riego, pero sí respecto a la presencia de cobertura y la interacción de esta con la frecuencia de riego siendo mayor cuando el PSR cuando no había cobertura.

En cuanto al área foliar se hallaron diferencias significativas entre tratamientos, debido tanto a las frecuencias de riego, como a la presencia y ausencia de cobertura. Se obtuvo que a mayor frecuencia de riego mayor es el área foliar principalmente en plantas con cobertura.

6.2.2. Identificación y Manejo de las enfermedades predominantes en *Stevia rebaudiana* B en los invernaderos de la Universidad Nacional de Colombia

Esta fase se realizó en el cultivo de estevia las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, ubicada a 4° 35' 46.34" N y 74° 4' 39.15" W y a 2640 msnm, en condiciones de invernadero, con temperatura media de 24 °C y humedad relativa del 60% con la colaboración de estudiantes del pregrado de Agronomía de la Universidad Nacional. El área de cultivo fue de 320 m², con una

densidad de siembra de 35 x 35 cm, entre plantas. Las plantas de Estevia de aproximadamente 6 meses de edad presentaban en las hojas inferiores, manchas cloróticas y pudrición, en el tallo se observaba un cambio de color (de verde a marrón) y leve presencia de micelio.

Para determinar qué tipo de patógeno afectaba a la plantación de Estevia se aplica una prueba con los postulados de Koch. Se realizó un muestreo al azar de material vegetal y se llevo a laboratorio, colocándolo en cámara húmeda por tres días, después se aisló directamente en medio PDA, y se pasó a una incubadora (Imperial III Lab-line Modelo 305) a 25 °C por ocho días. Posteriormente se re-aisló en PDA, bajo las mismas condiciones.

La prueba de patogenicidad se realizó infectando material vegetal sano (Plántulas de Estevia de 40 días de edad); se estableció la prueba con tres repeticiones y un testigo; las plántulas se colocaron en materas, utilizando como sustrato 1kg de turba esterilizada en auto clave (All American 75x).

Las plántulas se inocularon mecánicamente a través de herida (punción en la base del tallo) con micelio del cultivo aislado y se cubrió con plástico durante tres días para mantener la humedad en el área de infección.

Las plántulas se llevaron al laboratorio el día 15 de la prueba; se colocaron en cámara húmeda por tres días más, luego se hizo un aislamiento directo en PDA, se incubó por ocho días a 25 °C. Se re-aisló en PDA incubando bajo las mismas condiciones. La identificación del agente causal de la enfermedad se realizó tinción con azul de lactofenol. Luego se dejó el material de las cajas de petri por un mes en la incubadora a 25 °C para promover el desarrollo de esclerocios.

Se identificó el agente causal de la enfermedad en *S.rebaudiana* como *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Los síntomas y signos de la enfermedad presentes tanto en las plantas del cultivo como en las utilizadas en la prueba de infección son iguales, siendo consecuentes con los postulados de Koch; particularmente se observó amarillamiento y marchitez en las hojas bajas en la etapa inicial de la

infección y cambios en la coloración del tallo tornándose marrón a las 2 semanas de la inoculación. El límite comprendido entre los tejidos sanos y los enfermos fue más oscuro que los demás tejidos y micelio algodonoso blanco hacia la parte basal o central del tallo y la raíz, en la etapa más avanzada de la enfermedad.

6.2.3. Respuesta de Estevia *Stevia rebaudiana* (Bertoni) al estímulo con biofertilizantes.

El experimento fue desarrollado en las instalaciones de los invernaderos de la facultad de agronomía de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia. Se realizó un diseño completamente al azar en bloques con tres repeticiones por cada tratamiento. Los tratamientos que se utilizaron fueron: T1: lixiviado de lombricompost (producido en los invernaderos), T2: producto químico (RAISE I), T3: extracto de algas (Citoquinin 2-8-12) y T4: producto a base de pezuña. El área trabajada para cada tratamiento fue de 12,85m² y las dosis fueron las siguientes: T1: 400ml; T2: 2.5ml; T3: 1,5 ml y T4: 0,88Kg. Las variables que se midieron fueron: altura, peso fresco y seco. Para el análisis estadístico se procesaron los datos en el programa SAS 9.1 utilizando como prueba estadísticas ANOVA y prueba de tukey para cada una de las variables.

En la tabla 6, se presentan los resultados obtenidos en esta etapa con los diferentes fertilizantes

Tabla 7. Resultados de peso seco y peso fresco con los diferentes fertilizantes.

Moreno, 2012

ESTEVIA (<i>Stevia rebaudiana</i>)				
Variedad: Morita II				
Lugar: Invernaderos Universidad Nacional				
ESPECIE	TRATAMIENTO	REPETICION	PESO FRESCO (g)	PESO SECO (g)

Stevia	Azobac	1	52	9,67
Stevia	Azobac	2	11	3,01
Stevia	Azobac	3	26	7,75
Stevia	Bokashi	1	42	8,12
Stevia	Bokashi	2	25	7,67
Stevia	Bokashi	3	32	5,4
Stevia	Em	1	22	4,89
Stevia	Em	2	39	8,94
Stevia	Em	3	41	10,11
Stevia	Enmienda	1	48	10,81
Stevia	Enmienda	2	47	9,3
Stevia	Enmienda	3	19	5,93
Stevia	Escarabajo	1	37	5,9
Stevia	Escarabajo	2	42	8,67
Stevia	Escarabajo	3	76	16,08
Stevia	Escarabajo + Simg	1	59	13,33
Stevia	Escarabajo + Si Mg	2	17	2,83
Stevia	Escarabajo + Si Mg	3	67	16,59
Stevia	Escarabajo 2	1	74	14,74
Stevia	Escarabajo 2	2	47	10,57
Stevia	Escarabajo 2	3	52	12,89
Stevia	Escarabajo 2 + Simg	1	73	13,53
Stevia	Escarabajo 2 + Simg	2	72	17,08
Stevia	Escarabajo2 + Si Mg	3	75	14,73
Stevia	Lixiviado Lombriz	1	13	3,22
Stevia	Lixiviado Lombriz	2	30	6,97
Stevia	Lixiviado Lombriz	3	14	4,43
Stevia	Lombricompos	1	34	5,3
Stevia	Lombricompos	2	51	11,25
Stevia	Lombricompos	3	6	0,72
Stevia	Nutriortiga	1	64	15,35
Stevia	Nutriortiga	2	18	5,33
Stevia	Nutriortiga	3	55	13,49
Stevia	Simg Col	1	60	14,6
Stevia	Simg Col	2	54	12,7
Stevia	Simg Col	3	51	11,5
Stevia	Simg Español	1	42	8,82
Stevia	Simg Español	2	39	7,5
Stevia	Simg Español	3	37	6,1
Stevia	Testigo	1	25	6,05
Stevia	Testigo	2	46	10,19
Stevia	Testigo	3	62	12,89

Se pudo observar que para las variables de peso seco y altura, no existen diferencias significativas; sin embargo, en el peso fresco y seco se encuentra el mayor valor para el tratamiento de extracto de algas.

(Bonilla C. *et al.*, 2007) realizaron un estudio donde utilizaron como fuentes de fertilización nitrogenada urea, compost y gallinaza; en el cual no se observaron diferencias significativas. Estos resultados permiten inferir que la producción de biomasa seca de la estevia no está directamente relacionada con el manejo de la fertilización nitrogenada.

(Das K. *et al.*, 2007) evaluaron el rendimiento de biomasa y la cantidad de nutrientes en estevia utilizando fuentes químicas de fertilización: N, P y K solas y en combinación, y como biofertilizantes Micorrizas Vesículo Arbusculares (MVA), una bacteria solubilizadora de fósforo (PSB) y *Azospirillum*, igualmente solas y en combinación. En este estudio, la aplicación de biofertilizantes en combinación (MVA + PSB + *Azospirillum*) tuvo mayores incrementos en el rendimiento de biomasa y la cantidad de nutrientes en estevia, comparado con las aplicaciones químicas. Esto supone que quizá si se hubieran combinado los tratamientos orgánicos de este experimento, se hubiesen presentado diferencias significativas de peso fresco, peso seco y altura en cuanto al fertilizante químico y a las aplicaciones individualizadas.

6.2.4. Estudio de arvenses y análisis de crecimiento de Estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Se evaluó la época crítica de competencia de malezas y análisis de crecimiento de Estevia (*Stevia rebaudiana* B.), en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, ubicada a 4° 35' 46.34" N y 74° 4' 39.15" W y a 2640

msnm, en condiciones de invernadero, con temperatura media de 24°C y humedad relativa del 60%. Las plantas fueron sembradas con una distancias de 0.3m y una densidad de siembra teórica de 128.300 plantas/ha.

La siembra se realizó por medio de plántulas provenientes de estacas enraizadas en turba durante 30 días, obtenidas de plantas madre de *S. rebaudiana* variedad Morita 2. Este experimento se realizo por medio de un diseño de bloques completos al azar (BCA), con siete tratamientos por bloque. La desyerba se realizó manualmente en cada uno de los tratamientos.

Se realizaron cinco muestreos a los 20, 40, 63, 84 y 101 días después de trasplante (ddt); en estos muestreos se tomaron tres plantas al azar por cada bloque; a las cuales se les tomaron las medidas de peso seco de hojas y total, longitud de tallo y número de hojas por planta (longitud mayor a 2cm). Para el análisis estadístico se procesaron los datos en el programa SAS 9.1 utilizando como prueba estadísticas ANOVA y prueba de tukey para cada una de las variables. Los modelos trabajados fueron el Logístico, el Gomperts y el modelo Exponencial. Estos modelos fueron escogidos debido a que presentan un mejor ajuste a las curvas de tipo sigmoideal características de la tendencia del crecimiento (Hunt, 1982).

El mayor valor de peso seco lo obtuvieron los tratamientos de desyerba a los 15 ddt y de desyerba todo el tiempo, 9.4g y 15.1g, respectivamente. De esta manera el peso seco obtenido en el tratamiento de desyerba todo el tiempo, es mayor del de desyerba a los 15 ddt en 13%, en 20% del tratamiento sin desyerba, en 23% del tratamiento a los 60 ddt, en 24% del tratamiento a los 75 ddt, en 35 del tratamiento a los 30 ddt y en 36% del tratamiento a los 45 ddt, es decir que los valores más bajos se obtuvieron en estos dos últimos.

Los resultados indican que los primeros 30 días después de siembra son críticos en la acumulación de biomasa de plantas de estevia, pues si bien es cierto se

obtienen los mayores resultados al mantener el área libre de malezas a los 15 ddt, también es notable la disminución del peso seco de las plantas en el tratamiento de desyerba a los 30 ddt. Es de resaltar que las desyerbas proporcionan mejor retención de nutrientes en las primeras fases de desarrollo, estas fluctuaciones se dan no solo por la competencia con otras plantas, sino también por las condiciones ambientales o la interacción con plagas y enfermedades.

Para la variable de peso seco de hojas se encontraron diferencias significativas a los 101 ddt, así se obtuvo mayor peso seco en los tratamientos de desyerba a los 15 ddt y el de desyerba todo el tiempo con los tratamientos de desyerba a los 30 ddt, 45 ddt, 60 ddt, 75 ddt y sin desyerbar.

El peso seco de hojas en plantas de estevia, bajo el tratamiento de desyerba a los 15 ddt, es superior en 21% del peso seco de hojas obtenido en el tratamiento de desyerba a los 30 ddt, en 15% del tratamiento a los 75 ddt, en 11% del tratamiento sin desyerbar, en 5% del tratamiento de a los 60 ddt y en 1% del tratamiento a los 30 ddt, es decir que el valor de peso seco de hojas más bajo lo presentan las plantas del tratamiento de desyerba a los 30 ddt.

El peso seco de hojas en plantas de estevia es una variable de rendimiento, por lo tanto se debe tener en cuenta el periodo de desyerba que favorece la obtención del mayor valor, en este caso se obtienen los mayores valores de peso en los tratamientos de desyerba a los 15 ddt y en el de desyerba todo el tiempo.

Para la variable longitud de tallo a los 101 ddt, el valor más alto se obtuvo en el tratamiento sin desyerbar en el total del ciclo, 34.3 cm. Mayor en 19% del tratamiento de desyerba a los 30 ddt que fue el valor más bajo.

Para la variable número de hojas se puede observar que hay diferencias entre tratamientos a través del tiempo, en general el número de hojas inicial no presenta

diferencias, sin embargo la tasa de aumento diario (r) varía, esto se evidencia al observar los intervalos de confianza (min 95% a máx. 95%) de r , donde el solape de intervalos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas y viceversa.

Así se encuentran diferencias significativas en la tasa (r) de aumento de número de hojas diario entre los tratamientos de desyerba a los 15 ddt, 30 ddt, 60 ddt, 75 ddt y todo el tiempo con los tratamientos de desyerba a los 45 ddt y sin desyerbar. Es decir que al mantener el área de cultivo sin desyerbar la tasa de aumento diario del número de hojas es menor en comparación con los tratamientos en los que se realizó la desyerba a diferentes tiempos.

Con los resultados, se intentaron ajustar modelos sigmoidales propios del aumento de peso, sin embargo esta variable solo se ajustó a modelos logísticos, los otros modelos (Gomperts y Exponencial) no encontraron convergencia para todos los tratamientos.

6.3. Estrategias de intervención del cultivo para obtener esteviósidos y rebaudiósidos adecuados para su comercialización

A continuación, en la tabla 8 se presentan las estrategias de intervención del cultivo de *Stevia rebaudiana* B para la obtención de esteviósidos y rebaudiósidos que le permita al agricultor una producción competitiva en el mercado.

Tabla 8. Estrategias de intervención para mejorar las condiciones de cultivo de *Stevia Rebaudiana* B. Moreno 2012.

PROBLEMA DETECTADO	ESTRATEGIA DE INTERVENCION
Baja producción de follaje	Cobertura plástica
Área foliar disminuida	Frecuencia mínima de riego de dos días por semana

Área radical deficiente en <i>Stevia Rebaudiana</i> Var. Morita	El uso de cobertura en suelo con frecuencias de riego menores a dos días por semana
Enfermedad que causa más pérdidas en el cultivo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Combinación de agroquímicos y productos orgánicos con extracto de algas (aún deben ser estudiadas las proporciones de unos y otros).
Poca biomasa baja de producción	Combinación de las estrategias anteriores a lo largo del desarrollo del cultivo
Presencia de malezas	Uso de métodos culturales especialmente desyerbe en todas las etapas de desarrollo del cultivo

7. CONCLUSIONES

- ✓ La recolección de información como investigación documental permitió establecer los factores ambientales que podían influir en el desarrollo vegetativo de *Stevia rebaudiana* B. Esta recopilación era necesaria para la fase experimental y será muy valiosa para que a futuro se continúe el trabajo y encontrar otros factores que sean importantes para mejorar la producción.
- ✓ La fase de experimentación combinó las variables más importantes reportadas por la investigación documental con el desarrollo vegetativo de la planta. El análisis de los resultados permitió presentar estrategias para mejorar la producción y llegar a la comercialización de este cultivo. Esto indica que los métodos de investigación cuantitativa y cualitativa son necesarios el desarrollo de una investigación y la obtención de resultados que den respuesta a las necesidades del agricultor.
- ✓ La estandarización del riego para el cultivo de *Stevia rebaudiana* B es posiblemente uno de los factores más significativos en el éxito o fracaso de la producción de este cultivo. Los resultados obtenidos en esta investigación lo indican, aunque es necesario realizar otros experimentos para estimular el sistema radicular de la planta y mejorar el ingreso de nutrientes para obtener mayores índices de crecimiento.
- ✓ El uso de cobertura en suelo es una estrategia efectiva para evitar la pérdida de agua provocada por la evaporación y la transpiración que se ven afectadas el piso térmico en el que se produce la estevia. Este sistema mejora los niveles de humedad por condensación directa sobre el sustrato.
- ✓ Aunque la producción de *Stevia rebaudiana* B se hace principalmente en ambientes semihúmedos y a 25°C puede producirse en climas fríos con buena humedad a través del riego, pero teniendo cuidado con las bajas temperaturas porque la planta podría congelarse, generando deshidratación de las células y provocando daños en los órganos, lo que provoca un efecto parecido a la marchitez.

- ✓ La relación de los factores ambientales con el desarrollo vegetativo se ha probado experimentalmente en forma individual. Sin embargo, al unir todos los aspectos y analizar sus efectos se concluye que todos, algunos o uno de ellos puede influir en la producción del cultivo y deben tomarse medidas correctivas haciendo un seguimiento efectivo al desarrollo del cultivo en todas las etapas de su desarrollo.
- ✓ El análisis del crecimiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* B puede ser explicado por la función expo-lineal, aún sometido a distintas condiciones ambientales (humedad, temperatura y radiación). Este modelo presenta gran potencialidad para ser utilizado como una herramienta descriptiva de la productividad del cultivo.
- ✓ El modelo de crecimiento permite la introducción de futuras modificaciones tendientes a aumentar la robustez del mismo y tendrán que establecerse mejores mecanismos para determinar los coeficientes de partición de hojas (*CPH*).
- ✓ A futuro sería conveniente realizar investigaciones relacionadas con el mejoramiento de la captación de minerales y toma de agua en el sistema radicular (*CPR*) porque de ello depende la estructura y funciones de la estructura aérea de la planta
- ✓ Con miras a utilizar modelos que permitan mejorar la producción, será necesario realizar investigaciones en donde se establezca la tasa de absorción diaria de nutrientes y eficiencia de uso de los mismos.
- ✓ El modelo ideal en este contexto, debe producir un resultado de pronóstico, frente a una acción de gestión específica. Este enfoque es importante para definir las medidas, herramientas y aplicaciones en busca de mejorar la eficiencia del cultivo. La confiabilidad del modelo se logra cuando se puedan comparar los resultados de las observaciones experimentales con los datos solicitados por el modelo.
- ✓ Para próximas investigaciones se recomienda validar el modelo sugerido en las recomendaciones

8. Recomendaciones

El desarrollo de un modelo, con sus posibles aplicaciones y limitaciones en la agricultura, tiende a modernizar los procesos productivos, además de establecer mecanismos de incorporación de la información de manera más ágil, permitiendo tomar decisiones rápidas y eficientes en términos económicos, ambientales y sociales.

Para posteriores investigaciones se recomienda utilizar modelos matemáticos que involucren los procesos de medición haciendo que se retroalimenten de tal forma que permiten aprender cada vez más, sobre el sistema, al que se le este implementando dicho modelo. Como lo expresan (Dourado, y otros 1998) se trata de uno de los mejores mecanismos para transformar la información en conocimiento útil y de transferir dicho conocimiento. Permitiendo a los investigadores una visión global de la realidad.

Para esto es necesario desarrollar un modelo robusto que permita alimentarlo con bastantes datos, teniendo en cuenta que debe ser sensible a las fluctuaciones ambientales que se producen en lapsos cortos de tiempo. Para el manejo del cultivo de *Stevia rebaudiana* B. en condiciones de invernadero en la Sabana de Bogotá, Sin embargo, este modelo con algunas variaciones podrá mostrar su versatilidad en cuanto a especie y factores climáticos.

Es por esta razón, se hace necesario establecer alternativas para que el modelo sea dinámico y que sea posible tener en cuenta las estrategias de manejo, las condiciones meteorológicas y el desarrollo vegetativo propio de la especie. Para lograr esto, es preciso ante todo, como primera medida tener claridad con respecto al objetivo del modelo, en segunda instancia el modelo necesario y por último el nivel de complejidad y precisión del modelo.

De acuerdo a lo expresado por (Omaña 2008) el modelo debe ser lo

suficientemente simple para permitir la manipulación y entendimiento de diferentes actores pero lo suficientemente complejo como para poder extrapolar las conclusiones.

Una de las características importantes a tener en cuenta es que el modelo debe ser construido de tal forma que los segmentos se puedan cambiar por algún otro segmento que represente una mejor relación de los factores tal y como lo ejemplifica (Dourado, y otros 1998) afirmando que en Barbieri (1993), desarrollo un modelo para predecir la variación temporal en el área de la hoja de caña de azúcar y posteriormente, Teruel (1995) agregó un procedimiento dinámico, que le aumento la precisión al modelo. Es de resaltar que el número de niveles jerárquicos o sub-modelos que figuran en el modelo general determinará su grado de precisión.

El análisis de las regresiones, es una de las técnicas estadísticas más comunes que se utilizan para ajustar los modelos matemáticos o las curvas a los datos experimentales. De acuerdo a lo establecido por (Dourado, y otros 1998). Es la técnica más simple de los modelos, prueba de esto, es que se ha utilizado desde el comienzo del siglo según (Omaña 2008).

Diferentes procedimientos de análisis de regresión se puede utilizar para ajustar los modelos lineales y los no lineales. El análisis de regresión con fines analíticos y de pronóstico ha permitido obtener una descripción matemática simple de crecimiento y desarrollo de la planta.

Ahora bien, en el sector agrícola, el comportamiento de los cultivos se puede determinar a partir de cuatro aspectos principalmente, estos son:

- El primero de ellos es la producción de materia seca total (MS).

- El segundo, la medición de varios indicadores de rendimiento de los cultivos, como lo son número de granos, semillas, número de hojas etc.,
- El tercero es el desarrollo del cultivo por sus relaciones fenológicas³⁷.
- El cuarto es el uso de los recursos disponibles para el cultivo y sus correspondientes respuestas.

Es importante resaltar que el comportamiento de los cultivos analizados bajo estos cuatro aspectos permite evidenciar un sistema susceptible a ser modelado, utilizando métodos de regresión (Salles Scarpari, Plà Aragonés y Gomes Ferreira de Beauclair 2008):

Los modelos ajustados por regresión, se han utilizado desde hace mucho tiempo para prever los efectos sobre el rendimiento de los cultivos expuestos a diferentes estímulos, como la aplicación de fertilizantes y la variación en las densidades de siembra. Aunque en principio el uso del análisis de regresión para ajustar una función lineal a una serie de datos experimentales es un ejercicio que no requiere un esfuerzo excesivo, el ajuste de funciones no lineales es una tarea más compleja, y debe utilizarse un método dinámico que permita reducir al mínimo la suma de los cuadrados de las desviaciones estándar (Salles Scarpari, Plà Aragonés y Gomes Ferreira de Beauclair 2008).

De acuerdo a las técnicas y aplicaciones del análisis expuestas por (Hunt 1981), las ecuaciones resultantes de un proceso de análisis de regresión son totalmente empíricas y sus parámetros no tienen ningún significado fisiológico. Por ejemplo, una ecuación del tipo siguiente se puede obtener con esta técnica:

$$Y = a + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{j=1}^m c_j T_j + e$$

Donde:

³⁷ Relación entre los factores climáticos y el comportamiento de los seres vivos.

Y= Rendimientos de los cultivos.
a, b, c = Coeficientes de regresión.
 x_i = Variables climáticas.
n = Número de variables climáticas.
T_j= Variables tecnológicas.
m= Número de variables tecnológicas.
e = Error estimado.

Para este modelo es posible utilizar como variables tecnológicas, las cantidades de fertilizantes y como variables climáticas la temperatura variable, ciclo de cultivo, las precipitaciones y la radiación solar.

Cuando este modelo se desarrolla a partir de una larga serie de datos, puede ser lo suficientemente exacto para ser utilizado en las condiciones propias de la zona en la cual fue diseñado. Sin embargo, no será fácil de extrapolar los análisis y los pronósticos a otras zonas o con condiciones diferentes en las que se desarrolló. Hay que resaltar que una de las primeras aplicaciones del análisis de regresión todavía se utiliza hoy para prever el desarrollo fenológico de los cultivos, el concepto de suma térmica o grados-día desarrollado por Réaumur en 1735, citado por (Salles Scarpari, Plà Aragonés y Gomes Ferreira de Beauclair 2008)

Algunos autores como (Rimington y Charles 1987) difieren en que, la elaboración de un modelo obtenido por medio del análisis de regresiones que no se pueda extrapolar a un sitio que tenga condiciones diferente a su origen es un simple modelo mecanicista basado en la seguridad del conocimiento de sus respuestas, pero existen otros como (Dourado, y otros 1998) que otorgan valor al modelo siempre y cuando se basen en la comprensión de los procesos del desarrollo de un cultivo.

Índices de crecimiento

El índice de crecimiento se basa en el concepto de índice climático donde se expresa el desarrollo de algunas características de la planta o de cultivos en función de una o más variables climáticas. (Ometto 1981). Un ejemplo de índice de crecimiento se presenta por (Fitzpatrick & Nix 1970):

$$GI=LI.TI.MI$$

Donde:

GI= índice de crecimiento (la fracción de la productividad máxima que puede alcanzarse en un determinado lugar).

LI= índice de la luz

TI=índice de temperatura

MI=índice de humedad relativa del aire.

Básicamente, LI, TI y MI representan, respectivamente, las relaciones entre la radiación solar observada, los niveles de temperaturas y las lluvias registradas, las condiciones de evapotranspiración durante el ciclo del cultivo.

En el modelo utilizado por la FAO para el cálculo de la rentabilidad real:

$$Y_r = Y_p \left[1 - K \left[1 - \frac{ET_r}{ET_p} \right] \right]$$

Este modelo ha sido analizado por varios investigadores, otorgándole la interpretación la expresión $K (1-ET_r/ET_p)$ es un índice que representa la falta de agua y $(1-Y_r/Y_p)$ a un índice que representa la relación entre el rendimiento observado y potencial productivo.

Ahora bien, para el desarrollo de modelos de simulación dinámica del crecimiento vegetal, es importante presumir que la planta en cualquier momento puede ser

sometida a valoración numérica determinando un discreto número de variables de estado.

Como establece (Dourado, y otros 1998) estas variables caracterizan el estado del sistema de crecimiento de las plantas. Se pueden seleccionar, para establecer indicadores de rendimiento de la planta (El tallo, área foliar, o el número de hojas etc.). Los modelos suponen que las transiciones temporales de los valores de estas variables se pueden describir matemáticamente.

Tomando como referencia el simulador dinámico propuesto por (Salles Scarpari, Plà Aragonés y Gomes Ferreira de Beauclair 2008) para el crecimiento de la caña de azúcar. Que describe brevemente:

$$MSC_t = MSC_{t-1} + TCC_t \Delta t$$

Donde:

MSC_t = la masa seca de los cultivos en el tiempo t (gm-2).

MSC_{t-1} = tiempo t-1 (gm-2);

CTPT = tasa de crecimiento de los cultivos en el tiempo t (gm-2.día-1).

dt = intervalo de tiempo considerado (días).

Matemáticamente, CTPT está dada por:

$$TCC_t = EC(FC_t - M(MSC_t))$$

Donde:

EC = Eficiencia de conversión de los materiales de la fotosíntesis en la masa,

TC = Tasa de cosecha

FC_t = fotosíntesis bruta en el tiempo t (gm-2.día-1),

M = Coeficiente de mantenimiento de los procesos fisiológicos de los cultivos (día⁻¹), y

$$FC_t = F_{\max} LAI_t FL.F$$

Donde:

F_{max} =es la tasa de fotosíntesis máxima para las condiciones ideales (g m⁻².día⁻¹.)

LAI= índice de área foliar (m².m⁻²) en ese día.

FL= relación entre las longitudes del día y la noche,

F= al factor de ajuste de FMAX a las condiciones ambientales,

Cada uno de los términos se expresa en una nueva ecuación matemática que sirvió como base hasta que algún otro investigador obtiene la medición de algunas otras variables.

Verificación del Modelo

En este paso del marco de modelación se verifica la capacidad con la cual el modelo es capaz de predecir condiciones observadas no incluidas en la calibración. La verificación del modelo nunca termina y por lo tanto debe realizarse permanentemente. Pero para investigaciones posteriores se recomienda documentar la evaluación de la predicción resultante del modelo después de implementadas modificaciones físicas en el sistema modelado.

Análisis de datos y determinación de conflictos *uso-calidad*

El objetivo del análisis de datos es obtener ideas relevantes, a partir de la información obtenida del modelo (Sarduy 2007). Lo cual permite expresar el contenido sin ambigüedades, con el propósito de almacenar, recuperar, predecir y tomar decisiones tendientes a aumentar la eficiencia.

El planteamiento anterior podría entenderse como, el análisis de información sólo para producir informes. Pero hay que agregar en este punto, el análisis de los datos obtenidos a partir de la fuente (cultivo), en base a las necesidades de los

usuarios, (producción del material vegetal ó aumento en el contenido de glucósidos) que deben estar en consonancia con los objetivos estratégicos de la modelación.

Además, en un análisis de este tipo se deben validar las fuentes a utilizar, pues resulta muy importante que la información sea confiable y actualizada; para que los resultados obtenidos direccionen el proceso hacia la conformidad relativa con las especificaciones, bien sean estas, física o fisicoquímicas, por esta razón es de trascendental importancia que el producto del análisis sea transmitido en un lenguaje sencillo y directo, con el propósito de lograr un conjunto de reacciones o respuestas que NO generen conflictos entre el uso y la calidad en la menor brevedad posible.

Los modelos que pretenden lograr el análisis del sistema suelo – planta – atmósfera, son herramientas importantes para la investigación agrícola moderna. Este modelo trata representar de manera sencilla y sintética los procesos fisiológicos y ecológicos más importantes que gobiernan el crecimiento utilizando ecuaciones matemáticas. Para esto es necesario modelar los principales factores responsables de estas condiciones. Con el propósito de:

- ✓ Interpretar o predecir el comportamiento de la especie frente a las variaciones en el ambiente y su influencia en el rendimiento de la misma.
- ✓ Mejorar el manejo del cultivo disminuyendo al máximo la aplicación de insumos.

Modelo para el crecimiento de la *Stevia rebaudiana*.

El crecimiento potencial del cultivo de *Stevia rebaudiana* se encuentra ligado a la cantidad de radiación fotosintéticamente activa que es interceptada por el cultivo y su capacidad para transformar esta energía en biomasa.

Entonces:

$$TPD_i = RFA_i * f_i * EUR_{iRFA}$$

Donde:

TPD_i = Tasa potencial diaria de crecimiento por unidad de superficie (kg/ ha/ día).

RFA_i = Radiación fotosintéticamente activa incidente sobre una superficie horizontal por unidad de tiempo (MJ/ha/día).

f_i = Proporción de radiación incidente que es interceptada por el cultivo expresada en (%).

EUR_{iRFA} = Eficiencia de uso de radiación ((g/m²) / (MJ/ha/día)).

Para la *radiación fotosintéticamente activa* diaria (*RFA*). Los valores se miden en unidades molares ($\mu E m^{-2} s^{-1}$), entonces para transformar esta cantidad de materia en energía (MJ/ha/día), se asume que cada fotón en el espectro fotosintéticamente activo tiene una energía equivalente a la de un fotón de una longitud de onda de 550 nanómetros (nm), que es la longitud promedio del espectro visible que va desde 400 a 700 nm, según (Sutton , 1996). Lo cual indica que 4,6 μE equivale a 1 MJ. Es de esperar que al RFA en términos energéticos puede causarse cierta distorsión conceptual, ya que las propiedades físicas de la luz y sus efectos biológicos dependen fuertemente de su longitud de onda. La radiación fotosintéticamente activa (RFA) está definida en términos cuánticos, ya que la “actividad” fotosintética es relativamente constante en el rango de 400 a 700 nm (al menos para las hojas de la planta).

En la *proporción de radiación incidente interceptada por el cultivo* (f) se asume que la atenuación de la radiación depende de la altura del follaje siguiendo la ley de Beer³⁸ se calcula de la siguiente manera:

$$f_i = 1 - \exp(-k \cdot IAF_i)$$

Donde:

k = coeficiente de extinción de la radiación del cultivo

IAF = es el índice de área foliar verde.

Es necesario aclarar que en los postulados de Beer se determina la intercepción de la luz por partículas pequeñas y homogéneamente distribuidas en un gas. Lo cual presenta algunas limitaciones debido a que las hojas no se encuentran ubicadas uniformemente en el follaje, de acuerdo a lo expuesto por (Curtis, 2002) la ecuación funciona adecuadamente en la mayoría de las condiciones a pesar de la limitación antes mencionada.

El coeficiente de extinción del cultivo (k), es específico para cada cultivo y etapa de desarrollo, dependiendo del ángulo de inclinación de las hojas y el cenit solar. Este se puede tomar como 0,08 de acuerdo a los estudios realizados por (Jarma Orozco, Cardona Ayala y Alarcón 2009).

El índice de área foliar verde (IAF) se interpreta como la sumatoria de las superficies de hojas verdes que crece sobre una determinada porción de suelo, por lo tanto se expresa m^2 de hoja por m^2 de suelo es decir (m^2/m^2). Es importante aclarar que la “superficie de hojas” corresponde al área del Haz³⁹ y no a la

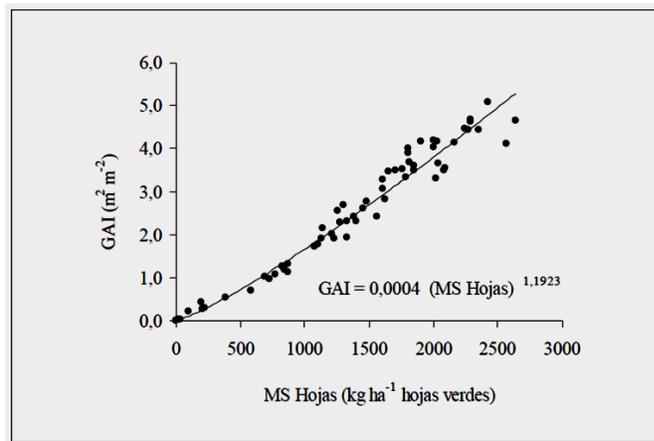
³⁸ La ley de Beer-Lambert relaciona la intensidad de luz entrante en un medio con la intensidad saliente después de que en dicho medio se produzca absorción

³⁹ Cara superior o cara adaxial del limbo de la hoja

sumatoria del haz y el envés⁴⁰, además NO se tendrán en cuenta las hojas senescentes.

El IAFi se determina a partir de la materia seca acumulada, es decir utilizando la relación desarrollada por (Fernández, 2006)

Figura 9. Relación entre la materia seca (MS) de hojas y el área foliar verde.



Esto sería equivalente a decir que cada kilogramo de hojas, corresponde a 21 m² de hojas (que sería la pendiente de la recta).

La cantidad de materia seca de hojas (*MSH*) es calculada como una proporción de la materia seca acumulada del aérea del día anterior:

Es decir:

$$MSH_i = MSA_{i-1} * CPH_i$$

Donde:

⁴⁰ Cara inferior o cara abaxial de la lámina o limbo de la hoja

MSA_{i-1} : Masa seca aérea y se expresa en (kg/ ha)

CPH_i : Corresponde a la proporción entre MS de hojas verdes y MS aérea (valor entre 0 y 1). Este valor variara significativamente dependiendo del estado de desarrollo del cultivo. Y se calcula de la siguiente manera:

$$CPH_i = CPH_{max} * (1 - CRL_i / 1 - 0,25) * (CRL_i / 0,25)^{0,25/1 - 0,25}$$

Donde CPH_{max} corresponde al valor máximo de CPH_i . El modelo asume un valor de 0,55 para este parámetro, que se alcanza cuando CRL_i es igual a 0,25.

Para determinar la eficiencia de uso de radiación (EUR_{IRFA}), el modelo asume que la radiación interceptada y la producción de materia seca, se relacionan linealmente debido a lo expuesto por (Fernández, 2006), donde definió la pendiente de esta relación como eficiencia de uso de la radiación y también aportó una base teórica para entender la misma. La eficiencia de uso de la radiación puede ser expresada de varias maneras, la radiación puede ser incidente, interceptada o absorbida, así como solar o fotosintéticamente activa, mientras el crecimiento puede expresarse como dióxido de carbono o materia seca. Ya que estas combinaciones resultan en distintos valores numéricos de EUR es conveniente establecer claramente las unidades en las cuales estarán expresadas las variables expuestas en el modelo.

La eficiencia de uso de la radiación de un cultivo es resultado de la interacción de una serie de fenómenos fisiológicos (Reynolds, 2000). Esto explica, tanto la complejidad del concepto, como también su relativa solidez y amplio uso en el área de la modelación de cultivos. La habilidad de un modelo de este tipo para simular el crecimiento vegetal depende, principalmente, de cuan invariable sea el valor de la EUR , lo que, en general, ocurre en condiciones en donde el agua, los

nutrientes o la temperatura, no limitan el crecimiento vegetal (CAMPBELL y NORMAN, 1998). Incluso cuando existe un factor que limita el crecimiento, este aún puede ser simulado considerando una reducción en la *EUR*. Al menos en el caso de agua y nitrógeno, ya que la relación teórica entre estos factores y *EUR* está bien establecida y ha sido experimentalmente cuantificada.

BIBLIOGRAFÍA

Adam, Katherine L. "Herb Production in Organic Systems." *ATTRA*, 2005: 1-20.

Agresott Foronda, Narciza. "Identificación y manejo de malezas asociadas al cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana* L.) bajo condiciones de ambientes secos en el departamento de Córdoba." 2010.

Akita, Motomu, Takeo Shigeoka, Yoko Koizumi, and Michio Kawamura. "Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor." *SpringerLink Plant Cell Reports* 13, no. 3-4 (enero 1994): 45-51.

ALINORM 97/12 . *Apéndice XI Informe de la 28ª reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios*. China : FAO, 2008.

Andolfi, Laura, Mario Macchia, and Lucia Ceccarini. "Agronomic-productive Characteristics of Two Genotype." (Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema) 2006.

Andolfi, Laura, Mario Macchia, and Lucia Ceccarini. "Agronomic-productive Characteristics of Two Genotype of *Stevia Rebaudiana* in Central Italy." *Ital. J. Agron. / Riv. Agron* (Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema), 2004: 257-262.

Atteh, J., O. Onagbesan, K. Tona, and J. Buyse. *Empleo potencial de Stevia rebaudiana en alimentación animal*. Vol. 60. Arch. Zootec. 60 vols. Madrid: Archivos de Zootecnia, 2011.

Atteh, J., O. Onagbesan, K. Tona, J. Buyse, E. Decuyper, and J. Geuns. "Empleo potencial de *Stevia rebaudiana* en alimentación animal." *SciELO - Archivos de Zootecnia*, 2011: 133-136.

Bello Cruz, Hilario, and Martín Guevara Martínez. "Diseño de una planta industrial para la producción de edulcorante natural a partir de *Stevia*." *Universidad Autónoma Metropolitana*, 2007: 1-70.

Bonilla, Carmen R, Manuel S. Sánchez, y Diego F. Perlaza. «Evaluación de métodos de propagación, fertilización nitrogenada y fenología de estevia en condiciones del Valle del Cauca.» *Acta Agronomica* 56, nº 3 (Septiembre 2007): 131 - 134.

Borda Molina, Daniel, Juan Manuel Pardo García, María Mercedes Martínez Salgado, and José Salvador Montaña Lara. "Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert." *Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana*, 2009.

Brandle, E., A. Richman, A. K. Swanson, and B. P. Chapman. "Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis." *SpringerLink Brittonia* 26, no. 4 (octubre 1974).

Bravo A., M, et al. "Caracterización Química de la Stevia rebaudiana." *Revista Peruana de Química e Ing. Química*, 2009: 5-8.

Bravo, M, et al. "Caracterización química de la Stevia rebaudiana." *Revista Peru Química. Ing. Química*, 2009: 5-8.

Calderón Díaz, Julia Adriana. "Determinación del efecto de Micorriza Vesículo- Arbuscular, Mijo (Pennisetum glaucum) y Oxamyl en el control de nematodos en el cultivo de Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)." *Ciencia y Producción Agropecuaria*, 2005: 1-18.

Cardello, Helena María, María Apare Da Silva, and María Helena Damásio. "Caracterización sensorial de edulcorantes por análisis descriptivo y análisis tiempo - intensidad." *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos* 346 (Septiembre 2003): 23-30.

Cardello, Helena María, Maria Aparecida Da Silva, and María Helena. Damasio. "Measurement of the relative sweetness of stevia extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations." *SpringerLink Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 1999: 119-152.

Castellanos, Catalina. "Estudio de la época crítica de competencia de arvenses y análisis de crecimiento de Estevia (Stevia rebaudiana Bert.), bajo invernadero en la sabana de Bogotá." *Universidad Nacional de Colombia*, 2011: 1-7.

Central Cooperativa Nacional, LTDA "Credicoop" . "Proyecto de Producción de Ka'a He'e (Yerba Dulce) Asunción, Paraguay." *Informe Proyecto de Producción de Ka'a He'e (Yerba Dulce) Asunción, Paraguay*, 1980: 4- 62.

Chang, J. C., M. C. Wu, I. M. Liu, and J. T. Cheng. "Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats." *Thieme e Journals*, 2005: 610-616.

Colombia Alternative Development. "Manual de Fitoprotección y Análisis de Plaguicidas." *Fundación Chemonics Colombia*, 2003.

Cuervo, Jairo., C. Parra Cortes, and C. Rivera Sandoval. "Identificación de sclerotinia sclerotium en Estevia Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni en los invernaderos de la Universidad Nacional de Colombia." *Universidad Nacional de Colombia*, 2010: 1-7.

Curi, R., M. Alvarez, R.B. Bazotte, L.M. Botion, J.L. Godoy, and A. Bracht. "Effect of Stevia rebaudiana on glucose tolerance in normal adult humans." *Revista brasileira de pesquisas medicas e biológicas* (sociedad brasileira de biofísica), 1986: 771-775.

Daciw, Marcos Gabriel. *Stevia rebaudiana bertoni, Kaá- heé*. Vol. 1. Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes, 2005.

De Vargas, Roger. "Informe sobre viaje al Japón para observar la producción, comercialización e." *Ciencia y Cultura* 29 , 1980: 1240-1248.

Díaz, M., A. García, and M. Velásquez. "EVALUACIÓN DE FUENTES QUÍMICAS Y ORGÁNICAS DE FERTILIZACIÓN EN EL CULTIVO DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni)." *Universidad Nacional de Colombia* , 2010: 1-5.

Diniz, Fronza, and Marcos Vinícius Folegatti. "Consumo de água da cultura de estévia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) estimado por microlisímetro." *Scientia Agricola* 60, no. 3 (Julio/Septiembre 2003): 595 - 599.

Dourado, D., D. A. Teruel, K. Reichardt, D. R. Nielsen, J. A. Frizzone, and O. S. Bacchi. "Principles of crop modelling and simulation: II. the implications of the objective in model development." *Sci. agric. vol.55 Piracicaba* vol.55 special issue (Agosto 1998): 51-57.

Duke, James. *Handbook of Medicinal Herbs. 5ª*. Boca Ratón, Florida: CRC Press, 1987.

Elizondo, José Alberto, and Juan Jose Ramírez. *Efectos del extracto de Stevia rebaudiana bertonii en la enfermedad periodontal*.

Espitia, Miguel M., Rafael A. Montoya, Juana R. Robles, Carolina C. C. Barbosa, and Cesar A. Vergara. "Modelos Estadísticos para estimación del área foliar en *Stevia rebaudiana* B. en el Sinu Medio." *Temas Agrarios*, 2006: 45-51.

Estevia, Asociación Europea de la. *EUSTAS* . Febrero 22, 2006. <http://www.eustas.org> (accessed Enero 29, 2012).

—. *EUSTAS* . Febrero 22, 2006. <http://www.eustas.org> (accessed Enero 29, 2012).

Ferreira, C. M., and Walter Handro. "Production, maintenance and plant regeneration from cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni." *SpringerLink Plant Cell Reports* 7, no. 2 (marzo 1988): 1-6.

FLORES NICOLALDE, JOSÉ EMILIANO, and ELIANA ELIZABETH LITA DÁVILA. *EFEECTO DE TRES NIVELES DE N, P, K Y CUATRO PROMOTORES DE CRECIMIENTO EN EL RENDIMIENTO DE STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni) EN SELVA ALEGRE, IMBABURA*. Ibarra- Ecuador: UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE, 2011.

Fronza, Diniz, and Marcos Vinícius Folegatti. "WATER CONSUMPTION OF THE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) CROP ESTIMATED THROUGH MICROLYSIMETER." *USP/ESALQ - Depto. de Engenharia Rural, C.P. 9 - 13418-900 - Piracicaba, SP Brasil*, 2003: 595-599.

García, Mauricio. *Guía para el manejo de tecnologías de producción limpia*. Bogotá: CAB, Ciencia y Tecnología 137, 2004.

González, Raúl Emilio, Julio Renán Paniagu, and Edgar Mayeregger. "Necesidad de agua para el cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana*, B.), calculado sobre la base de lectura de microlisímetro." *Investigación Agraria* 4, no. 2 (2002): 19 - 24.

Grashoff, Jerold Lee. "A systematic study of the North and Central American species of *Stevia*." *University of Texas at Austin*, 1972: 609.

Gutierrez R., Viviana, Angela Pinzón E., Jaime Casas, and María Mercedes Martínez. "Determinación de actividad celulolítica en suelo proveniente de cultivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni, mediante la comparación de dos técnicas cuantitativas." *Agronomía Colombiana* 26, no. 3 (2008): 497-504.

Hale, Andy D. "*Stevia rebaudiana*: propiedades, mercados y factibilidad de producción de un cultivo de venta al contado en Bolivia." *Chemonics International INC*, 2001.

Hunt, R. "The fitted curve in plant growth studies." *Mathematics and plant physiology.*, 1981: 341-352.

Ibrahim, I. A., M. I. Nasr, B. R. Mohammedm, and M. M. El-Zefzafi. "Nutrient factors affecting in vitro cultivation of *Stevia rebaudiana*." *SpringerLink Sugar Tech* 10,, no. 3 (octubre 2008): 248-253.

Infante Posada, Pedro Alexander. "Determinación del efecto de la acumulación de unidades de calor sobre el desarrollo y el rendimiento de dos variedades de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L. spp. vulgaris) en Duitama." *Universidad Nacional de Colombia*, 2009.

Institute of Himalayan Bioresource. "Estimation of leaf area in stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni)." *Asian journal of Plant Sciences*, 2007: 1037 - 1043.

Jarma Orozco, Alfredo, Carlos Cardona Ayala, and John Alarcón. "Temperaturas y radiación en la producción de glucósidos en *Stevia rebaudiana* en el Caribe Húmedo colombiano." *Ciencias Agrícolas* , 2009: 71-80.

Jarma Orozco, Alfredo, Carlos Cardona Ayala, and John Alarcón. "Temperaturas y radiación en la producción de glucósidos en *Stevia rebaudiana* en el Caribe Húmedo colombiano." *Agronomía Colombiana* , 2009: 71-80.

Jarma, Alfredo. "Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión." *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2008: 110-121.

Jarma, Alfredo, Teresita Rengifo, and Hermes Araménd. "Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana*) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento." *Agronomía Colombiana*, mayo 2006: 38-47.

Jarma, Alfredo, Teresita Rengifo, and Hermes Araméndiz-Tatis. "Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa ." *Agronomía Colombiana* 23, no. 2 (Julio / Diciembre 2005): 207 - 216.

Jordán, Francisco. *La propagación de ka'a he'é, Stevia rebaudiana Bertoni*. Paraguay: Primer Simposio Nacional de la Stevia (ka'a he'é), 1984.

Klepsch, Andreas. "'Stevia' – Ante Portas! Aktuelle Rechtslage und Stand der Zulassungsverfahren." *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* , 2009: 211-212.

Kohda, H., R. Kasai, K. Yamasaki, K. Murakami, and O Tanaka. "Phytochemistry." In *Phytochemistry*, by H. Kohda, R. Kasai, K. Yamasaki, K. Murakami and O Tanaka, 15, 981. Japon , 1976.

Koyama, E., et al. "In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora." *Food and Chemical Toxicology*, 2003: 359-374.

Kroyer, Gerhard. "Stevioside and Stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients." *SpringerLink Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2010: 225-229.

Ladygin, V. G., N. I. Bondarev, G. A. Semenova, A. A. Smolov, O. V. Reshetnyak, and A. M. Nosov. "Chloroplast ultrastructure, photosynthetic apparatus activities and production of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* in vivo and in vitro." *SpringerLink Biologia Plantarum* 52, no. 1 (marzo 2008): 9-16.

Landázuri, Pablo A, and Juan O Tigrero. *Stevia rebaudiana BERTONI, UNA PLANTA MEDICINAL*. Ecuador: Edición Especial. ESPE. Sangolquí, 2009.

López, Emilce. *Stevia rebaudiana (Bertoni), Edulcorante Natural*. Agosto 16, 2009. <http://groups.google.com/group/Vivir-Bien> (accessed Junio 23, 2011).

Mantovaneli, I. C. C., E. C. Ferretti, M. R. Simões, and C. Ferreira da Silva. "The effect of temperature and flow rate on the clarification of the aqueous stevia-extract in a fixed-bed column with zeolites." *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2004: 449-458.

Marico, Marley, Pedro Henrique Monnerat, Paulo Roberto Gomes Pereira, Paulo César Rezende Fontes, and Vicente de Paulo Campos Godinho. "Deficiência de macronutrientes em estêvia: sintomas visuais e efeitos no crescimento, composição química e produção de esteviosídeo." *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34, no. 6 (Junio 1999).

Marín, Wilmer. "Sondeo de mercado de estevia." *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt*. 2004.

http://www.minambiente.gov.co/documentos/347_Sondeo_del_Mercado_de_Estevia.pdf
(accessed abril 15, 2001).

Matthias, Saß. "Anwendung von Stevia in Getränken – Herausforderungen und Lösungen." *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* , 2010: 1-2.

Melis, M. S. "Effects of chronic administration of Stevia rebaudiana on fertility in rats." *Journal of Ethnopharmacology* 67 (Noviembre 1999): 157-161.

Ministerio de Industria y Comercio. *Foro de competitividad de la cadena productiva de la Stevia*. Paraguay: Ministerio de Industria y Comercio, 2006.

Mitsuhashi, H, J Ueno, and T Sumita. "Studies on the cultivation of Stevia rebaudiana Bert. Determination of stevioside II." *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* , 1975: 1501-1503.

Monteiro, Reinaldo. "Taxonomía e biología da reprodução de Stevia rebaudiana (Bert.) ." / *Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana Bertoni.* , 1982: 29-33.

Niño Ruiz, Jaime Alberto. "Estudio de las necesidades de riego en el cultivo de Estevia (SteviarebaudianaBert.) bajo invernadero en el Altiplano de Bogotá." *Universida Nacional de Colombia*, 2010: 1-12.

Niño Ruiz, Jaime Alberto. "Estudio de las necesidades de riego en el cultivo de Estevia (SteviarebaudianaBert.) bajo invernadero en el Altiplano de Bogotá." *Universida Nacional de Colombia* , 2010.

Nublea, T. F., Wilson Manara, and , M. C. Lopes. "Comportamento reprodutivo em Stevia rebaudiana (BERT.) Bertoni." *Open Journal Systems* 19, no. 1 (1989).

Nuñez, Evangelina. "Stevia rebaudiana Bertoni, un sustituto del azúcar." *Área Ciencia de las Plantas y Recursos Naturales* (Maestría en Producción Vegetal – Ciclo de Seminarios 2010), 2010: 1-3.

Omaña, Zoraida. *Manual de estudio de la asignatura Investigacion de Operaciones*. Carabobo: Universidad de Carabobo, 2008.

Ometto, J. O. *Bioclimatología vegetal*. Sao Pablo: Ceres, 1981.

Pàmies, Josep. "La dulce revolución ." *Revista Athanor*, 2007: 62 - 75.

Parra Mesa, Carlos Mario, Jorge Iván Pérez Rave, and Diego Torres Franco. "Modelación y simulación computacional de un proceso productivo de una pequeña empresa usando dinámica de sistemas." *INGENIERÍA & DESARROLLO* , 2006: 151-171.

Pasquel, Antonio, and Abel del Castillo Dante Linares. "MONTAJE DE UN EXTRACTOR DE FLUIDOS PRESURIZADOS." *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 2001: 9-14.

Peña Motencinos, Tania Edith. "La Stevia Rebaudiana y su Propiedad Hipoglicemiante en Pacientes con Diabetes Mellitos Tipo 2." *Universidad Mayor de San Andres Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquimicas*, 2006.

Pincha, Tania Paola, and Manuel Suquilanda Valdivieso. "Respuesta del Cultivo de Estevia (stevia rebaudiana Bertoni), a la Aplicacion foliar Complementaria de Tres Fitoestimulantes a Tres Dosis Tumbaco, Pichincha. ." *XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo*, 2008.

Piojan, Manuel. "Los dulces de un mundo sin azúcar." *Ámbito Farmaceutico Etnobotánica*, 2006: 102-110.

Posso, Pedro Santiago. "cadena productiva de plantas aromaticas,medicinales,condimentarias y aceites esenciales." *Secretaría de Agricultura y Pesca*.

Ramesh, K, Naleeni Ramawat, and Virendra Singh. "Leaf Area Distribution Pattern and Non-Destructive estimation Methods of Leaf area For stevia Rebaudiana (bert.)Bertoni." *Asian Journal Of Plant Sciences* , 2007: 1037-1043.

Ramírez, Alberto. *Metodología de la Investigación Científica*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana - Facultad de ciencias Ambientales y Rurales, 2006.

Richman, Alex, et al. "Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of Stevia rebaudiana." *The Plant Journal*, NOVIEMBRE 2004: 56 - 67.

Rimington, G.M., and D.A. Charles. "Mathematical descriptions of plant growth and development." *Plant growth modeling for resource management 1* (1987).

Rivero, Dilue, and Elí Casadiego. "Estrategias técnicas y económicas para la producción y el procesamiento de la stevia." *Revista Electrónica Facultad de Ingeniería UVM* (Revista Electronica facultad de ingenieria UVM) 5 (2011): 20.

Rivero, Dilue, and Elí Casadiego. "Estrategias técnicas y económicas para la producción y procesamiento de la Estevia." *Revista Electronica Facultad de Ingeniería UVM* 5, no. 1 (2011): 329 - 348.

Rodríguez González, Horacio, et al. "Comportamiento del cultivo de Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni en Cuba." *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 12, no. 4 (octubre - diciembre 2007): 1-7.

Rodríguez González, Horacio, et al. "Comportamiento del cultivo de Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni en Cuba." *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 12, no. 4 (octubre - diciembre 2007).

Sakaguchi, Mixue, and Kan Tatsuiko. "As pesquisas japonesas com Stevia rabaudiana (Bert.) Bertoni e o esteviosideo." *Ciencia e Cultura* , 1982: 235-248.

Salazar, Gustavo, Ruth Ávila, and Salomón Salcedo. "Comunidad Andina." *Comunidad Andina*. Octubre 2004. http://www.comunidadandina.org/rural/doc_seguridad/aup.pdf (accessed Junio 24, 2011).

Salles Scarpari, Maximiliano, Lluís Miquel Plà Aragonés, and Edgar Gomes Ferreira de Beauclair. "LA OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE VARIEDADES DE CAÑA-DE-AZÚCAR." *REVISTA INVESTIGACIÓN OPERACIONAL*, 2008: 26-33.

Sarduy, Yanetsys. "El análisis de información y las investigaciones cuantitativa y cualitativa." *Revista Cubana de Salud Pública* 33, no. 2 (2007): 16-23.

Shock, Clinton. "Rebaudi's stevia: natural noncaloric sweeteners." *CALIFORNIA AGRICULTURE*, 1982: 4-6.

Soto, Alicia Ester, and Susana Del Val. "EXTRACCIÓN DE LOS PRINCIPIOS EDULCORANTES DE LA STEVIA REBAUDIANA." *Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos*, 2002: 5-9.

Suárez, Isidro E., and José A. Salgado. "PROPAGACIÓN IN VITRO DE Stevia rebaudiana BERT. (Asteraceae-Eupatorieae) A TRAVÉS DE ORGANOGÉNESIS." *TEMAS AGRARIOS*, 2008: 40-48.

Sumida, Tetsuya. "Studies on Stevia rebaudiana Bertoni as a new possible crop for sweetening resource in Japan." *Cent. Agric*, 1980: 1-71.

Taiariol, Rubén Darío. "Esteviósido y los demás edulcorantes." *Informe Agronomico* (El Cid Editor), 2009: 19.

Takahashi, Luciana, Elena Melges, and José Walter Carneiro. "Desempenho Germinativo de Sementes de Stevia rebaudiana." *Revista Brasileira de Sementes* (Revista Brasileira de Sementes), 1996: 1-5.

TAKAHASHI, LUCIANA, ELENA MELGES, and JOSÉ WALTER P. CARNEIRO. "DESEMPENHO GERMINATIVO DE SEMENTES DE Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni SOB DIFERENTES TEMPERATURAS." *Revista Brasileira de Sementes*, 1996.

Tamura, Yukiyoishi , Shigeharu Nakamura, and Hiroshi Fuku. "Comparison of Stevia plants grown from seeds, cuttings and stem-tip cultures for growth and sweet diterpene glucosides." *Springer* 3, no. 5 (1984): 50 - 62.

Tamura, Yukiyoishi , Shigeharu Nakamura, Hiroshi Fuku, and Mamoru Tabata. "Comparison of Stevia plants grown from seeds, cuttings and stem-tip cultures for growth and sweet diterpene glucosides." *Springer* 3, no. 5 (1984): 50 - 62.

Teixeira Duarte, Marta Cristina. "Atividade Antimicrobiana de Plantas." *Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas*, 2006.

Urango, Naudith, and Rodrigo Orlando Campo Arana. "Identificación de enfermedades en estevia (*Stevia rebaudiana bertonii*) y albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en parcelas demostrativas en San Isidro Córdoba." *Facultad de ciencias agrícolas, Montería, Colombia*, 2010: 1-4.

Utumi, M. M., P. H. Monnerat, P. R. Pereira, P. C. Fontes, and V. de P. Godinho. "Deficiência de macronutrientes em estevia: sintomas visuais e efeitos no crescimento, composição química e produção de esteviosídeo." *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34, no. 6 (1999): 911-1118.

Volker, Maier, and Christian Huber. "Stevia – Ein natürliches Süßungsmittel mit gesundheitlichem Zusatznutzen?" *SpringerLink Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2010: 1-4.