



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y

BROMATOLOGÍA

Cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni en campo y por micropropagación *in vitro*: estudio prospectivo de su potencial antioxidante en función del tipo de cultivo y de las condiciones de conservación

TESIS DOCTORAL (RESUMEN EN CASTELLANO)

Marisa Ramos Barroso

Supervisores:

Dra. Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Dr. Celestino Santos-Buelga

Dra. Maria João Sousa

Salamanca, 2019



DPTO QUIMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN
Y BROMATOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA

Campus Miguel de Unamuno-37007 Salamanca
Teléf.: 923 294537 – Fax: 923 294515;
e-mail: nutr@usal.es

Celestino Santos Buelga, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca, Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira, Profesora Coordinadora Principal del Instituto Politécnico de Bragança (Portugal), y María João Sousa, Profesora Adjunta del mismo Instituto, directores del trabajo “*Stevia rebaudiana* Bertoni cultivated in the field and obtained by *in vitro* micropropagation: A prospective study of the antioxidant potential in different culture and storage conditions”, realizado por Marisa Ramos Barroso para optar al grado de Doctor, AUTORIZAN la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 18 de junio de 2019

Celestino Santos-Buelga

Isabel C. F. R. Ferreira

Maria João Sousa

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	7
1.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	7
1.2. Procesos de conservación	8
1.3. Fertilización para mejorar la producción de compuestos bioactivos	9
1.4. Fitohormonas para mejorar la producción <i>in vitro</i> de compuestos bioactivos	10
OBJETIVOS	11
PRINCIPALES RESULTADOS	12
CONCLUSIONES	14
REFERENCIAS	15

INTRODUCCIÓN

1.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni

Stevia rebaudiana Bertoni (estevia) es un arbusto perenne, miembro de la familia Asteraceae, que alcanza hasta 90 cm de altura, con hojas pequeñas de 3 a 5 cm de longitud y 1 a 1,5 cm de ancho. Las flores son blancas y los pétalos se agrupan en racimos terminales o axilares. Crecen en altitudes de 500-3000 m en zonas de montaña semiseca, pero también pueden crecer en pastizales, matorrales y áreas subalpinas (**Magalhães et al., 2000; Serfaty et al., 2013**). Es una planta originaria del noreste de Paraguay y áreas vecinas de Brasil y Argentina, cuyas hojas secas han sido utilizadas durante siglos por los indígenas guaraníes de América del Sur como un edulcorante tradicional, al que llaman *ka'a he'ê* ("hierba dulce"). Actualmente, la estevia es reconocida por sus propiedades edulcorantes y, en este sentido, constituye una especie de interés económico emergente en todo el mundo (**Khalil et al., 2016**). China es el mayor productor mundial, aunque también se cultiva en otros lugares, como Japón, Taiwán, Tailandia, Corea, Brasil, Malasia, Paraguay y algunos países de la Unión Europea. Japón y Corea son sus mercados más importantes (**Yadav et al., 2010**).

El esteviósido ($C_{38}H_{60}O_{18}$), un compuesto diterpenoide, es el edulcorante principal producido por la estevia. Los glicósidos de esteviol (SGs) pueden alcanzar hasta el 30% del peso seco de la hoja de estevia (**Geuns et al., 2003**) y tienen un poder edulcorante unas 300 veces mayor que el de la sacarosa (**Gardana et al., 2010**). En los mercados internacionales, los edulcorantes derivados de la estevia se comercializan comúnmente en forma de extractos líquidos o como cristales de esteviósido (**Bender, 2018**). Japón fue el primer país de Asia en comercializar el esteviósido como edulcorante para las industrias de alimentos y medicamentos (**Pal et al., 2015; Bender, 2018**).

La demanda de edulcorantes naturales ha ido creciendo en importancia debido a la controversia asociada al uso de algunos edulcorantes sintéticos como ciclamato, aspartamo o acesulfamo K. Los SGs se han utilizado ampliamente como edulcorantes naturales no calóricos en productos como refrescos, salsa de soja, sopas de pasta o yogur en Japón, Brasil y otros países. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria reconoció la seguridad del extracto de hoja de estevia para uso alimentario en 2011 estando actualmente reconocido como aditivo alimentario en la Unión Europea con el código E-960 (**Yu et al., 2017**). Las hojas de estevia también se consumen cada vez más como infusiones por sus propiedades

antioxidantes, que se han relacionado con sus contenidos de compuestos fenólicos (**Periche et al., 2015**).

Además de esteviósido, los extractos de estevia contienen también otros metabolitos con potencial bioactivo, como alcaloides, complejos clorofila-proteína solubles en agua, xantofilas, compuestos fenólicos, oligosacáridos neutros solubles en agua, azúcares libres, aminoácidos, lípidos, aceites esenciales y oligoelementos (**Komissarenko et al., 1994**). También se ha descrito que poseen actividades antimicrobianas y antioxidantes (**Xi et al., 1998; Tadhani et al., 2007**). Entre los antioxidantes de la hoja de estevia se encuentran compuestos como los tocoferoles, ácido ascórbico (**Kim et al., 2011**) o compuestos fenólicos (**Shukla et al., 2009**).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de plantas superiores sintetizados para una variedad de funciones, entre las que se incluyen los mecanismos de resistencia natural contra el estrés biótico y abiótico, defensa frente herbívoros o procesos de señalización celular. Como componentes de los alimentos, estos compuestos se han relacionado con la prevención de enfermedades de origen oxidativo, como la enfermedad coronaria (**Robbins et al., 2005**). Otras propiedades descritas para los compuestos fenólicos incluyen actividades anticariogénicas, antineoplásicas, antihipertensivas, antiinflamatorias y antihiperglucémicas (**Yang et al., 2015**).

1.2. Procesos de conservación

Las plantas con valor comercial a menudo se almacenan durante un tiempo variable antes de su uso y una conservación eficiente es muy importante para evitar la pérdida de moléculas bioactivas. El secado es la forma más antigua de preservar el material vegetal. En este proceso, se pierde hasta el 85% de peso y durante el mismo pueden producirse pérdidas de componentes de bajo punto de ebullición y cambios que afectan la composición nutricional, física y química de las hojas, así como atributos de calidad como textura, color y sabor (**Babu et al. 2018; Ahmad-Qasem et al., 2013**). El mayor inconveniente, sin duda, radica en las pérdidas de componentes nutritivos durante el procesado térmico a alta temperatura, como vitaminas termolábiles (**Korus et al., 2011**). Por otro lado, debido al bajo contenido de agua, las plantas secas presentan mayor densidad de nutrientes y de componentes bioactivos que las frescas (**Babu et al., 2018**).

La congelación de alimentos es otro método eficiente de conservación y almacenamiento utilizado para preservar las materias primas vegetales, tanto en la industria alimentaria como

en el hogar, aunque su coste es mayor que el secado con aire caliente (**Periche et al., 2015; Korus et al., 2011**). Las bajas temperaturas utilizadas en esta técnica contribuyen a mantener la calidad inicial y el valor nutritivo con pocos cambios. En general, se considera que el secado por liofilización es el proceso que da lugar a productos secos de mayor calidad, aunque se trata de un proceso costoso.

1.3. Fertilización para mejorar la producción de compuestos bioactivos

Muchas propiedades funcionales de los alimentos se basan en las acciones de componentes bioactivos específicos. La concentración de metabolitos secundarios bioactivos de las plantas (fitoquímicos) está influida por las condiciones de cultivo, como la intensidad luminosa, niveles de dióxido de carbono, temperatura, fertilización o factores bióticos y abióticos (**Ibrahim et al., 2011**). La diversidad química y biológica de las plantas de estevia está asimismo determinada por factores como el genotipo, la etapa fenológica y las condiciones de crecimiento (**Brandle & Rosa, 1992; Brandle et al., 1998; Yadav et al., 2010**). La fertilización con nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), así como el estado de la planta, juegan un papel importante en la definición de la concentración final de metabolitos secundarios (**Aires et al., 2006**). El N es uno de los elementos esenciales más importantes para las plantas, siendo utilizado para sintetizar muchos compuestos orgánicos, como aminoácidos, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos (**Koeduka et al., 2006**). Además, tiene otras funciones en la vida de las plantas, como las relacionadas con el rendimiento en obtención de biomasa (**Rodrigues et al., 2016**). Se ha indicado que la disponibilidad de N no sólo influye en la producción de metabolitos secundarios de manera predecible, sino también en los procesos de diferenciación y crecimiento de las plantas (**Aires et al., 2006; Ibrahim et al., 2011**). De esta manera, es de esperar que el empleo de distintas tasas de fertilización con N tenga influencia en la biosíntesis de constituyentes activos (**Karimi et al., 2013**). En estudios sobre plantas como manzana o pomelo, se encontró que el empleo de concentraciones crecientes de N ejercía un efecto negativo en la biosíntesis de flavonoides o ácido clorogénico (**Patil y Alva, 1999; Awad & de Jager, 2002**), mientras que su déficit aumentaba la concentración de flavonoides en tomate (**Bongue y Phillips, 1995**). Existe, sin embargo, una falta de información sobre los efectos reales de la fertilización en las propiedades químicas y bioactivas de *S. rebaudiana*. **Tavarini et al. (2015)** observaron que tanto la fertilización con N como el momento de cosecha tenían una influencia pronunciada sobre la composición fitoquímica y la actividad antioxidante de la estevia. Estos resultados

sugieren que un adecuado manejo del nivel de fertilización podría ser utilizado para modificar la expresión de metabolitos secundarios.

1.4. Fitohormonas para mejorar la producción *in vitro* de compuestos

bioactivos

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se utilizan para cultivar células, tejidos y órganos de plantas en condiciones axénicas (*in vitro*), así como para regenerar y propagar plantas completas. El cultivo *in vitro* en un ambiente controlado, con un conocimiento adecuado de las condiciones requeridas y de la naturaleza del material vegetal, garantiza una propagación clonal efectiva de genotipos seleccionados por sus mejores características de plantas económicamente importantes (Iliev et al., 2010).

Estas técnicas son empleadas en muchos laboratorios comerciales e institutos de investigación, ya que ofrecen ciertas ventajas sobre los métodos clásicos de propagación, para multiplicación rápida de plantas, conservación de germoplasma, eliminación de patógenos, manipulación genética y producción de metabolitos secundarios utilizados como productos farmacéuticos, aromas, fragancias, colorantes, aditivos alimentarios o agroquímicos (Wang et al., 2017; Kumar & Reddy, 2011). El empleo de reguladores del crecimiento, o fitohormonas, ha revolucionado el desarrollo del cultivo de plantas *in vitro*, al permitir el control de procesos fisiológicos de células más especializadas y la inducción de la producción de metabolitos secundarios (Dias et al., 2016).

Existen tres tipos de técnicas de micropropagación: 1) la propagación de brotes empleando citoquininas, como benciladenina o cinetina; 2) la obtención diferenciada de brotes múltiples a partir de tejido indiferenciado (callo) utilizando auxinas, como el ácido indol acético, y 3) la diferenciación embrionaria a partir de callos. Hoy en día, el método de propagación de brotes es el más empleado, ya que los otros dos están sujetos a variaciones genéticas al partir de material indiferenciado (Ota y Yokoyama 2010). Las citoquininas son un grupo de fitohormonas que estimulan la captación de agua, aumentan la división celular, promueven el desarrollo de órganos y conducen a la regeneración y proliferación de brotes. La cinetina (6-furfurilaminopurina) es un ejemplo de citoquinina sintética que tiene capacidad para mitigar los efectos adversos del estrés salino durante el crecimiento de las plantas (Eser et al., 2016).

OBJETIVOS

La realización de estudios con condiciones de cultivo bien establecidas es de extrema importancia para estandarizar la producción de plantas y, por lo tanto, su composición química. Sin embargo, las condiciones de conservación también pueden influir sobre los compuestos bioactivos presentes en la mismas.

Considerando que tanto las condiciones de cultivo como de conservación ejercen un papel determinante sobre la actividad biológica de *Stevia rebaudiana*, en el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluar los efectos de procesos de conservación sobre el potencial antioxidante de *S. rebaudiana*, comparando la actividad captadora de radicales libres, el poder reductor y la composición de sustancias antioxidantes de muestras congeladas en fresco y plantas desecadas. Las muestras a estudiar se obtendrán de campos experimentales en condiciones de cultivo definidas, para estandarizar la producción y, por tanto, su composición química.
2. Evaluar el efecto de diferentes tasas de aplicación de N sobre la composición química en hojas de estevia posteriormente congeladas o desecadas, y definir las mejores condiciones de cultivo para maximizar los niveles de estos compuestos.
3. Analizar en cuanto a su potencial antioxidante hojas de estevia obtenidas por cultivo *in vitro*; más específicamente, muestras obtenidas en presencia de cinetina se compararán con muestras cultivadas sin esta fitohormona, en cuanto a composición de tocoferoles, azúcares libres y compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes.

PRINCIPALES RESULTADOS

Muestras de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivadas en el noreste de Portugal fueron sometidas a dos condiciones de conservación diferentes: secado en invernadero a 30 °C y congelación en fresco a -20 °C, y posteriormente almacenadas durante seis días. Por otra parte, para definir las mejores condiciones de cultivo y maximizar los niveles de compuestos bioactivos, se evaluó también el efecto de diferentes concentraciones de nitrógeno (N) sobre la composición química y las propiedades antioxidantes de las hojas frescas y secas congeladas de estevia. En todos los casos, las muestras fueron caracterizadas en cuanto a cuantificación e identificación de azúcares libres, tocoferoles y compuestos fenólicos, y determinación del potencial antioxidante mediante ensayos de captación del radical DPPH y poder reductor (RP) de sus extractos metanol:agua.

Los azúcares más abundantes en las muestras estudiadas fueron xilosa, arabinosa + fructosa y sacarosa, mientras que los principales compuestos fenólicos fueron los derivados del ácido cafeico, ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogénico) y ácido 3,5-O-dicafeoilquínico.

Las muestras secadas en invernadero dieron lugar a valores más elevados de actividad antioxidante y de compuestos fenólicos totales que las mantenidas a -20 °C. Sin embargo, las muestras frescas congeladas presentaron contenidos más altos de tocoferoles y de azúcares totales. Se pudo comprobar que el proceso de conservación afectaba más significativamente los valores de tocoferoles y de contenido de azúcares que la fertilización con N. En general, la fertilización con N conducía a una mejora en la composición química y el potencial bioactivo de las hojas de estevia. Los mayores niveles de compuestos fenólicos se encontraron en las muestras secas y en aquellas fertilizadas con 25 kg de N/ha. Las hojas de plantas fertilizadas con 25 y 50 kg N/ha también fueron las que evidenciaron mayor actividad antioxidante, que parecía estar especialmente determinada por la composición fenólica.

Los reguladores del crecimiento de las plantas, que controlan los procesos fisiológicos en células especializadas, se utilizan en el desarrollo de cultivos de plantas *in vitro*. Por ello, se estudió también la composición en azúcares libres, tocoferoles y compuestos fenólicos y el potencial antioxidante en hojas de estevia obtenidas por cultivo *in vitro* con y sin cinetina (fitorregulador). Las muestras cultivadas sin cinetina evidenciaron una mayor concentración de tocoferoles totales y de compuestos fenólicos que las obtenidas en presencia de cinetina. Por lo contrario, se observó una tendencia opuesta para los azúcares libres totales. Los

extractos de metanol:agua obtenidos de muestras cultivadas sin cinetina también evidenciaron mayor actividad captadora de radicales y poder reductor que los de las muestras cultivadas en presencia de cinetina, lo que parece confirmar la relación de este fitorregulador con la producción de compuestos fenólicos. En general, el cultivo *in vitro* es una forma eficaz de obtener biomasa vegetal que pueda ser utilizada como fuente de compuestos antioxidantes de manera continua y sin estar sometida a condiciones edafoclimáticas. Sin embargo, a las dosis ensayadas el empleo de cinetina, aunque mejoró la tasa de multiplicación, no condujo a una mayor acumulación de moléculas bioactivas, por lo que se deberían ensayar otros niveles de aplicación de este regulador, así como otras hormonas para establecer su influencia sobre la producción de este tipo de compuestos.

El estudio realizado proporciona evidencias para elegir la metodología más apropiada para favorecer la acumulación y preservar los niveles de metabolitos primarios y secundarios de *Stevia rebaudiana* relacionados con su actividad antioxidante. Los resultados obtenidos con relación a las prácticas de cultivo y su influencia sobre la calidad y la composición fitoquímica de hojas de estevia aportan información relevante de cara a su producción y posible empleo con fines de promoción de la salud, como nutracéuticos o ingredientes de alimentos funcionales.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se ha demostrado que muestras procesadas por desecación presentan mayor actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos que muestras congeladas en fresco, mientras que estas últimas poseen mayores niveles de tocoferoles y de azúcares libres. De este modo, se ha comprobado que tan importante como establecer condiciones de cultivo de *S. rebaudiana* adecuadas para estandarizar la composición química, lo es el proceso de conservación elegido para el almacenamiento de esta planta.

Otra conclusión relevante es que el proceso de conservación ejerce mayor impacto sobre la composición química que la fertilización con N durante el cultivo de la planta. Las muestras de estevia con mayor abundancia de compuestos fenólicos y de azúcares libres (es decir, las desecadas y aquellas no fertilizadas o cultivadas con bajo nivel de fertilización) son también las que poseen la mayor capacidad reductora. Por su parte, las muestras de estevia con mayores contenidos de tocoferoles poseen mayor actividad captadora de radicales libres. Parece, por tanto, que la actividad antioxidante de las hojas de estevia está estrechamente relacionada con su composición fitoquímica y los mecanismos de acción antioxidante considerados. En todo caso, existe, en general, una buena correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de algunos compuestos fenólicos presentes en las muestras, especialmente quercetina-3-*O*-rutinosido y ácido 5-*O*-cafeoilquínico (compuesto fenólico mayoritario en las hojas de estevia).

El cultivo *in vitro* de plantas de estevia con y sin cinetina no produce un aumento significativo ni en el potencial antioxidante ni en los contenidos de compuestos fenólicos (excepto en el caso de algunos ácidos clorogénicos secundarios) y de azúcares libres, aunque da lugar a una mayor tasa de multiplicación, lo que es interesante con vistas a la producción industrial. Son necesarios más estudios para establecer si el empleo de otras concentraciones de cinetina podría mejorar la acumulación de sustancias antioxidantes en la hoja, así como ensayar otros fitorreguladores y condiciones de cultivo y de estrés. Esta evaluación sería de gran importancia, ya que las técnicas de micropropagación constituyen una herramienta eficaz para obtener biomasa vegetal para explotación industrial. El cultivo *in vitro* permite la producción continua sin depender de condiciones edafoclimáticas, lo que lo hace de gran valor para estudios sin las limitaciones impuestas por el clima o el terreno.

REFERENCIAS

A

- Ahmad-Qasem**, M.H., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Mulet, A., García-Pérez, J.V., **2013**. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Resea. Int.*, 1, 50,189–196.
- Aires**, A., Rosa, E., & Carvalho, R., **2006**. Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. italica). *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 86, 1512–1516.
- Awad**, M.A., & **de Jager**, A., **2002**. Relationship between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in ‘Elstar’ apple skin. *Sci. Hort.*, 92, 265–276.

B

- Babu**, A.K., Kumaresan, G., Antony Aroul Raj, V., Velraj, R., **2018**. Review of leaf drying: Mechanism and influencing parameters, drying methods, nutrient preservation, and mathematical models. *Renew. and Sustain. Ener. Rev.*, 90, 536–556.
- Bender C.**, **2018**. *Stevia Rebaudiana’s* Antioxidant Properties. J.-M. Mérillon, K.G. Ramawat (eds.), *Sweeteners, Reference Series in Phytochem.*, 349-375.
- Brandle**, J., & Rosa, N., **1992**. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Can. Jour. of Plant Sci.*, 72, 1263–1266.
- Brandle**, J.E., Starratt, A.N., & Gijzen, M., **1998**. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, 78, 527–536.
- Bongue-B. M.** & **Phillips**, D.A. **1995**. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol. Biochem.*, 33, 539–546.

D

Dias, M.I.; Sousa, M.J.; Alves, R.C.; Ferreira, I.C.F.R., 2016. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Ind. Crops Prod.*, 82, 9–22.

E

Eser, A.; Aydemir, T., 2016. The effect of kinetin on wheat seedlings exposed to boron. *Plant Physiol. Biochem.*, 108, 158–164.

G

Gardana, C., Scaglianti, M., Simonetti, P., 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 1217, 1463-1470.

Geuns, J.M.C., Augustijns, P., Mols, R., 2003. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 1599-1607.

I

Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z.E., Rahmat, A., & Rahman, Z.A., 2011. Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kacip fatimah (*Labisia pumila* blume). *Int. J. of Molec. Sci.*, 12(8), 5238–5254.

Iliev, I, Gajdosov, A., Libiakova, G., and Jain, S.M., 2010. Plant Micropropagation. *Plant Cell Culture*, 2-23.

K

Karimi, E., Jaafar, H.Z.E., & Ahmad, S., 2013. Antifungal, anti-inflammatory and cytotoxicity activities of three varieties of *labisia pumila* benth: from microwave obtained extracts. *BMC Complem. and Alternat. Med.*, 13(20), 1–10.

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

- Khalil, S.A.; Kamal, N.; Sajid, M.; Ahmad, N.; Zamir, R.; Ahmad, N.; Ali, S., 2016.** Synergism of polyamines and plant growth regulators enhanced morphogenesis, stevioside content, and production of commercially important natural antioxidants in *Stevia rebaudiana* Bert. *Vitr. Cell. Dev. Biol.- Plant*, 52, 174–184.
- Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D.R., Vassão, D.G., Jackson, B.L., Kish, C.M., ... Pichersky, E. 2006.** Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proceedi. of the Natio. Acad. of Sci. of the U. S. A.*, 103(26), 10128–10133.
- Komissarenko, N.F., Derkach, A.I., Kovalyov, I.P., Bublik, N.P., 1994.** Diterpene glycosides and phenylpropanoids of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Rastitel'Nye Resursy*, 1, 53-64.
- Korus, A., Lisiewska, Z., 2011.** Effect of preliminary processing and method of preservation on the content of selected antioxidative compounds in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves. *Food Chem.*, 129, 149–154.
- Kumar, N. & Reddy, M.P., 2011.** *In vitro* Plant Propagation: A Review. *J. of Forest Sci.*, 27(2), 61-72.

M

- Magalhães, P.M., de Martínez, A.J.V., Yesid, B.H., Cáceres, A., 2000.** Agrotecnología para el cultivo de estevia o hierba dulce. In: CAB, CYTED (Eds.), *Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales ibero americanas*. Colombia, 441–450.

O

- Ota, M., & Yokoyama, M., 2010.** *Chemistry of Cosmetics*, Shiseido Co., Ltd., Yokohama, Japan, 317-348.

P

- Pal, P.K., Kumar, R., Guleria, V., Mahajan, M., Prasad, R., Pathania, V., Gill, B.S., Singh, D., Chand, G., Singh, B., Singh, R.D., Ahuja, P.S., 2015.** *Crop-ecology and*

nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. BMC Plant Biology, 15, 67.

Patil, B.S.; Alva, A.K., 1999. Enhancing citrus nutraceuticals through variable nutrient rates. Hort. Sci., 34, 520–520.

Periche, A., Castelló, M.L., Escriche, I., 2015. Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves. Food Chem., 173, 1-6.

R

Robbins, R.J., Keck, A.-S., Banuelos, G., & Finley, J.W., 2005. Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli. J. of Med. Food, 8(2), 204–214.

Rodrigues, M.A., Afonso, S., Ferreira, I.Q., & Arrobas, M., 2016. Response of stevia to nitrogen fertilization and harvesting regime in northeastern Portugal. Archives of Agron. and Soil Sci., 1–12.

S

Serfaty, M., Ibdah, M., Fischer, R., Chaimovitsh D., Saranga, Y., Dudai, N., 2013. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. Ind. Crop Prod., 50, 731-736.

Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V.K., Shukla, S., 2009. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Food Chem. Toxicol., 47, 2338-2343.

T

Tadhani, M.B., Patel, V.H., & Subhash, R., 2007. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. J. of Food Compos. and Anal., 20(3–4), 323–329.

Tavarini, S., Sgherri, C., Ranieri, A.M., & Angelini, L.G., 2015. Effect of nitrogen fertilization and harvest time on steviol glycosides, flavonoid composition, and

antioxidant properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. J. of Agric. and Food Chem., 63(31), 7041–7050.

W

Wang, J.; Li, J.; Li, J.; Li, J.; Liu, S.; Huang, L.; Gao, W., **2017**. Production of active compounds in medicinal plants: From plant tissue culture to biosynthesis. Chinese Herb. Med., 9, 115–125.

Y

Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P.S., **2010**. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. Canad. J. of Plant Science, 91(1), 1–27.

Yang, Y., Huang S., Han Y., Yuan H., Gu, C., Wang Z., **2015**. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. Plant Phys. and Biochem., 86, 174-180.

Yu, H.; Yang, G.; Sato, M.; Yamaguchi, T.; Nakano, T.; Xi, Y., **2017**. Antioxidant activities of aqueous extract from *Stevia rebaudiana* stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds. Food Chem., 232, 379–386.

X

Xi, Y., Yamaguchi, T., Sato, M., Takeuchi, M., **1998**. Antioxidant activity of *Stevia rebaudiana*. J. Japanese Soc. Food Sci. Technol., 45, 310-316.