



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

**STEVIA ED ESTRAZIONE DEGLI STEVIOSIDI  
PER UNA MIGLIORE PRODUZIONE  
AGRICOLA**

Relatore

Prof. Paolo Sambo

Correlatore

Dott.



ANNO ACCADEMICO

2013/2014



# INDICE

1. Introduzione. ....	1
2. Storia. ....	3
3. La Stevia. ....	4
4. La divulgazione. ....	6
5. Struttura e proprietà degli steviosidi. ....	11
6. I diversi volti della Stevia. ....	13
6.1 Foglie essiccate. ....	13
6.2 Polvere verde di stevia. ....	14
6.3 Estratto bianco di stevia. ....	14
6.4 Concentrati liquidi. ....	15
7. Stevia come sostituto dello zucchero e non solo. ....	16
7.1 Acesulfame K. ....	16
7.2 Aspartame. ....	17
7.3 Saccharina. ....	19
8. La Stevia in commercio. ....	21
8.1 Utilizzo in cucina. ....	22
8.2 Utilizzo in cosmesi. ....	25
8.3 Utilizzo in medicina. ....	26
9. Curiosità. ....	27
10. Stevia e Coca Cola.....	29
11. Scopo del lavoro. ....	31
12. Materiali e metodi. ....	32
12.1 Sperimentazione in campo a Pojana Maggiore.....	32
12.2 Sperimentazione in laboratorio.....	37
12.2.1 Estrazione degli steviosidi.....	37
12.2.2 Identificazione e quantificazione degli zuccheri riducenti.....	38
13. Risultati sperimentali. ....	39
13.1 Grafici riguardanti le tre tesi di concimazione.....	39

13.2 Grafici riguardanti i metodi irrigui.....	45
14. Conclusioni. ....	51
15. Bibliografia. ....	53



# 1. Introduzione:

Questa tesi tratterà l'introduzione di un nuovo dolcificante naturale nel mercato, trattandone i vari aspetti della coltura per migliorarne le proprietà. Questo studio è necessario a causa di mutamenti nell'alimentazione degli ultimi anni, in particolare dal crescente consumo di zucchero nella dieta comune. L'eccessivo consumo di saccarosio ha portato a consistenti problemi nutrizionali e medici come ad es. obesità, diabete e problemi cardiovascolari. Pertanto sono stati ricercati dei sostituti a basso contenuto calorico. Una importante classe di questi sostituti presenti nel mercato sono, ormai da anni, i dolcificanti artificiali. Oggigiorno i più importanti e diffusi dolcificanti sono composti come l'acesulfame K, l'aspartame, la saccarina e il sucralosio. Il problema generale di questi dolcificanti nell'uomo e in diversi altri mammiferi, è lo stimolano del pancreas a sintetizzare insulina. A sua volta l'insulina (ormone) stimola le cellule corporee ad assorbire glucosio e di conseguenza la concentrazione di glucosio nel sangue (la glicemia) diminuisce.

Ricapitolando questi dolcificanti artificiali (assimilati a causa del loro gusto dolce) stimolano la produzione di insulina in persone sane e abbassando la loro glicemia provoca iperinsulinemia nel sangue, che a sua volta può portare a: ipoglicemia o diabete, aumento della sintesi di VLDL (ipertrigliceridemia), ipertensione (l'insulina aumenta la ritenzione di sodio dai tubuli renali), aumento del rischio di malattia cardiovascolare, aumento di peso e letargia. Per tutti questi problemi elencati precedentemente si ritiene necessario trovare un valido sostituto a questi zuccheri artificiali, un sostituto che non comporti tutte queste controindicazioni. Per tutti questi motivi si è arrivati a studiare un nuovo dolcificante come la Stevia.

Andando a descrivere in maniera più specifica prodotti come l'aspartame possiamo notare che questo prodotto può provocare, in persone affette

da fenilchetonuria o con disfunzioni metaboliche, problemi anche gravi se consumato. La saccarina è invece un dolcificante a cui sono associati potenziali rischi di cancro alla vescica, se utilizzato in dosi elevate. Oltre a tutti i fatti descritti precedentemente è necessario sottolineare il modo in cui molti dolcificanti artificiali vengono spesso utilizzati in combinazioni non studiate e verificate nei cibi di uso comune, comportando logici rischi per i consumatori. In commercio possiamo trovare anche diversi dolcificanti naturali (positivi dal punto di vista nutrizionale) come il fruttosio, glucosio, sorbitolo, xilitolo, mannitolo, glicina e lattosio ma non vengono particolarmente utilizzati a causa della loro natura ipercalorica relativa.

Per tutti questi motivi è utile analizzare e studiare approfonditamente la Stevia, pianta con elevati contenuti zuccherini, bassissimi contenuti di calorie e nessuna controindicazione attualmente riscontrata. Si ritiene quindi che questa pianta possa sostituire gran parte degli zuccheri precedentemente citati nel commercio mondiale e conseguentemente nazionale.

## 2. Storia:

Originaria delle montagne fra Paraguay e Brasile, la Stevia è una pianta erbacea perenne, di piccole dimensioni. Conosciuta da molti secoli per il suo potere dolcificante e per le proprietà medicinali, è molto usata da alcuni popoli indigeni dell'America Latina per le sue doti curative. In particolare, nel Sud America, era conosciuta come "Yerba dulce". Gli Indios Guaranì Paraguaiani e Brasiliani, che utilizzano la pianta da più di millecinquecento anni, le hanno dato una notevole varietà di nomi interessanti che, in un modo o nell'altro, rimandano al suo gusto dolce: Caa-ehe, Azuca-caa, Kaa-he-e, Ca-a-yupe, e tutti quanti significano "simile al nettare".

Nonostante fosse utilizzata dagli Indios già da molti secoli, fu solo verso la fine dell'ottocento che questa pianta iniziò a destare interesse. Fu Mosè Bertoni, uno svizzero del Canton Ticino, ad osservare che gli indigeni usavano le sue foglie per dolcificare le loro bevande amare. In seguito il chimico argentino Ovidio Rebaudi, studiandone i principi attivi, la riclassificò; oggi il nome completo con cui la conosciamo dà merito ad entrambe le figure storiche degli uomini che ce l'hanno fatta conoscere: Stevia Rebaudiana Bertoni.

La Stevia nonostante ciò rimase a lungo poco conosciuta fino a che non venne coltivata in Inghilterra durante la Seconda Guerra Mondiale (1942), a seguito del razionamento dello zucchero. Negli anni a seguire, la prima coltivazione ai fini commerciali iniziò in Paraguay, terra natia, e solo successivamente in Giappone che nei primi anni settanta già la introdusse come dolcificante per cibi e bevande. Da qui in poi la Stevia ha conosciuto un prospero mercato grazie anche agli studi e alle ricerche fatte per capire più a fondo le proprietà e quindi le potenzialità di una pianta fino ad ora ignorata.



Recentemente il paese che coltiva maggiormente Stevia ai fini commerciali è la Cina, che la esporta principalmente in Giappone. Naturalmente ora che il mercato si è allargato sia in Europa che in Nord America si aprono nuovi spazi per le colture intensive, si cercherà anche la meccanizzazione del processo che fino ad oggi non è avvenuta.

### 3. La Stevia

La Stevia è una pianta dicotiledone (riferimento figura 3.1), della famiglia delle *Asteraceae* (*Compositae*, a cui fanno parte anche lattuga, radicchio, carciofo, piretro, camomilla); è perenne nel suo ambiente naturale, la valle del Rio Monday nel Nord-est del Paraguay. Questa pianta in Paraguay è conosciuta ed utilizzata da secoli per le sue proprietà edulcoranti. Due sono i composti che la contraddistinguono, stevioside e rebaudioside A, che conferiscono alle foglie un gusto dolce. Il maggior contenuto di questi principi attivi lo si trova nelle foglie più giovani, le inflorescenze ne contengono circa la metà, mentre l'apparato radicale della pianta ne è privo.



(figura 3.1)

Le tecniche di propagazione di questa pianta sono principalmente due: attraverso i semi o la propagazione per taleaggio. Nella coltura i semi, dopo la raccolta, richiedono un periodo di vernalizzazione e, dopo essere stati seminati, necessitano di diverse cure oltre che un successivo trapianto. La propagazione per taleaggio di solito è affidata alle talee di fusti poiché radicano facilmente; oltretutto questa tipologia di propagazione risulta la più adottata e sicura perché i semi ottenuti da piante libere di impollinarsi possono portare a variabilità nel contenuto di stevioside.

La pianta si adatta bene anche a climi più rigidi di quello tropicale caratteristico del suo habitat naturale e ciò ha permesso la sua recente diffusione e coltivazione in paesi con clima temperato. Le sue basse esigenze nutritive e una buona rusticità la rendono una pianta adatta ad essere coltivata in terreni marginali e come integrazione al reddito. Bisogna sottolineare però che questa pianta risponde bene a fertilizzanti a lenta cessione, come l'azoto, quindi si dovrà considerare l'utilizzo di fertilizzanti organici e compost nella coltivazione commerciale. I fertilizzanti organici hanno effetto soprattutto da metà ciclo in poi, fornendo nutrienti per sintesi ed accumulo di steviosidi. La concentrazione di stevioside nelle foglie è direttamente collegata alla presenza di alcuni elementi essenziali: carenza di boro, calcio, potassio e zolfo riducono l'accumulo del principio attivo.

Nel suo ambiente naturale la Stevia si trova in un terreno continuamente umido e ricco di acqua sottosuperficiale, per questo motivo l'irrigazione è fondamentale per la coltivazione commerciale. E' bene però fare attenzione ai ristagni idrici che possono portare a marciume radicale ed attacchi fungini.

La raccolta della Stevia, alle nostre latitudini, solitamente viene fatta due volte: il primo raccolto viene fatto nel mese di luglio mentre il secondo, generalmente più abbondante, in settembre – ottobre. Il momento ideale del taglio dipenderà dalla forma di commercializzazione, si raccomanda di raccogliere quando la pianta è in bottone floreale o al 10% della fioritura (quattro mesi dalla messa in campo): è in questa fase, infatti, che si raggiunge il massimo livello di edulcorazione, mentre a seguito della fioritura il contenuto di principio attivo si dissipa.

#### 4. Divulgazione:

In passato i principi attivi della Stevia vennero ritenuti dei composti sospetti di cancerogenicità e per questo in Europa e negli USA l'utilizzo di questa pianta era vietato. Successivamente la *Food and Drug Administration* (FDA) ne permise l'utilizzo ma solo come integratore alimentare. Infine, la FDA in seguito a domanda di Cargill e di Whole Earth Sweetener Company LLC, approvò il rebaudioside come additivo alimentare nel 2008.

Ecco una breve storia della legislazione sulla Stevia.

In Sud America la Stevia è utilizzata come edulcorante fin dall'antichità. In Giappone la diffusione della Stevia fu rapidissima ed iniziò con la proibizione dei dolcificanti di sintesi durante gli anni sessanta. Nel 1970 l'Istituto Nazionale Giapponese di Sanità iniziò l'importazione di questa pianta a scopo sperimentale e nel 1980 si iniziò ad utilizzarla in centinaia di prodotti alimentari in tutto il Paese. La Stevia attualmente costituisce circa il 41% del totale dei dolcificanti sul mercato giapponese. Nel 1997, una domanda di autorizzazione per l'utilizzo della Stevia come "Novel Food", è stata richiesta al "Scientific Committee on Food" (SCF) della Commissione Europea. Il regolamento dei nuovi alimenti (Novel Food),

determina che per i prodotti alimentari provenienti da altri contesti culturali, devono essere dimostrata la loro innocua tossicità per la salute, prima di essere approvato come prodotto alimentare. Soprattutto per un prodotto completamente naturale come la Stevia è quasi impossibile fornire tali prove, in quanto i costi per la ricerca sono molto elevati ed è difficile trovare finanziamenti. Nel 1999 la domanda è stata respinta con la seguente motivazione: i dati non sono sufficienti a garantire la completa innocuità per la salute umana. Dal 2000, la Stevia è stata esclusa a norma del regolamento UE n. 258/97 (Regolamento Novel Food) e la commercializzazione come prodotto alimentare in Europa è stata vietata (fonte: UE Gazette; L 61/14). Da allora numerosi studi scientifici sono stati fatti, per dimostrare l'innocuità completa. Nel 2004 un valore di ADI (acceptable daily intake, "dose accettabile giornaliera") per la Stevia ed i suoi contenuti (Stevioside e Rebaudioside A) è stato stabilito dal JECFA, dichiarando la completa innocuità per la salute umana. La raccomandazione del Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), relative alla Stevia rebaudiana ed i suoi contenuti, non ha però nessun significato per l'approvazione da parte dell'Unione Europea. In Europa, la domanda di autorizzazione per l'utilizzo deve essere presentata all'EFSA (European Food Safety Authority) con sede a Parma, e non più alla Scientific Committee on Food (SCF). Il governo francese, nel settembre 2009, ha approvato l'utilizzo di dolcificanti a base di Stevia con una purezza di Rebaudioside A (Reb A) del 97%, aprendo ufficialmente il primo mercato dell'UE a prodotti contenenti questo ingrediente. L'Unione Europea (EFSA) il 14 aprile 2010 ha approvato l'uso della Stevia come *Food Additive*, così come è accettato in Svizzera, e storicamente in tutti i Paesi latino – americani.

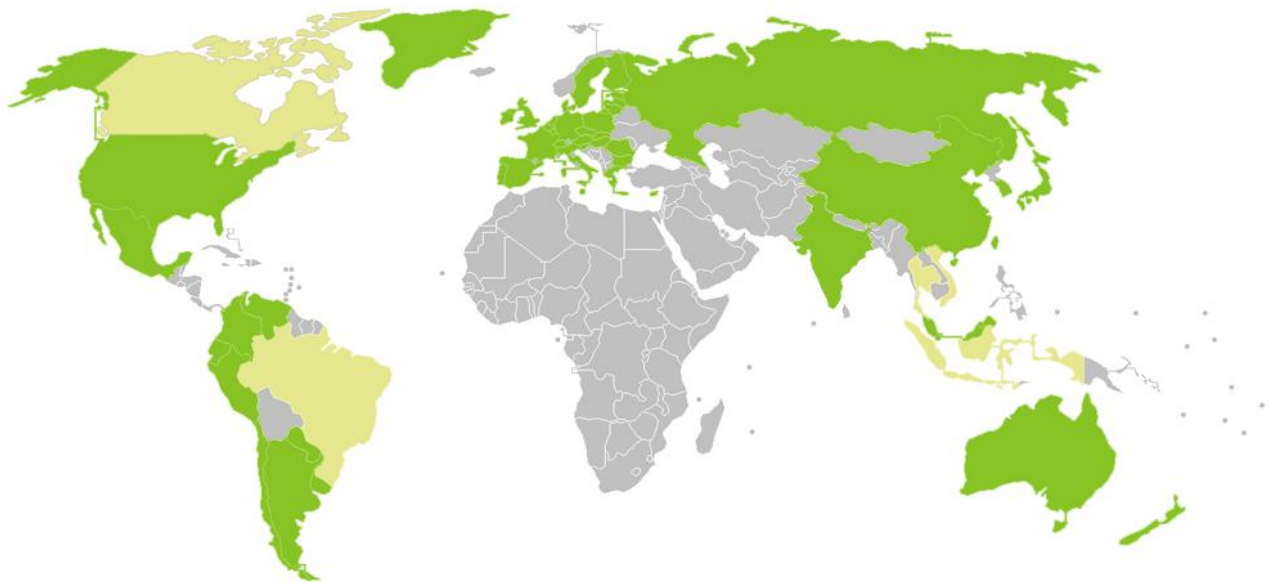
Il possibile uso della Stevia, in paesi diversi da quello di origine, ha prodotto notevoli controversie e contestazioni, facendo affermare

l'esistenza di una cospirazione commerciale, interessata a contrastarne l'uso, ed a favorire invece i dolcificanti artificiali.

Di rilievo è il fatto che la Stevia è normalmente consumata in molti Paesi, in alcuni di questi da molto tempo e senza particolari problemi. In tali Paesi è considerata meno dannosa di altri dolcificanti, come l'aspartame o l'acesulfame K, usata come estratto secco o come infuso fresco. Esaminiamo tali dati provenienti dai paesi che ne fanno uso corrente, anche da molto tempo, la FAO e l'OMS hanno stabilito una "dose massima giornaliera" pari a 2 mg/kg peso corporeo di steviololo. Questo limite, nello studio della FAO, presenta un fattore di sicurezza 200, ossia è 200 volte inferiore alla quantità che possono essere considerate "eccessive", e quindi influenti negativamente sulla salute. In altri studi è risultata una tossicità acuta LD<sub>50</sub> per lo stevioside pari a 8,2g/kg di peso corporeo.

Il consumo di prodotti Stevia è ammesso sotto il regime JEFCA (con un "ADI of 0-4 mg/kg bw"), in America Latina e nei Caraibi, in Asia, in Oceania, in Medio Oriente e in Russia. Negli Stati Uniti, la FDA (Food and Drug Administration, ente governativo) ha ammesso la sostanza "Rebaudioside-A" nel dicembre del 2008. In Canada è commercializzata come prodotto naturale per uso privato e come integratore alimentare, edulcorante o additivo alimentare. La FSANZ (Food Standard Australian-New Zealand) ha autorizzato l'utilizzo in Australia e Nuova Zelanda nel 2008.

Questa è la situazione nel mondo: i paesi in cui è permesso l'utilizzo come integratore alimentare della Stevia Rebaudiana Bertoni in foglie sono evidenziati in marroncino, in verde invece dove è concesso l'utilizzo anche come additivo alimentare.



Dal 1° di gennaio 2012 i prodotti a base di Stevia, quindi contenenti steviosidi (cioè sostanze di estrazione di Stevia e non foglie intere) sono commercializzabili e di libera vendita in tutta Europa ed anche in Italia.

America Latina	Asia Pacifico
Argentina: additivo alimentare	Australia: additivo alimentare
Brasile: integratore alimentare	Brunei: additivo alimentare
Cile: additivo alimentare	Cina: additivo alimentare
Columbia: additivo alimentare	Hong Kong: additivo alimentare
Ecuador: additivo alimentare	India: additivo alimentare
Paraguay: additivo alimentare	Indonesia: integratore alimentare
Perù: additivo alimentare	Giappone: additivo alimentare
Uruguay: additivo alimentare	Malesia: additivo alimentare
Venezuela: additivo alimentare	Nuova Zelanda: additivo alimentare
Europa	Singapore: additivo alimentare
Austria: additivo alimentare	Corea del Sud: additivo alimentare
Belgio: additivo alimentare	Taiwan: additivo alimentare
Bulgaria: additivo alimentare	Thailandia: integratore alimentare
Cipro: additivo alimentare	Vietnam: integratore alimentare
Repubblica Ceca: additivo alimentare	Nord America
Danimarca: additivo alimentare	Stati Uniti: additivo alimentare
Estonia: additivo alimentare	Canada: integratore alimentare
Finlandia: additivo alimentare	Messico: additivo alimentare
Francia: additivo alimentare	
Germania: additivo alimentare	
Grecia: additivo alimentare	
Groenlandia: additivo alimentare	
Ungheria: additivo alimentare	
Irlanda: additivo alimentare	
Italia: additivo alimentare	
Lettonia: additivo alimentare	
Lituania: additivo alimentare	
Lussemburgo: additivo alimentare	
Malta: additivo alimentare	
Olanda: additivo alimentare	
Polonia: additivo alimentare	
Portogallo: additivo alimentare	
Romania: additivo alimentare	
Russia: additivo alimentare	
Slovacchia: additivo alimentare	
Slovenia: additivo alimentare	
Spagna: additivo alimentare	
Svezia: additivo alimentare	
Svizzera: additivo alimentare	
Regno Unito: additivo alimentare	

Gli **integratori alimentari**: sono quei prodotti specifici volti a favorire l'assunzione di determinati principi nutritivi non presenti negli alimenti di una dieta non corretta.

Gli **additivi alimentari**: sono sostanze impiegate nell'industria alimentare durante la preparazione, lo stoccaggio e la commercializzazione di prodotti destinati all'alimentazione.

## 5. Struttura e proprietà degli steviosidi:

Sono state trovate, studiate e descritte più di cento cinquanta specie di Stevia, ma la *rebaudiana* è l'unica a possedere le proprietà dolcificanti trattate. Le foglie contengono un insieme complesso di glicosidi di terpenici. Queste sostanze sono caratterizzate dalla presenza nella loro struttura di tre molecole di glucosio. I costituenti di maggiore interesse delle foglie di Stevia sono questi glucosidi classificati con nomi differenti: stevioside (5-10% del totale del peso secco), rebaudioside A (2-4%), rebaudioside C (1-2%). Poi, in quantità progressivamente sempre minore, troviamo dulcoside A, rubusoside, steviolbioside e rebaudioside B, D, E ed F.

Lo stevioside fu isolato nel 1931, e gli scienziati lo descrissero come una polvere bianca, cristallina, igroscopica circa trecento volte più dolce dello zucchero di canna. Solo nel corso degli anni settanta si riuscì a descrivere in modo preciso la struttura chimica di tutte le sopraccitate molecole attive, presenti nella foglia di Stevia. Tra le nuove proprietà riscontrate dallo studio della pianta, è risultato che lo stevioside è molto stabile sia al Ph, che alla temperatura.

Diversi studi condotti su animali dimostrerebbero che i derivati della Stevia hanno la capacità, non solo di non innalzare i livelli di glicemia ematici, ma addirittura di abbassarli. Nell'uomo lo stevioside, pur se assunto ad alti dosaggi, farebbe mantenere inalterati i valori della glicemia ematica, come evidenzia una recente ricerca pubblicata nel 2007 (Geuns, J.M.C. *Exp Biol Med.* 2007). Sarebbe inoltre provata, nell'uomo oltre che negli animali, la capacità dello stevioside, di abbassare la glicemia in individui affetti da diabete di tipo due.

I derivati della Stevia sono in grado di abbassare i valori della pressione arteriosa in soggetti ipertesi, come dimostrano diversi studi scientifici (Hsieh, M. H. *Clin Ther.* 2003; Chan, P. *Br J Clin Pharmacol.* 2000). Inoltre è interessante notare che una recente ricerca dimostra che, nonostante i derivati di Stevia in alcune circostanze siano in grado di



abbassare sia la glicemia che la pressione del sangue, la loro assunzione nelle abituali dosi quotidiane come dolcificante non influisce né sui valori glicemici né su quelli pressori (Barriocanal, L. A. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2008).

Lo stevioside secondo alcuni studi, di per sé non mostrerebbe effetti cancerogeni anche se un suo metabolita, lo steviolo, è un cancerogeno riconosciuto. Non è stato provato se tale metabolita venga effettivamente assorbito durante la metabolizzazione *in vivo* dello stevioside.

La molecola contiene tre  $\beta$ -glucosidi, che in alcuni studi *in vitro* vengono idrolizzati e rimossi da parte della flora batterica intestinale umana, producendo appunto lo steviolo. Tuttavia secondo alcuni studi, nelle popolazioni che fanno uso di foglie di Stevia e derivati, tra cui il Giappone, non esisterebbe una marcata evidenza statistica di tumori riconducibile allo steviolo. Lo studio dell'università di Berkeley *in vivo* confermerebbe tali statistiche.

Il rebaudioside A, altro glucoside presente nella Stevia tende a degradarsi se sottoposto ad una lunga esposizione alla luce solare, a differenza dello stevioside. Il rebaudioside A, per quanto riguarda le caratteristiche sensoriali, è meno astringente e meno amaro dello stevioside. Anche questo glicoside non mostra nessun effetto carcinogeno nonostante il suo metabolita, sempre lo steviolo, sia un carcinogeno riconosciuto. Non è chiaro nemmeno in questo caso se lo steviolo venga effettivamente assorbito. Il rebaudioside A è solitamente presente insieme al suo isomero, il rebaudioside C. La molecola contiene quattro  $\beta$ -glucosi, che in altri studi *in vitro* vengono idrolizzati e rimossi da parte della flora batterica intestinale umana, producendo anch'essa steviolo.

## 6. I diversi volti della Stevia:

In Italia la Stevia è disponibile in polvere, in gocce o essicata (riferimento figura 3.1). Il suo sapore può leggermente variare in base alla marca: l'estratto bianco può avere un leggero retrogusto di liquerizia, mentre una produzione differente può essere del tutto priva di retrogusto. Ma analizziamo più da vicino le differenti forme in cui la Stevia può essere acquistata.



*(figura 6.1)*

### 6.1 Foglie essiccate:

Molte erboristerie e negozi specializzati in prodotti naturali vendono foglie essiccate di Stevia. Per sprigionare il sapore e la dolcezza delle foglie è necessario schiacciare. Una foglia essicata è molto più dolce di una foglia fresca, ed è sotto questa forma che la Stevia viene comunemente usata per addolcire tè e tisane. Le foglie di Stevia, che

hanno un colore verdastro, possono essere usate per esaltare il gusto di una grande quantità di alimenti e bevande: oltre a caffè e tè, succhi di frutta e cereali. In genere per edulcorare una tazza di caffè o di tè sono sufficienti da due a quattro foglie essiccate. Tuttavia in questa forma, la Stevia ha un retrogusto di liquerizia più intenso. Come regola generale, ogni foglia contiene stevioside e rebaudioside in percentuali del 5-10 %. Anche se le foglie di Stevia contengono varie vitamine, minerali e sostanze fitochimiche, le quantità consumate sono generalmente così ridotte che il loro valore nutrizionale è probabilmente trascurabile.

## 6.2 Polvere verde di Stevia:

Quando le foglie essiccate di Stevia sono macinate si trasformano in una fine polvere verde che generalmente, è da dieci a venti volte più dolce dello zucchero. Questa polvere può essere aggiunta direttamente al tè o ad altri alimenti. Si può anche trasformare la polvere in sciroppo, sciogliendo un cucchiaino da tè di polvere in cinquanta centilitri di acqua filtrata o distillata e lasciando sbollire fino ad ottenere un sciroppo denso. Una volta raffreddato lo sciroppo può essere tenuto in frigo per conservarlo più a lungo. La polvere di Stevia ha un retrogusto intenso e ciò non la rende particolarmente popolare.

## 6.3 Estratto bianco di Stevia:

L'estratto bianco di Stevia che in effetti, è una polvere, è la forma usata più comunemente in Giappone. In genere, contiene dall'85 al 90 % di glucosidi dolci ed è quasi trecento volte più dolce dello zucchero. Nel mondo sono registrati centinaia di brevetti per ricavare l'estratto bianco di Stevia: nel solo Giappone se ne conoscono più di centocinquanta. Anche se l'estratto bianco di Stevia ha il retrogusto meno evidente fra tutte le differenti forme di Stevia, i ricercatori canadesi stanno mettendo a punto un processo di estrazione che elimina completamente qualsiasi retrogusto. Questo tipo di estrazione influirà sulla concentrazione di

glucosidi dolci, come lo stevioside e il rebaudioside. Dato che, quando viene estratta, la polvere bianca di Stevia non ha più sapore così dolce, è raccomandato di mescolarla con l'acqua e usarla sotto forma di gocce.

## 6.4 Concentrati liquidi:

I concentrati liquidi di Stevia sono di due tipi. Uno scuro e denso mentre l'altro è chiaro.

Per realizzare il concentrato scuro, portare ad ebollizione cinquanta centilitri di acqua, ridurre la fiamma e aggiungere quattordici grammi di foglie di Stevia essiccate e polverizzate. Coprire e lasciar bollire per tre minuti. Togliere dal fuoco e lasciare il liquido in infusione fino a raffreddamento, poi filtrarlo. Questa è la forma più grezza, ma anche più indicata per sfruttare i benefici effetti della Stevia sul pancreas. Essa ha anche proprietà fungicide e antisettiche, e può essere usata localmente per curare ustioni e ferite.

Per realizzare il concentrato chiaro, il tipo più utilizzato per addolcire alimenti e bevande basta dissolvere un cucchiaino da tè di polvere bianca di Stevia in tre cucchiaini da tavola di acqua sterile. Alcuni di questi preparati liquidi commerciali contengono anche altri ingredienti, come fiori di crisantemo. Tutti i tipi di concentrato di estratto liquido sono disponibili nei negozi specializzati in prodotti naturali. In genere, qualche goccia di questo concentrato è sufficiente per addolcire un bicchiere di tè freddo o di limonata, una tazza di caffè o qualsiasi altro tipo di bevanda.

## 7. Stevia come sostituto dello zucchero e non solo:



*(figura 7.1)*

Lo zucchero raffinato è un carboidrato ad alto indice glicemico, responsabile del rapido innalzamento della concentrazione di glucosio nel sangue (glicemia), un uso eccessivo fa aumentare il livello d'insulina nel sangue quindi se assunto in eccesso si trasforma in grasso. Le alternative artificiali allo zucchero sono in generale tutti i dolcificanti artificiali di cui i più importanti sono tre: saccarina, aspartame e acesulfame K. Analizziamoli brevemente uno per uno rivolgendo particolare attenzione alla loro sicurezza.

### 7.1 Acesulfame K:

L'acesulfame K scoperto casualmente nel 1967 dal chimico tedesco Karl Claus è un edulcorante artificiale, chiamato anche acesulfame potassico e conosciuto come E950.

Ha un potere dolcificante pari a duecento volte quello del saccarosio, uguale a quello dell'aspartame e pari a metà di quello della saccarina. Allo

stesso modo della saccarina però ha un retrogusto amaro. Spesso l'acesulfame K è utilizzato insieme ad altri edulcoranti, solitamente il sucralosio e l'aspartame. A differenza dell'aspartame, l'acesulfame potassico è resistente al calore, anche in ambienti moderatamente acidi o basici, il che lo rende particolarmente adatto per prodotti di pasticceria a lunga conservazione, oltre che nelle bibite gassate.

L' Acesulfame K non è metabolizzato dall'uomo. Per investigare circa le possibili trasformazioni metaboliche è stato impiegato Acesulfame K contenente carbonio marcato (isotopo 14), somministrato a ratti, cani e suini. Gli studi non hanno rivelato nessun metabolismo, per cui lo stesso esperimento è stato ripetuto su uomini volontari; in entrambi i casi l'Acesulfame K veniva escreto intatto. Dato che questo edulcorante artificiale non viene metabolizzato, ad esso non si attribuisce alcun apporto calorico e nessuna influenza sulla glicemia. Studi farmacocinetici effettuati sempre su ratti, cani, suini e uomini volontari hanno evidenziato che Acesulfame K viene assorbito velocemente ed escreto con le urine; non viene inoltre accumulato nei tessuti (e' fortemente insolubile nei grassi), nemmeno dopo assunzioni ad alte dosi. Infine non è metabolizzato dai batteri responsabili della formazione delle carie ed è quindi acariogeno. I sospetti di cancerogenicità sono attribuibili al cloruro di metilene c in esso contenuto, alcuni esperimenti su cavie alimentate con altissime dosi di acesulfame diedero report positivi, ma ad oggi, dopo diversi studi è stata smentita definitivamente la cancerogenicità di questo dolcificante. La FDA ha approvato la sua commercializzazione nel 1988.

## 7.2 Aspartame

Scoperto nel 1965 mentre si compivano ricerche su un farmaco per curare l'ulcera, l'aspartame è composto da fenilalanina, acido aspartico e metanolo o alcol metilico. E' disponibile sotto forma di polvere cristallina a scarsa igroscopicità; la sua stabilità dipende da umidità, pH e temperatura. Non si modifica in ambiente secco, ma si decompone in

presenza di temperature elevate (superiori a 100°C, soprattutto in ambiente umido) perdendo il sapore dolce. Nonostante l'aspartame abbia un contenuto energetico significativo (circa 4 kcal/g), le quantità utilizzate sono talmente basse da farlo considerare praticamente acalorico. L'aspartame garantisce una sensazione dolce simile a quella del saccarosio, che tende a permanere nel tempo. Il potere dolcificante varia da centotrenta a duecentocinquanta a seconda che si considerino soluzioni acquose a diversa concentrazione o differenti matrici alimentari.

L'aspartame è stato approvato dalla FDA nel 1981. Dal 1983 è possibile utilizzarlo nella preparazione di bevande dietetiche. Sulla sua confezione non è riportato alcun avvertimento, salvo quello riguardante la sua assunzione da parte di chiunque soffra di fenilchetonuria, una rara malattia ereditaria.

L'aspartame è stato il primo indiziato al quale attribuire una grande quantità di sintomi riportati dalla FDA e all'Aspartame Consumer Safety Network di Dallas da migliaia di consumatori. Essi includevano sintomi gastrointestinali, emicrania, eruzioni cutanee, depressione, perdita di memoria, visione annebbiata, dislessia e altri disturbi di natura neurologica. Ovviamente, il fatto che una persona sperimenti un particolare sintomo dopo aver ingerito un determinata sostanza non rende automaticamente la sostanza responsabile. E' molto difficile dimostrare che l'ingestione di aspartame sia la causa di un sintomo o di una malattia, perché bisogna tenere conto di una grande quantità di altri fattori. Per esempio, anche gli additivi e i conservanti chimici contenuti negli alimenti e nelle bevande possono essere sospettati.

Due scienziati, i dottori John Olney e Nuri Farber, del Dipartimento di Psichiatria della Washington University Medical School di St. Louis, Missouri, sono convinti che l'aspartame sia la possibile causa di gran numero di malattie. In un articolo pubblicato nel mese di novembre del 1996 sul *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, essi

scrivono quanto segue: “Negli ultimi due decenni i tassi d’incidenza di tumore cerebrale sono aumentati in molti Paesi industrializzati, inclusi gli Stati Uniti [...] Paragonato ad altri fattori ambientali virtualmente collegati ai tumori del cervello, il dolcificante artificiale aspartame è un valido candidato per spiegare il recente aumento dell’incidenza e del grado di malignità di questo tipo di tumori. Le prove che inducono a puntare il dito sull’aspartame includono un recente studio effettuato su animali da laboratorio che ha rivelato un’incidenza incredibilmente elevata di tumori cerebrali nei ratti nutriti con aspartame rispetto all’assenza di tumori cerebrali nei controlli concomitanti. Possiamo pertanto concludere che è necessario rivedere il potenziale cancerogeno dell’aspartame.

Nel novembre del 1996 la FDA fece la seguente dichiarazione: “Un articolo pubblicato recentemente su una rivista medica solleva la questione se l’aumento dell’incidenza nel numero di persone colpite da tumore cerebrale negli Stati Uniti sia associato con la commercializzazione dell’ aspartame. Le analisi effettuate dal National Cancer Institute riguardano l’incidenza del cancro negli Stati Uniti non evidenziano un’associazione fra l’uso dell’aspartame e l’incremento dell’incidenza dei tumori cerebrali. La FDA rimane fedele alla sua decisione di approvazione iniziale.

### 7.3 Saccarina:

Trecento - cinquecento volte più dolce del saccarosio, la saccarina (additivo alimentare E954) è il primo dolcificante sintetico della storia. Dalla sua prima commercializzazione è arrivata a noi ed è ancora venduta e industrialmente usata nonostante periodi in cui era accusata di essere dannosa per l’organismo o addirittura cancerogena. Il costo di produzione è molto competitivo rispetto allo zucchero per l’eccezionale rapporto potere dolcificante/prezzo; quindi è possibile trovarla in ogni sorta di bevanda e prodotti dietetici o per diabetici come bevande, succhi di frutta, chewing gum, gelatine, marmellate, salse e condimenti lavorati a



base di frutta oppure nei dolcificanti in forma di tavolette, polveri o liquidi. Può essere inserita in pietanze sottoposte a cottura o lavorazione complesse a causa della sua alta stabilità termica e l'ampio range di pH in cui non degrada. Presenta tuttavia un retrogusto amaro-metallico, specialmente ad elevate concentrazioni, ciò ha spinto ad una corsa verso altri dolcificanti sintetici. Proprio per questo suo inconveniente organolettico è spesso utilizzata in aggiunta ad alcuni altri edulcoranti per correggere i rispettivi difetti e superare eventuali restrizioni di legge.

La saccarina e i suoi Sali sono commercialmente disponibili in tre forme: acido saccarinico, saccarina di sodio e saccarina di calcio, non si decompongono in modo rilevabile in condizione relativamente estreme di pH e temperatura se non dopo un lungo periodo. La forma più usata è quella di sale sodico, a causa della maggiore stabilità e solubilità, più raramente si ricorre al sale di calcio, soprattutto da parte di chi segue una dieta povera di sodio.

Non essendo la saccarina metabolizzata dall'organismo umano, non sono riscontrabili prodotti derivanti dal suo metabolismo anche in tracce minime o comunque rilevabili con le moderne tecniche analitiche nell'organismo di chi l'ha assunta. Una volta ingerita viene velocemente assorbita (quasi al 90%) e come tale secreta con le urine senza essere metabolizzata; conseguentemente a quanto detto non influenza i livelli glicemici, non fornisce alcuna energia all'organismo né contribuisce all'insorgere della carie dentale.

La saccarina è stata oggetto di lunghi dibattiti: benché la quasi totalità degli studi disponibili ne dimostri la sicurezza alle dosi di consumo usuali, sono stati sollevati infatti molti dubbi circa la sua tossicità. Le controversie sono legate soprattutto ad alcune ricerche che hanno dimostrato la correlazione con il cancro alla vescica in ratti maschi trattati con dosi elevate di saccarina sodica. Tuttavia, numerosi studi estensivi successivi effettuati sull'uomo hanno dimostrato che non esiste alcuna correlazione tra cancro alla vescica e assunzione di saccarina (ai livelli di consumo usuali).

Nel 1977, sulla base degli studi condotti sui ratti, la FDA bandì la

saccarina; questa posizione è stata successivamente rivista negli anni novanta dalle opportune commissioni mondiali per la tutela della sanità, per cui oggi la saccarina è stata pienamente riconsiderata tra i dolcificanti. Prudenza è spesso consigliata in gravidanza per la capacità di questa molecola di attraversare la placenta e per l'assenza di una soddisfacente quantità di studi dei possibili effetti sullo sviluppo del feto.

## 8. La Stevia in commercio:

Le caratteristiche principali della Stevia Rebaudiana sono:

- non contiene calorie;
- non altera il livello di zucchero nel sangue;
- inibisce la formazione della carie e della placca dentale;
- non contiene ingredienti artificiali;
- può essere usata per cucinare.

Campi principali di utilizzo (nei paesi dove è possibile utilizzarla):

- diabete, comportando una riduzione del valore glicemico, stabilizzandone i valori;
- obesità, viene usata nelle diete alimentari, poiché soddisfa la voglia di dolce, quasi sempre mette a tacere la "fame psicologica" di carboidrati (pane, pasta, ecc.) e di dolci;
- iperattività;
- pressione alta;
- indigestioni;
- riduce il livello di colesterolo;
- giova alla pelle e la tonifica;
- guarisce da dermatite, eczema, tagli e ferite lievi; viene utilizzata per i suoi effetti medicamentosi, dando beneficio al pancreas; è antifungina e antibatterica;
- diminuisce i rischi cardiovascolari (arteriosclerosi), aumenta le difese antiossidanti e protegge la parete vascolare e venosa, regolarizzando la pressione arteriosa;

- fornisce una gradevole soddisfazione primaria (il dolce) e diminuisce le "voglie" di fumare e bere alcool;
- utilizzabile nei prodotti della cosmesi e nella produzione di dentifricio;
- utilizzabile in ogni settore dell'industria alimentare.

La Stevia Rebaudiana come già detto in precedenza può essere impiegata come dolcificante a zero calorie sotto forma di:

- Foglie fresche o essiccate;
- Foglie tritate in polvere (20/30 volte più dolci dello zucchero)
- Estratto in polvere (200/300 volte più dolce dello zucchero)
- Concentrato liquido da estrazione acquosa e/o idroalcolica (circa 70 volte più dolce dello zucchero).

## 8.1 Utilizzo in cucina:

La Stevia può essere impiegata come dolcificante naturale a calorie zero sotto le diverse forme descritte in precedenza. I prodotti di estrazione possono essere usati in diverse preparazioni alimentari precotte e da forno poiché sono stabili a temperature non superiori ai 200°C e non fermentano. Hanno impieghi analoghi ai dolcificanti artificiali a basso contenuto calorico e sono utilizzati come tali per migliorare il gusto di alimenti e bevande (riferimento figura 8.1.1).



(figura 8.1.1)

In commercio esiste la Stevia allo stato puro oppure può essere mescolata con altri dolcificanti naturali, come l'eritritolo o il fruttosio, utili a migliorare il prodotto nella fase di cottura e a ridurre il retrogusto di liquirizia. Dunque, per usare la Stevia in cucina è fondamentale conoscerne la capacità dolcificante e la sua peculiare tipologia di amalgamare gli ingredienti tra loro, differente rispetto allo zucchero e al maltitolo, prodotti questi ultimi che contribuiscono a creare la maglia glutinica dei dolci.

Quando la Stevia viene usata in cucina come prodotto puro, va dosata con parsimonia perché il suo retrogusto dolciastro persistente potrebbe essere troppo forte. Bisogna considerare infatti che 1 cucchiaino da caffè

pieno di Stevia pura equivale a circa 2,5 grammi di prodotto pari a 800 grammi di zucchero.

L'estratto bianco di Stevia è la forma più utilizzata, può trovare innumerevoli utilizzi ed essere un efficace sostituto dello zucchero (per diminuire le calorie) o dei dolcificanti sintetici (visto che non è del tutto accertata l'assenza di effetti collaterali a medio lungo termine). A seconda della marca si può trovare un estratto che abbia un retrogusto più o meno marcato di liquerizia, ma non è possibile comunque eliminarlo del tutto quindi non è possibile utilizzare la Stevia come unico sostituto dello zucchero.

Gli estratti utilizzati nel settore industriale (gli stevio-glicosidi), provengono tutti dall'apparato fogliare. La prima estrazione, sia che sia fatta con acqua che con alcool alimentare, permette di ottenere lo stevioside, che è il primo dolcificante che si ottiene dalle foglie della pianta. E' anche il responsabile del retrogusto di liquerizia. La purezza dello stevioside dipende dal tipo di estrazione e varia da un minimo accettabile del 90% sino ad un massimo preferibile del 95%. A maggiore purezza si associa un potere edulcorante maggiore ed un minore retrogusto di liquerizia. Una seconda estrazione dello stevioside, permette di ottenere ed isolare il rebaudioside A, che con purezza limite del 97% permette di ottenere un potere dolcificante di oltre 350 volte quello dello zucchero.

Quando si parla di purezza, si intende il prodotto ottenuto dall'estrazione al netto delle impurità (parti della pianta, clorofilla, etc.) che sono impossibili da eliminare con i processi estrattivi fatti in modo naturale. Ovviamente queste piccole percentuali di impurità vanno ad inficiare né la qualità né le caratteristiche dei dolcificanti estratti, ma anzi sono un indice che ci permette di valutare il tipo di estrazione. Indici di purezza superiori al 95% per lo Stevioside e superiori del 97% per il Rebaudioside A, non sono sempre ottenuti con processi di estrazione naturali.

Le caratteristiche più importanti in campo alimentare degli steviglicosidi sono:

- Resistenza al calore: presentano stabilità alle normali temperature di cottura degli alimenti, hanno punto di fusione di 238°C e resistente sino a 350°C senza caramellarsi;
- Alterazione del colore: non si osservano alterazioni nel colore, anche nei più rigorosi processi di cottura;
- Solubilità: altamente solubili in acqua, alcool etilico e metilico, insolubili in etere;
- Resistenza al pH: stabile tra pH 3 e pH 9;
- Calorie: sono estratti che non contengono calorie e non sono metabolizzati dall'organismo umano, caratteristiche che rendono i glicosidi sani ed adeguati ad usi dietetici;
- Proprietà osmotiche: ottime proprietà osmotiche nella preparazione delle conserve;
- Fermentabilità: non fermentabili né attaccabili dalla flora batterica orale. Non sono idrolizzabili da *Aspergillus Niger* né dal lievito seccodi birra. E' idrolizzabile dall'acido solforico diluito e dalla diastasi.

## 8.2 Utilizzo in cosmesi

Gli estratti della *Stevia Rebaudiana* Bertoni non sono conosciuti ed usati solo in campo alimentare come dolcificanti. In tutto il mondo nel campo cosmetico, gli stevio-glicosidi sono usati nel masking, nel flavouring e nell'oral care. Questa è una notevole qualità se si pensa come sia a volte necessario mascherare sapori particolari o dare un sapore piacevole a, per esempio, dentifrici e colluttori, che, contenendo il più delle volte sostanze chimiche, hanno sapori sgradevoli. L'uso degli stevio glicosidi permette di mascherare sapori particolari o dare un sapore piacevole a tutte quelle soluzioni sia liquide che in pasta utilizzate per l'igiene orale.

Inoltre, le qualità antisettiche e antibatteriche della *Stevia*, permettono di prevenire le cause che poi portano alla carie, riducendo in modo notevole le eventuali delicatezze delle gengive, evitandone il sanguinamento. L'uso

regolare dei prodotti della Stevia realmente permette una sicura igiene orale. Proprio per le sue qualità antibatteriche, è in grado di controllare l'acne, la seborrea, le dermatiti e l'eczema. Inoltre contribuisce ad elasticizzare la pelle. In cosmetica si utilizzano principalmente lo steviolglicoside e foglie e parti della pianta come descritto nell'elenco COSING (Cosmetic Ingredients), rilasciato dalla Comunità Europea.

### 8.3 Utilizzo in medicina:

Le caratteristiche benefiche accertate scientificamente sono:

- non apporta calorie in quanto non metabolizzata dall'organismo;
- facilita la digestione e le funzioni gastrointestinali;
- obbliga il pancreas a produrre insulina;
- è in grado di regolare la glicemia;
- è un aiuto nella cura dell'obesità in quanto il suo utilizzo elimina la "smania" da cibo, coadiuva il controllo di trigliceridi e colesterolo, diminuisce l'assorbimento degli idrati di carbonio a livello intestinale;
- diuretica e cardiotonica: il suo consumo permette il controllo della pressione arteriosa e dei battiti cardiaci;
- anticarie e antibatterica, previene la placca batterica;
- combatte l'ansietà e rilassa il sistema nervoso.

L'uso terapeutico della Stevia è stato raccomandato su base scientifica (Midmore e Rank, 2002; Slow Food Huesca 2007).

Le proprietà interessanti in campo medico riguardano la cura del diabete. Il Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo dell'Hospital University Aarhus in Danimarca, è arrivato alla conclusione che la Stevia agisce stimolando le cellule beta del pancreas, in modo tale da produrre da sole inulina, e pertanto ha un importante ruolo anti-iperglicemico nelle persone affette da diabete di tipo 2 (non insulina dipendente). Sono ora in corso studi su i suoi effetti in diabetici di tipo 1 (insulina dipendente).

Anche per la cura della pressione alta, la Stevia può essere considerata un buon rimedio naturale. Infatti, la Divisione di Medicina Cardiovascolare dell'Università di Medicina di Taipe-Taiwan, lavorando con 106 ipertesi cinesi di ambo i sessi, di età compresa tra 28 e i 75 anni, ha determinato che la Stevia agisce come ipertensore e cardiotonico (regolarizzando la pressione e i battiti del cuore). Infine, gli studi hanno determinato che la Stevia aiuta a combattere l'obesità, in quanto non produce calorie, riduce il desiderio per gli alimenti grassi e dolci, giacché diminuisce i meccanismi della fame attraverso il suo effetto sull'ipotalamo che regola appunto la fame, l'appetito e la sazietà.

## 9. Curiosità:

I cinesi nel tentativo di contrastare il monopolio sudamericano della Stevia stanno immettendo sul mercato un edulcorante naturale ricavato dal Luo han guo, più noto come Monk Fruit, è il frutto di una pianta delle Cucurbitaceae viene dalla tradizione cinese chiamato frutto dell'imperatore in quanto secondo alcune leggende garantiva la longevità degli imperatori, lo si diceva anche della Stevia come lo zucchero degli Inca, come vediamo il marketing degli ingredienti è piuttosto attivo.

Il Luo han guo, il suo nome botanico è *Momordica grosvenorii* o *Thladiantha grosvenorii* è un frutto che ha origine nel Sud della Cina e al nord della Thailandia, viene chiamato anche con altri nomi come Budha Fruit, Monkey's Fruit e in Vietnam la han qua, si distingue per un contenuto dolce molto forte pari a 150 volte quello del saccarosio, a vederlo sembra quasi un kiwi (riferimento figura9.1).





*(figura 9.1)*

Sono secoli che viene utilizzato nella medicina cinese, come frutto disidratato, come estratto dalla radice o dalle foglie in qualità di rimedio per le malattie respiratorie come per il male di gola, tosse, bronchite e anche per problemi intestinali e stitichezza.

Le notizie su questo frutto sono piuttosto frammentarie, da fonti cinesi, pare che sia ricco di antiossidanti, ha un alto contenuto di Vitamina C dai 400 ai 500 mg per 100g, pare stimoli le difese immunitarie, si ricava uno zucchero lento che potrebbe trovare una sua applicabilità in prodotti rivolti ai diabetici e agli obesi.

Il dato più interessante è che ricavare zucchero dal Monkey's Fruit costi meno della Stevia, ma non è più semplice, si presta con più facilità ad essere introdotto negli alimenti, crea meno complicazioni della Stevia. Così diverse aziende americane si apprestano a utilizzarlo nelle loro bevande, soprattutto in bevande funzionali.

C'è pertanto attorno a questo frutto un movimento di ricercatori impegnati per rendere il frutto più dolce e ricavarne più estratto possibile, perchè dai test sul mercato in alcuni prodotti ha dato dei risultati molto positivi. Attualmente viene seguita la strategia del prodotti d'elite in quanto la quantità è limitata 30 tonnellate mentre per i prossimi

anni gli obiettivi sono di raggiungere i 1000 tonnellate. La maggior parte degli investimenti su questo nuovo zucchero sono d'origine neo zelandese e lo zucchero Luo Han Guo viene commercializzata con il marchio PureLo.

## 10. Stevia e Coca Cola:

In Giappone, la Stevia è addizionata agli alimenti e alle bevande da più di 20 anni: più precisamente si dolcificano caramelle, gomme da masticare, alimenti secchi e cereali, yogurt e gelati, tè e sidro, dentifrici e collutori, ma viene utilizzata anche per alimenti salati, dove contribuisce ad attenuare il gusto del sale (tipico della cultura agrodolce della cucina orientale).

La Stevia in Giappone viene utilizzata per dolcificare molte bevande, perfino la Diet Coke. Nell'agosto del 2013 la Coca Cola ha annunciato la produzione di un nuovo prodotto "Coca-Cola Life" (riferimento figura 10.1) che utilizza la Stevia come dolcificante. Il prodotto è disponibile per ora solo per il mercato Argentino.



*(figura 10.1)*

## 11. Scopo del lavoro

Lo scopo della tesi è quello di individuare un buon metodo di coltivazione della Stevia. Entrando nei particolari, è stata eseguita una analisi dei dati ricavati dalla sperimentazione diretta (a tentativi) di diverse tipologie di coltivazione della pianta.

L'obiettivo di queste colture varie era quindi di ricavare quali sono le sostanze migliori (materiale di concimazione) da utilizzare onde ricavare le migliori percentuali di steviosidi e rebaudiosidi all'interno della pianta. Infatti, come sarà ampiamente spiegato nel resto della tesi, queste 2 sostanze determinano la quantità di materiale dolcificante ricavabile dalla pianta e quindi l'efficienza di una sua coltivazione.

Importante è capire che coltivare una "nuova" pianta (nuova per la nostra cultura) è utile e proficuo soltanto se quest'ultima viene coltivata nel modo migliore, altrimenti ne perderemmo come potenziale produttivo.

## 12. Materiali e metodi

### 12.1 Sperimentazioni in campo a Pojana Maggiore

La prima prova di coltivazione trattata nel seguente esposto è quella svolta nella località di Pojana Maggiore (VI). In questa zona sono stati preparati dei campi prova, a sua volta divisi in parcelle, nelle quali sono state utilizzati diversi metodi di coltivazione: varie dosi di concime e due diversi metodi di irrigazione.

Le metodologie di irrigazione utilizzate nei campi prova sono l'irrigazione per aspersione e per microirrigazione. La concimazione invece è stata apportata con tre livelli crescenti di dosi che nel rapporto sono: 1 , 1.5 , 2 ( doppio del primo).

Una volta divisi i campi sono state preparate le diverse dosi di concime con i relativi livelli di N-P-K ( urea 46%, solfato di potassio e perfosfato triplo ) destinate alle varie parcelle per i test. Successivamente sono state distribuite nei vari campi ed interrate.

Nei 2 giorni successivi i campi sono stati irrigati per preparare il terreno al trapianto della Stevia (piante ottenute da seme e non da talee).

Lo schema sperimentale scelto è del tipo a blocchi randomizzati; di conseguenza le parcelle sono state così concimate (vedi tabella 21.1-2):

Aspersione		
1 - 1	1.5 - 1	2 - 1
1.5 - 2	2 - 2	1 - 2
2 - 3	1 - 3	1.5 - 3
1 - 4	1.5 - 4	2 - 4

(tabella 12.1)

Microirrigazione		
1 - 1	1.5 - 1	2 - 1
1.5 - 2	2 - 2	1 - 2
2 - 3	1 - 3	1.5 - 3
1 - 4	1.5 - 4	2 - 4

(tabella 12.2)

Il primo numero di ogni colonna della tabella corrisponde alla tesi, cioè alla quantità di concime (es. 1.5 corrisponde ad utilizzare una quantità che è 1.5 volte la quantità base), mentre il secondo numero corrisponde alla ripetizione, cioè a quante volte i campi sono stati irrigati.

La concimazione di copertura a Pojana Maggiore è stata fatta dopo 33 giorni sulle parcelle irrigate per aspersione, ovvero il 01/08/2012, e 35 sulle parcelle irrigate con microirrigazione, il 03/08/2012.

Il concime è stato localizzato per ogni pianta e date le piccole quantità da distribuire, è stato scelto un concime azotato con titolo inferiore all'urea che era stata distribuita sul fondo. E' stato nello specifico scelto nitrato ammonico al 27%, il solfato di potassio ed il perfosfato triplo. In pre-semina sono stati distribuiti l'urea 46%, il solfato di potassio ed il perfosfato triplo, mentre in copertura solo il nitrato ammonico, e le dosi che sono state apportate per ogni pianta sono (vedi tabella 12.3):

Tesi	Gr Nitrato Amm 27%
1	2.1
1.5	3.1
2	4.2

(tabella 12.3)

Per quanto riguarda la dose totale dia azoto, metà è stata distribuita in pre-semina e metà in copertura.

Nel seguente schema ritroviamo il riassunto della concimazione azotata (vedi tabella 12.4):

		Totale	Pre- Trapianto 50%	Post- Trapianto 30gg 50%		Post- Trapianto 30gg 50%
Irrigazione	Tesi	Urea 46% kg/parc	Urea 46% kg/parc	Urea 46% kg/parc	N. piante	Urea 46% gr/pianta
Manichetta	1	0.41	0.21	0.21	168	1.22
Manichetta	1.5	0.62	0.31	0.31	168	1.85
Manichetta	2	0.83	0.42	0.42	168	2.47
Aspersione	1	0.41	0.21	0.21	168	1.22
Aspersione	1.5	0.62	0.31	0.31	168	1.85
Aspersione	2	0.83	0.42	0.42	168	2.47

(tabella 12.4)

Tabella riassuntiva delle concimazioni totali effettuate in Kg/ha (vedi tabella 12.5):

	Tesi	N (Kg/ha)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (Kg/ha)	K <sub>2</sub> O (Kg/ha)
Manichetta	1	50	21	115
Manichetta	1,5	75	31,5	172,5
Manichetta	2	100	42	230
Aspersione	1	50	21	115
Aspersione	1,5	75	31,5	172,5
Aspersione	2	100	42	230

(tabella 12.5)

Ogni parcella che è composta da 7 file, è stata concimata solo per sei file, lasciando la prima fila non concimata come testimone.

L'area di saggio all'interno di ogni porcellone è composto da 24 piante centrali, come mostrato in figura (vedi schema 12.6), all'interno delle quali si individuano 6 piante significative seguendo una linea teorica obliqua che attraversa l'area di saggio. Su queste sei piante andranno eseguite le analisi più approfondite.

Il taglio e la raccolta sono stati effettuati appena prima della fioritura (momento in cui c'è la maggior concentrazione di steviosidi ). Ne hanno seguito l'essiccazione all'aria, la divisione di foglie e steli della parte essiccata, e la misura del peso fresco e del peso secco della pianta intera.

Nella sottoparcella invece sono state raccolte le piante e divisi gli steli delle foglie, ed in seguito rilevato il peso fresco. Ecco un riassunto schematico di una parcella. La parte gialla è la micro parcella da cui vengono raccolte le piante da valutare. In rosso è rappresentata la parcella di rilievo, entro la quale sono scelte le piante oggetto di rilievi.



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

x	Micro – parcella, Area di Saggio
x	Parcelle di rilievo
x	Bordo
x	Parcella

(schema 12.6)

Le 6 piante determinate all'interno dell'area di saggio (gialla) sono state tagliate (01/09/2012) ad un'altezza di 15 cm, quindi sono state separate subito foglie e steli e pesato il peso fresco di foglie e il peso fresco di steli di ogni micro-parcella di 6 piante.

Di queste circa metà sono state conservate in congelatore, le restanti sono state prime pesate e poi essiccate, per determinare il peso fresco e successivamente il peso secco.

Le altre 18 piante che rimangono nell'area di saggio (rossa) sono state tagliate e pesate ( peso fresco totale di foglie e fusti insieme) per determinare il peso secco.

Le piante della rimanente parte della parcella, cioè l'area delineata con il colore verde, sono state tagliate e distrutte.

Delle foglie e degli steli che sono stati raccolti nella micro-parcella ( 6 piante ) sono state fatte le seguenti analisi presso il laboratorio dell'Università di Padova, per determinare:

- Antiossidanti sul campione congelato;
- Total Kjeldhal Nitrogen- P – K – Nitrati – Ca – Mg;
- Zuccheri;
- Stevioside;

## 12.2 Sperimentazioni in laboratorio

### 12.2.1 Estrazione degli steviosidi

Preparazione su secco:

- 0.200 g da aggiungere a 50 ml di acqua portata ad ebollizione;
- 10 minuti in ebollizione;
- Filtrazione con carta da filtro;
- Portare a volume ( 50 ml );
- Diluire con acetonitrile ad ottenere una soluzione come F.M. ( 3 ml di estratto più 7 ml di AcN );
- Filtrazione con filtri in cellulosa rigenerata ( 0,20  $\mu$ m ).

HPLC:

F.M.: acetonitrile : acqua 70:30 ( v/v )

Colonna: Hypersil APS-2 ( 150×4.6 mm, 5  $\mu$ m )

Flusso: 1 ml/min

Temperatura colonna: 25 °C

UV: 205 nm

Preparazione degli STDs per la curva di calibrazione:

Gli STDs sono stati preparati in fase mobile. La curva di calibrazione è stata eseguita mediante diluizioni seriali (500-100-50-5 mg/l )

	tr ( min )	$\lambda_{max}$ ( nm )	Channel
Stevioside	2.97	205	9
Rebaudioside-A	3.57	205	9

## 12.2.2 Identificazione e quantificazione degli zuccheri riducenti

L'analisi è stata eseguita mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Le cromatografie liquide sono state effettuate usando un sistema cromatografico in gradiente (Jasco X.LC), costituito da una pompa binaria (Jasco PU-2080) basata sul principio di mescolamento ad alta pressione. Per l'identificazione degli zuccheri è stato utilizzato un rivelatore a indice di rifrazione (Jasco RI 2031 Plus). La separazione è avvenuta utilizzando la colonna HyperRez XP Carbohydrate Ca<sup>2+</sup> (o Pb<sup>2+</sup>) (300x7.7mm) termostata a 80°C (Jasco CO-2060) con flusso di 0,6 mL/min. La fase mobile utilizzata è costituita da acqua ultrapura (18ΩA) preparata utilizzando un sistema di purificazione dell'acqua (Sartorius, Italy). I dati forniti da questo sistema sono stati raccolti ed elaborati utilizzando il software ChromNAV Chromatography Data System. Le iniezioni (20 uL) sono state fatte usando un auto campionatore (Jasco AS-2055). L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante curva di calibrazione ottenute con diluizioni seriali degli standard.

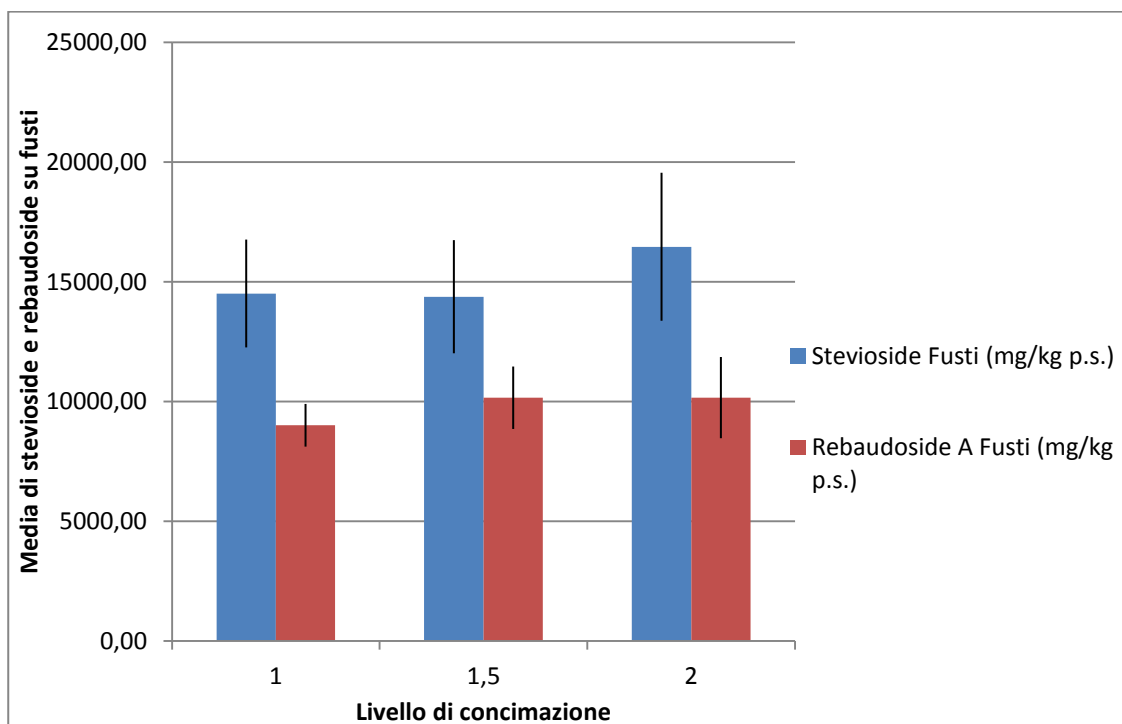
## 13. Risultati sperimentali

I risultati ottenuti dalla estrazione degli edulcoranti presenti nella Stevia, dove si ricorda che sono state adottate diverse tipologie di irrigazione e concimazione, sono i seguenti:

### 13.1 Grafici riguardanti le tre tesi di concimazione

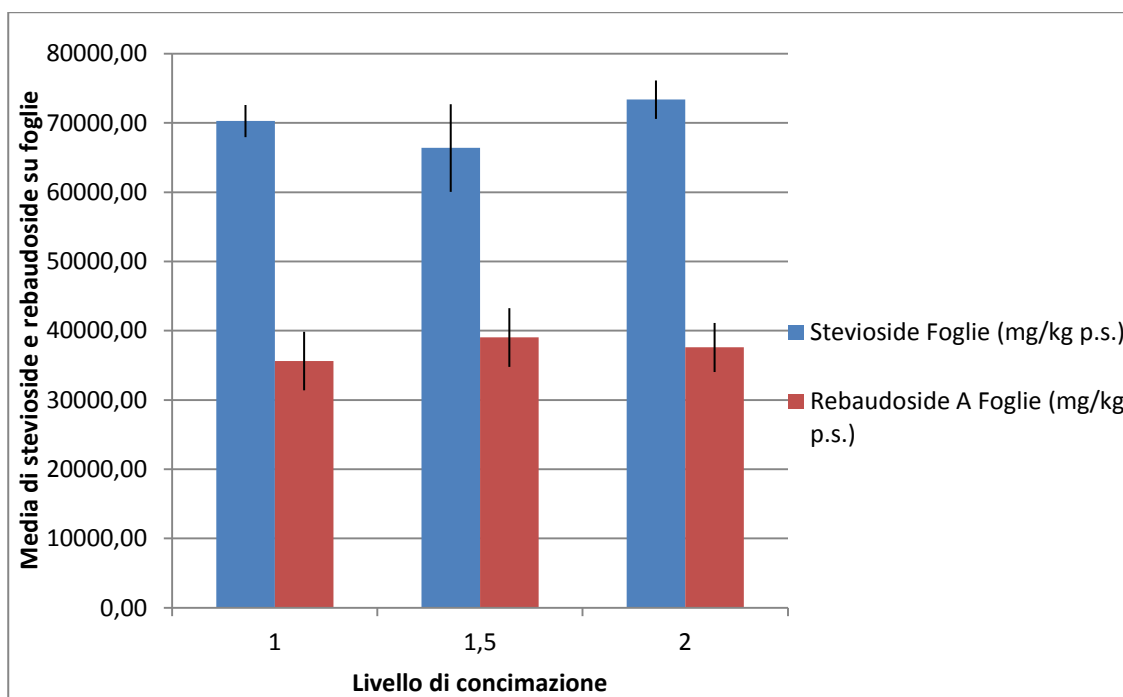
Dal *grafico 13.1*, riguardante la media del contenuto di stevioside e rebaudioside A nei fusti, si può notare che, tra i tre livelli di concimazione lo stevioside aumenta notevolmente nella tesi 2 mentre il rebaudioside ha un lieve aumento nella tesi 2 e 1,5.

Da questa osservazione se ne deduce che la concimazione comporta un aumento minimo delle sostanze dolcificanti presenti nel fusto.



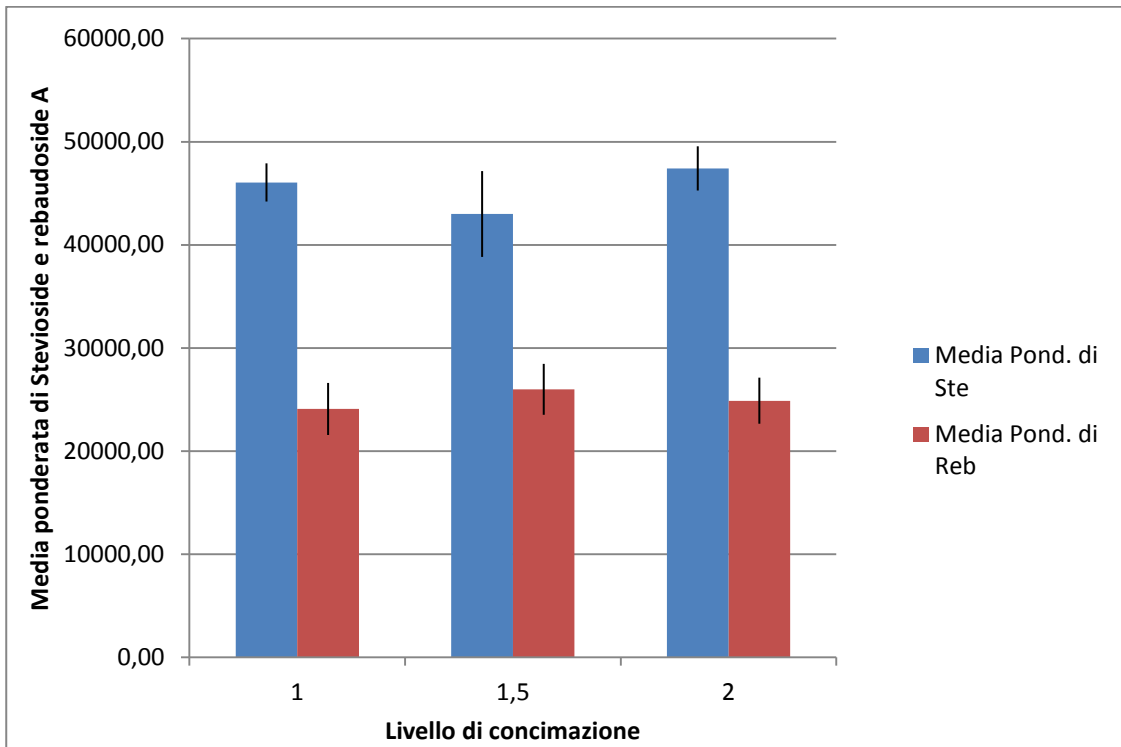
*Grafico 13.1 Media del contenuto di stevioside e di rebaudioside A nei fusti, per i tre livelli di concimazione.*

Dal *grafico 13.2* possiamo notare come il contenuto di stevioside sia maggiore nelle foglie rispetto al fusto e come lo stesso diminuisca inoltre nella tesi 1,5 ed aumenti nella tesi 2. Per il rebaudioside si ripeterà un ragionamento analogo al precedente, nonostante se con variazioni più limitate.



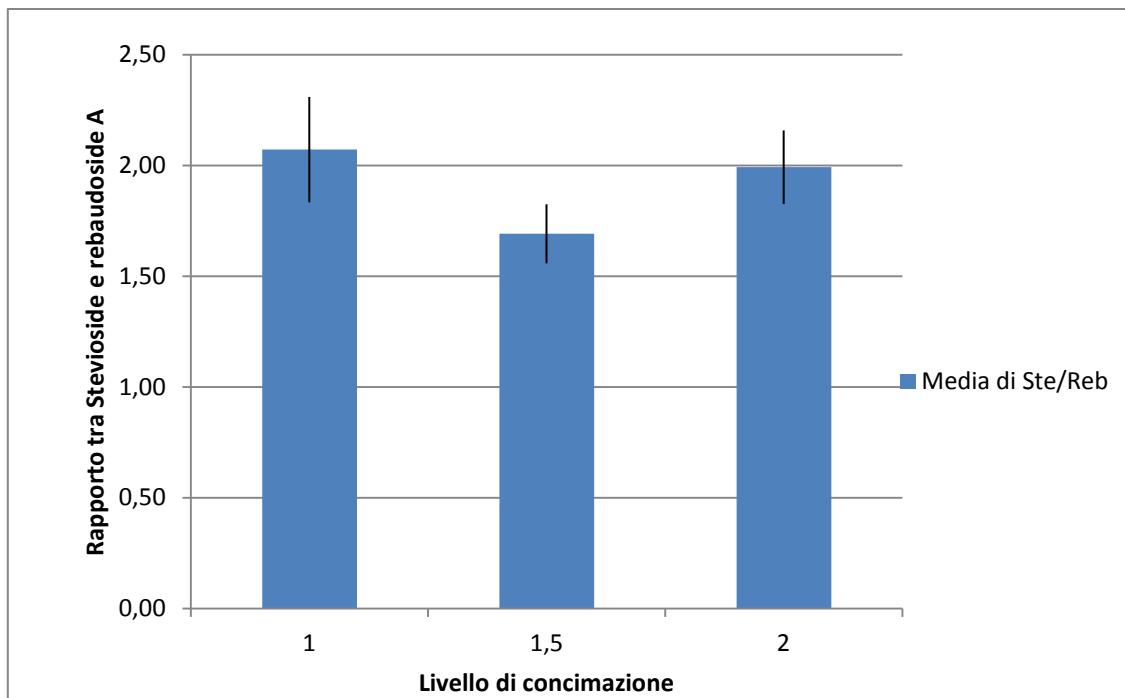
*Grafico 13.2 Media del contenuto di stevioside e di rebaudioside A nelle foglie, per i tre livelli di concimazione.*

Nel *grafico 13.3* possiamo trovare la media ponderata del contenuto di steviosidi e rebaudioside nella intera pianta. Anche in questo caso possiamo notare che non ci sono variazioni significative del contenuto dei due componenti (obbiettivo delle analisi) in nessuna delle 3 tesi di concimazione.



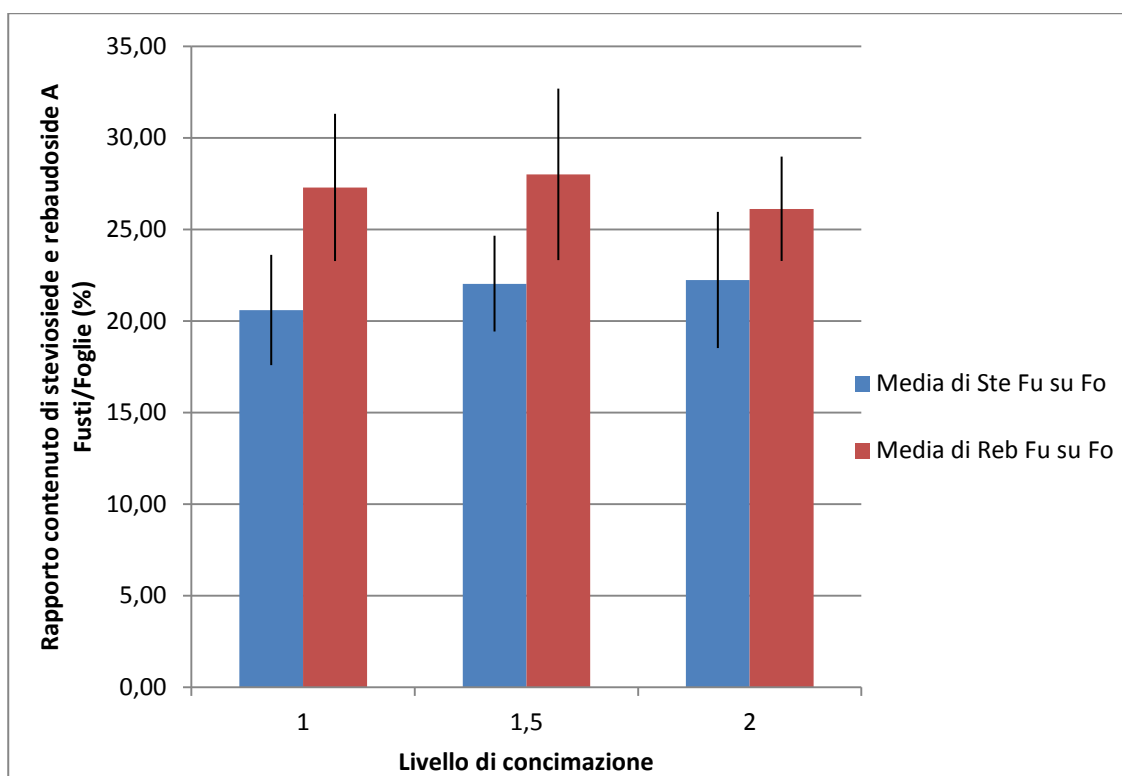
*Grafico 13.3 Media ponderata di stevioside e di rebaudioside nella pianta intera, per i tre livelli di concimazione.*

Nel *grafico 13.4* possiamo notare il rapporto tra i contenuti medi di stevioside e rebaudioside A nei tre livelli di concimazione. Si può osservare subito il modo in cui il livello di concimazione 1 sia maggiore rispetto agli altri, mentre il livello di concimazione 1,5 sia leggermente inferiore (1,7 circa) ad entrambi gli altri. Questo risultato rispecchia le piccole variazioni dei contenuti di edulcoranti dei precedenti grafici.



*Grafico 13.4 Rapporto tra i valori medi di stevioside e rebaudioside A, per i tre livelli di concimazione.*

Nel *grafico 13.5* sono rappresentati i rapporti del contenuto di steviosidi e rebaudioside A tra fusti e foglie espressi in percentuale. Si può notare come il contenuto di stevioside nel fusto sia poco più del 20% rispetto a quello delle foglie, ed il valore sia abbastanza costante (leggero aumento all'aumentare della quantità di fertilizzante utilizzata) per i tre livelli di concimazione. Per quanto riguarda il rebaudioside contenuto nel fusto, invece, troviamo un valore iniziale (quantità base di concimazione) del 27% di quello trovato nelle foglie che aumenta leggermente raddoppiando la concimazione ma cala abbastanza con il triplo del concime.

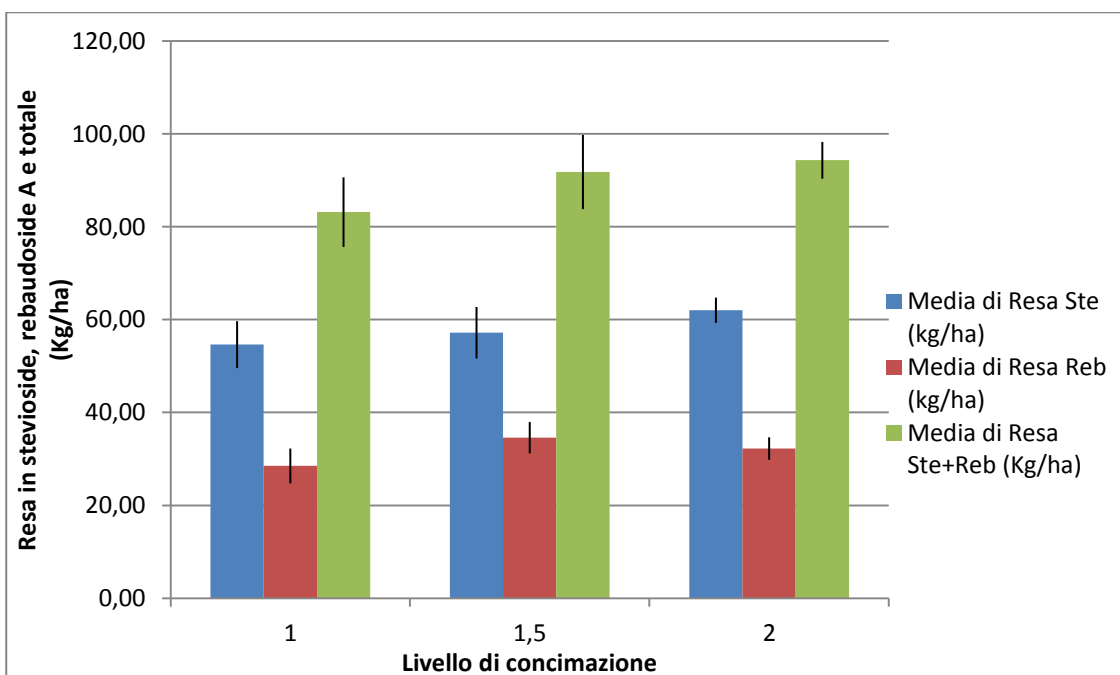


*Grafico 13.5 Rapporto del contenuto di stevioside e rebaudioside A tra fusti e foglie (%), per i tre livelli di concimazione.*



Nel Grafico 13.6 possiamo notare come lo stevioside, con l'aumentare della concimazione, aumenti gradualmente mentre il rebaudioside aumenta solamente nella concimazione raddoppiata e, per la concimazione della tesi 2, diminuisca.

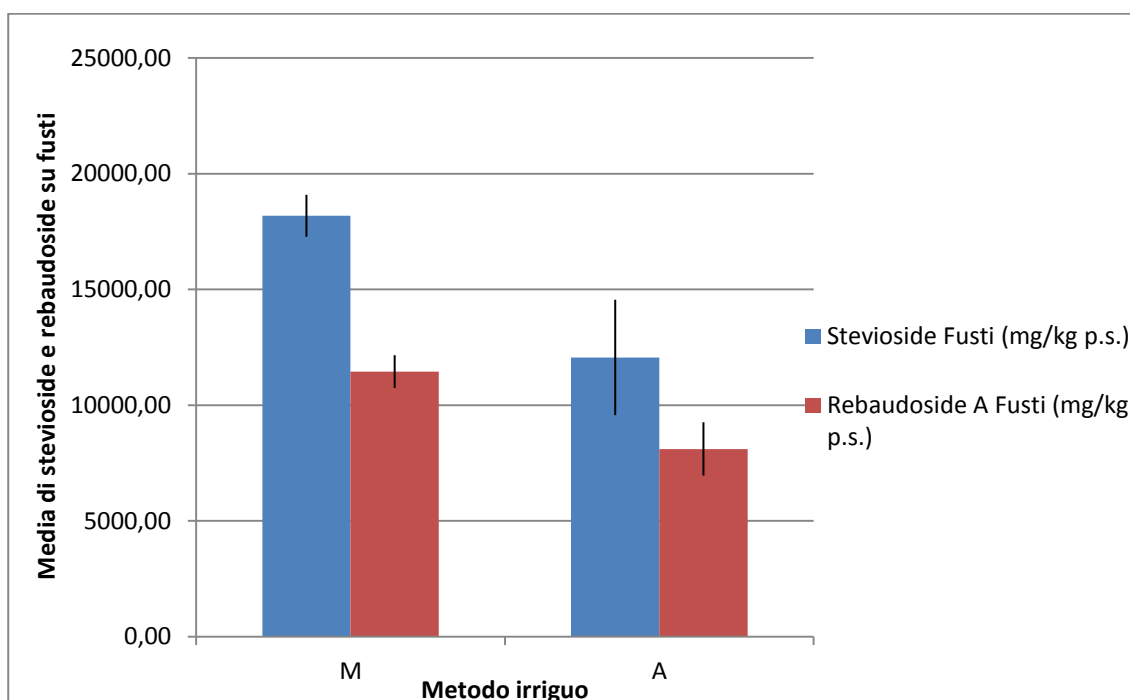
Per quanto riguarda la media sulla resa delle due sostanze edulcoranti (considerate complessivamente), possiamo notare un graduale aumento dalla tesi 1 alla 2.



*Grafico 13.6 Resa in stevioside, rebaudioside A e somma dei due (Kg/ha), per i tre livelli di concimazione.*

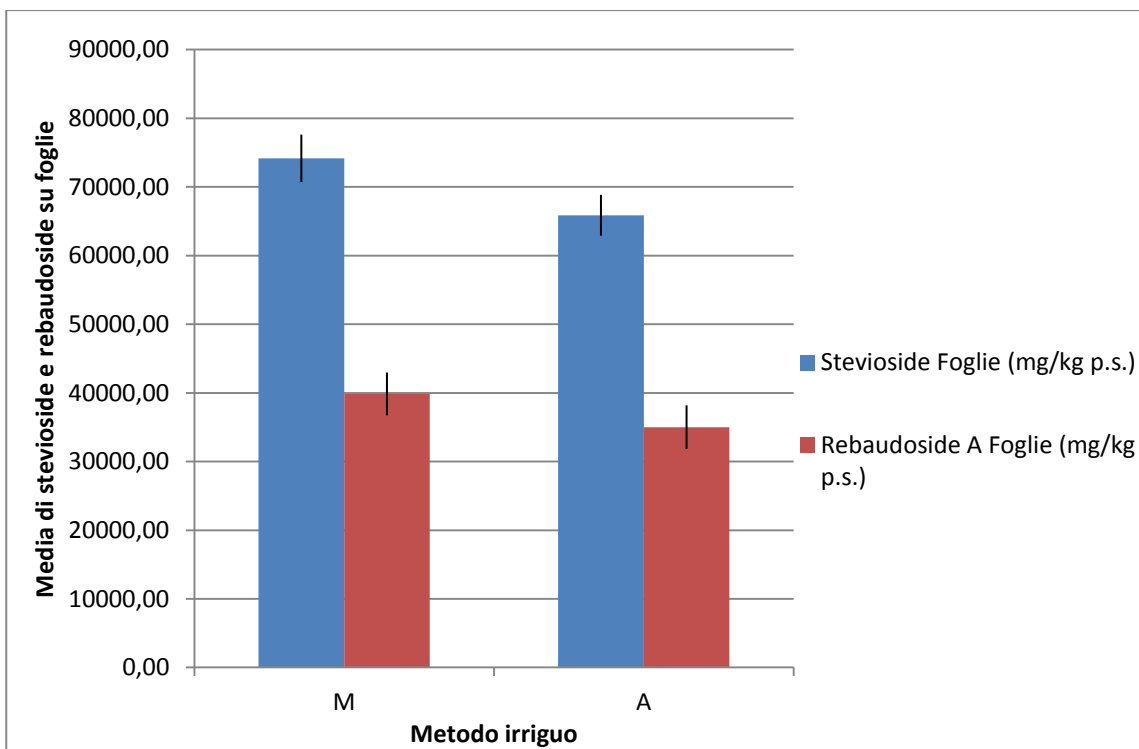
## 13.2 Grafici riguardanti i metodi irrigui

Nel *Grafico 13.7* sono riportati i dati relativi alla media di steviosidi e rebaudioside rilevati nei fusti per due diverse tipologie di irrigazione: la microirrigazione e l'aspersione. Possiamo notare come, tra le due diverse tipologie di irrigazione, quella per microirrigazione dia una media di stevioside e rebaudioside A nel fusto, decisamente maggiore rispetto a quella per aspersione.



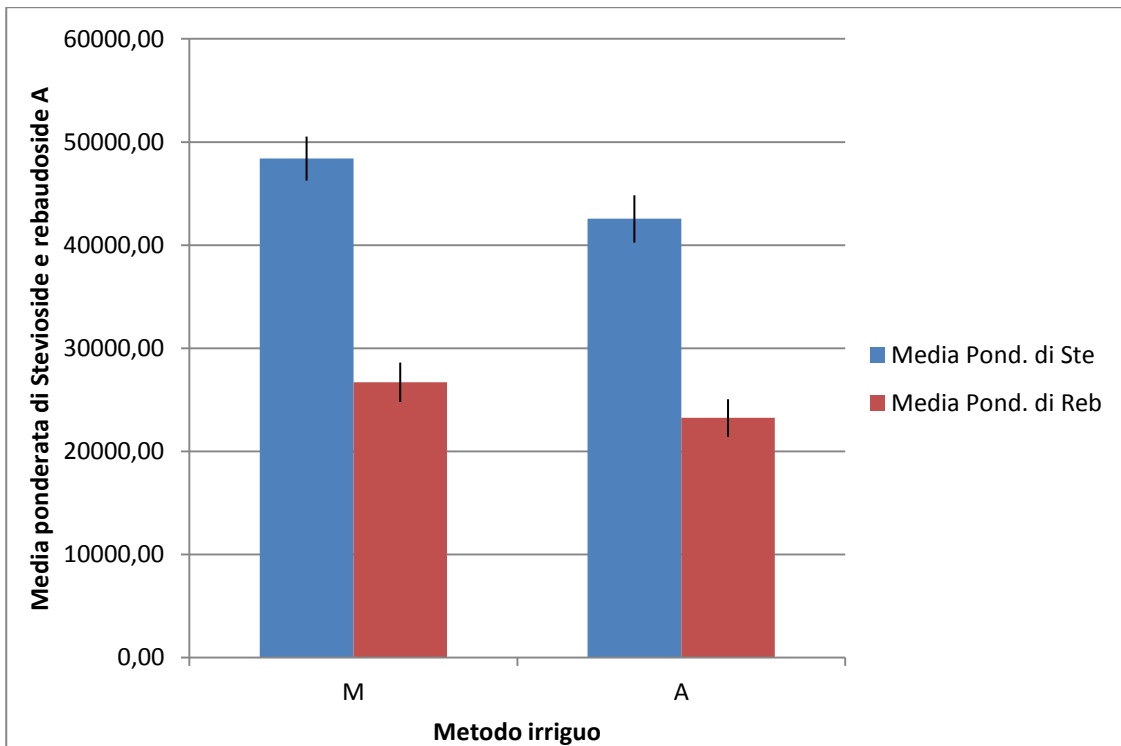
*Grafico 13.7 Media del contenuto di stevioside e di rebaudioside A nei fusti.*

Nel *Grafico 13.8* troviamo la media del contenuto di stevioside e rebaudioside A nelle foglie, per i due metodi irrigui. Possiamo notare come la media degli steviosidi nel caso della microirrigazione abbia un valore più alto rispetto alla irrigazione per aspersione. Mentre, per quanto riguarda la media di rebaudioside A nelle foglie, si osserva sempre un aumento nella microirrigazione rispetto alla aspersione però in maniera meno marcata rispetto allo stevioside.



*Grafico 13.8* Media del contenuto di stevioside e di rebaudioside A nelle foglie, per i due metodi irrigui.

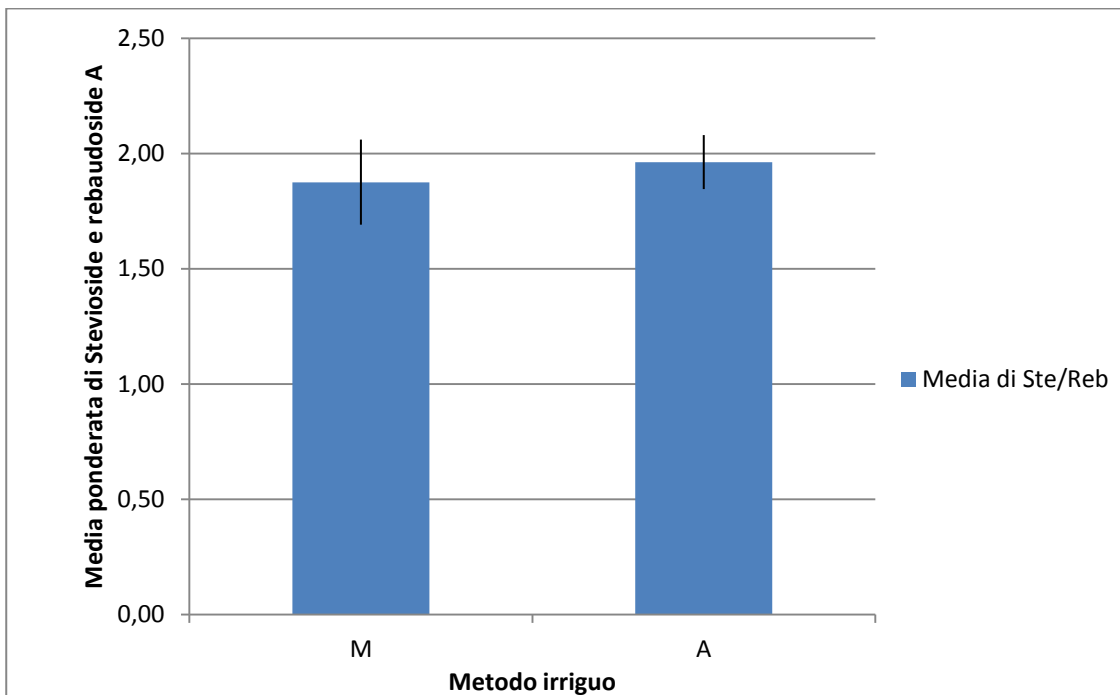
Nel *Grafico 13.9* possiamo osservare la media ponderata di stevioside e rebaudioside nella pianta intera, per i due metodi irrigui. Anche in questo caso, come per i precedenti grafici, possiamo notare come la microirrigazione ottenga migliori risultati nel caso di entrambi gli edulcoranti e come lo stevioside aumenti maggiormente rispetto al rebaudioside A.



*Grafico 13.9 Media ponderata di stevioside e di rebaudioside nella pianta intera, per i due metodi irrigui.*

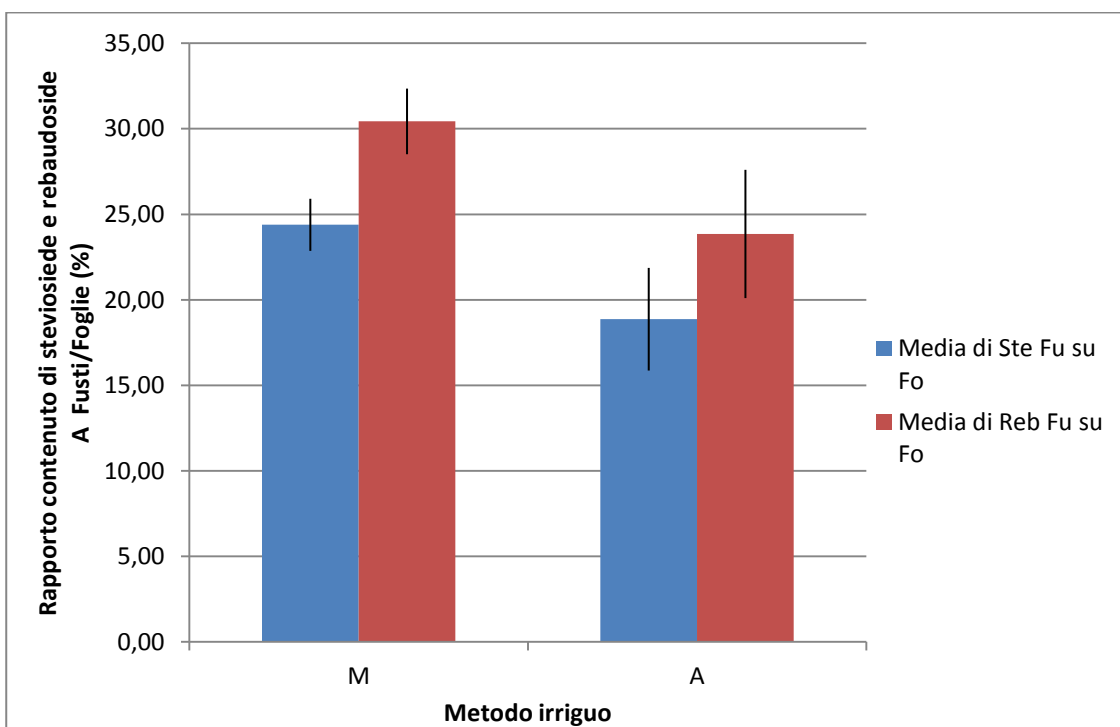
Nel *Grafico 13.10* possiamo osservare il rapporto tra i valori medi dello stevioside sul rebaudioside A, per i due metodi irrigui.

Si può facilmente dedurre che lo stevioside è, in entrambi i casi, quasi il doppio del rebaudioside A, anche se con la microirrigazione il rapporto è leggermente inferiore rispetto all'aspersione.



*Grafico 13.10 Rapporto tra i valori medi di stevioside e rebaudioside A, per i due metodi irrigui.*

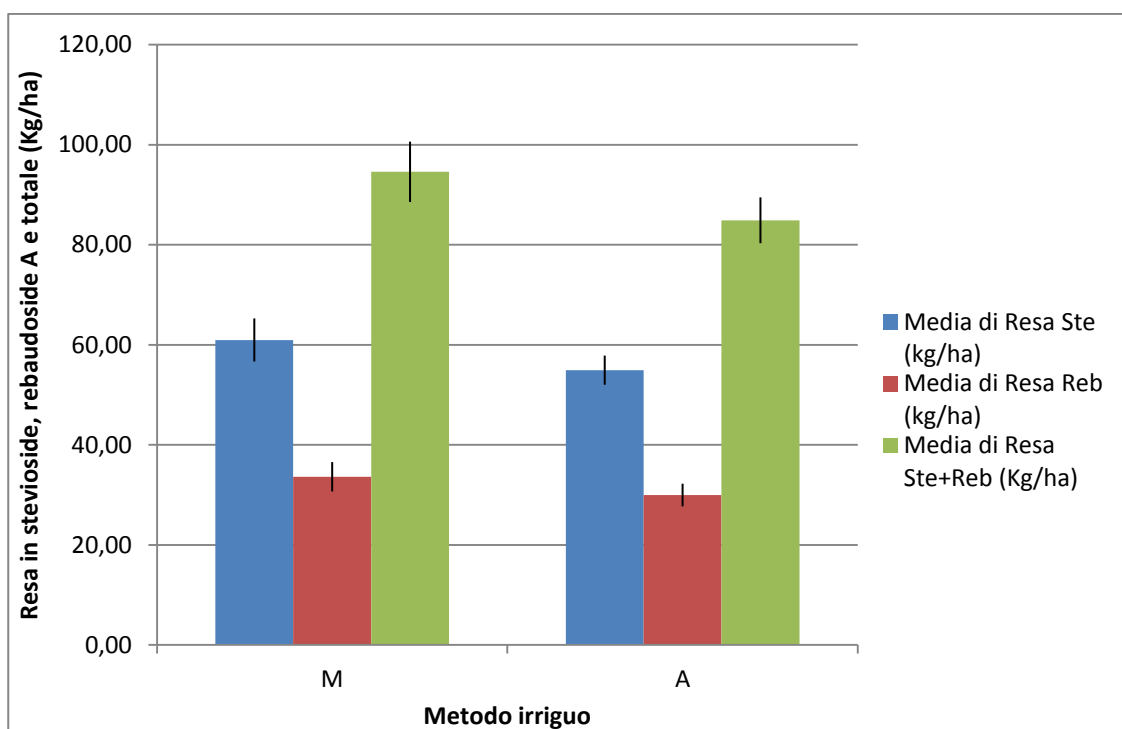
Nel *Grafico 13.11* viene rappresentato il rapporto del contenuto di stevioside e rebaudioside A tra fusti e foglie (%), per i due metodi irrigui. Si può notare in maniera molto evidente come nel caso della microirrigazione la percentuale di stevioside e rebaudioside sia nettamente superiore rispetto alla irrigazione per aspersione. Questa diminuzione percentuale la si può dedurre anche dai precedenti grafici (13.8-13.7), nei quali si può notare come il metodo di irrigazione per aspersione faccia abbassare le quantità di edulcoranti nel fusto molto di più che sulle foglie (si traduce quindi nella diminuzione percentuale del *grafico 13.11*). In sintesi irrigando con microirrigazione si aumenta di più il contenuto di edulcoranti nei fusti che nelle foglie.



*Grafico 13.11 Rapporto del contenuto di stevioside e rebaudioside A tra fusti e foglie (%), per i due metodi irrigui.*

Osserviamo dal *grafico 13.12* la resa in stevioside, rebaudioside A e somma dei due (Kg/ha), per i due metodi irrigui.

Volendo precisare, si può nuovamente ribadire come la resa in edulcoranti per la microirrigazione sia più alta, sia in stevioside (circa 5kg/ha) che rebaudioside A (circa 4 kg/ha), rispetto a quella ottenuta irrigando con aspersione. Inoltre si nota come questo aumento sia più considerevole per lo stevioside rispetto al rebaudioside A.



*Grafico 13.12 Resa in stevioside, rebaudioside A e somma dei due (Kg/ha), per i due metodi irrigui.*

## 14. Conclusioni

I dati trattati precedentemente ci hanno potuto fornire una visione completa per quanto riguarda i risultati ottenuti dalla sperimentazione sulla stevia ma soprattutto ci hanno fornito degli importanti spunti sulle tecniche di coltivazione della stevia per migliorare il contenuto degli edulcoranti nella stessa. I grafici possono essere suddivisi in due: la prima parte riguarda i risultati ottenuti dalle tre diverse tesi di concimazione della pianta mentre i restanti riguardano la variazione degli edulcoranti per le due tipologie di metodi irrigui, la microirrigazione e l'aspersione.

Nei grafici riguardanti la concimazione (quindi la prima parte), abbiamo potuto notare come per le tre diverse tesi di concimazione il contenuto di stevioside e rebaudioside non vari in maniera importante soprattutto per quanto riguarda le foglie mentre nei fusti, come si può vedere nel grafico 13.1, il contenuto di stevioside e rebaudioside varia in maniera più elevata anche se si deve considerare che solitamente per l'estrazione degli edulcoranti vengono utilizzate le foglie (maggiore purezza dell'estratto).

Per quanto riguarda le due tipologie di metodi irrigui possiamo fare delle nette distinzioni, cioè la microirrigazione è un metodo irriguo molto efficace per quanto riguarda i miglioramenti nella pianta ma decisamente dispendioso in quanto richiede la messa in campo delle manichette cosa che non viene fatta nella irrigazione per aspersione. Oltre a ciò la messa in campo delle manichette provoca un difficile utilizzo dei mezzi all'interno del campo stesso cosa che nell'irrigazione per aspersione non avviene. Altro particolare molto importante di cui tenere conto a livello di risultati ottenuti è che, l'apparato radicale della pianta si sviluppa meno nella microirrigazione in quanto l'acqua viene data in maniera più precisa e grazie a ciò si può ottenere un maggior apparato aereo della pianta stessa. Mentre con l'irrigazione per aspersione dando l'acqua a pioggia, il



risultato che otteniamo sarà il contrario, cioè abbiamo un maggiore sviluppo dell'apparato radicale in quanto costretto a cercare l'acqua nei dintorni del terreno e quindi ciò provocherà una minore produzione dell'apparato superiore.

Per quanto riguarda i risultati del contenuto di edulcoranti all'interno della pianta per i diversi metodi irrigui possiamo dire che la microirrigazione comporta sicuramente un aumento del contenuto di stevioside e rebaudioside nella stevia rispetto alla irrigazione per aspersione ma bisogna tener conto anche se l'investimento fatto nella microirrigazione viene coperto successivamente dalla raccolta di piante con maggior contenuto di edulcoranti.

Da notare anche che tra le tre diverse tesi di concimazione e i due metodi irrigui, il maggiore contenuto di edulcoranti sulla stevia lo abbiamo ottenuto grazie a una delle due tipologie di irrigazioni, cioè la microirrigazione. Invece con le tre diverse tesi di concimazione la stevia non abbia avuto variazioni notevoli per quanto riguarda il contenuto di stevioside e rebaudioside.

## 14. Bibliografia:

### Siti internet:

- [naStevia.it](http://naStevia.it)
- [Stevia.net](http://Stevia.net)
- [Steviaitalia.it](http://Steviaitalia.it)
- [wikipedia.org](http://wikipedia.org)
- [efsa.europa.eu](http://efsa.europa.eu)

### Pubblicazioni scientifiche

- “Downstream processing of stevioside and its potential application”  
Munish Puri, Deepika Sharma, Ashok K. Tiwari
- *Rassegna: Molecole ad azione dolcificante di origine naturale e di sintesi e loro impiego in matrici alimentari (Natural and synthetic sweet active molecules and their use in foods)* di A. Santini  
Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli  
“Federico II”, Portici (Napoli), Italia Adi magazine 2009

### Libro:

- *Stevia. L'alternativa naturale allo zucchero* di Ray Sahelian, Donna Gates, Ray Sahelian