

ASPECTOS DE TOXICIDAD Y EL EFECTO SOBRE LA GLICEMIA DE *Stevia rebaudiana* BERTONI, (KA'A HE'Ë)

Aspects of toxicity and effect on glycemia of *Stevia rebaudiana* Bertoni, (ka'a he'ë)

MARÍA LUISA KENNEDY¹; MIGUEL ÁNGEL CAMPUZANO-BUBLITZ²

Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. Campus UNA 2169. San Lorenzo. Paraguay; e-mail: ¹lukenrol@qui.una.py, ²mbublitz@qui.una.py

RESUMEN: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) es una planta herbácea perenne de la familia Asteraceae. La planta contiene los componentes dulces, llamados esteviósidos, el principal es el esteviósido. Durante siglos, *S. rebaudiana*, se ha empleado como endulzante y con fines medicinales, sobre todo para la regulación de la glicemia. En esta revisión se enfocan dos aspectos, la seguridad de uso de la *S. rebaudiana* y los esteviósidos, y el efecto sobre el nivel de glicemia. El esteviósido parece tener muy poca o ninguna toxicidad aguda y representa poco riesgo basado en los estudios en humanos. La ingesta de esteviósido (750mg/día durante 3 meses) en individuos sanos o con enfermedades subyacentes como diabetes mellitus e hipertensión, no produce efectos adversos o anomalías en el hígado o en la función renal. El esteviósido administrado oralmente en ratas no aumenta la incidencia de cáncer. No se han obtenido evidencias de carcinogénesis en estudios *in vivo* con ratones. De hecho el esteviósido, rebaudiósidos A and C y dulcósido A suprimen la promoción de tumor en piel de ratón por el 12-O-tetradecanoilforbol-13 acetato. En el 2006, la JECFA estableció que no hay evidencia que indique que el esteviósido induce genotoxicidad *in vivo* o *in vitro*. Estudios realizados en ratas, ratones y hámsters han demostrado que el esteviósido no tiene efecto sobre la fertilidad. Tanto los extractos de *S. rebaudiana*, como los esteviósidos pueden disminuir la glicemia. Los extractos de *S. rebaudiana* pueden disminuir el nivel de glucosa en sangre en ratas diabéticas con un efecto tiempo-dependiente, y los resultados son similares a los obtenidos utilizando polvo de hojas de *S. rebaudiana*. En ratas diabéticas, los esteviósidos regulan el nivel de glucosa en la sangre por el incremento en la secreción de insulina y una mejor utilización de la glucosa por los tejidos periféricos y los músculos; también se postula que los esteviósidos contrarrestan la glucotoxicidad en las células β o que también suprimen la secreción de glucagón por parte de las células α del páncreas. Los extractos de *S. rebaudiana* también mejoran el desempeño en las pruebas de tolerancia a glucosa y disminuyen las concentraciones de glucosa plasmática. Estas investigaciones indican que la *S. rebaudiana* puede ser útil en el manejo de la diabetes no insulino-dependiente.

Palabras claves: *Stevia rebaudiana*, seguridad, efecto sobre glicemia.

SUMMARY: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) is a perennial herb of the Asteraceae family. It contains the sweet components known as steviosides, being the main the stevioside. This plant has been used as a sweetener and for medicinal purposes, especially for the regulation of glycemia. In this review, two aspects are considered: the safety of use of stevia and

Manuscrito recibido: septiembre de 2014.

Manuscrito aceptado: junio de 2015.

stevioside, and the effect on blood sugar level. Stevioside seems to have little or no acute toxicity and poses little risk according to the results observed on human. Stevioside intakes (750mg / day for 3 months) in healthy people or in those with some underlying conditions such as diabetes mellitus and hypertension, produces no adverse effects or abnormalities in liver or kidney function. Stevioside orally administered in rats do not increase the incidence of cancer. No evidence of carcinogenesis was obtained after *in vivo* studies in mice. Actually, stevioside, rebaudioside A and C, and dulcoside A, suppress tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate on the skin of mice. In 2006, JECFA stated that there is no evidence that stevioside induces *in vivo* or *in vitro* genotoxicity. Several studies have shown that stevioside orally administered has no effect on fertility in mice, rats or hamsters. Both, extracts and stevioside, can reduce blood sugar levels. *S. rebaudiana* extracts can lower blood glucose level in diabetic rats with a time-dependent effect, similar results to those obtained using stevia leaf powder. Stevioside regulate the level of blood glucose by increasing insulin secretion and improving glucose utilization by peripheral tissues and muscles in diabetic rats; also it has been postulated that stevioside counteract glucotoxicity in beta cells or also suppresses glucagon secretion by the pancreatic α cells. *Stevia rebaudiana* extracts also improve glucose tolerance tests and decrease plasma glucose concentrations. These studies indicate that *S. rebaudiana* may be useful in the management of non-insulin dependent diabetes.

Keywords: *Stevia rebaudiana*, toxicity, effect on glycemia.

INTRODUCCIÓN

El género *Stevia* presenta cerca de 200 especies, todas americanas; en Paraguay se han coleccionado 20 especies y es posible que existan más ya que la taxonomía de este género es sumamente difícil debido a la frecuente variabilidad intraespecífica y a la probable frecuencia de hibridación (Cabrera et al. 1996).

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, es una especie de la Familia Asteraceae, originaria de las regiones altas del noreste de Paraguay (en la frontera con Brasil), en la región montañosa de Amambay. El poder edulcorante de sus hojas y sus propiedades medicinales han sido conocidos por los indios guaraníes locales desde hace cientos de años (Hanson y De Oliveira, 1993; Lemus-Mondaca, Vega-Gálvez, Zura-Bravo y Ah-Hen, 2012).

S. rebaudiana es un sufrutice de 0,30 a 0,50 m de altura, con tallos ramosos levemente pubescentes (**Fig. 1-2**). Las hojas son opuestas, sésiles anchamente oblanceoladas o espatuladas obtusas aserradas en la mitad superior de sus márgenes, cuneiformes en su mitad inferior, trinervadas desde su base, puberulas o glabras, de sabor sumamente dulce, de 3-6 x 0,7 x 2 cm, las inflorescencias se disponen en capítulos numerosos cortamente pediceladas, dispuestos en panojas de cimas, con un involucre de 5-6 mm de altura, densamente velludo con pelos pluricelulares no glandulosos, las flores son blancas, con garganta purpúrea, los frutos son aquenios con papus formado por 15-17 aristas cortamente ciliadas en su parte superior y algo ensanchadas inferiormente. Esta especie es cultivada en Paraguay y en muchos jardines botánicos (Cabrera et al. 1996).

La hoja tiene un sabor agradablemente dulce y refrescante. La planta contiene los componentes dulces, rodeado de los componentes amargos en las venas. Puede utilizarse para la producción comercial por un periodo de cinco años o más, dando varias cosechas anuales a partir de la parte aérea de la planta. Crece en suelos arenosos

cerca de arroyos de la parte selvática subtropical del alto Paraná (Madan et al. 2010).

Composición química

La parte útil de este arbusto son las hojas. De las 110 especies de *Stevia* estudiadas, sólo 18 presentan sabor dulce (Soejarto, Douglas y Farnsworth, 1982). Ocho glucósidos de *ent*-kaureno, dulcósido A y B, rebaudiosidos A-E, esteviolbiósido, y esteviósido (**Fig. 3, Tabla 1**), producen la sensación de sabor dulce. Estos glucósidos son principalmente compuestos derivados del diterpeno esteviol. *S. rebaudiana*, la especie más dulce, contiene en sus hojas los ocho glucósidos de *ent*-kaureno, siendo esteviósido el componente principal (3-8 % en peso de las hojas secas) Además, *S. rebaudiana* contiene estigmasterol, β -sitosterol, campesterol. También contiene esteviol, un producto formado por la hidroxilación enzimática dentro de la planta (Raina, Bhandari, Romesh y Yashpal, 2013).



Fig. 1. *Stevia rebaudiana* cultivada en el jardín de aclimatación del Departamento de Botánica- FCQ. (Foto: G. Delmás, 2004).



Fig. 2. Aspecto de la inflorescencia de *S. rebaudiana* (Foto: G. Delmás, 2004).

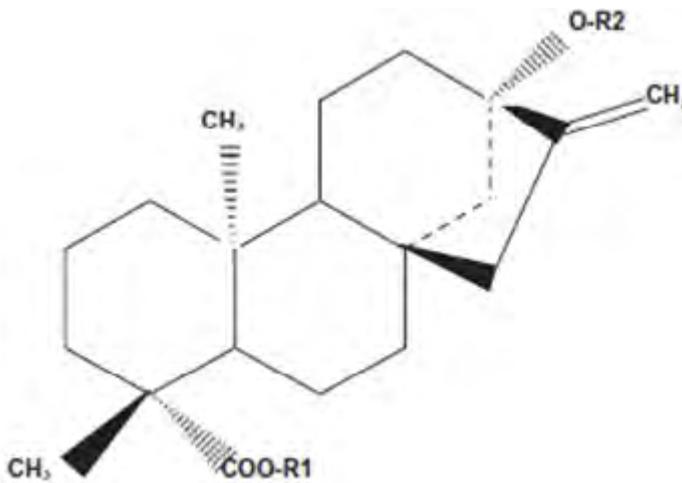


Fig. 3: Esqueleto base de los glucósidos de *Stevia rebaudiana* Bert.

El esteviósido es un glucósido con residuos glucosilo y soforosilo unidos a la aglicona esteviol, la que posee esqueleto ciclopentanoperhidrofenantreno. Los átomos C4 y C13 del esteviol están conectados a un grupo β -glucosilo y β -soforosilo, respectivamente.

La estructura del rebaudiósido A es similar a la del esteviósido, con la excepción que el residuo soforosilo se sustituye por un residuo glucosil-(1-3)-soforosilo. Los edulcorantes de *Stevia* son similares en estructura, la aglicona esteviol se conecta en los carbonos C4 y C13 a trisacáridos que consisten en glucosa y/o ramnosa (**Fig. 3., Tabla1**). *S. rebaudiana* contiene además, una mezcla compleja de diterpenos del labdano, triterpenos, estigmasterol, taninos, aceites volátiles, flavonoides, alcaloides, clorofila, ácidos hidroxycinámicos (caféico, clorogénico), oligosacáridos, azúcares libres, aminoácidos, lípidos y elementos traza (Komissarenko, Derkach, Kovalyov y Bublik, 1994).

De los glucósidos, rebaudiósido A es el más dulce y el más estable, y es menos amargo que el esteviósido (Jakimovich, Moon, Choi y Kinghorn, 1990). El rebaudiósido E es tan dulce como el esteviósido y el rebaudiósido D es tan dulce como el rebaudiósido A, mientras que los otros glucósidos son menos dulces que el esteviósido. El esteviósido es un polvo blanco, cristalino extraído de las hojas de la planta, es 100 % natural, no aporta calorías significativamente, es entre 200 y 300 veces más dulce que la sacarosa, estable al calor a 198 °C, no fermentable, un potenciador del sabor, y es anti-placa y anti-caries. Es altamente higroscópico (Savita et al. 2004).

Los dos glucósidos principales son el esteviósido, de 5 a 10 % del peso seco de las hojas, y rebaudiósido A, 2 a 4 %. El dulzor de estos compuestos comparado con la sacarosa es: esteviósido 250 a 300, rebaudiósido A 350 a 450, rebaudiósido B 300 a 350, rebaudiósido C 50 a 120, rebaudiósido D 200 a 300, rebaudiósido E 150 a 300, dulcósido A 50 a 120 y esteviolbiósido 100 a 125 veces más dulce (Jarma, Combatt y Cleves, 2010; Madan et al. 2010; Muanda, Soulimani, Diop y Dicko, 2011; Goyal, Samsher y Goyal, 2010; Lemus-Mondaca et al. 2012; Landázuri y Tigrero, 2009).

Tabla 1. Estructura de los principales glicósidos de las hojas *S. rebaudiana* (Gluc, Xil, Ram = glucosa, xilosa y ramnosa, respectivamente).

Compuesto	R1	R2
Steviol	H	H
Steviolbioósido	H	β -Gluc- β -Gluc (2 \rightarrow 1)
Steviósido	β -Gluc	β -Gluc- β -Gluc (2 \rightarrow 1)
Rebaudiósido A	β -Gluc	β -Gluc- β -Gluc (2 \rightarrow 1) β -Gluc (3 \rightarrow 1)
Rebaudiósido B	H	β -Gluc- β -Gluc (2 \rightarrow 1) β -Gluc (3 \rightarrow 1)
Rebaudiósido C (dulcósido B)	β -Gluc	β -Gluc- β -Ram (2 \rightarrow 1) β -Gluc (3 \rightarrow 1)
Rebaudiósido D	β -Gluc- β -Gluc (2 \rightarrow 1)	β -Gluc- β -Gluc (2 \rightarrow 1) β -Gluc (3 \rightarrow 1)
Rebaudiósido E	β -Gluc- β -Gluc (2 \rightarrow 1)	β -Gluc- β -Gluc (2 \rightarrow 1)
Rebaudiósido F	β -Gluc	β -Gluc- β -Xil (2 \rightarrow 1) β -Gluc (3 \rightarrow 1)
Dulcósido A	β -Gluc	β -Gluc- β -Ram (2 \rightarrow 1)

Entre los componentes de la *Stevia*, el rebaudiósido A es de particular interés debido a que tiene el perfil de sabor más deseable. El rebaudiósido A constituye de 30 a 40 % del total de heterósidos y tiene el sabor más dulce, evaluada como entre 180 y 400 veces más dulce que el azúcar, sin regusto amargo (sabor regaliz). La relación rebaudiósido A/esteviósido, determina la calidad del dulzor; cuanto más rebaudiósido A, mejor será la calidad. El rendimiento edulcorante de compuestos en el tejido de la hoja puede variar de acuerdo con el método de propagación, la duración del día y las prácticas agronómicas (Jarma et al. 2010). A diferencia de muchos edulcorantes bajos en calorías, el esteviósido es estable a altas temperaturas (100 °C) y en un rango amplio de valores de pH. No aporta significativamente calorías, es no fermentable y no se oscurece durante la cocción. El mayor contenido de esteviósidos es en las hojas, y le siguen en orden decreciente brotes, raíces, flores. Por lo tanto, se sugiere que las hojas sirven para la síntesis y la acumulación de los compuestos glicosídicos. Las hojas de la planta silvestre de *S. rebaudiana* contienen 0,3% de dulcósido, 0,6% de rebaudiósido C, 3,8% de rebaudiósido A y el 9,1% de esteviósido. (Pande y Gupta, 2013; Marcinek y Krejpcio, 2015).

Según Sharma, Mogra y Upadhyay (2006), otros componentes presentes en *S. rebaudiana* son: ácido ascórbico, β -caroteno, cromo, cobalto, magnesio, hierro, potasio, fósforo, riboflavina, tiamina, estaño, zinc. Los otros productos químicos encontrados en *S. rebaudiana* incluyen apigenina, austroinulin, avicularin, β -sitosterol, ácido cafeico, compesterol, cariofileno, centaureidín, ácido clorogénico, clorofila, cinarósido, daucoesterol, foeniculín, ácido fórmico, ácido giberélico, giberelinas, indol-3-acetonitrilo, isoquercitrina, isosteviol, kaempferol, kaureno, lupeol, luteolina, polisatácido, quercetina, quercitrina, escopoletina, estigmasterol y umbeliferona.

PROPIEDADES DE LA ESTEVIA

Durante siglos, las tribus Guaraníes de Paraguay y Brasil han usado diferentes especies de estevia, principalmente *Stevia rebaudiana*, como endulzante para contrarrestar el sabor amargo de los medicamentos a base de diferentes plantas y bebidas, y con fines medicinales que incluyen la regulación de la glicemia e hipertensión. Este efecto hipotensor leve se observó en sujetos tratados con el té, administrado diariamente por 30 días. Se reporta como útil en el tratamiento de alteraciones de la piel y en prevención de caries, ya que no puede ser fermentado. Se ha informado que tiene efectos bactericidas sobre *Streptococcus mutans*, responsable de las caries dentales al poseer propiedades antibacterianas y antivirales (Durán, Rodríguez, Cerdón y Record, 2012).

Además, los componentes de *S. rebaudiana* estimulan el estado de alerta, facilitan la digestión, las funciones gastrointestinales y mantienen la sensación de vitalidad y bienestar. La disminución del deseo de comer dulces y alimentos grasos, es reportada por consumidores de estevia. Otros, en cambio, indican que su consumo reduce el deseo del tabaco y de bebidas alcohólicas (Anton et al. 2010).

El botánico suizo Moisés Santiago Bertoni fue el primero que la describió en 1887, detallando su sabor dulce. En 1900, el químico paraguayo Ovidio Rebaudi, logró aislar los principios activos responsables del dulzor. *S. rebaudiana* no contiene calorías y las hojas pueden utilizarse en su estado natural, gracias a su gran poder edulcorante, y sólo

son necesarias pequeñas cantidades del producto (Durán et al. 2012).

SEGURIDAD EN SU CONSUMO

El estevióside parece tener muy poca o ninguna toxicidad aguda. Del mismo modo, el consumo crónico de estevióside se cree que representa poco riesgo basado en los estudios en humanos. El estevióside en cantidades elevadas como 550 mg/kg de peso corporal al día (es decir 200 veces la ingesta máxima probable de alrededor de 2 mg/kg/peso corporal/día) por 2 años, no tuvo efectos tóxicos o cancerígenos en ratas. Por otro lado, el metabolito de la aglicona, el esteviol, se informó que es mutagénico y bactericida en *Salmonella typhimurium* TM677 (Perzzuto, Compadre, Swanson, Nanayakkara y Kinghorn, 1985). Los efectos biológicos e interacciones adversas con fármacos se desconocen (Mogra y Dashora, 2009; Misra et al. 2011; Durán et al. 2012).

Aspectos de seguridad: Toxicidad, carcinogénesis y teratogénesis

Debido a su uso popular como sustituto del azúcar no calórico, han sido estudiadas de manera intensiva las propiedades toxicológicas del estevióside y el steviol tanto en condiciones *in vitro* como en animales experimentales. Además, se han evaluado los potenciales carcinogénicos y teratogénicos así como los efectos en la reproducción (Giannuzzi y Molina, 1995).

Estudios toxicológicos

En estudios *in vitro* que implican varias líneas de células diferentes de riñón e intestino indicaron que se requiere una concentración tan alta como 2 mM de estevióside para afectar la viabilidad de estas células, sin embargo 0.2 mM de steviol reduce significativamente la viabilidad de las mismas. Este efecto tóxico puede ser consecuencia de una interrupción del metabolismo mitocondrial como se ha sugerido en estudios anteriores (Xili et al. 1992; Avila Monzón, 2014).

En evaluaciones de toxicidad aguda y crónica por ingestión, en ratones, ratas y hámsteres, con un consumo de estevióside tan elevado como 15g/Kg de peso corporal no se observaron signos de toxicidad aguda. Sin embargo, la administración oral de esteviol es letal con un LD50 de 5-20 g/kg de peso corporal, dependiendo de la especie animal, siendo los hámsteres más susceptibles a la toxicidad del esteviol que las ratas o los ratones (Avila Monzón, 2014; Toskulkao, Sutheerawatananon, Wanichanon, Saitongdee y Suttajit, 1995; Perzzuto et al. 1985).

El examen histológico de hámsteres tratados con esteviol ha revelado la degeneración de la célula tubular proximal, la extensión de la cual está relacionada con la subida en el suero sanguíneo del nitrógeno de urea y la creatinina, indicadores del deterioro de la función renal. Así pues, la causa de muerte en hámsteres tratados con esteviol es un fallo renal agudo. La ingesta de estevióside (750mg/día durante 3 meses) en individuos sanos o con enfermedades subyacentes como la diabetes mellitus e hipertensión, no produce efectos adversos o anormalidades en el hígado o en la función renal (Barriocanal, Palacios, Benitez, Jimenez y Rojas, 2008).

De acuerdo con estudios farmacocinéticos previos en humanos, después de la administración oral de una dosis individual de 4,2 mg de estevióside por Kg de peso corporal, supone la máxima concentración de esteviol glucuronido y esteviol libre en

plasma de 1,89 µg/ml (3,7 µM) y 0,19 µg/ml (0,38 µM) respectivamente. Este nivel de esteviol, no debería ser tóxico para las células humanas, y parece que el esteviol glucurónido no se convierte de nuevo en esteviol (Avila Monzón, 2014; Landazuri y Triguero, 2009; Nakayama, Kasahara y Yamamoto, 1986).

Evaluación carcinogénica

El potencial carcinogénico del esteviol es una preocupación particular y varias investigaciones usando diferentes modelos experimentales han sido realizadas para evaluar los efectos mutagénicos del esteviósido y el esteviol. Análisis genéticos bacterianos han revelado que el esteviósido no es mutagénico (Suttajit, Vinitketkaumnue, Meevatee, y Buddhasukh, 1993). Sin embargo, varios ensayos mutagénicos sobre el potencial genotóxico del esteviol son no concluyentes. En ensayos de mutación usando *Salmonella typhimurium* TM677, el esteviol mostró toxicidad genética después de la activación metabólica por homogenato de hígado. Estudios usando *E. coli* y células mamarias cultivadas sugirieron que el esteviol puede producir lesiones genéticas que pueden derivar en la formación de cáncer. Sin embargo, otros ensayos de mutagenicidad realizados en bacterias, fracasaron en la demostración de la actividad mutagénica del esteviol. Además, linfocitos cultivados de donantes humanos, no mostraron alteraciones cromosómicas tras la exposición a esteviósido o esteviol (Perzzuto et al. 1985; Avila Monzón, 2014).

El esteviósido administrado oralmente a ratas no aumenta la incidencia de cáncer. No se han obtenido evidencias de carcinogénesis en estudios *in vivo* con ratones. En realidad, el esteviósido, los rebaudiósidos A y C, y el dulcósido A, suprimen la promoción de tumores inducida por 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetato en la piel de los ratones (Yamada, Ohgaki, Noda y Shimizu, 1985; Yasukawa, Kitanaka y Seo, 2002).

En el año 2006, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, (JECFA, por sus siglas en inglés) declaró que no existen evidencias de que el esteviósido induzca a la genotoxicidad tanto *in vivo* como *in vitro*. En dosis de hasta 2 g/Kg de peso corporal (varones) y 2,4 g/Kg de peso corporal (mujeres), el esteviol no promovió ninguna incidencia de cáncer (JECFA, 2006).

Fertilidad y evaluación teratogénica.

La preocupación sobre los efectos antifertilidad y teratogénicos del esteviósido aumentó después de ver que las decocciones de *S. rebaudiana* disminuyen el ritmo de nacimiento en ratas, pero estos resultados no han podido ser reproducidos (Kumar y Oommen, 2008). Varios estudios han demostrado que el esteviósido oral no tiene efectos sobre la fertilidad en ratones, ratas o hámsteres. Las ratas alimentadas con comida conteniendo un 1% (peso/peso) de esteviósido no mostraron cambios en la espermatogénesis o en las células intersticiales de proliferación. Sin embargo, cuando se alimentan con una dosis inusualmente altas (2,6g/día) de extracto de *S. rebaudiana* durante 2 meses las ratas pueden manifestar un descenso en la fertilidad. Esto podría deberse a la presencia de componentes minoritarios que son tóxicos en estas cantidades elevadas de extracto de *S. rebaudiana* (Kumar y Oommen, 2008). La mayoría de los estudios están de acuerdo en que el esteviósido oral, en una ingesta aceptable de 5mg/kg

de peso corporal es seguro y no carcinogénico o teratogénico (Avila Monzón, 2014).

Regulación y producción

Ante la creciente demanda de productos bajos en calorías o sin calorías, *S. rebaudiana* ha tomado un sitio muy importante en la canasta familiar, se emplea como edulcorante de mesa, en la elaboración de bebidas, dulces, mermeladas, chicles, en pastelería, confituras, yogures, entre otros. Pero además de sus propiedades endulzantes, *S. rebaudiana* tiene importantes efectos sobre la salud.

Hace unos años fue aprobado para su utilización comercial y calificado como Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS, por sus siglas en inglés). El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, FAO/OMS, 2008) en sus reuniones 68ª y 69ª del año 2008, estableció una Ingestión Diaria Admisible (IDA) para los glucósidos de Esteviol de hasta 4 mg por kg de peso corporal por día, la IDA se refiere al peso molecular del total de esteviol presente en la mezcla.

A escala comercial la utilización de este edulcorante está de moda desde principios de los setenta en Japón. Actualmente se cultiva en Japón, Brasil, México, Canadá, Corea, Indonesia, Tanzania, India, China, Canadá y, los Estados Unidos de América, siendo China el principal exportador de esteviósido. En Japón, el cultivo de *S. rebaudiana* se emplea principalmente como sustituto de azúcar. Cerca de un cuarto de cucharadita de hojas es equivalente a una cucharadita de azúcar (Durán et al. 2012).

***Stevia rebaudiana* y diabetes mellitus**

Los extractos de *S. rebaudiana* pueden disminuir el nivel de glucosa en sangre en ratas diabéticas con un efecto tiempo-dependiente, y muestran resultados similares a los obtenidos utilizando polvo de hojas de *S. rebaudiana* (Kujur, Singh, Ram, Yadava, Singh et al. 2010). Los esteviósidos regulan el nivel de glucosa en la sangre por el incremento en la secreción de insulina y por una mejor utilización de la glucosa por los tejidos periféricos y los músculos en ratas diabéticas; también se postula que los esteviósidos contrarrestan la glucotoxicidad en las células β o también suprime la secreción de glucagón por parte de las células α del páncreas (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

En estudios en humanos (voluntarios sanos), se investigó el efecto de la administración de extractos de *S. rebaudiana* en las pruebas de tolerancia a glucosa. A los sujetos se les dio un extracto acuoso de hojas de 5 g cada 6 horas por 3 días y se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa antes y después de la administración de los extractos. Los resultados mostraron que el tratamiento con *S. rebaudiana* aumentó la tolerancia a la glucosa y disminuyó las concentraciones de glucosa plasmática. Diversos autores concluyen que la planta podría tener un uso potencial en el manejo de la diabetes tipo 2 (Aranda-González, Segura-Campos, Moguel-Ordoñez y Betancur-Ancona, 2014).

Efecto anti-hiperglicémico

En el presente, se ha incrementado la incidencia de la diabetes de tipo 2 y de la obesidad como resultado del envejecimiento, los hábitos dietéticos y la disminución de las actividades físicas. El síndrome metabólico se ha convertido en un problema de salud

pública en los países industrializados y más desarrollados. La diabetes mellitus de tipo 2 es un desorden metabólico crónico resultado de defectos en la secreción de insulina de las células β y en la acción de la insulina. Además de esto, también contribuyen la disfunción de las células α del páncreas y el exceso relativo de glucagón. La hiperglicemia postprandial observada en la diabetes de tipo 2 esta normalmente debida a un incremento de la producción de glucosa hepática basal y una disminución de la disposición de la glucosa periférica (Barnes, 2004). Por lo tanto, la corrección de este desequilibrio bien sea de la entrada o la salida de la glucosa plasmática debe ayudar a corregir esta afección patológica.

En la actualidad, es común el uso de hierbas y medicina alternativa para el tratamiento de la diabetes. En realidad, el extracto de *S. rebaudiana* ha sido utilizado en tratamientos para la diabetes (Negri, 2005; Kinghorn y Soejarto, 2002). Además, el esteviósido, el principal componente del extracto, proporciona altos niveles de dulzor sin aportar significativamente calorías y sólo una pequeña cantidad de éste es necesaria con el propósito de endulzar. Por lo tanto, es una buena alternativa al azúcar para pacientes diabéticos (Durán et al. 2012).

Uno de los primeros estudios mostró que 0,5 g % de esteviósido y 10 g % de *S. rebaudiana* en polvo en dietas altas en carbohidratos y altas en grasa, en ratas, causó una reducción significativa en el nivel de glucosa en sangre después de 4 semanas de tratamiento. Estas observaciones confirman la idea anterior de que el esteviósido y el extracto de *S. rebaudiana* pueden ser utilizados para tratar la condición diabética (Curi et al. 1986).

Efecto en la absorción de glucosa

El esteviósido en concentraciones altas (5Mm) no tiene efecto inhibitorio sobre la absorción intestinal de glucosa (en yeyuno de hámster). Sin embargo, 1mM de esteviol inhibe la absorción de glucosa aproximadamente un 40%. El esteviol causa una disminución de la acumulación de la glucosa en el tejido intestinal. Además el esteviol altera la morfología de las células entéricas. Estos resultados sugieren que el lugar de la acción inhibitoria del esteviol podría estar en la parte de la mucosa y/o en los orgánulos intracelulares del enterocito. Los investigadores sugirieron que la inhibición de la absorción de la glucosa por el esteviol se debe a la reducción del contenido de ATP en la mucosa intestinal, lo que es una consecuencia de la disminución de la actividad de enzimas de fosforilación mitocondriales en el intestino y alteraciones morfológicas de las células de absorción intestinales. De hecho, la inhibición por esteviol de la absorción de glucosa en células intestinales podría resultar en una bajada del nivel de glucosa plasmática, lo que sería indeseable en individuos sanos (Toskulkao et al. 1995 y Toskulkao, Sutteerawattananon y Piyachaturawat, 1995). De todas formas, la ingesta diaria aceptable (IDA) de esteviósido (5mg/Kg/día) conduciría a un máximo de concentración de esteviol de aproximadamente 20 μ M si el esteviósido se convierte por completo en esteviol. Esta concentración de esteviol está muy por debajo de la cantidad estudiada para inhibir la absorción de glucosa intestinal (JECFA, 2006).

Efecto sobre la síntesis de glucosa

Los efectos de esteviósido sobre la síntesis de glucosa se han estudiado en dos tipos de ratas diabéticas, tipo 1 (dependiente de insulina) y tipo 2 (independiente de la insulina). El esteviósido disminuye los niveles elevados de glucosa en sangre, tanto en ratas diabéticas tipo 1 como en tipo 2. El efecto hipoglucémico de esteviósido en rata diabética inducida por STZ (streptozotocina), que sigue a la ingesta oral de esteviósido (1, 2 o 10 mg/kg peso corporal/día durante 15 días) es mediada por su efecto sobre fosfoenol carboxipiruvato quinasa (PEPCK), una enzima limitante de la velocidad para la gluconeogénesis, controlando la producción de glucosa en el hígado. En ratas diabéticas inducidas por streptozotocina con muy bajo nivel de insulina el gen para fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) está sobreexpresado y el esteviósido disminuye las concentraciones de PEPCK ARNm y de proteínas de una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto, parece probable que el esteviósido frena la gluconeogénesis en el hígado a través de la supresión de la expresión del gen de PEPCK lo que conduce a una disminución en el nivel de glucosa en plasma en rata diabética (Chen et al. 2005).

Un estudio reciente (Ferreira et al. 2006) ha comparado los efectos de *S. rebaudiana* y el esteviósido sobre la glucemia y la gluconeogénesis hepática en ratas normoglicémicas. La administración oral a Ratas Wistar machos en ayunas, de la mezcla esteviósido/*S. rebaudiana* 5.5mg/kg/día por 15 días no tiene ningún efecto, mientras que el polvo de hoja en una dosis de 20 mg/kg peso corporal/día reduce la concentración de glucosa plasmática al disminuir actividades de piruvato carboxilasa y PEPCK. Como las hojas contienen una variedad de glicósidos de esteviol, el compuesto (s) activo exhibiendo el efecto sigue pendiente de ser identificado. Sin embargo, es importante señalar que el esteviósido no mostró ningún efecto en la reducción de la glucosa plasmática en condiciones normales en este estudio (Chen et al. 2005).

Efecto sobre la secreción de insulina y la sensibilidad

El esteviósido y el esteviol mejoran la secreción de insulina en islotes incubados, de modo dependiente de la dosis, aunque esteviósido y esteviol poseen efecto insulínico y anti-hiperglucémico, el esteviol es más potente que el esteviósido (Jeppesen, Gregersen, Alstrup y Hermansen, 2002). El mismo grupo de investigadores probó si con el esteviósido y el esteviol se observa el mismo efecto en el animal vivo, (en ratas Goto-Kakizaki, modelo con diabetes tipo 2, no obeso, y en ratas normales). Estos resultados apoyan la idea de que el esteviósido posee efecto anti-hiperglucémico e insulínico en ratas GK (Jeppesen, Gregersen, Alstrup y Hermansen, 2002; Jeppesen, Gregersen, Poulsen, y Hermansen, 2000; Jeppesen et al. 2003; Lailerd et al. 2004).

La mayor incidencia de diabetes en el mundo corresponde a la de tipo 2. Bajo esta condición, la reducción de la sensibilidad a insulina en tejidos periféricos hace decrecer la eficiencia de la utilización de la glucosa conduciendo al desarrollo de hiperglucemia.

El rol del esteviósido para incrementar la sensibilidad a la insulina ha sido estudiado en ratas alimentadas con comida rica en fructosa, en las que la habilidad de la insulina para estimular la disposición de glucosa esta marcadamente afectada, indicando un descenso de la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos asociado a una resistencia

a la insulina. El esteviósido (5 mg/kg de peso corporal) administrado oralmente a estas ratas aumenta en gran manera la sensibilidad a la insulina indicado por el índice glucosa/insulina. El tratamiento con esteviósido, 3 veces al día retrasa el desarrollo de la resistencia a la insulina respondiendo a tolbutamida. La ingesta aguda de esteviósido (500mg/kg de peso corporal) en ratas diabéticas incrementa la sensibilidad a la insulina en todo el organismo, indicado por el valor del índice glucosa/insulina, lo que indica sensibilidad a la insulina o acción de la insulina en la tasa de eliminación de la glucosa. Además, se ha estudiado *in vitro*, el efecto directo del esteviósido en la actividad de transporte de glucosa en los músculos esqueléticos, lugar de mayor concentración de glucosa. Se ha comprobado que una baja concentración de esteviósido (0,01 a 0,1 mM) puede aumentar el efecto de la insulina en el transporte de glucosa del músculos tanto en ratas flacas como en las obesas, sugiriendo como lugar potencial de acción del esteviósido el sistema de transporte de glucosa de los músculos esqueléticos (Chen et al. 2005).

Se observó una reducción en la glucosa plasmática y glucagón junto con un incremento de la secreción de insulina, en las ratas diabéticas de tipo 2 de Goto-Kakizaki después de una ingesta oral de esteviósido de 25mg/kg de peso corporal/día durante 6 semanas (Jeppesen, Gregersen, Poulsen y Hermansen, 2000).

Para determinar si la ingesta de esteviósido en ayunas puede conducir a la hipoglucemia, se ha administrado esteviósido a ratas GK y Wistar en ayunas, con concentraciones normal y baja de glucosa plasmática (3,3 mM o menos) y no se encontró acción insulínica. De hecho, el esteviósido estimula la liberación de insulina sólo en algunos casos aislados de ratones con altas concentraciones de glucosa (> 8,3 mM). De ahí, es probable que el esteviósido muestre su efecto beneficioso estimulando la liberación de insulina sólo en estado diabético (Jeppesen, Kyrskog, Aggersen y Hermansen, 2006).

Se ha realizado un número limitado de estudios experimentales para evaluar el efecto del extracto de *S. rebaudiana* y del esteviósido en humanos. Una comida estándar suplementada con 1 g de esteviósido administrada a 12 sujetos diabéticos de tipo 2, es capaz de reducir los niveles de glucosa postprandial en sangre en 18%. En los mismos, se observó un leve incremento en la circulación de insulina y un descenso en los niveles de glucagón. El índice insulínico indicó que tras el tratamiento con esteviósido se incrementó un 40% la secreción de insulina. No se observó pérdida de glucosa urinaria por el consumo de esteviósido, esto implica que el esteviósido puede tener un efecto directo en la disposición de la glucosa periférica inducido por la insulina responsable del descenso en los niveles en sangre de glucosa postprandial. Esto puede incluir un aumento en el almacenamiento de glucógeno en el hígado (Gregersen, Jeppesen, Holst y Hermansen, 2004).

En contraste con lo anterior, Barriocanal et al. (2008), han expuesto que el consumo prolongado de esteviósido (> 92% pureza) de 250 mg, 3 veces/día durante 3 meses, cantidad similar a la usada como edulcorante, no tiene efectos farmacológicos en individuos diabéticos tanto de tipo 1 como de tipo 2 así como en sujetos normotensos o hipotensos. No se encontró menos glucosa en sangre o reducción de la presión sanguínea. Se desconoce la explicación a esta carencia de efecto del esteviósido, pero se debe señalar que el esteviósido parece tener la habilidad de bajar los niveles de glucosa

en plasma y la presión sanguínea sólo cuando estos parámetros son anormalmente elevados. Estos resultados son consecuentes con aquellos obtenidos previamente a corto plazo sobre los efectos en individuos sanos.

El segundo componente más abundante de la hoja de *S. rebaudiana* es el rebaudiósido A, que se diferencia del esteviósido porque tiene una glucosa adicional. Esto eleva la posibilidad de que el rebaudiósido A pueda poseer efectos hipoglucemiantes similares a los del esteviósido y el extracto de estevia. De hecho, el rebaudiósido A estimula la liberación de insulina considerablemente en islotes de ratones en presencia de grandes concentraciones de glucosa (>6,6 mM). Sin embargo, un estudio de tratamiento a largo plazo de ratas GK con rebaudiósido A demostró no ser un estímulo para la secreción de insulina. De manera parecida, el consumo a largo plazo de rebaudiósido A durante 16 semanas por parte de sujetos con diabetes mellitus tipo 2 no ha tenido efecto en la homeostasis de la glucosa, ni en el perfil lipídico, ni en la presión sanguínea (Maki et al. 2008).

Basado en estudio en células, animales y humanos, el esteviósido y sus compuestos relacionados (esteviol y rebaudiósido A) afectan a la glucosa plasmática mediante la modulación de la secreción de insulina y la sensibilidad, lo que mejora la eliminación de glucosa del plasma. También inhiben la absorción de glucosa intestinal y la generación de glucosa por el hígado alterando la actividad de varias enzimas claves envueltas en la síntesis de la glucosa reduciendo así el aporte de glucosa plasmática. Es interesante resaltar que los efectos del esteviósido dependen enormemente de los niveles de glucosa plasmática, siendo observados sólo cuando estos son elevados. Así, parece ser totalmente seguro para individuos sanos (Rizzo et al. 2013).

CONCLUSIONES

La *S. rebaudiana* es una especie vegetal empleada como edulcorante no calórico que se cultiva y utiliza en diversas partes del mundo y que ha penetrado de manera importante en el mercado internacional. Diversas publicaciones reportan propiedades positivas entre ellas en el manejo de la diabetes mellitus transformándose en una nueva potencial herramienta para el tratamiento de la diabetes. Los organismos internacionales avalan su consumo seguro como suplemento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anton, S., Martin, C., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W. y Geiselman, P. (2010). Effects of Stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, 55, 37-43.
- Aranda-González, I., Segura-Campos, M., Moguel-Ordoñez, Y. y Betancur-Ancona, D. (2014). *Stevia rebaudiana* Bertoni: a potential adjuvant in the treatment of diabetes mellitus. *Journal Of Food*, 12 (3), 218-226.
- Barnes, D. (2004). *Action plant for diabetes. Your guide for controlling blood sugar*. Human Kinetics. USA.

- Barriocanal, L., Palacios, M., Benítez, G., Benítez, S., Jiménez, J.T., Jiménez, N. y Rojas, V. (2008). Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, 1 (51), 37-41.
- Bertoni, M. (1905). *Stevia rebaudiana*. *Anales Ci.*, 1 (5), 3.
- Cabrera, A., Holmes, W., McDaniel, S. (1996). Compositae III. IN: R., Spichiger y L. Ramella. *Flora del Paraguay* 25, (pp. 302-306). Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Geneve y Missouri Botanical Garden.
- Chatsudthipong, V. y Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, 121, 41-54.
- Chen, T.H., Chen, S.C., Chan, P., Chu, Y.L., Yang, H.Y. y Cheng, J.T. (2005). Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Planta Med.*, 71 (2), 108-13.
- Curi, R., Alvarez, M., Bazotte, R.B., Botion, L.M., Godoy, J.L. y Bracht, A. (1986). Effect of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance in normal adult humans. *Braz J Med Biol Res.*, 19 (6), 771-774.
- Durán, S., Rodríguez, M., Córdón, K. y Record, J. (2012). Estevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. *Rev Chil Nutr.* 39 (4), 203-206.
- JECFA (Expert Committee on Food Additives FAO/OMS). (2006). Summary and Conclusions of the 69th meeting of the Joint FAO/ WHO. Recuperado de FAO/OMS (online) de 2008, de http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/jecfa69_final.pdf.
- Ferreira, E.B., de Assis Rocha Neves, F., da Costa, M.A., do Prado, W.A., de Araújo Funari Ferri, L. y Bazotte, R.B. (2006). Comparative effects of *Stevia rebaudiana* leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis. *Planta Med.*, 72 (8), 691-696.
- Goyal, S.K., Samsher, S. y Goya, R.K. (2010). *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: a review *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61 (1), 1-10.
- Gregersen, S., Jeppesen, P.B., Holst, J.J. y Hermansen, K. (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*, 53 (1), 73-76.
- Hanson, J.R. y De Oliveira, B.H. (1993). Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. *Nat. Prod. Rep.* 10, 301-309.
- Jakinovich, W., Moon, C., Choi, Y. y Kinghorn, A.D. (1990). Evaluation of plant extracts for sweetness using the Mongolian gerbil. *J. Nat. Prod.* 53, 190-195.
- Jarma, A.J., Combatt, E.M. y Cleves, J.A. (2010). Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 28 (2), 199-208.
- Jeppesen, P.B., Gregersen, S., Alstrup, K.K. y Hermansen, K. (2002). Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine*, 9 (1), 9-14.

- Jeppesen, P.B., Gregersen, S., Poulsen, C.R. y Hermansen, K. (2000). Stevioside acts directly on pancreatic β cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K^+ -channel activity. *Metabolism*, 49 (2), 208-214.
- Jeppesen, P.B., Gregersen, S., Rolfsen, S.E.D., Jepsen, M., Colombo, M., Agger, A., et al. (2003). Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism*, 52: 372–378.
- Jeppesen, P.B., Kyrskog, S.E., Aggersen, X.J. y Hermansen, K. (2006). Can stevioside in combination with a soy based dietary supplement be a new useful treatment of type 2 diabetes? An in vivo study in the diabetic Goto-Kakizaki Rat. *Rev Diabet stud.*, 3 (4), 189-199.
- Kinghorn, A.D. y Soejarto, D.D. (2002). Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. *Pure Appl. Chem.* 74, 1169–1179.
- Komissarenko, N.F., Derkach, A.I., Kovalyov, I.P. y Bublik, N.P. (1994). Diterpene glycosides and phenylpropanoids of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Rast. Res.*, 1, 53-64.
- Kujur, R.S., Singh, V., Ram, M., Yadava, H.N., Singh, K.K., Kumari, S. y Roy, B.K. (2010). Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res.*, 2, 258-263.
- Kumar, D. y Oommen, V. (2008). *Stevia rebaudiana* Bertoni does not produce female reproductive toxic effect: Study in Swiss albino mouse. *J Endocrinol Reprod.*, 12 (1), 57-60.
- Lailerd, N., Saengsirisuwan, V., Sloniger, J.A., Toskulkao, C. y Henriksen, E.J. (2004). Effects of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulinresistant rat skeletal muscle. *Metabolism*, 53, 101–107.
- Landázuri, P.A. y Tigrero, J.O. (Eds.) (2009). *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Sangolquí – Ecuador: Boletín técnico.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L. y Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132, 1121-1132.
- Madam, S., Ahmad, S., Singh, G.N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R. y Garg, M. (2010). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni A Review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1 (3), 267-286.
- Maki, K.C., Curry, L.L., Reeves, M.S., Toth, P.D., McKenney, J.M., Farmer, M.V. et al. (2008). Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food Chem Toxicol.*, 46 (7 Suppl 1), 47-53.
- Marcinek, K. y Krejpcio, Z. (2015). *Stevia rebaudiana* Bertoni - Chemical composition and functional properties. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 14 (2), 145-152.
- Misra, H., Soni, M., Silawat, N., Mehta, D., Mehta, B.K. y Jain, D.C. (2011). Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *J. Pharm. Bioallied Sci.*, 3 (2), 242-248.

- Mogra, R. y Dashora, V. (2009). Exploring the use of *Stevia rebaudiana* as a sweetener in comparison with other sweeteners. *J. Hum. Ecol.*, 25, 117-120.
- Muanda, F.N., Soulimani, R., Diop, B. y Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves *LWT- Food Science and Technology*, 44, 1865-1872.
- Monzón Ávila, D. (2014). Estudio de mercado para la introducción de *Stevia Rebaudiana* Bertoni en el mercado guatemalteco. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad De Ciencias Químicas y Farmacia. Tesis de maestría.
- Nakayama, K., Kasahara, D. y Yamamoto, F. (1986). Absorption, distribution, metabolism and excretion in rats. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 27, 1-8.
- Negri, G. (2005). Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41 (2), 121-142.
- Pande, S.S. y Gupta, P. (2013). Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5 (1), 26-33.
- Perzzuto, J.M., Compadre, C.M., Swanson, S.M., Nanayakkara, P.D. y Kinghorn, A.D. (1985). Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 2478-82.
- Raina, R., Bhandari, S., Romesh, C. y Yashpal, S. (2013). Strategies to improve poor seed germination in *Stevia rebaudiana*, a low calorie sweetener. *Journal Of Medicinal Plants Research*, 7(24), 1793-1799.
- Rizzo, B., Zambonin, L., Angeloni, C., Leoncini, E., Vieceli Dalla Sega, F., Prata, C., Fiorentini, D. y Hrelia, S. (2013). Steviol Glycosides Modulate Glucose Transport in Different Cell Types. *Oxid Med Cell Longev.*, 2013, 1-11.
- Savita, S.M., Sheela, K., Sunanda, S., Shankar, A.G. y Ramakrishna, P. (2004). *Stevia rebaudiana* – A Functional Component for Food Industry. *J. Hum. Ecol.* 15 (4), 261-264.
- Sharma, N., Mogra, R. y Upadhyay, B. (2009). Effect of *Stevia* Extract Intervention on Lipid Profile. *Ethno-Med.*, 3 (2), 137-140.
- Soejarto, D.D., Douglas, K. y Farnsworth, N.R. (1982). Potential sweetening agents of plant origin—III. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. *J Nat Prod*, 45 (5), 590-599.
- Suttajit, M., Vinitketkaumnuen, U., Meevatee, U. y Buddhasukh, D. (1993). Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Environ Health Perspect.* 101, 53-56.
- Toskulkao, C., Sutheerawattananon, M. y Piyachaturawat, P. (1995). Inhibitory effect of steviol, a metabolite of stevioside, on glucose absorption in everted hamster intestine in vitro. *Toxicology Letters*, 80(1-3), 153-159.
- Toskulkao, C., Sutheerawattananon, M., Wanichanon, C., Saitongdee, P. y Suttajit, M. (1995). Effects of stevioside and steviol on intestinal glucose absorption in hamsters. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 41, 105-113.
- Xili, L., Chengjiany, B., Eryi, X., Reiming, S., Yuengming, W., Haodong, S., y Zhiyian, H. (1992). Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food Chem Toxicol.*, 30, 957-65.

- Yamada, A., Ohgaki, S., Noda, T. y Shimizu, M. (1985). Chronic Toxicity Study of Dietary Stevia Extracts in F344 Rats. *Food Hygiene and Safety Science*, 26 (2), 169-183.
- Yasukawa, K., Kitanaka, S. y Seo, S. (2002). Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25 (11), 1488-1490.