Toxicidad de extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* en *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley

Toxicity of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in *Rattus norvegicus* variety Sprague Dawley

Julio Alberto Todco Palza y Henry Diaz-Murillo

Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa Perú.

INFORMACIÓN

Historia del Artículo

Recepción: 12/02/2019

Revisión: 03/04/2019

Aceptación: 15/04/2019

Palabras Clave

Stevia rebaudiana, Toxicidad, Steviosidos.

Key Words

Stevia rebaudiana, Toxicity, Steviosides.

DOI

<https://doi.org/10.35286/veritas.v20i1.235>

RESUMEN

Se evaluó la toxicidad del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* en *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley durante 60 días. Se llevó a cabo en el Bioterio de Biología UNSA, Arequipa, durante los meses Agosto a Diciembre del 2012. Se utilizaron 16 *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley distribuidas en cuatro grupos de 4 ratas cada uno: Al grupo control se le administró agua destilada (Grupo Control), al grupo experimental 2, 3, 4 se le administró vía orogástrica extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* a dosis de 0.3, 0.6 y 0.9 g/Kg./día respectivamente. Se utilizó los kit de Wiener para la determinación de TGO, TGP, glucosa y creatinina. El peso corporal se midió en una balanza digital Omni 5300. Los tejidos evaluados (hígado, riñón y estómago) por el método de Harris. No se encontró diferencia significativa en la actividad de TGO y TGP en plasma de *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley con tratamiento de extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* en dosis de 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día durante 60 días ($p > 0.05$). Se encontró disminución significativa en los niveles de glucosa en plasma de *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley con tratamiento de extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* en dosis de 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día durante 60 días ($p > 0.05$). No se observó diferencia significativa en los niveles de creatinina en los tratamientos con extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día respecto al grupo control ($p > 0.05$). Se encontró una disminución significativa en el peso corporal de las ratas con tratamiento con extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día respecto al grupo control ($p < 0.05$). No se encontró alteración microscópica en Hígado, riñón y estómago de *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley con tratamiento de extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* en dosis de 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día durante 60 días.

ABSTRACT

The toxicity of the aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in *Rattus norvegicus* variety Sprague Dawley was evaluated for 60 days. It was held at the Biology Biology UNSA, Arequipa, during the months August to December 2012 16 *Rattus norvegicus* Sprague Dawley variety distributed in four groups of 4 rats each were used: The distilled water (Control Group) was administered to the control group, the *Stevia rebaudiana* aqueous extract was administered to the orogastric group experimentally 2, 3, 4 doses of 0.3, 0.6 and 0.9 g / kg / day respectively. Wiener's kits were used for the determination of TGO, TGP, glucose and creatinine. Body weight was measured on an Omni 5300 digital scale. The tissues evaluated (liver, kidney and stomach) by the Harris method. There was no significant difference in the activity of TGO and TGP in plasma of *Rattus norvegicus* variety Sprague Dawley with treatment of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in doses of 0.3, 0.6 and 0.9 g / kg / day for 60 days ($p > 0.05$). There was a significant decrease in plasma glucose levels of *Rattus norvegicus* Sprague Dawley variety with treatment of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in doses of 0.3, 0.6 and 0.9 g / kg / day for 60 days ($p > 0.05$). There was no significant difference in creatinine levels in treatments with aqueous extract of *Stevia rebaudiana* 0.3, 0.6 and 0.9 g / kg / day with respect to the control group ($p > 0.05$). A significant decrease was found in the body weight of the rats treated with aqueous extract of *Stevia rebaudiana* 0.3, 0.6 and 0.9 g / kg / day with respect to the control group ($p < 0.05$). No microscopic alteration was found in Liver, kidney and stomach of *Rattus norvegicus* Sprague Dawley variety with treatment of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in doses of 0.3, 0.6 and 0.9 g / kg / day for 60 days.

INTRODUCCIÓN

El Steviosido, un componente abundante de la hoja de *Stevia rebaudiana*, se ha hecho famoso por su intenso dulzor (250-300 veces más dulce que la sacarosa) y está siendo usado como un dulcificante no calórico en diferentes países. Varios estudios han sugerido que, además del dulzor, el

steviosido junto con sus compuestos relacionados, entre los que se incluyen rebaudiosido (el segundo componente más abundante de la hoja de *S. rebaudiana*), steviol e isosteviol (componentes metabólicos del steviosido) también ofrecen beneficios terapéuticos, debido a que contienen anti-hiperglicémicos, anti-hipertensivos, anti-inflamatorios, antitumorales, anti-diarreicos, diuréticos, y acciones inmunomoduladoras. Cabe resaltar que sus efectos a nivel de la glucosa en el plasma y tensión arterial sólo son observados cuando estos parámetros son más altos de lo normal. Puesto que el steviol puede actuar como transportadores de

Correspondencia:
Henry Diaz-Murillo
hdiazmur@gmail.com

moléculas, se propone como un modulador de fármacos.

Por lo anteriormente mencionado es que nos proponemos evaluar la toxicidad de Stevia rebaudiana en forma crónica vía oral en Rattus norvegicus Variedad Sprague Dawley.

Debido a su uso popular como sustituto del azúcar no calórico, han sido estudiadas de manera intensiva las propiedades toxicológicas del steviosido 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.

MATERIAL Y METODOS

MATERIALES

a) Material Biológico

- Stevia rebaudiana.
- Rattus norvegicus variedad Sprague Dawley.
- Mus musculus

b) Equipos

- Balanza analítica.
- Centrífuga.
- Cocina eléctrica.
- Espectrofotómetro.
- Estufa.
- Equipo de disección.
- Microcentrífuga.
- Microscopio.
- Licuadora.

MÉTODOLOGIA

MÉTODO PARA TRANSAMINASAS TGO TGP

La muestra de sangre se obtendrá por el método de Dorman extraído de la punta de la cola del animal de experimentación con la ayuda de un tubo capilar.

Fundamento

- La TGP cataliza la siguiente reacción: L- alanina + a-cetoglutarato TGP Glutamato + Piruvato.
- La TGO cataliza la siguiente reacción: L-aspartato + a-cetoglutarato TGO Glutamato + Oxalacetato

El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato) reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina produciendo en medio alcalino un compuesto coloreado que se mide a 505nm.

Se utilizará el método colorimétrico. (Reitman y Frankel) para la determinación de la actividad transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y transaminasa glutámico oxalacética (TGO) en suero.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE TGO (UI/L)

CURVA DE CALIBRACIÓN DE TGP (UI/L)

MÉTODO DETERMINACIÓN GLUCOSA: Método Wiener

El esquema de reacción es el siguiente:

GOD

Glucosa + O₂ + H₂O > ácido glucónico + H₂O₂

POD

H₂O₂ + 4-AF + 4-hidroxibenzoato > quinonimina roja

PROCEDIMIENTO

En tres tubos de fotocolorímetro marcados con B (Blanco) S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Standard	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Incubar 5 minutos en baño de agua a 37°C. Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero con el blanco.

MÉTODO DETERMINACIÓN DE CREATININA: Método de Wiener

- Longitud de onda: 510 nm en espectrofotómetro
- Temperatura de reacción: 37°C.
- Tiempo de reacción: 15 minutos.
- Volumen de muestra: 0.1 ml
- Volumen de Reactivo: 1 ml
- Volumen final de reacción: 1.15 ml.

PROCEDIMIENTO

En tres tubos marcados B (blanco), S (Standard) y D (desconocido) colocar:

	B	S	D
Agua destilada	100 ul	-----	----
Standard	-----	100 ul	----
Muestra	-----	-----	100 ul
Reactivo de trabajo	1 ml	1 ml	1 ml
Mezclar. Incubar 10 minutos en baño María a 37° C. Dentro de los 15 minutos de retirado del baño, leer el Standard y el desconocido (D1) en espectrofotómetro a 510 nm llevando a 0.0 D.O. con el blanco. Luego agregar:			
Stopper	50 ul	----	50 ul
Mezclar. Dejar los tubos 5 minutos a temperatura ambiente y volver a leer el Desconocido (D2), llevando a 0.0 D.O. con el blanco.			

El color de la reacción es estable durante 6 horas por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{Creatinina en suero (mg/l)} = \frac{(D1 - D2) \times f}{S}$$

f = 20 mg/l

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

MÉTODO DE HARRIS

Fue realizado de acuerdo al método de Harris

Diagnóstico Histopatológico

El Diagnóstico Histopatológico de las muestras obtenidas se realizó en el laboratorio de Anatomía Patología del Hospital CASE ESSALUD por el Dr. Henry Mercado.

MÉTODO ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como promedios. Se aplicó Análisis de Varianza (ANOVA) para establecer las diferencias significativas ($p < 0.01$) en los promedios de TGO, TGP, Glucosa y creatinina y peso de las ratas en los diferentes tratamientos evaluados y se aplicó la prueba de especificidad de Tukey ($P: 0.05$) para establecer el mejor tratamiento para el efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana en *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley. Se utilizó el paquete estadístico computarizado SPSS versión 18 para Windows 7.

RESULTADOS

Se muestran los resultados en Tablas, gráficos y Figuras del efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre *rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley por 60 días

Tabla 1: VALORES PROMEDIO DE TGO (UI/L) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana*

TRATAMIENTOS	TGO (UI/L)			
	BASAL	30	45	60
CONTROL	67.51	67.85	72.34	72.29
Stevia rebaudiana 0.3g/kg/día	60.10	75.01	74.99	79.76
Stevia rebaudiana 0.6g/kg/día	65.92	70.28	75.51	72.84
Stevia rebaudiana 0.9g/kg/día	66.16	72.76	71.35	72.08
F (ANOVA)	1.71	0.83	0.30	1.83
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
SIGNIFICANCIA	NS	NS	NS	NS

^{abc}TUKEY ($p < 0.05$)

En la Tabla y Gráfico N° 1 se observa que los valores basales no muestran diferencia significativa entre los tratamientos fluctuando los promedios de 60.10 UI/L a 67.51 UI/L. A los 60 días no se evidencia diferencia significativa en los tratamientos con extracto acuoso de Stevia rebaudiana 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/dá respecto al grupo control ($p < 0.05$). Por lo que podemos establecer que el extracto acuoso de Stevia rebaudiana no induce insuficiencia cardíaca.

Graf 1: VALORES PROMEDIO DE TGO (UI/L) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana*

Tabla 2: VALORES PROMEDIO DE TGP (UI/L) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana*

TRATAMIENTOS	TGP (UI/L)			
	BASAL	30	45	60
CONTROL	55.26	56.32	57.53	55.36
Stevia rebaudiana 0.3g/kg/día	56.86	57.98	52.35	56.30
Stevia rebaudiana 0.6g/kg/día	57.61	57.35	55.83	57.47
Stevia rebaudiana 0.9g/kg/día	57.17	53.54	57.51	57.24
F (ANOVA)	0.27	2.33	1.77	0.53
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
SIGNIFICANCIA	NS	NS	NS	NS

^{abc}TUKEY ($p < 0.05$)

En la Tabla y Gráfico N° 2 se observa que los valores basales no muestran diferencia significativa entre los tratamientos fluctuando los promedios de 55.26 UI/L a 57.61 UI/L. A los 60 días no se evidencia diferencia significativa en los tratamientos con extracto acuoso de Stevia rebaudiana 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día respecto al grupo control ($p < 0.05$). Por lo que podemos establecer que el extracto acuoso de Stevia rebaudiana no induce insuficiencia hepática.

Graf 2: VALORES PROMEDIO DE TGP (UI/L) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana*

Tabla 3: VALORES PROMEDIO DE GLUCOSA (mg/dl) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana*

TRATAMIENTOS	GLUCOSA (mg/dl)			
	BASAL	30	45	60
CONTROL	117.00	106.75	100.25	99.69 ^b
Stevia rebaudiana 0.3g/kg/día	122.25	120.50	105.50	96.75 ^a
Stevia rebaudiana 0.6g/kg/día	120.5	120.5	107.25	96.75 ^a
Stevia rebaudiana 0.9g/kg/día	116.25	119.25	103.25	95.00 ^a
F (ANOVA)	1.85	3.44	2.31	4.57
P	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05
SIGNIFICANCIA	NS	NS	NS	S

^{abc}TUKEY ($p < 0.05$)

En la Tabla y Gráfico N° 3 se observa que los valores basales no muestran diferencia significativa entre los tratamientos fluctuando los promedios de 116.25 a 122.25 mg/dl ($p > 0.05$). A los 60 días se evidencia disminución significativa en los tratamientos con extracto acuoso de Stevia rebaudiana 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día respecto al grupo control ($p < 0.05$). Por lo que podemos establecer que el extracto acuoso de Stevia rebaudiana disminuye los niveles de glicemia en comparación al grupo control.

Graf 3: VALORES PROMEDIO DE GLUCOSA (mg/dl) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana*

Tabla 4: VALORES PROMEDIO DE CREATININA (mg/dl) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana*.

TRATAMIENTOS	CREATININA (mg/dl)			
	BASAL	30	45	60
CONTROL	0.60	0.59	0.60	0.63
Stevia rebaudiana 0.3g/kg/día	0.60	0.63	0.62	0.62
Stevia rebaudiana 0.6g/kg/día	0.64	0.64	0.63	0.59
Stevia rebaudiana 0.9g/kg/día	0.65	0.64	0.65	0.61
F (ANOVA)	1.95	3.66	0.91	1.53
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
SIGNIFICANCIA	NS	NS	NS	NS

^{abc}TUKEY ($p < 0.05$)

En la Tabla y Gráfico N° 4 se observa que los valores basales no muestran diferencia significativa entre los tratamientos fluctuando los promedios de 0.6 a 0.65 mg/dl ($p > 0.05$). A los 60 días no existe diferencia significativa en los tratamientos con extracto acuoso de Stevia rebaudiana 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día respecto al grupo control ($p > 0.05$). Por lo que podemos establecer que el extracto acuoso de Stevia rebaudiana no provoca insuficiencia renal.

Graf 4: VALORES PROMEDIO DE CREATININA (mg/dl) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana*

Tabla 5: VALORES PROMEDIO DE PESO CORPORAL (g) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana*

TRATAMIENTOS	PESO CORPORAL (G)			
	BASAL	30	45	60
CONTROL	272	284	326	383 ^c
Stevia rebaudiana 0.3g/kg/día	269	284	309	346 ^b
Stevia rebaudiana 0.6g/kg/día	269	285	315	340 ^b
Stevia rebaudiana 0.9g/kg/día	278	298	312	329 ^a
F (ANOVA)	0.64	4.18	5.31	74.32
P	>0.05	>0.05	<0.05	<0.01
SIGNIFICANCIA	NS	NS	S	AS

^{abc}TUKEY (p<0.05)

En la Tabla y Gráfico N° 5 se observa que los valores basales no muestran diferencia significativa entre los tratamientos fluctuando los promedios de 269 a 278 gramos (p>0.05). A los 60 días se evidencia disminución significativa en los tratamientos con extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día respecto al grupo control (p<0.05).

Graf 5: VALORES PROMEDIO DE PESO CORPORAL (g) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana*

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

A continuación mostramos fotografías de corte histológico de hígado de *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley, con aumentos de 400 X respectivamente.

Fig 1: ESTRUCTURA DE HÍGADO DEL GRUPO CONTROL EN *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley, (HEMATOXILINA EOSINA 400 X).

En esta microfotografía observamos la citoarquitectura normal de hígado de ratas del grupo control. Se puede observar:

- 1: Hepatocitos
- 2: Vasos sanguíneos
- 3: Porta hepática

Fig 2: ESTRUCTURA DE HÍGADO DE TRATAMIENTO EXTRACTO ACUOSO DE STEVIA REBAUDINA 0.9 g/kg /día DE *Rattus norvegicus* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY POR 60 DÍAS HEMATOXILINA EOSINA 400 X

En esta microfotografía observamos hígado de ratas del grupo con dosis de extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* 0.9 g/kg/día durante 60 días de tratamiento. Se puede observar estructura normal:

- 1: Hepatocitos
- 2: Vasos sanguíneos
- 3: Porta hepática

Fig 3: ESTUDIO HISTOLOGICO DE RIÑÓN DE TRATAMIENTO DE GRUPO CONTROL DE *Rattus norvegicus* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY HEMATOXILINA EOSINA 400 X

En esta microfotografía observamos la citoarquitectura normal de riñón de ratas del grupo control. Se puede observar:

- 1: Capilares tubulares
- 2: Glomérulo de Malpighi
- 3: Capsula de Bowman
- 4: Túbulo colectores

Fig 4: ESTRUCTURA DE RIÑÓN DE TRATAMIENTO EXTRACTO ACUOSO DE STEVIA REBAUDINA 0.9 g/kg /día DE *Rattus norvegicus* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY POR 60 DIAS HEMATOXILINA EOSINA 400 X

En esta microfotografía observamos riñón de ratas del grupo con dosis de extracto acuoso de Stevia rebaudiana 0.9 g/kg/día durante 60 días de tratamiento. Se puede observar estructura normal:

- 1: Capilares tubulares
- 2: Glomérulo de Malpighi
- 3: Capsula de Bowman
- 4: Túbulo colectores

Fig 5: ESTRUCTURA DE ESTÓMAGO DE TRATAMIENTO CONTROL DE *Rattus norvegicus* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY HEMATOXILINA EOSINA 400 X

En esta microfotografía observamos la citoarquitectura normal de estómago de ratas del grupo control.

Fig 6: ESTRUCTURA DE ESTOMAGO DE TRATAMIENTO EXTRACTO ACUOSO DE STEVIA REBAUDINA 0.9 g/kg/día DE *Rattus norvegicus* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY POR 60 DIAS HEMATOXILINA EOSINA 400 X

En esta microfotografía de estómago observamos estructura dentro de los límites normales en ratas tratadas con extracto acuoso de Stevia rebaudiana en dosis de 0.9 g/kg/día.

DISCUSION

No se encontró diferencia significativa en la actividad de TGO y TGP en plasma de *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley con tratamiento de extracto acuoso de Stevia rebaudiana en dosis de 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día durante 60 días ($p > 0.05$). Por lo que podemos establecer que el extracto acuoso de Stevia rebaudiana no induce insuficiencia cardíaca y hepática. Estos resultados coinciden con lo reportado por (Xili et al., 1992; Toskulkao et al., 1997).

Se encontró disminución significativa en los niveles de glucosa en plasma de *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley con tratamiento de extracto acuoso de Stevia rebaudiana en dosis de 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día durante 60 días ($p > 0.05$). Por lo que podemos establecer que el extracto acuoso de Stevia rebaudiana disminuye los niveles de glicemia en comparación al grupo control. Estos resultados coinciden con lo reportado por (Jeppesen et al., 2000; Lailerd et al., 2004; JECFA, 2006).

Esta disminución de los niveles de glucosa se deberían probablemente a que la inhibición de la absorción de la glucosa por el steviol se debe a la reducción del contenido de ATP en la mucosa intestinal, lo que es una consecuencia de la disminución de las actividades enzimáticas mitocondriales en el intestino al nivel de fosforilación y alteraciones morfológicas de las células de absorción intestinales. De hecho, la inhibición por steviol de la absorción de glucosa en células intestinales podría resultar en disminución del nivel de glucosa plasmática, lo que sería indeseable en individuos sanos. De todas formas, la ingesta diaria aceptable (IDA) de steviosido (5mg/Kg de peso corporal/día) tendría un rendimiento máximo de concentración de steviol de aproximadamente 20 μ M si el steviosido se convierte por completo en steviol (JECFA,2006). Esta concentración de steviol esta muy por debajo de la cantidad estudiada para inhibir la absorción de glucosa intestinal.

Asimismo la reducción de la glicemia se debería probablemente a que steviosido estimula la secreción de insulina (Jeppesen et al., 2000) y así como el aumento de la sensibilidad a la insulina (Lailerd et al., 2004) subrayan sus efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa. En realidad, se observó una reducción en la glucosa plasmática 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 steviosido de 25mg/kg de peso corporal/día durante 6 semanas (Jeppesen et al., 2003).

Sin embargo, estos resultados aumentan la preocupación sobre si la ingesta de steviosido en ayunas puede conducir a la hipoglucemia, como en el la situación de sulfonilurea, que estimula la liberación de insulina, constituyendo así, una amenaza potencial para sujetos diabéticos. Para contestar esta cuestión, se ha administrado steviosido a ratas GK y Wistar en ayunas, con una concentración normal y baja de glucosa plasmática (3,3 mM o menos), y no se encontró acción insulínica (Jeppesen et al., 2002). De hecho, el steviosido estimula la liberación de insulina sólo en algunos casos aislados de ratones con altas concentraciones de glucosa ($> 8,3$ mM) (Jeppesen et al., 2000). De ahí, es probable que el steviosido muestre su efecto beneficioso estimulando la liberación de insulina sólo en estado diabético.

Se han realizado un número limitado de estudios experimentales para evaluar el efecto del extracto de stevia y del steviosido en humanos. Un comida estándar suplementada con 1 g de steviosido administrada a 12 sujetos diabéticos de tipo 2, es capaz de reducir los niveles de glucosa postprandial en sangre sobre un 18% (Gregersen et al., 2004). Se observó un leve incremento en la circulación de insulina y un descenso en los niveles de glucagones. El índice insulínico indicó que tras el tratamiento con steviosido se incrementó un 40% la secreción de insulina. No se observó pérdida de glucosa urinaria por el consumo de steviosido, esto implica que el steviosido puede tener un efecto directo en la disposición de la insulina 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.

En contraste con lo anterior, Barriocanal et al. (2008), ha expuesto que el consumo prolongado de steviosido ($> 92\%$ pureza) de 250 mg 3 veces/día durante 3 meses, cantidad similar a la usada como dulcificante, 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 presión sanguínea. Se desconoce la explicación a esta carencia de efecto del steviosido, pero se debe señalar que el steviosido 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 (Geuns et al., 2007).

El segundo componente más abundante de la hoja de stevia es el rebaudiosido A, que se diferencia del steviosido porque tiene una mitad de glucosa adicional. Esto eleva la posibilidad de que el rebaudiosido A pueda poseer efectos hipoglucémicos similares a los del steviosido y el extracto de stevia. De hecho, rebaudiosido A estimula la liberación de insulina considerablemente en ratones en presencia de grandes concentraciones de glucosa ($>6,6$ mM) (Abudula et al., 2004). Inesperadamente, un estudio de tratamiento a largo plazo de ratas GK con rebaudiosido A fracasó en el estímulo de secreción de insulina. De manera parecida, el consumo a largo plazo de rebaudiosido 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 la presión sanguínea (Maki et al., 2008).

Basado en estudio en células, animales y humanos, steviosido y sus compuestos relacionados (steviol y rebaudiosido A) afectan a la glucosa plasmática mediante la modulación de la secreción de insulina y la sensibilidad, lo que mejora la eliminación de glucosa en el 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 steviosido dependen enormemente de los niveles de glucosa plasmática, siendo observados sólo cuando estos son elevados. Así, parece ser totalmente seguro para individuos sanos. De todas formas, el mecanismo de este efecto no se conoce.

Se observó que los valores basales de creatinina no muestran diferencia significativa entre los tratamientos fluctuando los promedios de 0.6 a 0.65 mg/dl ($p>0.05$). A los 60 días no existe diferencia significativa en los tratamientos con extracto acuoso de Stevia rebaudiana 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día respecto al grupo control ($p>0.05$). Por lo que podemos establecer que el extracto acuoso de Stevia rebaudiana no provoca insuficiencia renal.

Se encontró a los 60 días de tratamiento una disminución significativa en el peso corporal de las ratas con tratamiento con extracto acuoso de Stevia rebaudiana 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día respecto al grupo control ($p<0.05$). Estos resultados coinciden con lo reportado por (Jeppesen et al., 2000; Lailerd et al., 2004; JECFA,2006). El mecanismo probable es que el steviol disminuye la absorción de glucosa a nivel intestinal y el steviosido incrementa la secreción de insulina y aumenta la sensibilidad al mismo (Jeppesen et al., 2000; Lailerd et al., 2004).

En el diagnóstico histopatológico de Hígado, riñón y estomago de *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley con tratamiento de extracto acuoso de Stevia rebaudiana en dosis de 0.3, 0.6 y 0.9 g/kg/día no se encontró alteración microscópica. Estos resultados coinciden con lo reportado por (Akashi & Yokoyama, 1975; Xili et al., 1992; Toskulkao

et al.,1997).

En estudios de vitro que implican varias líneas de célula diferentes de riñón e intestino indicaron que steviosido en una concentración tan alta como 2 mM tienen que ser expuestos a células para afectar la viabilidad de célula, pero 0.2 mM de steviol reduce significativamente la viabilidad de la célula (Srimaroeng et al., 2005b; Boonkaewwan et al., 2008). Este efecto tóxico puede ser consecuencia de una interrupción del metabolismo mitocondrial como se ha sugerido en estudios anteriores (Toskulkao et al., 1997).

En evaluaciones de toxicidad agudas y crónicas de ingestión steviosido investigado en ratones, ratas y hámsteres, con un consumo de steviosido tan elevado como 15g/Kg de peso corporal no produce toxicidad aguda alguna (Akashi & Yokoyama, 1975; Xili et al., 1992; Toskulkao et al.,1997). Sin embargo, la administración oral de steviol 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 steviol que las ratas o los ratones (Toskulkao et al.,1997). El examen histológico del tratamiento con steviol en hámsteres ha revelado la degeneración de la célula tubular del proximal, la extensión de la cual esta relacionada con el 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 steviol es un fallo renal agudo.

La ingesta de steviosido (750mg/día durante 3 meses) en individuos sanos o con enfermedades subyacentes como la diabetes mellitus e hipertensión, no produce efectos adversos o anomalías en el hígado o en la función renal (Barriocanal et al., 2008). De acuerdo con estudios farmacocinéticos previos en humanos, después de la administración oral de una dosis individual de 4,2 mg de steviosido por Kg de peso corporal, supone la máxima concentración de steviol glucorinido y steviol libre en plasma de 1,89 µg/ml (3,7 µM) y 0,19 µg/ml (0,38 µM) respectivamente (Wheeler et al., 2008). Este nivel de steviol, no debería ser tóxico para las células humanas, y parece que el steviol glucorinido no se convierte de nuevo en steviol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abudula, R., Jeppesen, P. B., Rolfsen, S. E.D., Xiao, J., & Hermansen, K. (2004). Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency. *Metabolism* 53(10), 1378–1381.
2. Akashi, H., & Yokoyama, Y. (1975). Security of dried-leaf extracts of stevia: toxicological tests. *Food Industry* 18, 34–43.
3. Barriocanal, L. A., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J. T., Jimenez, N (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. *Regul Toxicol Pharmacol* 51(1), 37–41.
4. Boeckh, E. M. A., & Humboldt, G. (1981). Efeitos cardiocirculatorios do extrato aquoso total em individuos normais e do esteviosideo em ratos. *Cienc Cult* 32, 208–210.
5. Boonkaewwan, C., Ao, M., Toskulkao, C., & Rao, M. C. (2008). Specific immunomodulatory and secretory activities of stevioside and steviol in intestinal cells. *J Agric Food Chem* 56(10), 3777–3784.
6. Boonkaewwan, C., Toskulkao, C., & Vongsakul, M. (2006). Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and its metabolite steviol on THP-1 cells. *J Agric Food Chem* 54(3), 785–789.
7. Cardoso, V. N., Barbosa, M. F., Muramoto, E., Mesquita, C. H., & Almeida, M. A. (1996). Pharmacokinetic studies of ¹³¹I-stevioside and its metabolites. *Nucl Med Biol* 23(1), 97–100.
8. Chan, P., Tomlinson, B., Chen, Y. J., Liu, J. C., Hsieh, M. H., & Cheng, J. T. (2000). A doubleblind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 50(3), 215–220.
9. Ferri, L. A. F., Alves-Do-Prado, W., Yamada, S. S., Gazola, S., Batista, M. R., & Bazotte, R. B. (2006). Investigation of the antihypertensive effect of oral crude stevioside in patients with mild essential hypertension. *Phytother Res* 20(9), 732–736.
10. Gardana, C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., & Pietta, P. (2003). Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *J Agric Food Chem* 51(22), 6618–6622.
11. Geuns, J. M., Bruggeman, V., & Buyse, J. G. (2003). Effect of stevioside and steviol on the developing broiler embryos. *J Agric Food Chem* 51(17), 5162–5167.
12. Hanson, J. R., & De Oliveira, B. H. (1993). Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. *Nat Prod Rep* 10(3), 301–309.
13. Hutapea, A. M., Toskulkao, C., Buddhasukh, D., Wilairat, P., & Glinsukon, T. (1997). Digestion of stevioside, a natural sweetener, by various digestive enzymes. *J Clin Biochem Nutr* 23(3), 177–186.
14. JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, (2006). Steviol Glycosides [Addendum to stevioside]. In: *Safety Evaluation of Certain Food Additives: Sixtythird*
15. Jeppesen, P. B., Gregersen, S., Alstrup, K. K., & 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.
16. 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(3), 372–378.
17. Kinghorn, A. D., & Soejarto, D. D. (1985). Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In H. Wagner, H. Hikino, & N. R. Farnsworth (Eds.), *Economic and medical plant research Vol. 1* (pp. 1–52). London: Academic Press.
18. Kitahata, S., Ishikawa, H., Miyata, T., & Tanaka, O. (1989). Production of rubusoside derivatives by transgalactosylation of various β-galactosidases. *Agric Biol Chem* 53 (11), 2923–2928.
19. Koyama, E., Kitazawa, K., Otori, Y., Izawa, O., Kakegawa, K., Fujino, A., et al. (2003). In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal

- microflora. *Food Chem Toxicol* 41(3), 359–374.
20. 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), S47–53.
 21. Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y., et al. (1996). Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis* 11(6), 573–579.
 22. Melis, E. (1997). Effects of steviol on renal function and mean arterial pressure in rats. *Phytomedicine* 3, 349–352.
 23. Pezzuto, J. M., Compadre, C. M., Swanson, S. M., Nanayakkara, D., & Kinghorn, A. D. (1985). Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(8), 2478–2482.
 24. Planas, G. M., & Kuc, J. (1968). Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Science* 162 (3857), 1007.
 25. Roberts, A., & Renwick, A. G. (2008). Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. *Food Chem Toxicol* 46(7 Suppl 1), S31–39.
 26. Sekihashi, K., Saitoh, H., & Sasaki, Y. (2002). Genotoxicity studies of stevia extract and steviol by the comet assay. *J Toxicol Sci* 27(Suppl 1), 1–8.
 27. Shibata, H., Sawa, Y., Oka, T., Sonoke, S., Kim, K. K., & Yoshioka, M. (1995). Steviol and steviol-glycoside: glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni — purification and partial characterization. *Arch Biochem Biophys* 321(2), 390–396.
 28. Shiotsu, S. (1996). Fertility study of *Stevia* decoction in rats. *Tech J Food Chem. Chemicals* 4, 108–113.
 29. Shiozaki, K., Fujii, A., Nakano, T., Yamaguchi, T., & Sato, M. (2006). Inhibitory effects of hot water extract of the *Stevia* stem on the contractile response of the smooth muscle of the guinea pig ileum. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(2), 489–494.
 30. Suttajit, M., Vinitketkaumnun, U., Meevatee, U., & Buddhasukh, D. (1993). Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Environ Health Perspect* 101(Suppl 3), 53–56.
 31. Toskulkao, C., Deechakawan, W., Leardkamolkarn, V., Glinsukon, T., & Buddhasukh, D. (1994). The low calorie natural sweetener stevioside: nephrotoxicity and its relationship to urinary enzyme excretion in the rat. *Phytother Res* 8(5), 281–286.
 32. Toskulkao, C., Sutheerawattananon, M., & Piyachaturawat, P. (1995). Inhibitory effect of steviol, a metabolite of stevioside, on glucose absorption in everted hamster intestine in vitro. *Toxicol Lett* 80(1–3), 153–159.
 33. Wheeler, A., Boileau, A. C., Winkler, P. C., Compton, S. C., Prakash, J., Jiang, X., et al. (2008). Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food Chem Toxicol* 46, S54–S60.
 34. Wingard, R. E., Jr., Brown, J. P., Enderlin, F. E., Dale, J. A., Hale, R. L., & Seitz, C. T. (1980). Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia* 36(5), 519–520.
 35. Xili, L., Chengjiany, B., Eryi, X., Reiming, S., Yuengming, W., Haodong, S., et al. (1992). Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food Chem Toxicol* 30(11), 957–965.
 36. Yasukawa, K., Kitanaka, S., & Seo, S. (2002). Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol Pharm Bull* 25(11), 1488–1490.