

Stevia rebaudiana Bertoni Bitkisinin Yaprak Ekstraktının *Caenorhabditis elegans*

Bireylerinde Yumurtadan Çıkma ve Fiziksel Büyüme Üzerine Etkisi

Effect of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaf Extracts on the Egg Productivity and Physical Growth of *Caenorhabditis elegans*

Ozpinar H^{1*}, Yüksek M¹

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik AD., Sivas, Türkiye

Araştırma makalesi

Özet

Makale bilgisi

Alındı: 15.10.2019
Revize form alındı: 20.10.2019
Kabul: 25.10.2019
Online yayım: 01.12.2019

Anahtar Kelimeler
Stevia rebaudiana
C. elegans
Fertilite

Stevia rebaudiana Bertoni yapraklarının su ve metanol ekstraktları, *Caenorhabditis elegans*'ın yumurta üretimi ve fiziksel gelişimi üzerinde test edildi. *S. rebaudiana* su ekstraktlarının farklı konsantrasyonları *C. elegans*'ın yumurta üretimini kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalttığı görüldü ($p < 0.05$). *S. rebaudiana* yapraklarının 0.1, 0.25 ve 0.5 gr / 100 ml metanol ekstreleri incelendiğinde, 0.25 gr / 100 ml konsantrasyonunda yumurta veriminde belirgin bir azalma gözlemlendi ($p < 0.05$). Test edilen tüm konsantrasyonlarla kontrol grupları arasında önemli farklılıklar bulundu. *S. rebaudiana*'nın su ve metanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonları *C. elegans*'ın fiziksel büyümesi üzerinde herhangi bir etki göstermedi. Halk hekimliğinde kullanılan *S. rebaudiana*'nın su ekstraktının *C. elegans* üzerinde olumlu bir etkisi olup olmadığı şüphelidir. Gelecekte in vitro ve in vivo çalışmalar, *S. rebaudiana*'yı tedavi edici bir ilaç olarak kullanabilmek için gereklidir.

Orijinal article

Abstract

Article info

Received: 15.10.2019
Received in revised form: 20.10.2019
Accepted: 25.10.2019
Available online: 01.12.2019

Keywords

Stevia rebaudiana
C. elegans
Fertility

Water and methanol extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni (*S. rebaudiana*) leaves were tested on the egg production and physical growth of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). It could be demonstrated that the different concentrations of the water extracts significantly reduced the egg production of *C. elegans* as compared to the controls ($p < 0.05$). When the 0.1, 0.25 and 0.5 gr/100 ml methanol extracts of *S. rebaudiana* leaves were examined, a significant decrease in egg yield was observed at concentration of 0.25 gr/100 ml ($p < 0.05$). Significant differences were found between all the concentrations tested and the control groups. The different concentrations of water and methanol extracts of *S. rebaudiana* did not show any effect on the physical growth of *C. elegans*. It is doubtful whether the water extract of *S. rebaudiana*, which are being used in folk medicine have a positive effect on *C. elegans*. Future in vitro and in vivo studies are necessary to be able to use *S. rebaudiana* as a therapeutic remedy.

GİRİŞ

Bitkilerin tedavi amacıyla kullanımları insanlık tarihi kadar eskidir. İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgular, insanların besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için bitkileri kullandığını göstermektedir. Paraguay Kızılderilileri "Tatlı ot" ve "Ballı yaprak" ismiyle adlandırdığı *Stevia* bitkisini uzun yıllar boyunca doğal tatlandırıcı olarak kullanmışlardır. *Stevia* bitkisini incelemek ve araştırmak amacıyla, Bridel ve Lavieille isimli iki Fransız kimyacı 1931 yılında bitkinin yapraklarından elde ettikleri özütler üzerinde çalışmışlar ve çalışma sonucunda beyaz kristal yapıya sahip "Stevioside" ismiyle bilinen saf bir ürün elde etmişlerdir¹. Bu madde vücudumuz içerisindeki tat duyuları bakımından bildiğimiz anlamda rafine şekerin 100-150 katına ulaşacak kadar daha şekerli olarak tanımlanmaktadır². Tatlandırıcı olarak kullanılan *Stevia* bitkisinin özütü ve steviosidin insan sağlığı üzerine öncelikle antihiperglisemik olmak üzere antihipertansif, antioksidan, anti-human rota virüs aktivitesi gibi yararlı etkileri olduğu ve sağlıklı bir yaşam sağladığı görülmüştür³.

Stevia yapraklarından kurutulularak elde edilen ekstrakt-

lar flavonoid, alkaloit, suda çözünen klorofil ve ksantofil, hidrokisisinnamik asit (kafeik, klorojenik, vs), nötral suda çözünen oligosakkarit, serbest şeker, aminoasit, lipit, esansiyel yağlar ve iz elementleri (alüminyum, demir, çinko vs.) ihtiva etmektedirler⁴.

Stevia ekstraktı yüksek oranda diterpen steviol glikozitlerini içerir. Diterpen steviol glikozit bileşenleri; Steviol, Steviolbioside, Stevioside, Rebaudioside A, B, C, D, E, F, Rubusoside, Dulcoside A olarak tanımlanır. Başlıca tatlılık özelliğine sahip bileşenler Stevioside ve Rebaudioside A'dır⁵. Stevioside'in tatlılık oranı, sakkarozdan 110–270 kez, Rebaudioside A'nın ise, 150–320 kez daha fazladır. Bunun yanında Rebaudioside C, sakkarozdan 40–60 kez, Dulcoside A ise 30 kez daha tatlıdır. Diğer steviol glikozitler de düşük oranda tatlılık özelliğine sahiptir. *Stevia* yapraklarında bulunan (kurumadde esasına göre) Stevioside, Rebaudioside A, Rebaudioside C ve Dulcoside A miktarları sırasıyla %9.1, %3.8%0.6 ve %0.3'dür⁶. Steviosidin yaygın kullanımı, steviosid ve bileşenlerinin fertiliteye etkisi ve olası teratojenik etkileri hakkındaki tartışmaları, soruları ve araştırmaları da beraberinde getirmektedir.

Model organizma olarak kullanılacak olan *Caeno-*

rhabditis elegans (*C. elegans*) son zamanlarda yapılan birçok bilimsel çalışmalarda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *C. elegans* genlerinin önemli bir kısmı insan genlerine büyük benzerlik göstermektedir. *C. elegans* genlerinin %60-80'inin insan da homologları tanımlanmıştır⁷. Ilıman bölgelerde toprakta serbest olarak yaşayan, parazitik olmayan, yaklaşık 1 mm boyunda, mikroskopik, şeffaf, gözlenmesi kolay, hermafrodit ve erkek olmak üzere iki cinsiyete sahip bir organizmadır⁸. Büyüme ve üreme için nemli bir çevre, oda sıcaklığı, atmosferik oksijen ve besin olarak da genellikle *Escherichia coli* suşu olan OP50'ye ihtiyaç duyarlar⁹.

MATERYAL VE METOD

Bitki Örneklerinin Eldesi

Çalışmamızda kullanılacak olan *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisi yaprakları KunAna Çiftliği Tarım ve Ticaret Şirketi'nden satın alınmıştır.

Bitki Örneklerinin Ekstraksiyonu

Kurutulmuş örnekler laboratuvar tipi değirmende öğütülerek küçük parçalara ayrılmış, daha sonra 100 gr. tartılarak cam kavanozlara alınmış, üzerlerine 200 ml metanol eklenmiştir. 24 saat maserasyonda bekletilen örnekler filtre kâğıtlarıyla süzülerek, süzüntü içerisindeki metanol evaporatörle uçurulmuş, elde edilen kuru ekstrale +4 °C de saklanmıştır.

Su ekstraksiyonu içinde aynı yöntem izlenmiştir. Sadece yöntemde metanol yerine su kullanılmıştır.

Bitki Örneklerinin Dozlarının Ayarlanması

Elde edilen kuru ekstralelerden doz ayarlamak amacıyla ön denemeler yapılmış, yapılan ön denemeler sonucunda yaprak metanol ekstralelerinden 0,1 gr, 0,5 gr, 0,25 gr, 0,125 gr tartılmış ve bu dozlar *C. elegans* bireylerinin besi ortamına katılmıştır.

C. elegans Suşlarının Eldesi

Yaban tip *C. elegans* N2 suşu Ceanorhabditis Genetic Center (University of Minnesota, Minneapolis, USA)'dan alınmıştır.

NGM Hazırlanması

2,5 gr Peptone, 3 gr NaCl, 20 gr Agar 1 L distile su içerisinde eritilmiş ve 125 °C de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 55 °C' a kadar soğutulmuştur. Daha önceden hazırlanan ve 0,2 µm gözenekli filtrelerden süzülen 1mL MgSO4(1M), 1 mL Cholesterol (5 mg/mL), 1 mL CaCl2 (1M), 25 mL KPO4 tampon (pH:7) besiyerine eklenerek homojenizasyonu sağlanmıştır. Çalışma için besiyerine *Volvox scum* L. ssp. *austriacum* yaprak ve meyve kuru ekstraleleri ayrı ayrı eklenmiştir (0,2 gr/100 ml, 0,1 gr/100 ml, 0,5 gr/100 ml, 0,25 gr/100 ml, 0,125 gr/100 ml).

Hazırlanan Nematot growth media (NGM), petri kutularına yeteri kadar aktarılmış ve katılaştıktan sonra hazırlanan *Escherichia coli* OP50 suşu NGM' a eklenerek steril kabinde kurutulmuştur. Kontrol grubu hiç bir kuru ekstre eklenmemiş besiyerinde beslenmiştir.

Yumurta Verimi Analizi

Yumurta verimi analizi için, yumurta sayımı Koelle¹⁰ protokolüne göre yapılmıştır. Buna göre *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisi yaprakları su ve metanol ekstralelerinin farklı dozları (0,1 gr/100 ml, 0,5 gr/100 ml, 0,25 gr/100 ml, 0,125 gr/100 ml.) ile hazırlanmış her bir petriye 25 adet iyi beslenen L4 *C. elegans* aktarılmıştır. 36 saat sonra bunların 25 tanesi yeni bir petriye aktarılarak, 20 °C'de 30 dk. bekletilmiştir. Süre sonunda 20x objektif ile yumurtalar sayılmıştır. Petriyelerdeki yumurta sayıları belirlendikten bir gün sonra çatlamayan yumurtalar tespit edile-

rek sayılmış ve yumurtadan çıkma yüzdesi hesaplanarak kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Fiziksel Büyümenin Kontrolü

Fiziksel büyümenin kontrolü amacıyla hazırlanan yaprak ve su ve metanol ekstralelerinin farklı dozları (0,1 gr/100 ml, 0,5 gr/100 ml, 0,25 gr/100 ml, 0,125 gr/100 ml) NGM içerisine petrilere eşit miktarda *C. elegans* yumurtası ilave edilmiştir. İçerlerinde 90-100'er adet yumurta bulunan petrilere, yumurtadan yavruların çıkışı ve fiziksel büyüklükleri açısından her gün kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Çalışmalar üç kez tekrar edilerek, ortalamalar belirlenip SPSS programı ile gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

BULGULAR

Yumurta Verimi Analiz Sonuçları

Araştırmamız sonucunda *Stevia rebaudiana* Bertoni yaprak su ekstraktı analiz sonuçları incelendiğinde çalışmaya alınan bütün dozların kontrol grubuna göre yumurta verimini doza bağlı olarak azalttığı tespit edilmiştir. Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde deney gruplarının tamamı ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Gruplar arası veriler incelendiğinde ise bütün gruplar kendi aralarında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur (p<0,05). *Stevia* yaprak metanol ekstraktı analiz sonuçları incelendiğinde 0,1 ve 0,5 gr/100 ml' lik konsantrasyonlarda yumurta veriminde belirgin bir azalma görülürken çalışmaya alınan diğer konsantrasyonlarda yumurta veriminde artma saptanmıştır. Çalışmada 0,25 gr/100 ml'lik konsantrasyonda yumurta veriminin en üst seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde deney gruplarının tamamı ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Gruplar arası veriler incelendiğinde ise bütün gruplar kendi aralarında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur (p<0,05, Tablo 1 Şekil 1).

Fiziksel Büyümenin Kontrolü Analiz Sonuçları

Araştırmamız sonucunda *Stevia rebaudiana* Bertoni yaprağının su ve metanol ekstrelerinin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan *C. elegans* bireyleri üzerinde herhangi bir fiziksel büyüme geriliği saptanmamıştır (Şekil 2).

TARTIŞMA

Bitkilerin ürettiği doğal ürünler olan primer ve sekonder metabolitler doğrudan ve dolaylı olarak endüstrinin en temel ürünleridir. Bitkiler, topraktan aldıkları su, mineral ve bazı öğeleri kendi metabolizmalarında insan vücudunun özümleyebileceği bileşimlere dönüştürürler¹¹. Özellikle 1990'lı yıllardan sonra, tıbbi ve aromatik bitkilerin yeni kullanım alanlarının bulunması, doğal ürünlere olan talebin artması; bu bitkilerin kullanım hacmini her geçen gün artırmaktadır. Günümüzde tıbbi bitkiler piyasasının yıllık yaklaşık 60 milyar dolarlık bir rakama sahip olduğu tahmin edilmektedir.

Şekerin insan vücudu üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak ve ürün çeşitliliğini arttırmak amacıyla, birçok gıda sektöründe olduğu gibi içecek sektöründe de tatlandırıcıların kullanımı günümüzde yaygınlaşmıştır. Çalışmamızda şu an piyasada bulunan birçok tatlandırıcının yerini alan ve birçok market ürünü içerisinde gördüğümüz *S. rebaudiana* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının bir model organizma olan *C. elegans* bireyleri üzerinde yumurta verimi ve fiziksel büyüme üzerine olan etkileri çalışılmıştır.

Tablo 1: *Stevia rebaudiana* yaprağı su ve methanol e kstraktının *C. elegans* bireylerinde doğurganlık üzerine etkisi

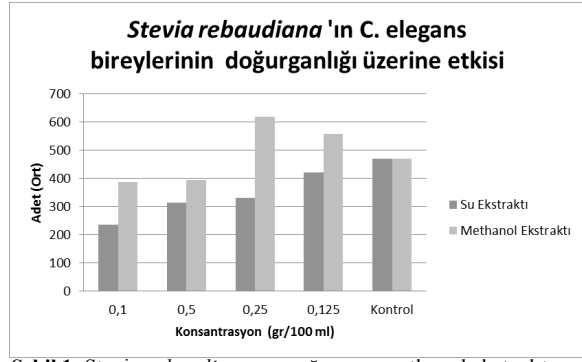
Dozlar (gr/100ml)	Su Ekstraktı (Ort / Adet)	Methanol Ekstraktı (Ort / Adet)
0,1	237 ^a	388 ^a
0.50	313 ^b	393 ^b
0.25	332 ^c	618 ^c
0.125	420 ^d	557 ^d
Kontrol	469 ^e	469 ^e

Farklı harfle belirtilen gruplar arası fark önemlidir ($p < 0,05$), One-Way Anova Test (SPSS-21), sütunlar kendi arasında değerlendirilmiştir.

Planas ve ark.¹² tarafından yapılan bir çalışmada dişi fareler *S. rebaudiana* bitkisinin %5 lik sulu ekstreleri ile beslenmiş ve farelerde fertilitite de azalma saptanmıştır. Portella ve Pereira¹³ tarafından yapılan dişi fareler üzerindeki farklı bir çalışmada bu çalışmayı destekler niteliktedir.

Melis¹⁴ tarafından erkek fareler üzerinde yapılan farklı bir çalışmada 60 gün boyunca her gün *Stevia* sulu özütü verilen farelerde testis büyüklüğünde bir küçülme olduğu, sperm sayısının azaldığı ve plazma testesteron seviyelerinde de bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma verilerine göre *Stevia* bitkisinin fertilitite üzerinde olumsuz etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. Yaptığımız çalışmada bu çalışmayı destekler niteliktedir. Özellikle *Stevia* bitkisinin sulu ekstresinin bütün dozlarında *C. elegans* bireylerinde yumurta sayısını düşürdüğü Tablo 1 ve Şekil 1’de görülmektedir.

S. rebaudiana, steviol glikozidleri olarak bilinen en az sekiz değişik şeker glikozidi içeren karmaşık bir yapıdadır. Ana bileşenleri steviosid ve rebaudiosid A’dır¹. Steviosid, steviosid veya stevia özütü şeklinde şeker bileşeni ve ticari tatlandırıcı olarak nitelendirilmektedir. Meyve suyu, kurutulmuş deniz ürünleri, soya sosu, şeker, sakız, yoğurt, dondurma, diş macunu gibi birçok gıda ve çeşitli ürünlerde kullanılmaktadır. *Stevia* özütü ve steviosid Brezilya, Kore, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri’nde gıda katkı maddesi olarak kullanımı onaylanmış ve diyet desteği olarak tüketimine izin verilmiştir. FAO/DSÖ Gıda Katkıları Üzerine Uzman Ortak Komitesi (JECFA) tarafından steviosid için kabul edilebilir günlük alım olan 5,0 mg/kg kadar tüketilebileceği açıklanmıştır¹⁵. Yaptığımız çalışmada, *S. rebaudiana* bitkisinin methanol ekstraktında doza bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. *Stevia* yaprak methanol ekstraktı analiz sonuçları incelendiğinde 0,1 ve 0,5 gr/100 ml’lik konsantrasyonlarda yumurta veriminde belirgin bir azalma görülürken çalışmaya alınan diğer konsantrasyonlarda yumurta veriminde artma saptanmıştır. Çalışmada 0,25 gr/100 ml’lik konsantrasyonda yumurta veriminin en üst seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde deney gruplarının tamamı ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Gruplar arası veriler incelendiğinde ise bütün gruplar kendi aralarında da istatistik-

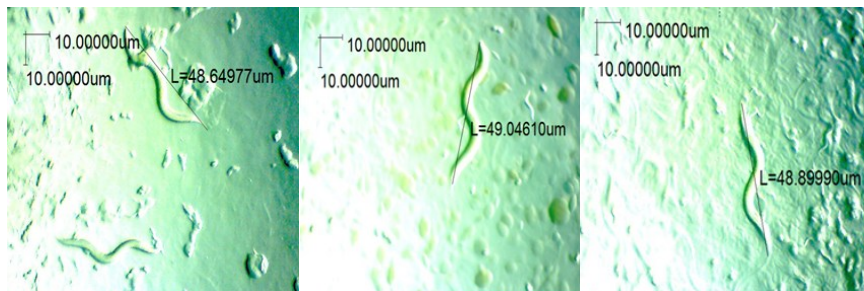


Şekil 1: *Stevia rebaudiana* yaprağı su ve methanol ekstraktının *C. elegans* bireylerinde doğurganlık üzerine etkisi

sel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur ($p < 0,05$, Tablo 1, Şekil 1).

ABD’de resmi bir kuruluş olan Gıda ve İlaç Organizasyonu (FDA) 23/02/2008 tarihinde stevia hakkında bir uyarı raporu yayınlamıştır¹⁶. *Stevia* ile ilgili olarak daha önceki raporları yeniden düzenleyen bu rapora göre *Stevia* kabul edilebilir bir gıda katkı maddesi olmadığı ve ABD içerisinde “GRAS (güvenli)” olarak kabul edilmediği bildirilmiş, gerekçe olarak ta bir gıda katkı maddesi olarak ya da GRAS statüsünde olması için *Stevia* üzerinde yeterli toksikolojik bilginin mevcut olmadığını gösterilmiştir. Fakat bir gıda maddesinin bileşenlerinden biri olmasının herhangi bir sakınca yaratmayacağı da rapor edilmiştir.

S. rebaudiana ve içeriğindeki steviosidin sağlıklı bireylerde kullanımı güvenli kabul edilse de mekanizması henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Steviosid ve bileşenlerinin in vivo etkilerine, mekanizmalarına, toksik etkilerine yönelik birçok aydınlatma çalışması devam etmektedir. *Stevia*’nın hastalarda tedavi amacıyla kullanılabilmesi için etkilerinin yapılacak çalışmalarda elde edilecek tutarlı ve kabul edilebilir sonuçlarla desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmamız sonuçlarına göre *Stevia rebaudiana* bitkisinin yapraklarının methanol ve su ekstreleriyle yaptığımız çalışmada ekstre türü ve doza bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Buna göre *Stevia rebaudiana*’nın halk arasında kullanım şekli olan su ekstraktında fertilitite üzerine çıkan olumsuz sonuç düşündürücüdür. Bütün dozlarda görülen yumurta sayısındaki azalış, bu bitkinin kullanımında sürekliliğin zararlarına işaret etmektedir (Tablo 1). Yaptığımız çalışmayı destekler nitelikte pek çok çalışmaya yukarıda değinilmiştir. Ancak yapılacak daha fazla biyokimyasal analiz ve hayvan deneyleri ile çalışmalar devam ettirilmelidir. Methanol ekstraktında 0.1gr/ 100 ml ve 0.5 gr/100 ml dozlarındaki yumurta sayısındaki düşüş ve 0.25 gr/100ml ve 0.125 gr/100ml dozundaki artış doza bağlı olarak fertilitite üzerindeki değişimi göstermektedir (Tablo 1). Özellikle piyasada bulunan *Stevia* ekstrelerinin su mu yoksa methanol ekstresi mi olduğu üzerinde durulmalı, kullanım dozlarına ve kullanım sıklığına dikkat edilmelidir. Farklı çözücülerin kullanımı farklı etken maddelerin ortaya çıkışına sebep olabilir.



Şekil 2.a. *C. elegans* Bireylerinin Kontrol Grubundaki Görüntüsü x4, **b.** *C. elegans* Bireylerinin *Stevia rebaudiana* Bertoni Yaprak Su Ekstresinin 0,1gr/100ml Dozundaki Görüntüsü (x4) **c.** *C. elegans* Bireylerinin *Stevia rebaudiana* Bertoni Yaprak Methanol Ekstresinin 0,1gr/100ml Dozundaki Görüntüsü (x4)

Kaynaklar

1. Williams LD, Burdock GA. Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. *Food and chemical toxicology*. 2009;47:1831-1836.
2. Nicotra F. *Organic and Bio-molecular Chemistry-Volume II*: EOLSS Publications; 2009.
3. Gardana C, Simonetti P, Canzi E, Zanchi R, Pietta P. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from Stevia rebaudiana extracts by human microflora. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51:6618-6622.
4. İnanç AL, Çınar İ. Alternatif doğal tatlandırıcı: Stevya. *Gıda*. 2009;34:411-420.
5. H. W. Steviol Glycosides Chemical and Technical Assessment. *JECFA*. 2007:1-7.
6. Abelyan VH, Ghochikyan VT, Markosyan AA, Adamyant MO, Abelyan LA. Extraction, separation and modification of sweet glycosides from the Stevia rebaudiana plant: Google Patents; 2010.
7. Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5:387-399.
8. Hertweck M, Hoppe T, Baumeister R. C. elegans, a model for aging with high-throughput capacity. *Experimental gerontology*. 2003;38:345-346.
9. Hodgkin J, Hope I. *Conventional genetics*: Oxford University Press; 1999.
10. M. K. Quantitation of constitutive egg-laying. *Yale University, NewHaven, CT.USA*. 2019; http://www.wormbook.org/chapters/www_behavior/behavior.html#sec 9.
11. Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*. 2011;11:52-67.
12. Planas GM, Kuć J. Contraceptive properties of Stevia rebaudiana. *Science*. 1968;162:1007-1007.
13. Nunes BdAP, Pereira NA. Influência do chá da caá-heê, Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni, sobre o peso dos órgãos sexuais isolados de camundongos jovens. *Acta Amazônica*. 1988;18:181-185.
14. Melis MS. Effects of chronic administration of Stevia rebaudiana on fertility in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 1999;67:157-161.
15. Chatsudthipong V, Muanprasat C. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & therapeutics*. 2009;121:41-54.
16. FDA. Sweeteners. http://www.fda.gov/fdac/features/2006/406_sweeteners.html (01.12.2008). 2008.