

Efecto antimutagénico del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre mutaciones y recombinaciones inducidas en *Drosophila melanogaster*

Gayozo, E.¹; Rivarola, C.¹; Núñez, C.¹; Marín Insfrán, L.¹

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay
E mail del autor: elviologo@gmail.com

Efecto antimutagénico del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre mutaciones y recombinaciones inducidas en *Drosophila melanogaster*. *Stevia rebaudiana* (Ka'a he'e) es muy conocida en todo el mundo como edulcorante natural, es empleada de manera tradicional en decoctos e infusiones, principalmente como agente antioxidante, sin embargo, es desconocida la capacidad antimutagénica de las infusiones. El estudio es experimental con diseño completamente al azar donde se evalúa la acción antimutagénica de *S. rebaudiana* mediante el test de mutación somática y de recombinación (SMART). Se llevó a cabo administrando el extracto acuoso de hojas oralmente por 24 horas a distintas concentraciones (0,001 mg.mL⁻¹; 0,01 mg.mL⁻¹ y 0,1 mg.mL⁻¹) a larvas heterocigotas de *Drosophila melanogaster* obtenidas de cruza estándar. Agua destilada fue utilizada como control y Ciclofosfamida 2,61 mg.mL⁻¹ para inducir mutaciones. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el Test Kastenbaum-Bowman $\alpha=\beta = 0,05$, nuestros resultados indican que el extracto acuoso posee acción antimutagénica con una inhibición del 50% a 58% en la incidencia total de mutaciones inducidas.

Palabras clave: antimutagenicidad, *D. melanogaster*, mutación, SMART, *Stevia rebaudiana*

Antimutagenic effect of the aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni on mutation and recombination induced in *Drosophila melanogaster*. *Stevia rebaudiana* (Ka'a he'e) is known worldwide as a natural sweetener, which is traditionally used in decoctions and teas, mainly as an antioxidant agent. However, the antimutagenic action of the infusions is unknown. This study is experimental with completely randomized design that evaluated the antimutagenic effect of *S. rebaudiana* by using the somatic mutation and recombination test (SMART). It was carried out by administering aqueous extract of leaves orally for 24 hours at different concentrations (0,001 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹, and 0,1 mg.mL⁻¹) to heterozygous larvae of *Drosophila melanogaster* obtained from standard crosses. Distilled water was used as control and Cyclophosphamide 2.61 mg.mL⁻¹ to induce mutations. The data obtained were analyzed using the test Kastenbaum-Bowman $\alpha=\beta=0.05$ and our results indicate that the aqueous extract has an antimutagenic action with inhibition of 50% to 58% in the overall incidence of induced mutations.

Key words: antimutagenicity, *D. melanogaster*, mutation, *Stevia rebaudiana*, SMART

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni (Ka'a he'e) es una planta que crece de manera silvestre en la región de la Cordillera del Amambay (Departamento de Amambay, Paraguay), considerada nativa de la región de

Sudamerica (Bender *et al.*, 2015; Mizutani y Tanaka, 2002; Shock, 1982). Es una hierba perenne de unos 30-50 cm de altura en promedio, usualmente con brotes secundarios en la base, raíces filiformes y hojas simples, opuestas, subsésiles con borde dentado (Kinghorn, 2002). Esta

Steviana, Vol. 8(2), 2016 pp. 92–101.

Original recibido el 27 de junio de 2016.

Aceptado el 14 de octubre de 2016.

planta ha sido utilizada por los guaraníes como hierba dulce desde tiempos ancestrales, sus hojas también son empleadas para la preparación de tés con fines terapéuticos por sus principios curativos (Bender *et al.*, 2015).

Se ha reportado que la planta posee un poder de endulzamiento de hasta 143 a 242 veces mayor que la sacarosa común, esto se debe a la presencia de un grupo de moléculas en las hojas conocidas como steviol glicósidos, los cuales con ayuda de métodos de alta resolución se lograron identificar moléculas pertenecientes a este grupo y son los Rebaudiósidos A, B, C, D, E y F, Steviolbíosido, Dulcósido A, es importante también destacar que este año se han descrito químicamente dos nuevos compuestos del mismo grupo encontrados en las hojas, son los Rebaudiósidos R y Rebaudiósidos S (Hubert *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2016; Bender *et al.*, 2015; Kasai *et al.*, 1981).

Estudios *in vitro* realizados con metodologías como Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC), la Actividad Antioxidante Celular (CAA) y la lipoperoxidación han demostrado que los extractos acuosos de las hojas poseen una alta actividad antioxidante, así como también en ensayos *in vivo* llevados a cabo con ratas de laboratorio (*Mus musculus*) se ha confirmado la acción antioxidante en las hojas de esta planta con una eficacia del 25% a 30% (Bender *et al.*, 2015; Zayova *et al.*, 2013; Shivanna *et al.*, 2013).

Estudio realizado con el ensayo de Ames ha demostrado que el steviósido, a concentraciones menores, no ejerce daño mutagénico en la bacteria *Salmonella typhimurium* cepas TA98 y TA100, tampoco se reportó deterioro genético

cromosómico remarcable en células de cultivo celular sanguíneo, aunque solo se observó daños mutagénicos en *Salmonella typhimurium* cepa TA98 a una dosis igual o mayor a 50 mg/placa (Suttajit *et al.*, 1993).

Además, son conocidas por poseer otras propiedades como su acción protectora contra daño hepático y nefrótico, así como también que el steviósido también induce a la vasorelajación, lo cual contribuye con la regulación de la presión sanguínea, sugiriendo su actividad hipotensora (Shivanna *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004). Otras investigaciones indican que el extracto acuoso de hojas de *S. rebaudiana*, posee un efecto hipoglicémico e hipolipidémico (Assaei *et al.*, 2016; Ritu & Nandini, 2016).

Este estudio se realizó con el fin de poder determinar la acción antimutagénica del extracto acuoso de hojas de *S. rebaudiana* en *Drosophila melanogaster* mediante el test de mutación somática y recombinaciones (SMART), ya que la mayoría de los investigadores consideran y sugieren que las hojas de *S. rebaudiana* no son tóxicas, ni mutagénicas, ni carcinógenas (Shivanna *et al.*, 2013; Smirnova, 2000; Takahashi *et al.*, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras vegetales e identificación

Las muestras vegetales fueron colectadas en la propiedad privada: *Melgarejo-Rodríguez*, en el distrito de 25 de Diciembre, departamento de San Pedro, Paraguay (24°44'33" S, 56°38'12" W). Se colectaron ejemplares fértiles (en estado de floración), que fueron prensados *in situ* tomándose notas del hábitat y los

caracteres morfológicos de la planta. La identificación taxonómica de este material se realizó por un especialista del Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales de la FACEN (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

Preparación del extracto acuoso

Las muestras vegetales fueron secadas a temperatura ambiente (19° - 21° C), sin exposición directa a luz solar ni sobreexposición al oxígeno (Hostettmann *et al.*, 2008). Se trituraron 50 gramos de hojas secas, y fueron mezcladas con 500 mL de agua destilada, llevándose a ebullición durante 5 minutos para la obtención de una solución stock de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. La solución se filtró con un equipo filtrador con bomba de vacío XZ-1B. Se realizaron las disoluciones seriadas ($0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$) las cuales fueron refrigeradas a 4° C hasta su utilización.

Tratamiento Crónico de larvas. Test de Mutación Somática y de Recombinación (SMART)

Se realizó el cruce estándar entre hembras vírgenes de la cepa *flr³/In(3LR)TM3, ri p⁹sep I(3)89Aa bx^{34e} &Bd^S* con machos de la cepa *mwh/mwh* en proporción de 2:1, con condiciones normales de temperatura ($24^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C), en medio ovopositor (Graf *et al.*, 1984). Pasadas 72 horas se extrajeron larvas de segundo estadio, que fueron distribuidas en cinco grupos de 100 larvas por unidad experimental para ser tratadas durante 24 horas en medios instantáneos de puré de papa rehidratados cada uno con 5 mL de cada extracto acuoso (concentraciones de 0,1; 0,01 y $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$), 5 mL de agua destilada como control y 5 mL de

Ciclofosfamida $2,61 \text{ mg.mL}^{-1}$ para inducir las mutaciones (Graf *et al.*, 1984).

Pasadas 24 horas de tratamiento, las larvas pre-tratadas fueron transferidas a otros medios instantáneos rehidratados, cada uno con 5 mL de Ciclofosfamida $2,61 \text{ mg.mL}^{-1}$, excepto el control. Este post-tratamiento se realizó por 72 horas hasta la eclosión de los individuos adultos.

Se seleccionaron al azar individuos trans-heterocigotas *mwh+/+flr³* de cada tratamiento (5 individuos de cada sexo) de los cuales se extrajeron las alas y fueron montadas con solución de Faüre (Goma arábica 300 g, Glicerol 20 mL, Hidrato de Cloral 50 g, y Agua destilada 50 mL). Las observaciones de las alas se realizaron con un aumento de 400X con microscopios ópticos Motic®. Se analizaron las regiones A, B, C', C, D', D y E de cada ala, incluyendo los márgenes que separan estas regiones (Rodrigues de Andrade *et al.*, 2004).

Análisis estadístico

Las frecuencias de las manchas encontradas por ala fueron comparadas con las de los testigos según la tabla estadística propuesta por Frei y Würzler (1988), que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman), con niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$ (Kastenbaum & Bowman, 1970). Los gráficos estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 6.00, La Jolla California USA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayor cantidad de clones encontrados durante el análisis microscópico de las alas correspondió al tratamiento que se realizó solo con la

Ciclofosfamida para la inducción a mutaciones, en el cual se cuantificó un total de 363 clones mutantes.

En aquellos grupos tratados previamente con el extracto acuoso, se observaron una reducción considerable en el número de mutaciones. La cantidad total de clones mutantes observados por concentración fueron los siguientes: a $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ 153 clones; a $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ un total de 182 clones y $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ sumó un total de 181 clones respectivamente (Tabla 1).

En todos los individuos tratados se encontraron los diferentes tipos de marcadores mutantes, los cuales fueron MSP (manchas simples pequeñas) los cuales se originan a consecuencia de eventos mutagénicos como delección, mutaciones puntuales, o no disyunciones, MSG (manchas simples grandes) también originados por eventos mutagénicos como no disyunciones, mutaciones puntuales y delecciones; y MG (manchas gemelas) el cual es un indicador de eventos de recombinaciones mitóticas las cuales pueden activar de forma inapropiada protooncogenes promoviendo la carcinogénesis (Marcos *et al.*, 2014; Sengstag, 1994) -**Fig. 1**.

La frecuencia de aparición de clones mutantes con Ciclofosfamida fue de 36,30, una tasa muy alta en comparación con la del tratamiento con agua destilada que fue de 1,90. El tratamiento con el extracto a $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ fue de 15,30 con una reducción de 58% de la inducción mutagénica; el extracto al $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ y el de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ con frecuencias de 18,20,

y 18,10 respectivamente, presentaron una reducción de 50%, lo que representa una disminución considerable en el número de clones mutantes. Estos porcentajes de inhibición fueron mayores que las encontradas en especies como *Capsicum annum*, *Piper nigrum*, *Ravensara aromatica* y *Ledum groenlandicum* conocidas por poseer propiedades antimutagénicas, y concuerdan con lo observado con extractos metanólicos de hojas, flores y raíces de *Stevia eupatoria* y *Stevia pilosa* en los cuales mediante el test de Ames y el método DPHH se evidenciaron acciones antimutagénicas y antioxidantes respectivamente (El Hamss *et al.*, 2003; Idaomar *et al.*, 2002; Cariño-Cortés *et al.*, 2007) -**Fig. 2**.

El rendimiento óptimo del extracto acuoso se observó a menores concentraciones siendo las frecuencias de clones tipo MSP 14,30, 15,70 y 16,20 para los tratamientos con el extracto acuoso $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ y $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente, las cuales fueron mínimas comparadas con la frecuencia del tratamiento con Ciclofosfamida (32,10). Esta disminución también se observó en los clones MSG donde las frecuencias fueron de 0,90, 2,00 y 1,60 para los tratamientos $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ y $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente. Sin embargo en los clones MG se observaron semejanzas entre las frecuencias de los grupos experimentales y testigos siendo 0,10, 0,50 y 0,30 las frecuencias para los tratamientos ($0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ y $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente).

Tabla 1. Número total de clones mutantes por tratamiento.

Tratamiento	Cantidad de alas	MSP	MSG	MG	TM
Control	20	10	7	2	19
Ciclofosfamida 2,61mg.mL ⁻¹	20	321	36	6	363
0,001mg.mL ⁻¹ + Ciclofosfamida 2,61mg.mL ⁻¹	20	143	9	1	153
0,01 mg.mL ⁻¹ + Ciclofosfamida 2,61mg.mL ⁻¹	20	157	20	5	182
0,1 mg.mL ⁻¹ + Ciclofosfamida 2,61mg.mL ⁻¹	20	162	16	3	181

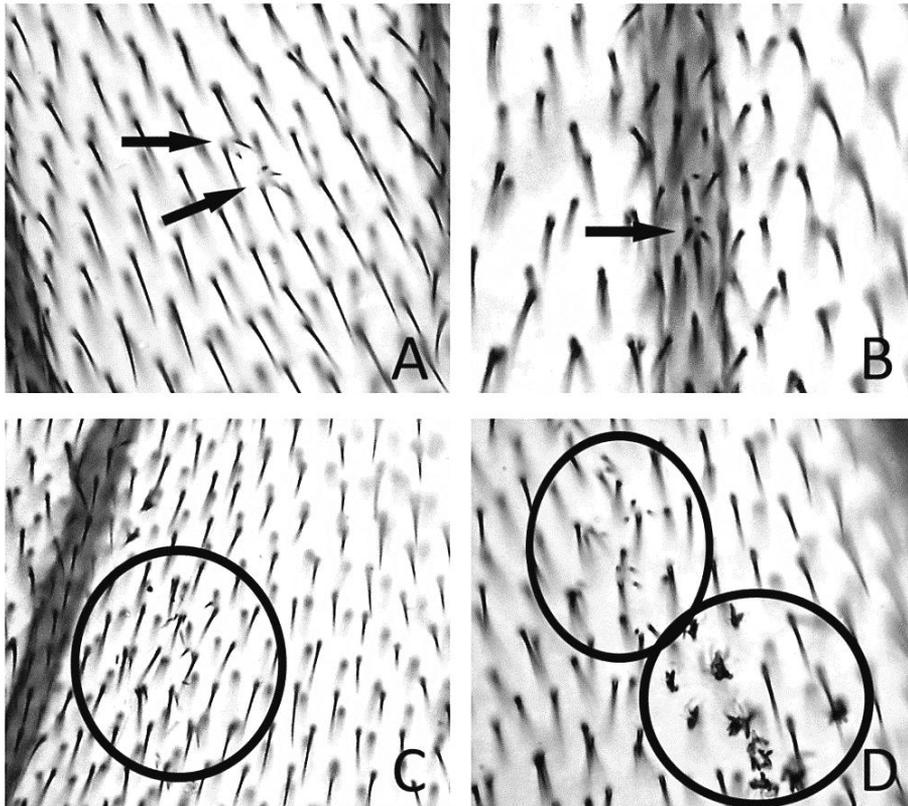


Fig. 1: Clones encontrados en alas de *Drosophila melanogaster* en tratamiento crónico, **A.** Manchas Simples Pequeñas (MSP), **B.** Mancha simple pequeña en el margen entre dos regiones del ala. **C.** Manchas Simples Grandes (MSG), **D.** Manchas Gemelas (MG). En **A-C.** se observan manchas del tipo *mwh*, **D.** Se observan manchas de tipo *mwh* (círculo superior) y manchas de tipo *flr³* (círculo inferior). Aumento (400X).

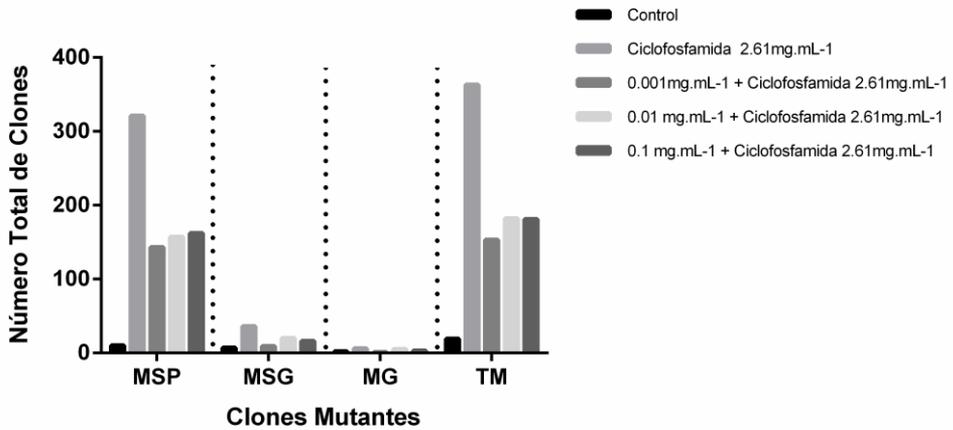


Fig. 2: Número total de clones mutantes encontrados en las alas de *Drosophila melanogaster*.

Las frecuencias de clones mutantes tipo MSP y el total de manchas (TM) en individuos tratados con las diluciones del extracto foliar de *S. rebaudiana*, son mayores que los encontrados en el control debido a que la Ciclofosfamida es un agente fuertemente mutagénico. También se observó lo mismo con clones tipo MSG, excepto en aquellas que fueron tratadas

con el extracto acuoso 0,001 mg.mL⁻¹, donde se contabilizaron números similares de mutaciones. En los clones tipo manchas gemelas (MG) fueron observados cantidades semejantes de mutaciones a las del control, sin que pueda evidenciarse diferencias estadísticas significativas - **Tabla 2.**

Tabla 2: Análisis estadístico del potencial antigenotóxico del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) en adultos trans-heterocigotas *mwh*^{+/+}*flr*³.

Tratamiento	Cant. de alas	MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2	Inhibición (%)
Control	20	1,00 (10)	0,70 (07)	0,20 (02)	1,90 (19)	—
Ciclofosfamida 2,61 mg.mL ⁻¹	20	32,10 (321) +	3,60 (36) +	0,60 (06) i	36,30 (363) +	—
0,001mg.mL ⁻¹ + Ciclofosfamida 2,61 mg.mL ⁻¹	20	14,30 (143) +	0,90 (09) i	0,10 (01) i	15,30 (153) +	58
0,01 mg.mL ⁻¹ + Ciclofosfamida 2,61 mg.mL ⁻¹	20	15,70 (157) +	2,00 (20) +	0,50 (05) i	18,20 (182) +	50
0,1 mg.mL ⁻¹ + Ciclofosfamida 2,61 mg.mL ⁻¹	20	16,20 (162) +	1,60 (16) +	0,30 (03) i	18,10 (181) +	50

- Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$
- Incluso las manchas simples *flr*³ raras.
- Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

Los eventos antimutagénicos y antioxidantes se deben principalmente a la presencia de moléculas del tipo fenólicas, estos son productos del metabolismo secundario y se encuentran distribuidas en casi todos los órganos vegetales (Mesa-Vanegas *et al.*, 2010). El mecanismo por el cual el extracto acuoso de las hojas de *S. rebaudiana* puede actuar sobre el mutágeno antes de que éste pueda afectar al ADN, es a consecuencia de la presencia de sustancias que poseen actividades antioxidantes y por ende son considerados desmutágenos, esto concuerda con resultados obtenidos en ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados con hojas de *Stevia rebaudiana*, así también con especies emparentadas como *Stevia eupatoria* y *Stevia pilosa* (Cariño-Cortés *et al.*, 2007; Kada *et al.*, 1985; Shivanna *et al.*, 2013; Zayova *et al.*, 2013).

En el caso de la *S. rebaudiana* podría atribuirse a la presencia de polifenoles, que se encuentran presentes en las hojas de la mismas, encontrándose en mayores concentraciones los derivados de Ácido hidroxibenzoico (Ácido 4-O-cafeoilquínico, Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico y Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico), Ácido clorogénico, quercetin 3-o-xylosido, Apigenin-7-O-glucosido, Ácido 3,4-Dimetoxicinámico, Luteolin 7-O-rutinosido, los cuales una vez disueltos a altas temperaturas en solvente acuoso, tienen la propiedad de interaccionar con radicales libres y moléculas mutágenas reduciendo de esta manera la actividad y el daño que puedan ocasionar al material genético (Bender *et al.*, 2015; Shivanna *et al.*, 2013; Bailey & Bailey, 1998; Kuroda & Hara, 1999).

CONCLUSIÓN

Los resultados encontrados nos sugieren que la decocción de las hojas de *S. rebaudiana* a diferentes concentraciones genera una interferencia sobre la acción mutagénica de la Ciclofosfamida constituyéndose de esta manera en desmutágeno de buena eficacia, sustentado así los resultados encontrados por Shivanna *et al.* (2013) y Zayova *et al.* (2013) quienes demostraron mediante bioensayos en ratas de laboratorio (*Mus musculus*) y el método de malondialdehído que las hojas de *S. rebaudiana* obtenidas tanto naturalmente como *in vitro* poseen actividades antioxidantes.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros sinceros agradecimientos al Sr. Ángel Melgarejo Rodríguez, por permitirnos realizar la colecta en su propiedad, a la especialista botánica MSc. Claudia Pereira Sühsner del Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales de la FACEN por su ayuda en la identificación de los ejemplares colectados.

REFERENCIAS

- Assaei, R.; Mokarram, P.; Dastghaib, S.; Darbandi, S.; Darbandi, M.; Zal, F.; Akmal, M.; Omrani, G.H.R. 2016. Hypoglycemic Effect of Aquatic Extract of *Stevia* in Pancreas of Diabetic Rats: PPAR γ -dependent Regulation or Antioxidant Potential. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 8(2): 65- 74.
- Bailey, P.S.; Bailey, C.A. 1998. Química Orgánica Conceptos y Aplicaciones.

- México. Pearson Prentice Hall. 502 - 534.
- Bender, C.; Graziano, S.; Zimmermann, B.F. 2015. Study of *Stevia rebaudiana* Bertoni antioxidant activities and cellular properties. *International journal of food sciences and nutrition*. 66(5): 553-558. doi: 10.3109/09637486.2015.1038223
- Cariño-Cortés, R.; Hernández-Ceruelos, A.; Torres-Valencia, J.M.; González-Avila, M.; Arriaga-Alba, M.; Madrigal-Bujaidar, E. 2007. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. *Toxicology in vitro*. 21(4): 691-697. doi: 10.1016/j.tiv.2006.12.001
- El Hamss, R.; Idaomar, M.; Alonso-Moraga, A.; Serrano, A.M. 2003. Antimutagenic properties of bell and black peppers. *Food and chemical Toxicology* 41(1): 41-47. doi:10.1016/S0278-6915(02)00216-8
- Frei, H.; Würigler, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 203(4): 297-308. doi:10.1016/0165-1161(88)90019-2
- Graf, U.; Würigler, F.E.; Katz, A.J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C.B.; Kale, P.G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis* 6(2): 153-188. doi: 10.1002/em.2860060206
- Hostettmann, K.; Gupta, M.P.; Marston, A.; Ferreira Quiroz, E. 2008. Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos. Colombia. Secretaría Ejecutiva de la Organización del Convenio Andrés Bello. 234 pp.
- Hubert, J.; Borie, N.; Chollet, S.; Perret, J.; Barbet-Massin, C.; Berger, M.; Daydé, J.; Renault, J.H. 2015. Intensified Separation of Steviol Glycosides from a Crude Aqueous Extract of *Stevia rebaudiana* Leaves Using Centrifugal Partition Chromatography. *Planta medica*. 81(17): 1614-1620. doi: 10.1055/s-0035-1545840
- Ibrahim, M.A.; Rodenburg, D.L.; Alves, K.; Perera, W.H.; Fronczek, F.R.; Bowling, J.; Mcchesney, J.D. 2016. Rebaudiosides R and S, Minor Diterpene Glycosides from the Leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal of natural products*. 79(5): 1468-1472. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00048
- Idaomar, M.; El Hamss, R.; Bakkali, F.; Mezzoug, N.; Zhiri, A.; Baudoux, D.; Muñoz-Serrano, A.; Liemans, V.; Alonso-Moraga, A. 2002. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 513(1): 61-68. doi: 10.1016/S1383-5718(01)00287-X
- Kada, T.; Kaneko, K.; Matsuzaki, S.; Matsuzaki, T.; Hora, Y. 1985. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens: a case of the green tea factor. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 150(1): 127-132. doi:10.1016/0027-5107(85)90109-5
- Kasai, R.; Kaneda, N.; Tanaka, O.; Yamasaki, K.; Sakamoto, I.; Morimoto, K.; Okada, S.; Kitahata, S.; Furukawa, H. 1981. Sweet diterpene-glycosides of

- leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Synthesis and structure–sweetness relationship of rebaudiosides-A, D, E and their related glycosides. *Nippon Kagakukaishi* 5: 726–735 (In Japanese, English abstract). doi: 10.1246/nikkashi.1981.726
- Kastenbaum, M.A.; Bowman, K.O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 9(5): 527-549. doi:10.1016/0027-5107(70)90038-2
- Kinghorn, A.D. 2002. Medicinal and aromatics plants- Industrial Profiles, Vol. 19. *Stevia The genus Stevia*. Taylor & Francis. 1-160.
- Liu, J.C.; Kao, P.K.; Chan, P.; Hsu, Y.H.; Hou, C.C.; Lien, G.S.; Hsieh M.H.; Chen Y.J.; Cheng, J.T. 2003. Mechanism of the antihypertensive effect of stevioside in anesthetized dogs. *Pharmacology* 67(1): 14-20. doi: 10.1159/000066782
- Marcos, R.; Sierra, L.M.; Gaivão, I. 2014. The SMART Assays of *Drosophila*: Wings and Eyes as Target Tissues. En *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach*, Ed. Sierra, L. M. & Gaivão, I., 283-295. Humana Press. New York.
- Mesa-Vanegas, A. M.; Gaviria, C.A.; Cardona, F.; Sáez-Vega, J.A.; Blair Trujillo, S.; Rojano, B.A. 2010. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 15(2): 13-26.
- Mizutani, K.; Tanaka, O. 2002. *Stevia*, the genus *Stevia*. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles. En *Use of Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. Ed. A. D. Kinghorn, 19: 178– 195. Taylor and Francis. London.
- Ritu, M.; Nandini, J. 2016. Nutritional composition of *Stevia rebaudiana*, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96(12):4231-4234. doi: 10.1002/jsfa.7627
- Rodrigues De Andrade, H.H.; Reguly, M.L.; Lehmann, M. 2004. Wing somatic mutation and recombination test. En *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Ed. D. S. Henderson, 389-412. Humana Press. Totowa. New Jersey.
- Sengstag, C. 1994. The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Critical reviews in toxicology* 24(4): 323-353. doi: 10.3109/10408449409017922
- Shivanna, N.; Naika, M.; Khanum, F.; Kaul, V.K. 2013. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications* 27(2): 103-113. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.10.001
- Shock, C.C. 1982. Experimental cultivation of Rebaudi's *Stevia* in California. *University of California Davis, Agronomy Progress Report* 122: 1-9.
- Smirnova, M.G. 2000. Study of physiological and toxic effects of a sweetening agent stevioside. *Voprosy pitaniia* 70(4): 41-44.
- Suttajit M.; Vinitketkaumnuen, U.; Meevatee, U.; Duangbuddhasukh, U. 1993. Mutagenicity and Human Chromosomal Effect of Stevioside, a Sweetener from *Stevia rebaudiana*

- Bertoni. *Environmental Health Perspectives Supplements* 101 (Suppl. 3): 53-56.
- Takahashi, K.; Matsuda, M.; Ohashi, K.; Taniguchi, K.; Nakagomi, O.; Abe, Y.; Mori, S.; Sato, N.; Okutani, K.; Shigeta, S. 2001. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral research* 49(1): 15-24. doi:10.1016/S0166-3542(00)00134-0
- Wong, K.L.; Chan, P.; Yang, H.Y.; Hsu, F.L.; Liu, I.M.; Cheng, Y.W.; Cheng, J.T. 2004. Isosteviol acts on potassium channels to relax isolated aortic strips of Wistar rat. *Life sciences* 74(19): 2379-2387. doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.065
- Kuroda, Y.; Hara, Y. 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 436(1): 69-97. doi:10.1016/S1383-5742(98)00019-2
- Zayova, E.; Stancheva, I.; Geneva, M.; Petrova, M.; Dimitrova, L. 2013. Antioxidant activity of in vitro propagated *Stevia rebaudiana* Bertoni plants of different origins. *Turkish Journal of Biology* 37(1): 106-113. doi:10.3906/biy-1204-64.