

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

STEVIA REBAUDIANA – VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ A FARMACII

Vedoucí diplomové práce: Ing. Martin Drastík, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Matěj Rücker

Poděkování

Tímto děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Martinovi Drastíkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, trpělivost a cenné rady, které mě vždy posunuly dál v psaní mé diplomové práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 17. 8. 2019

Matěj Růcker

OBSAH

1. ABSTRAKT	5
2. ABSTRACT	6
3. ÚVOD	7
4. TEORETICKÁ ČÁST	8
4.1 STEVIA REBAUDIANA BERTONI.....	8
4.1.1 Představení	8
4.1.2 Taxonomické zařazení.....	8
4.1.3 Výskyt.....	8
4.1.4 Vzhled	9
4.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ	11
4.2.1 Primární metabolity, minerály a vitamíny	11
4.2.2 Sekundární metabolity	15
4.3 EXTRAKCE BIOAKTIVNÍCH SLOUČENIN	22
4.4 STANOVENÍ SG	23
4.5 TOXICITA A BEZPEČNOST	24
4.5.1 Akutní toxicita.....	24
4.5.2 Subakutní a chronická toxicita	24
4.5.3 Reprodukční toxicita.....	26
4.5.4 Genotoxicita.....	27
4.5.5 Karcinogenita	28
4.5.6 Prohlášení JECFA, SCF a EFSA.....	29
4.6 VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ	30
4.6.1 Ovlivnění vlastností potravin	31
4.6.2 Legislativa v ČR.....	32
4.6.3 Situace ve světě.....	39
4.6.4 Přehled sladidel.....	39
4.6.5 Škodlivost cukru.....	41
4.7 VYUŽITÍ VE FARMACII A MEDICÍNĚ	45
4.7.1 Účinky SG.....	45
4.7.2 Další možná využití.....	50
5. ZÁVĚR	51
6. POUŽITÉ ZKRATKY	52
7. SEZNAM TABULEK	54
8. SEZNAM OBRÁZKŮ	55
9. SEZNAM GRAFŮ	56
10. POUŽITÁ LITERATURA	57

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Student: Matěj Rücker

Vedoucí diplomové práce: Ing. Martin Drastík, Ph.D.

Název diplomové práce: *Stevia rebaudiana* – využití v potravinářství a farmacii

Tato práce se ve své první části zabývá popisem rostliny a obsahovými látkami, mezi nejdůležitější patří steviolglykosidy, především steviosid a rebaudiosid A. V následující kapitole je hodnocena toxicita a bezpečnost, což přímo souvisí s možností využití stévie a steviolglykosidů v potravinářské a farmaceutické praxi. V další části je diskutováno využití v potravinářství, přičemž není ani opomenuta stávající legislativa a je nastíněna škodlivost rafinovaného cukru. Použití ve farmacii není tak rozšířené, proto se tato kapitola zabývá především účinky steviolglykosidů.

Stevia rebaudiana Bertoni a steviolglykosidy mají velký potenciál nahradit cukr a další sladidla. Díky svým blahodárným účinkům se těší velkému zájmu výzkumníků, a proto se v blízké budoucnosti můžeme těšit na jejich rozšířené využití jak ve farmacii, tak v potravinářství.

Klíčová slova: steviolglykosidy, steviosid, rebaudiosid A, cukr, farmaceutický průmysl, potravinářský průmysl

2. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Matěj Růček

Supervisor: Ing. Martin Drastík, Ph.D.

Title: *Stevia rebaudiana* – food and pharmaceutical industry applications

The first part of this thesis deals with the description of the plant and its substances, the most important are steviolglycosides, especially stevioside and rebaudioside A. In the following chapter, the toxicity and safety are evaluated, which is directly related to the use of stevia and steviolglycosides in food and pharmaceutical practice. In the next part, the utilization in the food industry and connected legislation is described. The harmfulness of the refined sugar is outlined as well. Application in the pharmacy is not so widespread, therefore this chapter deals primarily with the effects of steviolglycosides.

Stevia rebaudiana Bertoni and steviolglycosides have great potential to replace sugar and other sweeteners. Due to their beneficial effects, they are very popular among researchers, so we can look forward to their widespread application in food and pharmaceutical industry in the near future.

Key words: steviolglycosides, stevioside, rebaudioside A, sugar, pharmaceutical industry, food industry

3. ÚVOD

Rostlina *Stevia rebaudiana* Bertoni (SR) se dostává do povědomí stále více lidí. Většina ji zná jen jako sladkou rostlinu nebo stolní sladidlo, ale v diplomové práci jsem se zaměřil i na její další benefity.

Mezi nejdůležitější obsahové látky, které rostlině dávají sladkou chuť a lidem zlepšují zdraví, patří steviolglykosidy (SG). Nejvíce obsažený je steviosid a rebaudiosid A. Ale SR obsahuje i jiné prospěšné látky jako jsou vitamíny, minerály, esenciální aminokyseliny, flavonoidy, fenoly a další.

Blahodárné účinky SR znali indiáni z Jižní Ameriky už dlouhou dobu před námi. Používali ji na popáleniny, povrchová zranění, průjmy, sladili si s ní nápoje nebo ji pro její sladkou chuť jen tak přežvykovali. Po objevení rostliny Dr. Bertoniem v roce 1888 trvalo ještě dlouhou dobu než se krom své domoviny začala používat v USA, státech Evropské unie i jinde ve světě.

Od 80. let se bezpečností začaly zabývat různé autority, ale bohužel pro nedostatek toxikologických studií nebyla SR ani SG v potravinářství povoleny. Až v roce 2008 konečně získaly SG omezené povolení. Od té doby se toto povolení stále rozšiřuje.

V posledních letech se SR a SG používají stále častěji. SG patří mezi nekalorická sladidla, a proto by ani při nadměrné konzumaci nepoškozovaly zdraví tak, jako to činí rafinovaný cukr. SR má význam pro lidi postižené diabetem, vysokým krevním tlakem, obesitou a dalšími onemocněními. Pro své účinky má SR velký potenciál stát se hojně využívanou ve farmaceutickém průmyslu.

Cílem této diplomové práce je proto vytvořit přehled o využití rostliny *Stevia rebaudiana* Bertoni v potravinářství a farmacii.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni

4.1.1 Představení

Stevia rebaudiana Bertoni neboli stévie sladká má mnoho názvů, například paraguayští indiáni (Guarani) jí nazývají *caá-êhé*, což v jejich jazyku znamená sladká bylina¹. Tito indiáni používali stévii pro její sladivost a léčivé účinky dlouho před námi². Člověk, který jí v roce 1888 pro vyspělý svět objevil a popsal, byl botanik Dr. Moisés S. Bertoni³. V roce 1905 byla tato rostlina vědecky pojmenována podle paraguayského chemika Dr. Rebaudiho⁴.

SR se v posledních 20 letech těší zvýšenému zájmu, protože představuje vhodnou alternativu k sacharóze a umělým sladidlům. Tato rostlina navíc obsahuje látky, které mohou být extrahovány a použity pro výrobu nutraceutik a funkčních potravin.⁵

4.1.2 Taxonomické zařazení

SR patří do rodu *Stevia*, který obsahuje přes 200 druhů bylin a keřů, ale pouze jeden další druh, konkrétně *Stevia aristata*, obsahuje steviol-glykosidy⁶. Tento rod je v čeledi *Asteraceae* (hvězdnicovité), tedy stejně jako pampeliška (smetánka), slunečnice a čekanka, a řádu *Asterales* (hvězdnicotvaré)⁷.

4.1.3 Výskyt

Rod *Stevia* se přirozeně vyskytuje od jižních Spojených států přes Střední až po Jižní Ameriku⁸. Tomuto rodu vyhovují polosuché půdy a vyskytuje se na mnoha místech od 500 do 3000 metrů nad mořem, ať už to jsou horské lesy, břehy řek nebo vysychající údolí⁹. Konkrétně *Stevia rebaudiana* Bertoni je původně ze severovýchodní Paraguaye a přilehlých oblastí Brazílie. Poprvé byla objevena v údolí řeky Monday⁶.

Díky kultivaci se SR dostala i do dalších koutů světa a vznikly různé variace jako *S. rebaudiana* Morita nebo *S. rebaudiana* Criolla⁹. První pokus o začátek produkce SR proběhl v roce 1942 v Anglii, avšak neúspěšně¹⁰. Z roku 1964 jsou první zprávy o komerční kultivaci, a to konkrétně z Paraguaye, dále se zadařilo v Japonsku (1968). Dalšími pěstiteli byli Spojené státy americké, Brazílie, Korea, Mexiko, Čína, Kanada, Taiwan, Indie, Bangladéš, Španělsko, Francie, Spojené Království, Izrael a další (Obrázek 1, Obrázek 2, Obrázek 3)¹¹.



Obrázek 1: Americké státy (vyznačeny žlutě), které pěstují SR¹¹



Obrázek 2: Evropské státy (vyznačeny žlutě), které pěstují SR¹¹



Obrázek 3: Asijské státy (vyznačeny žlutě), které pěstují SR¹¹

4.1.4 Vzhled

SR (Obrázek 4) je víceletá bylina, která má až 100 cm vysoké lodyhy¹². Má silný kořen, válcovitého tvaru, který se téměř nevětví. Stonek je lehce zdřevnatělý⁶. Listy jsou 3 až 4 cm dlouhé a asi 1 cm široké. Jsou jednoduché, řapíkaté a vyrůstají vstřícně. Tvar čepele je kopinatý a okraj listu je zubatý. Jemné květy jsou uspořádané v úbořech, které tvoří okolíky. Je to květenství se dvěma až šesti trubkovitými květy. Plodem je nažka^{2,13}.



Obrázek 4: *Stevia rebaudiana* Bertoni – stévie sladká¹⁴

4.2 Chemické složení

4.2.1 Primární metabolity, minerály a vitamíny

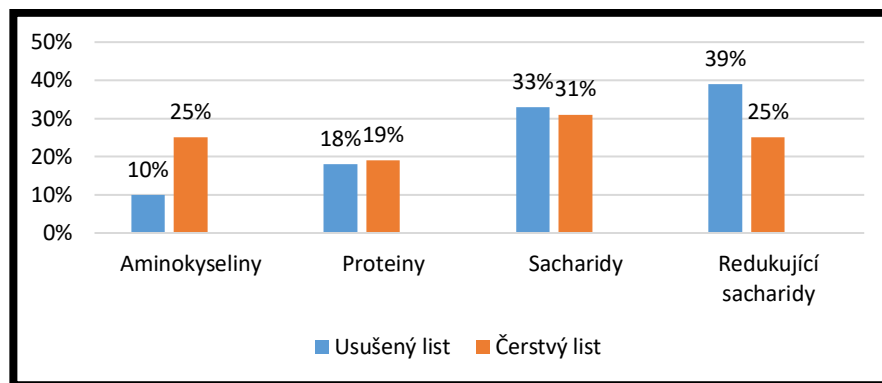
Listy z rostliny SR obsahují sacharidy, proteiny, aminokyseliny, tuky, minerály a vitamíny. Je nutné zmínit, že nutriční složení stéviových listů závisí na původu, genotypu, kultivačních podmínkách (složení půdy, podnebí) (*Tabulka 1*) a v neposlední řadě také na způsobu sušení (*Tabulka 2*)^{15,16}. Také je rozdíl mezi složením čerstvého a usušeného listu (*Graf 1*)¹⁷.

Tabulka 1: Složení usušených SR listů, podle jednotlivých autorů, přeloženo z (15)

Složka	Tadhani a Subhash (2006)	Goyal a Samsheer (2010)	Serio (2010)	Abou-Arab a kol. (2010)	Atteh a kol. (2011)
	% (suché váhy listu)				
Proteiny	20,4	11,2	11,2	11,4	16,0
Tuky	4,34	1,9	5,6	3,73	2,6
Popeloviny	13,1	6,3	-	7,41	15,5
Sacharidy	35,2	-	53	61,9	-
Vláknina	-	15,2	15	15,5	6,8
Vysvětlivky: - žádná data					

Tabulka 2: Složení stéviových listů v závislosti na metodě sušení, přeloženo z (15)

Složka	Na slunci	V troubě	V mikrovlnné troubě
	% (suché váhy listu)		
Proteiny	10,73	7,46	4,45
Tuky	6,13	4,39	4,18
Popeloviny	12,06	8,06	4,65
Sacharidy	63,10	69,85	73,99
Vláknina	5,03	5,26	4,35
Redukující cukry	4,50	4,80	5,30



Graf 1: Rozdíl ve složení čerstvého a usušeného listu, přeloženo z (17)

4.2.1.1 Sacharidy

„Sacharidy jsou první produkty fotosyntézy a mají význam jako zdroje energie, rezervní a stavební látky. Dalšími reakcemi z nich v rostlině vzniká celá řada dalších primárních látek, proteinů, tuků a sekundárních metabolitů.“¹⁸

Listy a kořeny SR obsahují fruktooligosacharidy (FOS), které mají řadu zajímavých vlastností, včetně nízké intenzity sladkosti, jsou také bez kalorií, nekariogenní a jsou považovány za rozpustnou vlákninu. Kromě toho, FOS mají významné prospěšné fyziologické účinky, jako je nízká karcinogenita, prebiotický účinek, zlepšují absorpci minerálů a snižují hladiny sérového cholesterolu, triacylglycerolů a fosfolipidů. V současné době jsou FOS stále více zařazovány do potravinářských výrobků včetně kojenecké výživy.¹⁹

4.2.1.2 Aminokyseliny a proteiny

Spojováním aminokyselin (AK) vznikají peptidy a proteiny. Proteiny mají v lidském těle mnoho důležitých funkcí, jako je funkce stavební (kolagen, elastin), motorická (aktin, myosin), informační (proteinové hormony), obranná (imunoglobuliny, komplement, antigeny) a transportní (albumin).²⁰

AK mají v těle také další funkce, např. ovlivňují srdeční činnost, podílí se na biochemických reakcích a jsou to výchozí látky pro tvorbu jiných aminokyselin. Jejich deriváty slouží jako neurotransmitery a látky ovlivňující růst buněk.²¹

V usušeném listu SR bylo zjištěno 9 esenciálních a 8 neesenciálních AK (Tabulka 3). Podle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) a Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou nezbytnými aminokyselinami leucin, isoleucin, valin, lysin, threonin, methionin, fenylalanin, histidin a tryptofan. Z tabulky (Tabulka 3) vidíme, že SR obsahuje kromě tryptofanu všechny důležité AK.²²

Tabulka 3: Aminokyseliny v usušeném listu SR, přeloženo z (22)

esenciální AK		neesenciální AK	
AK	AK/SR list	AK	AK/SR list
	g/100 g		g/100 g
arginin	0,45	kys. asparagová	0,37
lysin	0,70	serin	0,46
histidin	1,13	kys. glutamová	0,43
fenylalanin	0,77	prolin	0,17
leucin	0,98	glycin	0,25
methionin	1,45	alanin	0,56
valin	0,64	cystin	0,40
threonin	1,13	tyrosin	1,08
isoleucin	0,42		

4.2.1.3 Tuky

Tuky plní řadu biologických funkcí. Fungují jako zdroj a zásobárna energie, mají strukturální funkci jako součást buněčných membrán, chrání orgány a jsou to důležitá rozpouštědla vitamínů A, D, E a K.^{12,23}

V listech SR se vyskytuje několik volných mastných kyselin (MK) (Tabulka 4), které patří mezi základní strukturální jednotky tuků. Adekvátní příjem nenasycených mastných kyselin snižuje riziko ischemické choroby srdeční a zvyšuje imunitu.¹⁵

Tabulka 4: Obsah MK v oleji z SR listu, přeloženo z (15)

Mastné kyseliny	Tadhani a Subhash (2006)	Atteh a kol. (2011)
	Obsah MK v oleji z listu SR (%)	
Palmitová	27,51	29,50
Palmitoolejová	1,27	3,00
Stearová	1,18	4,00
Olejová	4,36	9,90
Linolová	12,40	16,80
Linolenová	21,59	32,60

4.2.1.4 Minerální látky

Minerální látky jsou esenciální, tudíž je musíme do těla dostávat z potravy. V lidském těle plní mnoho životně důležitých funkcí. Jsou zapojeny do všech aspektů růstu, zdraví a reprodukce, podílejí se také na tvorbě buněk, tkání a orgánů.¹⁵

V listech SR se vyskytuje mnoho těchto minerálních látek (*Tabulka 5*). Vysoký obsah draslíku stanovený ve všech studiích je pozoruhodný, i když množství draslíku nalezené u Abou-Arab a kol. a Atteh a kol se zdá být ve srovnání s ostatními studii velmi nízké, což lze vysvětlit různými růstovými podmínkami.¹⁵

Tabulka 5: Obsah minerálních látek v usušeném SR listu, přeloženo z (15)

Minerální látka	Mishra a kol. (2010)	Goyal a Samsher (2010)	Abou-Arab a kol. (2010)	Tadhani a Subhash (2006)	Atteh a kol. (2011)
	Obsah minerálních látek (mg·100 g ⁻¹)				
Draslík	1800	1780	21,15	2510	17,3
Vápník	464,4	544	17,7	1550	8,2
Sodík	190	89,2	14,93	160	0,7
Hořčík	349	349	3,26	-	2,4
Železo	55,3	3,9	5,89	36,3	366
Fosfor	11,4	318	-	350	2,6
Zinek	1,5	1,5	1,26	6,39	20

Zinek (Zn) je minerální látka, která působí jako neenzymatický antioxidant, takže jeho spotřeba by pomohla zabránit oxidačnímu poškození buňky. Zlepšuje paměť a pomáhá při kožních problémech⁶. Hlavní biologickou funkcí železa (Fe) je transport kyslíku do organismu. Nedostatek železa v potravě vede k anémii. V budoucnu by se mohly přípravky ze stévie používat k léčbě tohoto onemocnění¹². Mezi funkce vápníku (Ca) patří budování silných kostí a zubů, srážení krve, posílání a přijímání nervových signálů, uvolňování hormonů a jiných chemických látek, udržení normálního tepla a zajišťuje fungování svalů²⁴. Fosfor (P) se v lidském těle podílí na tvorbě kostí a zubů. Také ovlivňuje zpracování sacharidů a tuků²⁵. Draslík (K) je pro lidský organismus nepostradatelným minerálem. Je důležitý pro acidobazickou rovnováhu, správnou funkci srdce a svalů²⁶. Sodík (Na) slouží k regulaci krevního tlaku. Má také vliv na správnou funkci svalové a nervové soustavy²⁷. Hořčík (Mg) je potřebný pro více než 300 biochemických reakcí v těle. Pomáhá udržovat normální nervovou a svalovou funkci, podporuje zdravý imunitní systém, udržuje srdeční rytmus. Podílí se na regulaci hladiny glukózy²⁸.

4.2.1.5 Vitamíny

Vitamíny jsou organické látky, které si lidský organismus, až na výjimky, neumí sám vyrobit, proto je musí přijímat z potravy. Vitamíny jsou nezbytné pro život a v lidském těle mají mnoho funkcí.²⁹

Kyselina askorbová (vitamín C) působí jako antioxidant, podporuje imunitní systém a resorpci železa. Denní doporučená dávka (DDD) pro dospělé je 100 mg³⁰. Kyselina listová (vitamín B₉) je nezbytná pro tvorbu nukleových kyselin, syntézu kyseliny deoxyribonukleové (DNA) a také se účastní buněčného dělení. DDD pro dospělé je 400 µg³¹. Riboflavin (vitamín B₂) má klíčovou roli v oxidačním metabolismu. DDD pro dospělé je stanovena na 1,2 až 1,5 mg³². V usušeném listu SR jsou tři ve vodě rozpustné vitamíny (*Tabulka 6*)¹⁶.

Tabulka 6: Obsah vitamínů rozpustných ve vodě v extraktu z usušených listů SR, přeloženo z (16)

Vitamín	Obsah (mg·100 g ⁻¹)
C	14,98
B ₉	52,18
B ₂	0,43

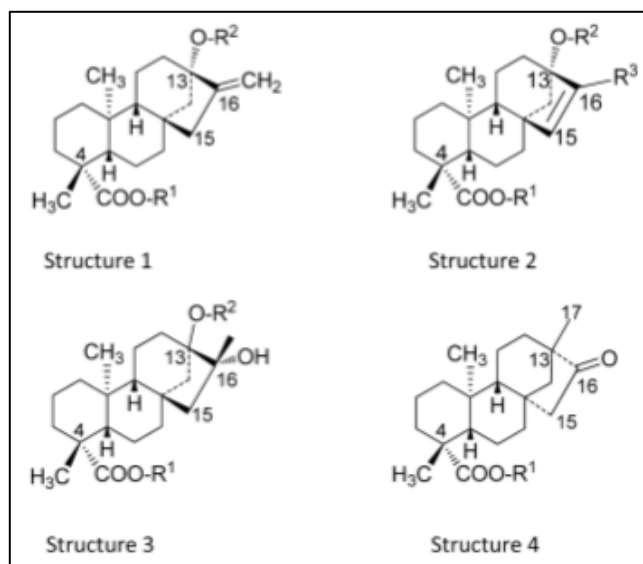
4.2.2 Sekundární metabolity

SR obsahuje mnoho látek. Většinu tvoří SG, kromě této skupiny látek obsahuje ještě neglykosidické diterpeny (sterebiny), jejichž obsah by se měl v budoucnu dalším šlechtěním minimalizovat, protože nebyl zjištěn žádný farmakologický účinek. Dále obsahuje polyfenolické sloučeniny (fenolické sloučeniny a flavonoidy), fytoosteroly, triterpeny a další látky.^{4,10,16}

4.2.2.1 Steviol-glykosidy

„Glykosidy jsou látky skládající se z cukerné a necukerné složky. Necukerná část molekuly se nazývá aglykon či genin.“¹⁸

SG jsou diterpenické glykosidy ent-kaurenového typu (*Obrázek 5*). Jejich obsah je proměnlivý, závisí na genotypu a kultivačních podmínkách (půda, podnebí). Dnes známe 35 SG (*Tabulka 7, Tabulka 8*), které se liší substitucí na R¹, R² nebo R³ (*Obrázek 5*). Nejznámější jsou steviosid a rebaudiosid A, jejichž obsah je nejvyšší.¹⁶



Obrázek 5: Čtyři základní struktury SG¹⁶

Tabulka 7: Steviol-glykosidy, přeloženo z (16)

Název	R ¹	R ²	Struktura
steviolmonosid	H	Glcβ1-	1
rubusosid	Glcβ1-	Glcβ1-	1
steviolbiosid	H	Glcβ1-2Glcβ1-	1
dulcosid A	Glcβ1-	Rhaα1-2Glcβ1-	1
(1c)	Glcβ1-	6-deoxyGlcβ1-2Glcβ1-	1
steviosid	Glcβ1-	Glcβ1-2Glcβ1-	1
rebaudiosid G	Glcβ1-	Glcβ1-3Glcβ1-	1
rebaudiosid B	H	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
dulcosid B	H	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
rebaudiosid A	Glcβ-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
(1b)	Glcβ-	Glcβ1-6Glcβ1-2Glcβ1-	1
(2b)	Glcβ-	Glcβ1-2(Fruβ1-3)Glcβ1-	1
rebaudiosid C	Glcβ-	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
(2c)	Glcβ-	6-DeoxyGlcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
(1f)	Glcβ-	Glcα1-3Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
(2f)	Glcβ-	Glcα1-4Glcβ1-3(Glcβ1-2)Glcβ1-	1
rebaudiosid L	Glcβ-	Glcβ1-6Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
rebaudiosid H	Glcβ-	Glcβ1-3Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
rebaudiosid F	Glcβ-	Xylβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1

Název	R ¹	R ²	Struktura
rebaudiosid E	Glcβ-2Glcβ1-	Glcβ1-2Glcβ1-	1
(1a)	Xylβ1-6Glcβ1-	Glcβ1-2Glcβ1-	1
rebaudiosid D	Glcβ1-2Glcβ1	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
rebaudiosid I	Glcβ1-3Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
rebaudiosid K	Glcβ1-2Glcβ1-	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
(1d)	Rhaα1-2Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
rebaudiosid J	Rhaα1-2Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
rebaudiosid N	Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
rebaudiosid M	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
rebaudiosid O	Glcβ1-3Rhaα1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	1
Vysvětlivky: Glc – glukóza, Rha – rhamnóza, Xyl – xylóza			

Tabulka 8: Steviol-glykosidy se změnou v základní struktuře, přeloženo z (16)

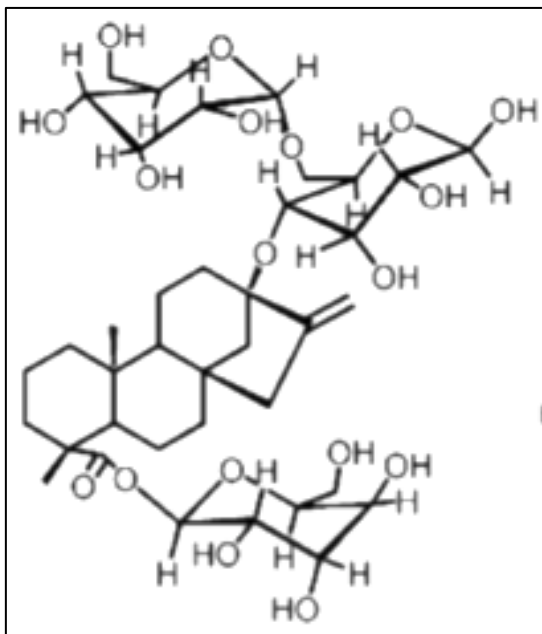
Název	R1	R2	R3	Struktura
2	Glcβ-	Glcβ1-2-Glcβ1-	CH ₂ OH	2
3	Glcβ-	Glcβ1-2-Glcβ1-	CHO	2
4	Glcβ-	Glcβ1-2-Glcβ1-	CH ₃	2
1	H	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-	CH ₃	2
2	H	Glcβ1-2(Glcβ1-3)Glcβ1-		3
3	Glcβ-			4
Vysvětlivky: Glc – glukóza				

4.2.2.1.1 Steviosid

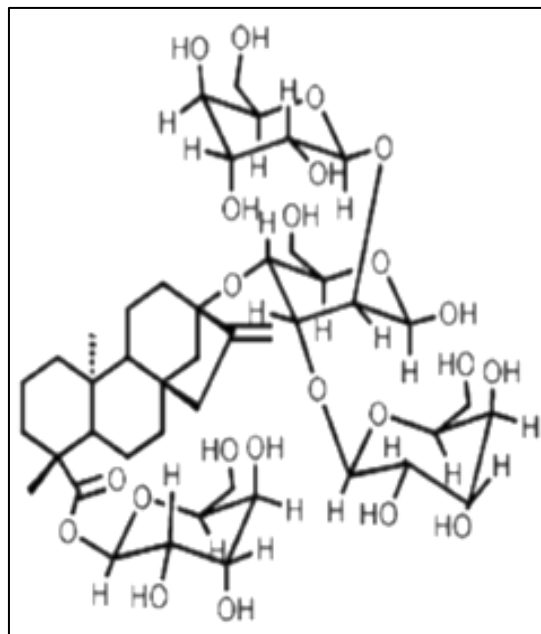
Steviosid (Obrázek 6) představuje 4–13 % všech glykosidů v SR. Má hořkou pachut'. Srovnávací organoleptické analýzy ukázaly, že čistý steviosid je 300krát sladší než sacharóza v koncentraci 0,4 %, 150krát sladší než sacharóza v koncentraci 4 % a 100krát sladší než 10 % roztok sacharózy³³. Molekuly steviosidu jsou vysoce stabilní ve vodných roztocích v širokém rozmezí pH (1–10) a při teplotách až 198 °C. Steviosidy jsou stabilní při různých podmínkách zpracování a skladování a v interakcích s vitaminy rozpustnými ve vodě, organickými kyselinami, sladidly a kávou. Během tepelného zpracování se nepodílí na Maillardových reakcích. Navíc steviosidy nefermentují^{34,15}

4.2.2.1.2 Rebaudiosidy

Všechny rebaudiosidy mají vyšší sladivost než sacharóza¹². Rebaudiosid A (Obrázek 7) je nejdůležitější rebaudiosid, je 250 až 450krát sladší než sacharóza a v sušině listu SR se ho nachází 2–4 %. Je to nejstabilnější glykosid, který nemá hořkou pachut', na rozdíl od steviosidu¹⁵.



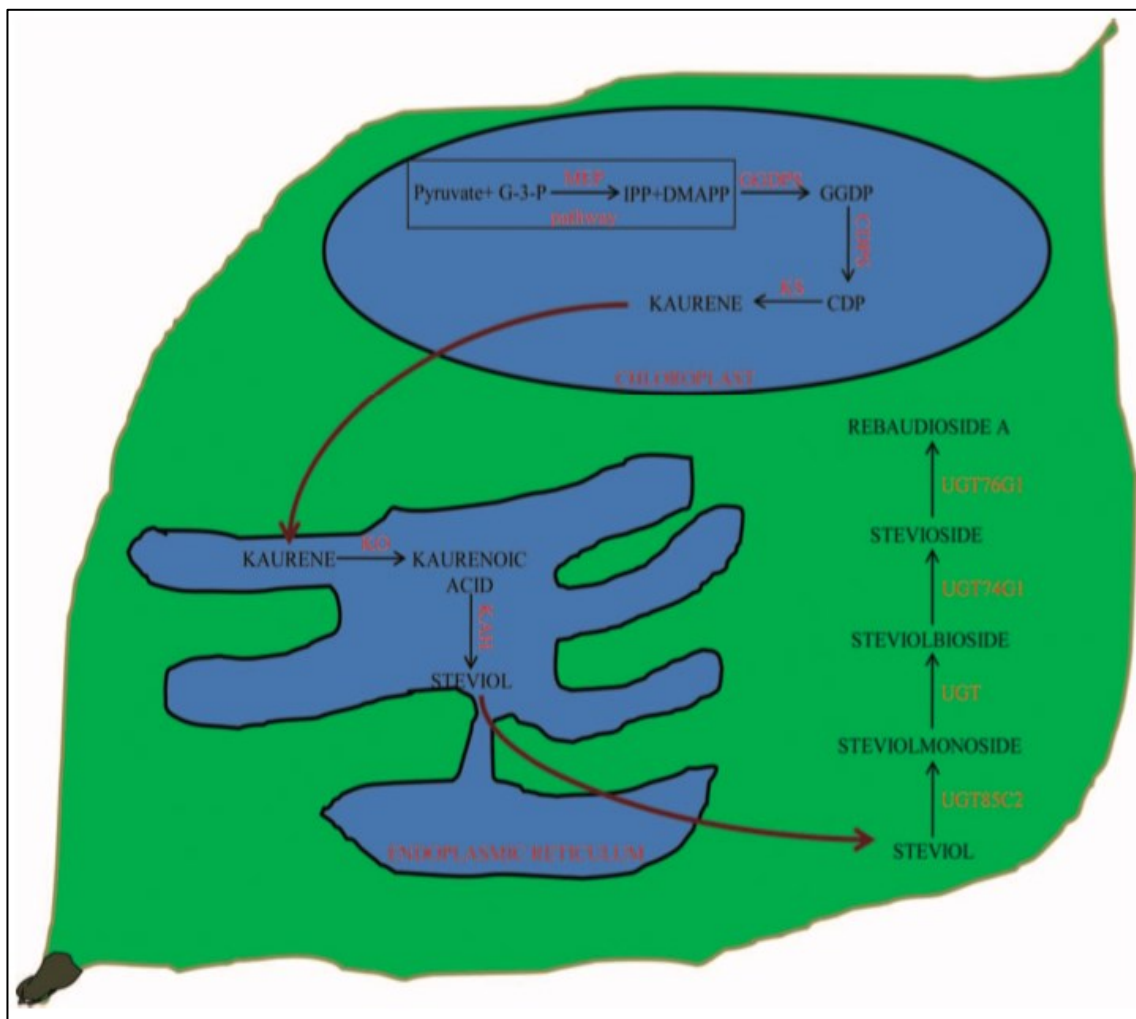
Obrázek 6: Steviosid³⁵



Obrázek 7: Rebaudiosid A³⁵

4.2.2.1.3 Biosyntéza SG

Biosyntéza SG probíhá v několika krocích v listech (Obrázek 8), odkud se SG dostávají do dalších částí rostliny. Nejvíce jsou tedy SG obsaženy v listech, malé množství ve stonku a nedetekovatelné množství je v kořenu. Jednotlivé části biosyntézy probíhají v různých strukturách listu. Biosyntéza začíná v chloroplastu, kde vzniká v sedmi krocích methylerythritol (MEP), který je přeměněn díky enzymu 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrofosfátreduktáze na isopentenyl pyrofosfát (IPP) a dimethylallyl pyrofosfát (DMAPP). Přes geranylgeranyl difosfát (GGDP), který je zacyklen na kauren, který je v endoplazmatickém retikulu oxidován na kyselinu kaurenovou. Kyselina kaurenová je v poloze C-13 hydroxylována hydroxylázou kyseliny kaurenové (KAH) a mění se na steviol. Poté nastávají glykosylační reakce, díky čtyřem typům enzymu glukuronyltransferázy (UGT). Postupně vznikají jednotlivé SG.^{4,36–38}



Obrázek 8: Biosyntéza SG⁴

4.2.2.1.4 Metabolismus SG

SG jsou eliminovány podobnými metabolickými reakcemi u lidí a zvířat³⁹. Rebaudiosid A je nejprve metabolizován střevními mikroorganismy na steviosid, který se následně rozkládá na glukózu a steviol. Výsledná glukóza je konzumována bakteriemi tlustého střeva a není absorbována do systémové cirkulace⁴⁰. Studie u lidí i myší ukázaly, že přeměna steviosidu na steviol je rychlejší ve srovnání s přeměnou rebaudiosidu A na steviosid. Studie ukázala, že steviol je konečným produktem metabolismu SR^{40,41}. Tento výzkum navíc ukázal, že většina SG je absorbována a podléhá glukuronidaci v játrech. Glukokronidované metabolity jsou filtrovány ledvinami a nakonec se vylučují močí³⁵.

Hutapea a kol. zkoumali *in vitro* stravitelnost steviosidu různými trávicími enzymy. Žaludeční tekutina ani trávicí enzymy nerozložily steviosid. Přestože lidský mikrobiom gastrointestinálního traktu hydrolyzuje steviol na steviol-16,17-epoxid, tak se stejně znovu přemění na původní sloučeninu a vyloučí se močí v glukuronidované formě. Tyto výsledky naznačují, že steviol může být jediným metabolitem střevní mikroflóry různých živočišných druhů včetně lidí.⁴²

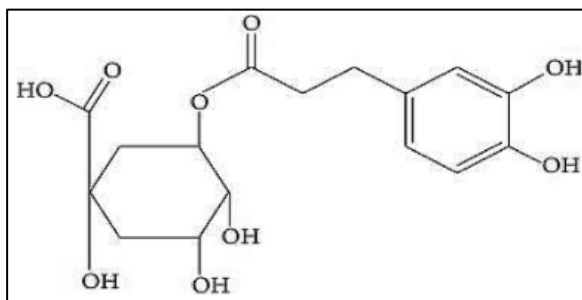
4.2.2.2 Polyfenolické látky

Polyfenolické sloučeniny plní v rostlinách rozličné funkce. Mají antioxidační aktivitu, chrání před UV zářením, patogeny a býložravci (taniny). Lignany mají strukturní funkci (výztuha). V lidském organismu mají různé biologické účinky.⁴³

4.2.2.2.1 Fenolické sloučeniny

Hlavní fenolickou sloučeninou je pyrogallol, který má antiseptické účinky (951,27 mg/100 g vodného extraktu suchého základu). Následovaný kyselinou 4-methoxybenzoovou (33,80 mg / 100 g), kyselinou p-kumarovou (30,47 mg/100 g), 4-methylcatecholem (25,61 mg/100 g) a kyselinou sinapovou a skořicovou.⁴⁴

V jiné studii bylo zjištěno 24 chlorogenových kyselin (CGA) (Obrázek 9)⁴⁵. CGA má několik důležitých terapeutických účinků, jako je antioxidační, antibakteriální, hepatoprotektivní, kardioprotektivní, protizánětlivý, antipyretický, neuroprotektivní, antiobezitní, antivirový, antimikrobiální a antihypertenzní. Spekuluje se, že CGA může hrát klíčovou roli v regulaci metabolismu lipidů a glukózy, a tak pomáhat při léčbě mnoha poruch, jako je jaterní steatóza, kardiovaskulární onemocnění, diabetes a obezita.⁴⁶



Obrázek 9: Chemická struktura CGA⁴⁶

4.2.2.2.2 Flavonoidy

Tato skupina sloučenin je široce přítomna v ovoci, zelenině, semenech, ořechách, koření aj. Tyto sloučeniny mají plno účinků na lidský organismus, například antioxidační a protizánětlivý účinek, některé snižují krevní tlak a působí antiagregačně. Flavonoidy detekované v listech SR patří do podskupin flavonolů (luteolin, apigenin) a flavonů (kvercetin a jeho deriváty).^{16,18}

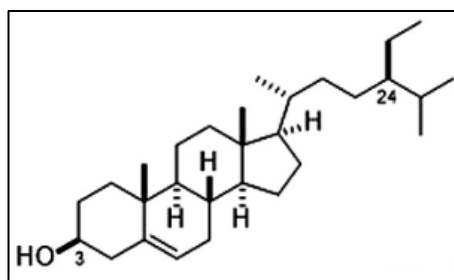
Luteolin má antioxidační, protirakovinné, protizánětlivé a neuroprotektivní účinky⁴⁷. Apigenin vzbudil v posledních letech zvláštní zájem jako látka podporující zdraví. Bylo prokázáno, že má několik biologických účinků, a to antitrombotický, antidepressivní, protizánětlivý, hepatoprotektivní, protirakovinný, antioxidační a estrogenní. Navíc by mohl inhibovat syntézu cholesterolu⁴⁸.

Kvercetin a jeho deriváty se účastní několika fyziologických funkcí. Má široké spektrum biologických účinků, jako jsou protizánětlivé, antiinfekční, antioxidační, protinádorové, neuroprotektivní, antihypertenzní účinky a také snižuje krevní glukózu.⁴⁹

4.2.2.3 Fytosteroly

Fytosteroly, rostlinné analogy cholesterolu, se široce vyskytují v lidské stravě⁵⁰. SR obsahuje β -sitosterol, stigmasterol, lanosterol¹⁶.

β -sitosterol (Obrázek 10) je nejrozšířenější rostlinný sterol v lidské stravě. V klinických studiích prokázal významný vliv na snížení příznaků benigní hyperplazie prostaty. Na zvířecích modelech byly prokázány protizánětlivé a analgetické účinky. Příjem β -sitosterolu může být také částečně zodpovědný za snížený výskyt rakoviny prostaty, tlustého střeva a prsu u vegetariánů a u mužů a žen v asijských zemích, kteří konzumují mnohem více β -sitosterolu než většina západních obyvatel⁵¹. Příjem stigmasterolu a β -sitosterolu zmírňuje kolitidu⁵⁰.



Obrázek 10: β -sitosterol⁵¹

Lanosterol by v budoucnu mohl sloužit k potlačení agregace a cytotoxicity špatně složených proteinů spojených s neurodegenerativními onemocněními.⁵²

4.2.2.4 Triterpeny

SR obsahuje β -amyrin¹⁶. Tato látka má hypolipidemické, hepatoprotektivní, protizánětlivé, antikonvulzivní, antihyperglykemické, antidepressivní, gastroprotektivní a analgetické účinky⁵³.

4.2.2.5 Těkavé látky

Čtyřicet různých složek bylo identifikováno ve frakci esenciálního oleje pěti různých genotypů SR, přičemž hlavními složkami byly spathulenol (13,4–40,9 %), karyofylenoxid (1,3–18,7 %), β -karyofylen (2,1–16,0 %) a β -pinen (5,5–21,5 %).¹⁶

4.3 Extrakce bioaktivních sloučenin

Trh v dnešní době vyžaduje zdravé a funkční produkty, takže SR je považována za rostlinu s bioaktivními sloučeninami (BAS), které by mohly být přidány k různým výrobkům.⁵⁴

Extrakce BAS z rostlinného materiálu je prvním krokem před jakýmkoliv vědeckým výzkumem léčivých bylin. Látky izolované extrakcí mohou být použity jako přídatné látky do potravin, pomocné látky při výrobě farmaceutických a kosmetických výrobků nebo jako fytochemikálie. Tyto chemické sloučeniny mají pozitivní vliv na určité fyziologické funkce lidského těla.⁵⁵

Extrakce je rychlou a účinnou metodou používanou k separaci a koncentraci extrahovaných látek, přičemž jedna nebo více látek se z materiálu, ve kterém jsou přítomny, přenesou do kapalné fáze extrakčního rozpouštědla. Následně je vyžadována separace a izolace látek z kapalné fáze⁵⁶. Pro účinnou extrakci je nezbytné optimalizovat podmínky zpracování, jako je poměr pevná látka:kapalina, fyzikálně-chemické vlastnosti rozpouštědla, doba extrakce a teplota⁵⁷.

Pro získání extraktů ze SR se používaly běžné (klasické) extrakční techniky založené na maceraci a zahřívání⁵⁸. Tyto extrakční techniky však vedly k nízké účinnosti, o čemž svědčí velké použití organických rozpouštědel a zdlouhavé zpracování. Používají se tedy nové extrakční techniky, jako jsou: extrakce pomocí mikrovln, studené plazmy nebo enzymů. Dále tlaková extrakce horkou vodou (PHWE) a extrakce superkritickou tekutinou (SFE). Nové extrakční techniky poskytují vyšší účinnost, nižší spotřebu energie (ve srovnání s klasickými), vyšší výtěžek, lepší kontrolu teploty a extrakty vyšší kvality⁵.

4.4 Stanovení SG

Je známo několik metod pro stanovení kvantitativního obsahu glykosidů v rostlinném materiálu. Stanovení steviosidu, rebaudiosidu A a steviolu bylo pečlivě sledováno různými metodami, včetně enzymatické hydrolýzy a chemické detekce, plynové chromatografie (GC), přetlakové TLC (chromatografie na tenké vrstvě), densitometrie, kapilární elektroforézy, ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) a blízké infračervené spektroskopie (NIRS)¹². Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je metodou volby pro stanovení SG, je nejjednodušší a nejspolehlivější¹⁶.

U metody HPLC byly počáteční chromatogramy připraveny na kolonách, kde stacionární fáze byla s aminy nebo se jednalo o reverzní fázi (C18) v kombinaci s UV detektorem. Všechny metody, které před rokem 2010 navrhl JECFA (Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva), jsou také s aminy⁵⁹. Stacionární fáze založené na aminech mají vysokou selektivitu pro všechny SG a poskytují dobrou separaci nejvíce vyskytujících se izomerních párů: rebaudiosid B a steviosid, rebaudiosid A a rebaudiosid E. Pořadí separace závisí především na polaritě. Čím více Glc jednotek je připojeno k hlavní struktuře ent-kaurenu, tím vyšší je jejich retenční čas na koloně. Proto steviosid (3 Glc jednotky) eluuje před rebaudiosidem A (4 Glc jednotky) a oba jsou dobře oddělené. Naneštěstí kolony na bázi aminoskupin trpí špatnou reprodukovatelností a nemůžou být použity v kombinaci s hmotností spektrometrií (MS) v důsledku jejich silného krvácení (únik stacionární fáze). Navíc nejsou vhodné pro stanovení aglykonu steviolu. Steviol je na těchto kolonách špatně zadržován a dochází k souběhu s některými nesespecifickými píky matrice⁶⁰. Na rozdíl od kolony s aminy je pořadí retence na fázi C18 invertováno. Je tedy možné detekovat i steviol. Kolony s reverzní fází jsou robustní, ale vykazují nízkou selektivitu s ohledem na separaci steviosidu a rebaudiosidu A. Tento problém lze vyřešit gradientovou elucí^{61,62} nebo použitím dvou kolon v sérii⁶³.

V posledních letech se na trhu objevilo mnoho nových kolon: kolony používané na hydrofilní interakční chromatografii (HILIC) jsou obecně kolony založené na „normální“ fázi (polární). Jejich retenční pořadí je v souladu s kolonami s aminy, ale jsou robustnější a méně krvácejí, takže se dají použít s MS. Dále kolony s amidy C16 (reverzní fáze).⁶⁰

K detekci se používá UV detektor, aerosolový detektor nabitých částic (CAD), pulzní amperometrický detektor (PAD), MS nebo kombinace UV a MS. MS je nejcitlivější metodou detekce SG.¹⁶

4.5 Toxicita a bezpečnost

Bezpečnost SG byla potvrzena v mnoha toxikologických studiích, včetně studií akutní a subakutní toxicity, reprodukční toxicity, genotoxicity a karcinogenity. SG proto splňují bezpečnostní standard JECFA.⁶⁴

4.5.1 Akutní toxicita

Testy akutní toxicity určují dávku, při které polovina zvířat umírá, tzv. LD₅₀ nebo střední letální dávka.⁶⁵

Toskulka a kol. zkoumali akutní toxicitu steviosidu (96% čistota) a steviolu (90% čistota) u tří druhů zvířat, a to u potkanů, myši a křečků. Citlivost na akutní toxicitu steviosidu a steviolu byla porovnána u obou pohlaví těchto druhů. Steviosid a steviol byl podán zvířatům intragastricky a poté byly pozorovány obecné znaky a symptomy. Pro stanovení LD₅₀ byl během 14 dnů od podání sledován počet mrtvých zvířat. Steviosid v dávce až 15 g/kg tělesné hmotnosti (TH) nebyl smrtelný pro myši, potkany ani křečky. Bylo zjištěno, že křečci jsou ke steviolu náchylnější než potkani a myši. Hodnoty LD₅₀ steviolu u křečků byly 5,20 a 6,10 g/kg TH pro samce a samice. U potkanů a myši byly hodnoty LD₅₀ steviolu vyšší než 15 g/kg TH u obou pohlaví. Histopatologické vyšetření odhalilo v ledvinách křečků těžkou degeneraci buněk proximálního tubulu vyvolanou steviolem. Tyto strukturní změny korelovaly se zvýšením močovinového dusíku a kreatininu v séru. Proto možnou příčinou smrti, vyvolanou steviolem, může být akutní selhání ledvin.⁶⁶

Cílem studie od Bazoteho a kol. bylo zjistit akutní toxicitu isosteviolu u myši, potkanů a psů. Potkanům a myším byl isosteviol podáván perorálně, intraperitoneálně a intravenózně. Psům byl podáván pouze perorálně. U perorálního podání nebylo pozorováno žádné úmrtí, což naznačuje nízkou toxicitu při podání touto cestou. LD₅₀ u potkanů a myši pro intraperitoneální podání byla 273 a 230 mg/kg TH a pro intravenózní podání byla 55 a 90 mg/kg TH. Rozdíly v toxicitě isosteviolu jednotlivých cest podání, naznačují, že při perorálním podání se isosteviol nedostane do krevního oběhu. Nejspíše se chová jako steviol, který je rychle vylučován do žluči a eliminován.⁶⁷

4.5.2 Subakutní a chronická toxicita

Pro hodnocení subakutní a chronické toxicity se stanovují nejvyšší dávky léčiv, při kterých se ještě na zvířatech neobjevují negativní účinky (NOEL, no observed effect level). NOEL je důležitá k určení ADI (acceptable daily intake, přijatelná denní dávka).⁶⁵

Studie subakutní toxicity byly prováděny s čistým steviosidem podávaným potkanům v denních dávkách během 3 měsíců. V jedné studii steviosid tvořil až 7 % potravy. V jiné studii byli potkani krmeni 2,5 g/kg TH/den čistého steviosidu. Žádná

z těchto dvou studií nevykazovala účinek související s dávkami steviosidu u testovaných zvířat. To znamená, že NOEL je vyšší než 2,5 g/kg TH/den a ADI lze vypočítat jako 25 mg/kg tělesné hmotnosti.⁶⁵

V další studii byla po dobu 2 let podávána skupinám potkanů (45 samců a 45 samic) strava obsahující různý podíl steviosidu (85% čistota). Steviosid tvořil 0 (kontrolní skupina), 0,2, 0,6 nebo 1,2 % stravy. Po 6, 12 a 24 měsících bylo pět potkanů z každé skupiny usmrceno a použito na hematologické a biochemické testy. Růst, využití a spotřeba potravin, celkový vzhled a mortalita byly u léčených a kontrolních skupin podobné. Průměrná délka života potkanů, kteří dostávali steviosid, se významně nelišila od kontrolních skupin. V žádné fázi studie nebyly pozorovány změny, které by souvisely s podáváním steviosidu, v hematologických nebo biochemických hodnotách. ADI steviosidu u lidí byla stanovena na 7,938 mg/kg TH/den.⁶⁸

Curry a kol hodnotili ve dvou studiích toxicity bezpečnost rebaudiosidu A (97% čistota). Ve čtyřtýdenní studii byl krysám Wistar podáván rebaudiosid A v koncentracích 0, 25.000, 50.000, 75.000 a 100.000 ppm (parts per milion, díl na milion dílů). Hodnota NOEL byla stanovena na 100.000 ppm. Ve třináctitýdenní studii byl potkanům Wistar podáván rebaudiosid A v koncentracích 0, 12.500, 25.000 a 50.000 ppm. Snížení přírůstku tělesné hmotnosti způsobené počáteční averzí k chuti a nižší kalorickou hustotou stravy bylo pozorováno u skupin s vysokou dávkou rebaudiosidu A u samců i samicích skupin. Nestejnoměrné snížení hladin žlučových kyselin a cholesterolu v séru bylo přičítáno fyziologickým změnám metabolismu žlučových kyselin v důsledku vylučování vysokých hladin rebaudiosidu A játry. Všechny ostatní výsledky testů jaterních funkcí a histopatologie jater byly v normálních mezích. Nebyly pozorovány žádné významné změny při makroskopických a mikroskopických vyšetřeních všech orgánů, včetně varlat a ledvin. NOEL ve třináctitýdenní studii toxicity byla určena na 50.000 ppm nebo přibližně 4.161 a 4.645 mg/kg TH/den u samců a samic.⁶⁹

Daší studie na bezpečnost rebaudiosidu A probíhala 90 dní, během kterých byl rebaudiosid A podáván potkanům Sprague-Dawley. Potkani byli rozděleni do 4 skupin, kde každou tvořilo 20 samic a 20 samců. Dostávali 0, 500, 1.000 a 2.000 mg/kg TH/den rebaudiosidu A. Nebyly pozorovány žádné účinky související s podáváním rebaudiosidu A na celkový stav a chování zvířat. Vyhodnocení parametrů z klinické patologie neodhalilo žádné toxikologicky relevantní účinky. Makroskopické a mikroskopické nálezy neprokázaly žádné účinky související s podáváním rebaudiosidu A u žádného hodnoceného orgánu. Nižší průměrné přírůstky tělesné hmotnosti v průběhu studie byly zaznamenány u samců ve skupině s dávkou 2.000 mg/kg TH/den. Vzhledem k malé velikosti rozdílu ve srovnání s kontrolními skupinami se však tento účinek nepovažoval za nežádoucí. Výsledky této studie jasně ukazují, že podávání vysokých koncentrací rebaudiosidu A po dobu 90 po sobě jdoucích dnů potkanům Sprague-Dawley nebylo spojeno se žádnými známkami toxicity.⁷⁰

Nikiforov a kol. porovnali bezpečnost rebaudiosidu D a rebaudiosidu A. Studie trvala 28 dní a bylo vytvořeno pět skupin, kde každou tvořilo 10 samic a 10 samců potkanů Sprague-Dawley. Čtyřem skupinám byl podáván rebaudiosid D v dávkách 0, 500, 1.000 a 2.000 mg/kg TH/den potkanům Sprague-Dawley. Páté skupině byl podáván rebaudiosid A v denních dávkách 2.000 mg/kg TH/den. Nebyly pozorovány žádné účinky související s podáváním rebaudiosidu A nebo D na celkový stav a chování zvířat. Makroskopické a mikroskopické nálezy neprokázaly žádné účinky související s podáváním rebaudiosidu A nebo D u žádného hodnoceného orgánu. Výsledky byly srovnatelné mezi skupinou, které bylo podáváno 2.000 mg/kg TH/den rebaudiosidu D a skupinou, které byl podáván rebaudiosid A ve stejné dávce (2.000 mg/kg TH/den).⁷¹

4.5.3 Reprodukční toxicita

Yodyingyuad a kol. zkoumali vliv steviosidu (90% čistota) na růst a reprodukci u křečků. Čtyři skupiny po 20 jednoměsíčních křečcích (10 samců a 10 samic) byly denně krmeny steviosidem (0, 0,5, 1,0 a 2,5 g/kg TH/den). U obou pohlaví nebyly zjištěny žádné abnormality v růstu a fertilitě. Všichni samci se se samicemi spáрили úspěšně. Samice vykazovaly normální čtyřdenní cykly a po páření otěhotněly. Každá samice během experimentu vrhla mláďata třikrát. Délka těhotenství, počet plodů, stejně jako počet mláďat se v experimentálních skupinách významně nelišily od těch v kontrolní skupině. Mladí křečci z 1. a 2. generace nepřetržitě dostávali steviosid prostřednictvím pitné vody až do jednoho měsíce a poté jim byly denně dávány stejné dávky jako jejich rodičům. Histologické vyšetření reprodukčních tkání ze všech tří generací neodhalilo žádné známky abnormality, které by mohly být spojeny s konzumací steviosidu. Steviosid v dávce až 2,5 g/kg TH/den neovlivňuje růst ani reprodukci u křečků.⁷²

Usami a kol. zkoumali teratogenitu steviosidu na těhotných potkanech Wistar. Těhotným potkanům byl podáván steviosid rozpuštěný v destilované vodě. Byl podáván jednou denně od šestého do patnáctého dne těhotenství žaludeční sondou v dávkách 0, 250, 500 a 1.000 mg/kg TH/den. Těhotné samice byly usmrceny dvacátého dne těhotenství a jejich plody byly vyšetřeny na malformace. Steviosid nezpůsobil zvýšený výskyt fetálních malformací a neměl žádné toxické účinky na březí samice a jejich plody. Byl učiněn závěr, že steviosid podávaný těhotným potkanům žaludeční sondou v dávce až 1.000 mg/kg TH/den nepůsobí na potkany teratogenicky.⁷³

Ve studii od Curry a kol. byl rebaudiosid A podáván samcům a samicím potkanům Han Wistar v koncentracích 0, 7.500, 12.500 a 25.000 ppm po dvě generace. Užívání rebaudiosidu A nebylo spojeno se žádnými příznaky klinické toxicity, nežádoucími účinky na tělesnou hmotnost nebo konzumaci potravin. Na reprodukční parametry, včetně páření, fertility, délky gestace, estrálních cyklů nebo motility, koncentrace a morfologie spermií nebyly ani v jedné generaci pozorovány účinky související

s užíváním rebaudiosidu A. Užívání rebaudiosidu A neovlivnilo přežití a celkový stav potomků, jejich vývoj v období před odstavením, celkový nárůst tělesné hmotnosti a načasování sexuálního dospívání. Hodnota NOEL je tedy 25.000 ppm neboli 2.048 až 2.273 mg/kg TH/den.⁷⁴

4.5.4 Genotoxicita

Bezpečnost SG byla v literatuře rozsáhle popsána. Bylo provedeno mnoho *in vitro* a *in vivo* studií na genotoxicitu SG (především steviosidu a rebaudiosidu A). Národní a mezinárodní agentury pro bezpečnost potravin a přibližně 20 skupin odborníků dospěly k závěru, že SG, včetně široce používaných sladidel steviosidu a rebaudiosidu A, nejsou genotoxické. Na základě vybraných studií byly v nejnovějších publikacích vyjádřeny obavy, že SG mohou být mutagenní, proto bylo navrženo, aby k dokončení profilů bezpečnosti byly vyžadovány další studie genotoxicity *in vivo*.⁷⁵

Ve své zprávě z roku 2005 JECFA na základě předložených informací konstatoval, že steviosid a rebaudiosid A nejsou genotoxické ani *in vitro*, ani *in vivo*.⁷⁶

Brusick zhodnotil celkem šestnáct studií o genotoxicitě steviosidu, dvě z nich potvrdily genotoxickou aktivitu⁷⁷. Awney a kol. prezentovali údaje, které prokazují, že po spotřebě rebaudiosidu A nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky⁷⁸.

Ve studii od Suttajit a kol. byly steviosid a steviol testovány na mutagenitu u kmenů *Salmonella typhimurium* TA98 a TA100 a na chromozomální účinky na kultivované lidské lymfocyty. Steviosid (99% čistota) nebyl mutagenní při koncentracích do 25 mg/miska, ale vykazoval pozitivní výsledky u kmene TA98 při 50 mg/miska. Výsledky analýzy dat ukázaly čtyřnásobný vzestup revertantů bez přidání S-9 směsi (směs S-9 připravená z jater potkanů předem ošetřených fenobarbitalem sodným a 5,6-benzoflavonem) a dvojnásobné zvýšení revertantů po přidání S-9 směsi oproti kontrolnímu vzorku. Steviol nevykazoval mutagenitu u TA98 ani TA100, s nebo bez metabolické aktivace (S-9). Suttajit a kol. také uvedli, že steviosid v koncentracích 1, 5 a 10 mg/ml nezpůsobil žádné chromozomální aberace. Žádné chromozomální změny nezpůsobil ani steviol v koncentracích 0,1 mg/ml a 0,2 mg/ml. Tato studie ukazuje, že steviosid a steviol nejsou v omezených dávkách mutagenní.⁷⁹

Oproti tomu Klongpanichpak a kol. na základě výsledků dospěli k závěru, že steviosid není mutagenní u kmene *Salmonella typhimurium* TA98 v koncentraci 50 mg/destička, i když se používá S-9 směs z myší, křečků, potkanů a morčat.⁸⁰

Matsui a kol. uvedli, že dávky steviosidu do 5 mg/destička nebyly mutagenní u kmenů *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102 a TA104 s nebo bez S-9, dále u kmenů *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537 a u kmene *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101 s přídavkem S-9. Steviosid v koncentraci 10 mg/ml nebyl mutagenní v kmenu *Salmonella typhimurium* TM677 s nebo bez S-9. Negativní výsledky

byly také stanoveny v testu umu s nebo bez S-9, spore a streak rec assay s nebo bez S-9 při koncentraci steviosidu 10 mg/papírový disk.⁸¹

Williams a Burdock zkoumali genotoxický potenciál rebaudiosidu A ve třech *in vitro* a dvou *in vivo* testech (prováděných podle doporučených postupů Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD)). Bylo zjištěno, že tato sloučenina v koncentracích do 5.000 µg/ml nebyla mutagenní v testu chromozomální aberace s použitím buněk V79 křečka čínské, v Amesově testu s použitím *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium* a v testu myšního lymfomu s použitím L5178Y +/- buněk s nebo bez metabolické aktivace (S-9). Navíc rebaudiosid A nebyl genotoxický v mikronukleovém testu kostní dřeně u myši v dávkách do 750 mg/kg TH a v neplánovaném testu syntézy DNA u potkanů v dávkách do 2.000 mg/kg TH. Tato studie poskytuje dostatek důkazů, že rebaudiosid A v testovaných dávkách není genotoxický.⁸²

4.5.5 Karcinogenita

Karcinogenní účinky steviosidu byly studovány na močovém měchýři u potkanů Fischer 344. Po dobu 36 týdnů jim byl podáván steviosid (5 % ve stravě). Výsledky ukázaly, že steviosid nezvyšuje vývoj preneoplastických nebo neoplastických lézí v močovém měchýři, když se podává samotný nebo když se aplikuje po iniciační dávce karcinogenu močového měchýře N-nitrosobutyl-N-(4-hydroxybutyl)aminu⁸³. Studie tohoto typu však nejsou dostatečné pro posouzení karcinogenního rizika³.

Výsledek kombinované dvacetičtyřměsíční studie perorální karcinogenity a chronické toxicity steviosidu (85% čistota) u potkanů Wistar ukázal, že v žádné tkáni potkana nebyly pozorovány preneoplastické nebo neoplastické léze. Nedostatečná toxicita byla také pozorována v subchronických studiích po podání maximální dávky 600 mg/kg TH/den⁶⁸. Nicméně tato nejvyšší dávka je relativně nízká vzhledem k nedostatku toxicity pozorované ve studiích subchronické toxicity prováděných při mnohem vyšších dávkách³.

Ve 13 týdenní studii karcinogenity u potkanů Fischer 344, kterým byly podávány dietní dávky steviosidu do 5 % (2500 mg/kg TH/den), nebyly vyvolány žádné závažné nežádoucí účinky⁸⁴. Výsledky této studie byly použity pro stanovení dávek pro dvacetičtyřměsíční studii karcinogenity provedené u tohoto potkaního kmene se steviosidem (95,6% čistota). Dietní dávky používané ve studii karcinogenity byly 0, 2,5 a 5 % (tedy 0, 970 a 2.000 mg/kg TH/den pro samce a 0, 1.100 a 2.400 mg/kg TH/den pro samice). Steviosid byl podáván *ad libitum* (podle vlastní vůle) po dobu 104 týdnů a všechna přeživší zvířata byla usmrcena po 108 týdnech. Vysoká dávka (5 %) byla stanovena jako maximální tolerovaná dávka založená na mírném snížení přírůstku tělesné hmotnosti. Spotřeba potravy se nezměnila, ale při vysoké dávce bylo pozorováno

významné snížení míry přežití u samců. Nebyly pozorovány žádné důkazy o zvýšeném výskytu neoplastických lézí a autoři došli k závěru, že steviosid není karcinogenní⁸⁵.

4.5.6 Prohlášení JECFA, SCF a EFSA

4.5.6.1 JECFA

Ve zprávě JECFA z roku 1999 je uvedeno, že v důsledku nedostatečných informací ohledně steviosidu nemohla být stanovena hodnota ADI. V některých studiích byl totiž testovaný materiál (steviosid nebo steviol) špatně specifikovaný nebo proměnlivé kvality a nebyly k dispozici žádné informace o jiných složkách nebo kontaminujících látkách. Kromě toho nebyly k dispozici žádné studie lidského metabolismu steviosidu a steviolu. Informace o dlouhodobé toxicitě a karcinogenitě steviosidu byly pouze u jednoho druhu. Mutagenní potenciál steviolu byl dostatečně testován pouze *in vitro*⁸⁶. S ohledem na nové studie a důkazy, které byly dostatečné pro zajištění bezpečnosti při denní expozici SG po celou dobu života osoby, byla v roce 2005 stanovena hodnota ADI na 0-2 mg/kg TH/den⁷⁶. V roce 2007 zůstala stejná⁸⁷. V dalším roce se zvýšila na 0–4 mg/kg TH/den⁵⁹. Tato hodnota ADI platí i po hodnocení v roce 2016⁸⁸, 2017⁸⁹ a 2019⁸⁹.

4.5.6.2 SCF a EFSA

SCF (Scientific Committee on Food, Vědecký výbor pro potraviny) hodnotil toxikologii steviosidu v letech 1984, 1989 a 1999. V roce 1984 byl steviosid kvůli nedostatečným studiím uznán jako toxikologicky neakceptovatelný⁹⁰. Stejně tak to dopadlo v roce 1989⁹¹. V roce 1999 výbor stále nebyl spokojen s předloženou dokumentací a měl obavy z možné toxicity. SCF si tedy stála za svým stanoviskem z let předešlých a steviosid nebyl uznán jako toxikologicky bezpečný⁹².

Po zvážení všech údajů o stabilitě, degradačních produktech, metabolismu a toxikologii EFSA (European Food Safety Authority, Evropský úřad pro bezpečnost potravin) v roce 2010 stanovila ADI pro SG, vyjádřené jako ekvivalenty steviolu, na 4 mg/kg TH/den⁹³.

4.6 Využití v potravinářství

Tržní potenciál SR a výrobků z ní je obrovský. Ve světě je 422 milionů diabetiků, z toho 60 milionů Evropanů⁹⁴, a třetina populace trpí nadváhou⁹⁵. V České republice je téměř 10 % diabetiků⁹⁴ a 50 % lidí ve středním věku má nadváhu⁹⁶. Počty těchto lidí neustále rostou. Také však roste počet lidí, kteří se snaží zlepšit svoji životosprávu a omezují cukr a umělá sladidla. SR nemá nežádoucí účinky, je nekalorická a může se přidávat do nejrůznějších potravin, léků a kosmetických přípravků⁹⁷.

Nejvíce se SR využívá v potravinářství především jako sladidlo. Nejjednodušším použitím je slazení čajů pomocí SR lístků. Na 100 g čajové směsi stačí půl čajové lžičky lístků. Například paraguayci ročně vypijí 6 až 8 kg čaje matté, který si většinou sladí pomocí SR. Takto oslazené čaje jsou vhodné pro diabetiky, lidi s nadváhou, kojence, ale i malé děti. A nemusí se bát, že jim způsobí karies, zvýší hmotnost nebo jinak poškodí zdraví.⁹⁷

Listy SR se v ČR prodávají jako čaj (*Obrázek 11*), zelený nebo bílý prášek (*Obrázek 12*), tekutý extrakt (*Obrázek 13*) a jako tablety (*Obrázek 14*) ve velikosti umělých sladidel.⁹⁷



Obrázek 11: STÉVIE SLADKÁ sypaný bylinný čaj | Centrum bylin⁹⁸



Obrázek 12: Sladidlo ze stévie, prášek⁹⁹



Obrázek 13: SÜSSINA STEVIA TEKUTÁ 220 ML¹⁰⁰



Obrázek 14: STEVIA IN 100% přírodní sladidlo 200 tablet¹⁰¹

Velké nadnárodní společnosti jako PepsiCo, Coca-Cola a další využívají náhražky cukru a SR ke slazení svých produktů stále častěji¹⁰². Výrobky se SR se nejdéle používají v Jižní Americe a Japonsku. V Evropské unii bylo téměř do konce roku 2011 zakázáno SR nebo produkty z ní v potravinách používat¹⁰³. Japonsko je pro SR a produkty se SR zemí zaslíbenou. Více než 40 % trhu se sladkostmi představují výrobky slazené SR. Různé podniky jako čajovny, kavárny a restaurace tam nabízí slazení svých nápojů pomocí SR místo cukru a umělých sladidel. V obchodech prodávají spoustu typických japonských jídel se SR, nakládanou zeleninu, sušené mořské plody, rybí výrobky, hotová jídla i mořské plody vařené v sojové omáčce⁹⁷.

4.6.1 Ovlivnění vlastností potravin

Kroyer v roce 2010 ve své studii hodnotil stabilitu steviosidu za různých podmínek zpracování a skladování, jakož i účinky jeho interakce s vitaminy rozpustnými ve vodě, s organickými kyselinami relevantními pro potraviny a s dalšími běžnými nízkokalorickými sladidly a jeho aplikaci v kávových a čajových nápojích. Inkubace steviosidu při zvýšených teplotách po dobu jedné hodiny, ukázala dobrou stabilitu steviosidu až do 120 °C, zatímco při teplotě nad 140 °C byla zaznamenána degradace. Úplný rozklad steviosidu proběhl při 200 °C. V důsledku toho není steviosid vhodný pro pečení nebo pro zpracování při vyšších teplotách. Ve vodných roztocích byl steviosid pozoruhodně stabilní v rozmezí pH 2–10 při tepelném zpracování do 80 °C. Došlo pouze k mírným ztrátám do 5 % (pH 2 a 10). Avšak za silně kyselých podmínek (pH 1) bylo zjištěno významné snížení koncentrace steviosidu. 4 hodiny inkubace steviosidu s jednotlivými ve vodě rozpustnými vitamíny ve vodném roztoku při 80 °C neprokázaly žádné významné změny, pokud jde o steviosid a vitaminy B, zatímco u vitamínu C byl pozorován ochranný účinek steviosidu na jeho degradaci, což vedlo k významnému zpoždění degradace vitamínu C. Při pokojové teplotě v přítomnosti dalších nízkokalorických sladidel ve vodném médiu nebyla zjištěna žádná interakce. Studie stability steviosidu v roztocích organických kyselin ukázaly tendenci ke zvýšenému rozkladu sladidla při nižších hodnotách pH. V kávě a čaji slazených steviosidem nebylo prakticky možné pozorovat změny v obsahu kofeinu a steviosidu.³⁴

Rad a kol. zkoumali efekt inulinu a SR na některé fyzikální vlastnosti čokoládového mléka. Náhrada cukru SR způsobila zvýšení srážení a snížení viskozity. Zato přidáním inulinu došlo ke snížení srážení a zvýšení viskozity. Nejlépe dopadl vzorek, kde bylo nahrazeno 50 % cukru pomocí SR a bylo přidáno 6 % inulinu. Z toho vyplývá, že zahušťovadlo, jako je inulin, může být použito ke zlepšení fyzikálních vlastností produktu slazeného SR.¹⁰⁴

Cílem studie od Alizadeh a kol. bylo vyvinout zmrzlinu, která bude nízkokalorická a bude mít nízký glykemický index (GI), pomocí směsi sacharózy a SR.

Použitím různých poměrů sacharózy a SR bylo vyrobeno pět různých variant zmrzliny. Nahrazení sacharózy pomocí SR mělo za následek významně nižší viskozitu a brix (stupnice cukernatosti). Celkové nahrazení sacharózy mělo za následek významné snížení kalorické hodnoty. Bohužel při vyšších koncentracích SR se objevovala hořká pachut'. Došli k závěru, že nahrazení sacharózy stevií může být volbou pro výrobu nízkokalorických zmrzlin s nízkým GI, ale je vhodně použít obě sladidla pro zlepšení sensorických vlastností.¹⁰⁵

Hergesell a kol se zabývali možnostmi nahrazení cukru rebaudiosidem A v jogurtech. Při nahrazení 50 % sacharózy rebaudiosidem A nebyla výsledná chuť nijak ovlivněna. Pokud bylo nahrazeno 75 % nebo 100 % sacharózy rebaudiosidem A, tak se snížila intenzita sladkosti a navíc začal být jogurt hořký.¹⁰⁶

4.6.2 Legislativa v ČR

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283¹⁰⁷ udává, že SR a její usušené listy jsou považovány za novou potravinu (*Obrázek 15*). Toto nařízení nahradilo nařízení Evropské parlamentu a Rady (ES) č. 258/1997¹⁰⁸. V roce 2017, díky doložení významné konzumace SR a jejich usušených listů před 15. květnem 1997, došlo k aktualizaci Katalogu nových potravin. Dnes je tedy možné použití rostliny SR pro čaje, bylinné a ovocné nálevy obsahující nebo připravené z listů SR¹⁰⁹. Na veškeré další použití SR je nutné aplikovat nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283¹⁰⁷.

Česká úprava podle §1 až 5 vyhlášky č. 330/1997 Sb. říká, že produkt, který je připraven z listů SR nebo obsahuje listy SR nemůže být označen jako „čaj“, protože SR není uvedena v příloze č. 2 k vyhlášce č. 330/1997 Sb. Toto se uplatňuje pouze u českých výrobků.¹¹⁰

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, o potravinářských přídatných látkách¹¹¹ (ve znění nařízení Komise (EU) č. 1131/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, pokud jde o SG¹¹²) je možné použít přídatnou látku (sladidlo) SG neboli E 960 při výrobě některých potravin. Výroba SG je popsána v nařízení Komise (EU) č. 231/2012 ze dne 9. března 2012, kterým se stanoví specifikace pro potravinářské přídatné látky uvedené v přílohách II a III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008¹¹³. Výroba tedy probíhá jiným způsobem než výroba extraktů¹¹⁴. V nařízení Komise (EU) č. 1131/2011 jsou uvedena maximální použitelná množství SG (E 960) a podmínky jejich použití v jednotlivých kategoriích potravin (*Tabulka 9*)¹¹².

- a) „novými potravinami“ se rozumí jakékoli potraviny, které se ve významné míře nepoužívaly k lidské spotřebě v Unii před 15. květnem 1997, bez ohledu na den přistoupení členských států k Unii, a které spadají alespoň do jedné z níže uvedených kategorií:
- i) potraviny s novou nebo záměrně modifikovanou molekulární strukturou, pokud tato struktura nebyla v Unii před 15. květnem 1997 používána jako součást potraviny či přímo jako potravina;
 - ii) potraviny sestávající, izolované nebo vyrobené z mikroorganismů, hub nebo řas;
 - iii) potraviny sestávající, izolované nebo vyrobené z látek minerálního původu;
 - iv) potraviny sestávající, izolované nebo vyrobené z rostlin nebo jejich částí, s výjimkou potravin s historií bezpečného používání v rámci Unie, které sestávají, jsou izolované nebo vyrobené z rostlin nebo odrůd stejného druhu a byly získány:
 - tradičními rozmnožovacími postupy, které se používaly pro produkci potravin v Unii před 15. květnem 1997; nebo
 - netradičními rozmnožovacími postupy, které nebyly používány před 15. květnem 1997 v Unii pro produkci potravin a které nevedou k významným změnám ve složení nebo struktuře potraviny majícím vliv na její výživovou hodnotu, metabolizaci nebo množství nežádoucích látek;
 - v) potraviny, které sestávají z těl živočichů nebo jejich částí, jsou z nich izolovány nebo vyrobeny, s výjimkou živočichů získaných tradičními chovatelskými postupy používanými k produkci potravin před 15. květnem 1997, mají-li potraviny z těl těchto živočichů historii bezpečného používání jako potraviny v Unii;
 - vi) potraviny sestávající, izolované nebo vyrobené z buněčné nebo tkáňové kultury získané ze zvířat, rostlin, mikroorganismů, hub či řas;
 - vii) potraviny získávané za použití výrobního postupu, který se v Unii před 15. květnem 1997 k produkci potravin nepoužíval a který způsobuje významné změny složení nebo struktury potraviny, jež mají vliv na její výživovou hodnotu, metabolizaci nebo množství nežádoucích látek;
 - viii) potraviny, které obsahují umělé nanomateriály podle definice v písmeni f) tohoto odstavce;
 - ix) vitaminy, minerální látky a jiné látky používané v souladu se směrnicí 2002/46/ES, nařízením (ES) č. 1925/2006 nebo nařízením (EU) č. 609/2013, pokud:
 - byl uplatněn postup výroby uvedený v písm. a) bodě vii) tohoto odstavce, který nebyl v Unii využíván před 15. květnem 1997 k produkci potravin; nebo
 - obsahují umělé nanomateriály podle definice v písmeni f) tohoto odstavce;
 - x) potraviny používané výlučně jako doplňky stravy v Unii před 15. květnem 1997, pokud jsou určeny k použití v jiných potravinách, než jsou doplňky stravy podle definice v čl. 2 písm. a) směrnice 2002/46/ES;

Obrázek 15: Definice „nových potravin“¹⁰⁸

Tabulka 9: Podmínky použití SG v kategoriích potravin, upraveno dle (112)

Číslo kategorie	Název kategorie	Maximální množství (mg/l nebo mg/kg)	Omezení/výjimky
01.4	Ochucené fermentované mléčné výrobky včetně tepelně ošetřených	100	pouze výrobky se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru
03	Zmrzliny	200	pouze výrobky se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru
04.2.2	Ovoce a zelenina v octě, oleji nebo slaném nálevu	100	pouze ovoce a zelenina ve sladkokyselém nálevu
04.2.4.1	Ovocné a zeleninové přípravky kromě kompotů	200	pouze výrobky se sníženým obsahem energie

Číslo kategorie	Název kategorie	Maximální množství (mg/l nebo mg/kg)	Omezení/výjimky
04.2.5.1	Výběrový džem (Extra) a výběrový rosol (Extra) ve smyslu směrnice 2001/113/ES	200	pouze džemy, rosoly a marmelády se sníženým obsahem energie
04.2.5.2	Džemy, rosoly a marmelády a slazený kaštanový krém ve smyslu směrnice 2001/113/ES	200	pouze džemy, rosoly a marmelády se sníženým obsahem energie
04.2.5.3	Ostatní obdobné ovocné nebo zeleninové pomazánky	200	pouze pomazánky na bázi sušeného ovoce se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru
05.1	Kakaové a čokoládové výrobky ve smyslu směrnice 2000/36/ES	270	pouze výrobky se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru
05.2	Ostatní cukrovinky včetně drobných cukrovinek na osvěžení dechu	270	pouze cukrovinky na bázi kakaa nebo sušeného ovoce se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru
		330	pouze pomazánky na bázi kakaa, mléka, sušeného ovoce nebo tuku se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru
		350	pouze cukrovinky bez přidaného cukru
		2000	pouze mikrocukrovinky pro osvěžení dechu, bez přidaného cukru
		670	pouze pastilky pro osvěžení dechu s výraznou příchutí bez přidaného cukru
05.3	Žvýkačky	3300	pouze bez přidaného cukru
05.4	Dekorace, polevy a náplně, kromě náplní na bázi ovoce spadajících do kategorie 4.2.4	330	pouze cukrovinky bez přidaného cukru
		270	pouze cukrovinky na bázi kakaa nebo sušeného ovoce, se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru

Číslo kategorie	Název kategorie	Maximální množství (mg/l nebo mg/kg)	Omezení/výjimky
06.3	Snídaňové cereálie	330	pouze snídaňové cereálie s obsahem vlákniny vyšším než 15 % a s obsahem otrub nejméně 20 %, se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru
07.2	Jemné pečivo	330	pouze essoblaten – jedlé papírové obaly
09.2	Zpracované ryby a produkty rybolovu včetně měkkýšů a korýšů	200	pouze sladkokyselé konzervy nebo polokonzervy z ryb a marinády z ryb, korýšů a měkkýšů
11.4.1	Stolní sladidla v tekuté formě	QS*	
11.4.2	Stolní sladidla ve formě prášku	QS*	
11.4.3	Stolní sladidla v tabletách	QS*	
12.5	Polévky a vývary	40	pouze polévky se sníženým obsahem energie
12.6	Omáčky	120	kromě sójové omáčky (fermentované i nefermentované)
		175	kromě sójové omáčky (fermentované i nefermentované)
13.2	Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely podle směrnice 1999/21/ES (kromě výrobků spadajících do kategorie potravin 13.1.5)	330	
13.3	Dietní potraviny pro diety zaměřené na regulaci hmotnosti určené k náhradě celodenní stravy nebo jednotlivého pokrmu (úplná nebo částečná náhrada celodenní stravy)	270	
14.1.3	Ovocné nektary ve smyslu směrnice Rady	100	pouze výrobky se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru

Číslo kategorie	Název kategorie	Maximální množství (mg/l nebo mg/kg)	Omezení/výjimky
	2001/112/ES a zeleninové nektary a podobné výrobky		
14.1.4	Ochucené nápoje	80	pouze výrobky se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru
14.2.1	Pivo a sladové nápoje	70	pouze nealkoholické pivo nebo pivo s obsahem alkoholu do 1,2 % (obj.); pivo „Bière de table/Tafelbier/Table beer“ (obsah původní mladiny menší než 6 %) kromě piva „Oberjähriges Einfachbier“; piva s titrační kyselostí nejméně 30 miliekvivalentů, vyjádřeno jako NaOH; tmavá piva typu „oud bruin“
14.2.8	Ostatní alkoholické nápoje včetně destilátů s obsahem alkoholu do 15 % a směsí alkoholických nápojů s nealkoholickými	150	
15.1	Bramborové, obilné, moučné nebo škrobové snacky	20	
15.2	Zpracované ořechy	20	
16	Dezerty, kromě výrobků spadajících do kategorií 1, 3 a 4	100	pouze výrobky se sníženým obsahem energie nebo bez přidaného cukru
17.1	Doplňky stravy dodávané v pevné formě, včetně tobolek a tablet a podobných forem	670	
17.2	Doplňky stravy dodávané v tekuté podobě	200	
17.3	Doplňky stravy dodávané ve formě sirupu nebo určené ke žvýkání	1800	
*QS – quantum satis (kolik je třeba)			

4.6.2.1 Označování potravin obsahující SR nebo SG

V nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, o potravinářských přídatných látkách, nejsou podmínky pro použití spojení „přírodní“ + aditivní látka¹¹¹. V nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, jsou v čl. 10 a příloze III stanoveny další údaje. Konkrétně v bodě 2. 1. je uvedeno, že potraviny obsahující sladidlo nebo sladidla povolená nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, musí mít k názvu potraviny doplněnu informaci „se sladidlem“ nebo „se sladidly“. V čl. 18 odst. 2 nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 je uvedeno, že se jednotlivé složky ve složení označí jejich specifickým názvem. V části C přílohy VII je stanoveno, že pro potravinářské přídatné látky musí být uveden název skupiny přídatných látek s následováním uvedením jejich specifického názvu nebo čísla E. Ve složení tedy musí být napsáno např. „sladidla: steviolglykosidy“^{102, 101}

Grafické znázornění SR na etiketě výrobku může být, pokud byly použity sušené listy SR k výrobě čaje mimo ČR, výrobě směsi k přípravě nálevu nebo výrobě nálevu. Dále pokud byly k výrobě použity SG a zároveň u toho grafického znázornění musí být uvedeno, že výrobek obsahuje SG.¹¹⁴

Tabulka 10: Navrhované vyhodnocení označení¹¹⁴

Označení	Je to povoleno?
se steviolglykosidy	ANO*
se stévií (na čaji**, na směsích pro přípravu nálevu a nálevech)	ANO
se stévií (na ostatních potravinách)	NE
se steviolglykosidy z rostliny stévie/se steviolglykosidy z částí rostliny <i>Stevia rebaudiana</i>	ANO*
se sladidly z rostliny stévie	ANO
s rebaudiosidem A/se steviosidem	ANO*
s extrakty ze stévie	NE – Výroba SG je dle nařízení č. 231/2012 jiná než výroba extraktů. Extrakty z SR nejsou povolenou přídatnou látkou dle čl. 4 odst. 1 nařízení (ES) č. 1333/2008
s přírodními sladidly	NE – SG extrahované z rostliny jsou ještě dále upravovány složitým fyzikálně-chemickým procesem. Dle § 2, respektive přílohy č. 1 vyhlášky č. 76/2003 Sb., nejsou SG přírodními sladidly. Proto se jedná o zavádějící informaci v rozporu s čl. 7 nařízení (EU) č. 1169/2011.

Označení	Je to povoleno?
slazeno přírodními látkami, slazeno přírodně	NE – SG extrahované z rostliny jsou ještě dále upravovány složitým fyzikálně-chemickým procesem. Dle § 2, respektive přílohy č. 1 vyhlášky č. 76/2003 Sb., nejsou SG přírodními sladidly. Proto se jedná o zavádějící informaci v rozporu s čl. 7 nařízení (EU) č. 1169/2011.
bez sladidel	NE – SG jsou schváleným sladidlem. Dle čl. 4 odst. 1 nařízení (ES) č. 1333/2008 jsou SG schválená sladidla.
bez umělých přípravků	NE – SG jsou extrahované z rostliny, ale jsou ještě dále upravovány složitým fyzikálně-chemickým procesem. Proto se jedná o zavádějící informaci v rozporu s čl. 7 nařízení (EU) č. 1169/2011.
přírodně sladké, s přírodní sladkou chutí (z rostliny stévie), se sladkou chutí rostlinného původu (v případě použití steviolglykosidů)	NE – Lze použít pro potraviny typu med, ovocná šťáva. SG jsou schválená aditivní látka, sladidlo. Dle nařízení (EU) č. 231/2012 mohou sladidla obsahovat i některé SG, které se v rostlině přírodně nevyskytují. Proto se jedná o zavádějící informaci v rozporu s čl. 7 nařízení (EU) č. 1169/2011.
přírodně sladké, s přírodní sladkou chutí (z rostliny stévie), se sladkou chutí rostlinného původu (v případě použití sušených listů rostliny na čaje, směsi pro přípravu nálevů a nálevy)	ANO
přírodně sladké, s přírodní sladkou chutí (z rostliny stévie), se sladkou chutí rostlinného původu (v případě jiného použití sušených listů rostliny než na čaje, směsi pro přípravu nálevů a nálevy)	NE, pokud není doloženo splnění podmínek nařízení (EU) č. 2015/2283.
steviolglykosidy se přírodně vyskytují v listech stévie	ANO*
se sladidly přírodního / rostlinného původu	ANO
se steviolglykosidy rostlinného původu, se steviolglykosidy získanými z přírodních surovin	ANO*
<p>*název potraviny musí být doprovázen tvrzením „se sladidlem“/„se sladidly“ v souladu s čl. 10 a přílohy III nařízení (EU) č. 1169/2011, a současně se ve složení musí v souladu s čl. 18 odst. 2 nařízení (EU) č. 1169/2011 objevit informace ve znění např. „sladidla: steviolglykosidy“ (viz. výše).</p> <p>**pokud nejde o čaj vyrobený v ČR</p>	

4.6.3 Situace ve světě

4.6.3.1 Japonsko

Začátky SR v Japonsku jsou spojené se jménem Tetsuya Sumidy, který poslal semena SR z Jižní Ameriky do Japonska a měl také na starost pěstování rostliny. Japonci SR důkladně prozkumali. Výsledky toxikologických výzkumů vedly ke schválení SR a produktů z SR jako potraviny. Japonci se o své zdraví velmi starají, proto mají negativní postoj k umělým sladidlům a mnoho jich odmítá i samotný cukr. Dlouhotrvajícím trendem v Japonsku je přesvědčení, že přirozené složky potravy jsou zdravější než ty syntetické. Dnes se nachází SR v mnoha japonských výrobcích a ročně se zde spotřebují tisíce tun SR.¹¹⁵

4.6.3.2 USA

Mezi lety 1970 až 1987 obdržela FDA 4 žádosti o povolení používání steviosidu nebo listů SR jako sladidla v potravinách. Žádná z těchto žádostí neobsahovala veškeré informace, které musí být vyplněny, a proto se jimi FDA nezabývala. Mezi lety 1989 až 1995 obdržela FDA 3 žádosti o GRAS potvrzení (generally recognized as safe, všeobecně považovaný za bezpečný) steviosidu nebo listů SR jako sladidla v potravinách a určitých nápojích a ani jedné nebylo vyhověno. Úřad FDA v roce 1991 zakázal dovoz a využívání listů SR, SG a potravin obsahujících SR nebo SG z důvodu nedostatečných toxikologických informací. Implementací zákona o doplňcích stravy z roku 1994¹¹⁶ byl v roce 1995 znovu dovoz a prodej povolen, pokud byly produkty označeny jako doplněk stravy. V roce 2008 získal rebaudiosid A GRAS. Od té chvíle se mohl začít dovážet a prodávat jako potravinová, stolní sladidlo a přídatná látka do jiných potravin nebo nápojů^{117,118}. Od roku 2008 FDA obdržela přes 50 žádostí o GRAS pro různé SG, k žádné neměla připomínku^{119,120}.

4.6.4 Přehled sladidel

Sladidla se dělí na přírodní a syntetická. Mezi přírodní sladidla patří sacharidy (alkoholické cukry, monosacharidy a oligosacharidy), glykosidy a proteiny. Sacharidy můžeme nazývat jako kalorická sladidla a jsou pro tělo hlavním zdrojem energie. Mezi nejznámější a nejpoužívanější patří sacharóza (řepný nebo třtinový cukr); D-glukóza a dextróza (hroznový cukr); maltóza (sladový cukr); laktóza (mléčný cukr); fruktóza (ovocný cukr); směs 50 % D-glukózy a 50 % D-fruktózy (invertní cukr); směs 38 % D-fruktózy, 30 % D-glukózy, 6 % různé disacharidy, ale max 1 % sacharózy (med); D-glucitol (sorbit) a D-mannitol (manna)¹²¹. Mezi nejznámější syntetická sladidla, která

jsou nekalorická, patří sacharin, cyklamát, aspartam, sukralóza, acesulfam, alitam a neotam¹²². Přehledy sladivosti jsou uvedeny v tabulkách (*Tabulka 11, Tabulka 12*).

Tabulka 11: Srovnání sladivosti jednotlivých sladidel. Vztaženo k sacharóze (ekvivalent sladivosti = 1)¹²¹

Sladidlo	Ekvivalent sladivosti	Sladidlo	Ekvivalent sladivosti
laktóza	0,27	acesulfam	200
palatinitol (isomalt)	0,4	aspartam	180–200
D-glucitol (sorbitol)	0,48	dulcin	250
glukóza	0,5–0,6	steviosid	200–300
glycerol	0,5	suosan	350
erythritol	0,6–0,7	sacharin	400–550
tagatóza	0,9	sukralóza	500–650
sacharóza	1,0	neohesperidin	1000
xylitol	1,0	antioxim perillaldehydu	2000
fruktóza	0,7–1,8	alitam	2000
D-glycin	1,5	monellin	3000
cyklamát sodný	30–60	1-methoxy-2-amino-4-nitrobenzen	4000
D-tryptofan	35	thaumatin I a II	3000
glycyrrhizin	50–100	neotam	8000

Tabulka 12: Přehled sladivosti vybraných SG, přeloženo z (123)

SG	Ekvivalent sladivosti (sacharóza = 1)	SG	Ekvivalent sladivosti (sacharóza = 1)
steviosid	150–300	rebaudiosid D	250–450
rebaudiosid A	250–450	rebaudiosid E	150–300
rebaudiosid B	300–350	steviolbiosid	100–125
rebaudiosid C	50–120	dulcosid A	50–120

4.6.5 Škodlivost cukru

Ačkoli cukry nejsou v malém množství pro naše tělo škodlivé, tak tělo nevyžaduje cukry, aby správně fungovalo. Přidané cukry dodávají potravinám jen další kalorie a naopak nedodávají žádné živiny. Během posledních 30 let Američané konzumovali stále více přidaných cukrů, což přispělo k epidemii obezity. Snížení konzumace potravin s přidanými cukry snižuje kalorie a může nám pomoci zlepšit stav srdce a cév, lépe ovládat naši hmotnost, snížit riziko zubního kazu. American Heart Association doporučuje omezit množství přidaných cukrů, které konzumujeme, na ne více než polovinu svého denního kalorického příjmu.¹²³

4.6.5.1 Zvýšení hmotnosti

Míra obezity celosvětově roste a přidaný cukr, zejména do nápojů, je považován za jeden z hlavních viníků. Nápoje slazené cukrem, jako jsou sodovky, džusy a sladké čaje, jsou plné fruktózy. Konzumace fruktózy zvyšuje hlad a touhu po jídle více než glukóza, což je hlavní druh sacharidů, který se vyskytuje ve škrobových potravinách¹²⁴. Nadměrná konzumace fruktózy může navíc způsobit rezistenci na leptin, důležitý hormon, který reguluje hlad a říká tělu, aby přestalo jíst¹²⁵. Výzkumy neustále ukazují, že lidé, kteří pijí sladké nápoje váží více než lidé, kteří to nedělají¹²⁶. Také pití hodně slazených nápojů je spojeno se zvýšeným množstvím viscerálního tuku, který je spojován s cukrovkou a srdečními chorobami¹²⁷.

4.6.5.2 Kardiovaskulární onemocnění

Strava s vysokým obsahem cukru byla spojena se zvýšeným rizikem mnoha nemocí, včetně ischemické choroby srdeční (ICHS), celosvětově nejčastější příčiny úmrtí¹²⁸. Důkazy naznačují, že strava s vysokým obsahem cukru může vést k obezitě, zánětům, vysokým hladinám triglyceridů a cukru v krvi a vysokému krevnímu tlaku, což jsou všechno rizikové faktory ICHS¹²⁹. Kromě toho konzumace příliš velkého množství cukru, zejména z nápojů slazených cukrem, byla spojena s aterosklerózou¹³⁰.

Podle studie z roku 2014 publikované společností JAMA Internal Medicine mají lidé, kteří konzumují 10 % nebo více kalorií z přidaných cukrů, o 30 % zvýšené riziko úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění. Toto riziko se zdvojnásobí u těch, kteří konzumují 25 % a více denních kalorií z přidaných cukrů¹³¹.

4.6.5.3 Akné

Sladká jídla rychle zvyšují hladinu cukru v krvi a hladinu inzulínu, což způsobuje zvýšenou sekreci androgenů, produkci mazu a zánětu, tohle vše hraje roli ve vývoji akné¹³². Studie ukázaly, že potraviny s nízkým GI jsou spojeny se sníženým rizikem akné,

zatímco potraviny s vysokým GI jsou spojeny s vyšším rizikem¹³³. Například studie na 2300 dospívajících ukázala, že ti, kteří často konzumovali přidaný cukr, měli o 30 % vyšší riziko vzniku akné¹³⁴. Také mnoho populačních studií ukázalo, že venkovské komunity, které konzumují tradiční nezpracované potraviny, mají téměř neexistující míru akné ve srovnání s městskými oblastmi s vysokými příjmy¹³⁵.

4.6.5.4 Diabetes

Celosvětová prevalence diabetu se za posledních 30 let více než zdvojnásobila¹³⁶. Ačkoli k tomu existuje mnoho důvodů, tak existuje jasná souvislost mezi nadměrnou spotřebou cukru a rizikem cukrovky. Obezita, která je často způsobena konzumací příliš velkého množství cukru, je považována za nejvýznamnější rizikový faktor diabetu. Navíc dlouhodobá konzumace potravin s vysokým obsahem cukru zvyšuje odolnost vůči inzulínu. Inzulínová rezistence způsobuje zvýšení hladiny cukru v krvi a výrazně zvyšuje riziko diabetu¹³⁷. Další studie také ukázaly, že u lidí, kteří pijí nápoje slazené cukrem, včetně ovocných šťáv, je vyšší pravděpodobnost vzniku cukrovky^{138,139}.

4.6.5.5 Rakovina

Konzumace nadměrného množství cukru může zvýšit riziko vzniku některých druhů rakoviny. Strava bohatá na sladká jídla a nápoje může vést k obezitě, která výrazně zvyšuje riziko rakoviny¹⁴⁰. Kromě toho strava s vysokým obsahem cukru zvyšuje riziko zánětu v těle a může způsobit inzulínovou rezistenci, což také zvyšuje riziko rakoviny¹⁴¹. Studie na více než 430.000 lidech zjistila, že spotřeba přidaného cukru byla pozitivně spojena se zvýšeným rizikem rakoviny jícnu, pohrudnice a tenkého střeva¹⁴². Studie od Friberg a kol. ukázala, že ženy, které konzumovaly sladké housky a sušenky více než třikrát týdně, měly 1,42 krát vyšší pravděpodobnost vzniku rakoviny endometria než ženy, které tyto potraviny konzumovaly méně¹⁴³.

4.6.5.6 Deprese

Zdravá strava sice může zlepšit náladu, ale strava s vysokým obsahem cukru a zpracovaných potravin může zvýšit šance na rozvoj deprese^{144,145}. Vědci se domnívají, že výkyvy cukru v krvi, dysregulace neurotransmiterů a zánět mohou být příčinou škodlivého dopadu cukru na duševní zdraví¹⁴⁶. Studie, která sledovala 8.000 lidí po dobu 22 let, ukázala, že u mužů, kteří konzumovali 67 g nebo více cukru denně, byla pravděpodobnost vzniku deprese o 23 % vyšší než u mužů, kteří jedli méně než 40 g denně¹⁴⁷. V jiné studii u více než 69.000 žen bylo prokázáno, že u žen s nejvyšším příjmem přidaného cukru bylo ve srovnání s těmi s nejnižším příjmem výrazně vyšší riziko vzniku deprese¹⁴⁸.

4.6.5.7 Stárnutí kůže

Vrásky jsou přirozeným příznakem stárnutí. Objeví se nakonec u každého. Špatně zvolený jídelníček však může zhoršovat vrásky a urychlit proces stárnutí kůže. Konzumace potravin s vysokým obsahem rafinovaných sacharidů a cukru vede k produkci AGEs (konečné produkty pokročilé glykace). AGEs jsou sloučeniny vytvářené reakcemi mezi cukry a proteiny v těle. Jsou podezřelé, že hrají klíčovou roli při stárnutí kůže. AGEs poškozují kolagen a elastin, což jsou bílkoviny, které pomáhají pokožce napnout se a udržet její mladistvý vzhled. Když dojde k poškození kolagenu a elastinu, kůže ztratí pevnost a začne klesat^{149,150}. Ve studii od Cosgrove a kol. měly ženy, které konzumovaly více sacharidů, včetně přidaných cukrů, více vráscitý vzhled než ženy, které měly dietu s vysokým obsahem bílkovin a nízkým obsahem cukrů. Vědci dospěli k závěru, že nižší příjem sacharidů byl spojen s lepším vzhledem kůže¹⁵¹.

4.6.5.8 Buněčné stárnutí

Telomery jsou struktury na konci chromozomů a fungují jako ochranné čepičky. Jak organismus stárne, tak se telomery přirozeně zkracují, což je způsobeno stárnutím buněk a jejich špatnou funkčností¹⁵². Ačkoli zkracování telomer je běžnou součástí stárnutí, výběr nezdravého životního stylu může tento proces urychlit. Bylo prokázáno, že konzumace vysokého množství cukru urychluje zkracování telomer, což zvyšuje stárnutí buněk¹⁵³. Studie na 5.309 dospělých ukázala, že pravidelné pití cukrem slazených nápojů bylo spojeno s kratší délkou telomer a předčasným stárnutím buněk¹⁵⁴.

4.6.5.9 Energie

Potraviny s vysokým obsahem přidaného cukru rychle zvyšují hladinu cukru v krvi a hladinu inzulínu, což vede ke zvýšené energii. Tento nárůst energetické hladiny je však prchavý. Produkty, které jsou nabitě cukrem, ale které neobsahují bílkoviny, vlákninu nebo tuk, vedou ke krátkodobému zvýšení energie, po kterém rychle následuje prudký pokles hladiny cukru v krvi¹⁵⁵. Trvalé výkyvy cukru v krvi mohou vést k velkým výkyvům v hladinách energie¹⁵⁶.

4.6.5.10 Steatóza jater

Vysoký příjem fruktózy je spojen se zvýšeným rizikem steatózy jater. Na rozdíl od glukózy a jiných sacharidů, které jsou přijímány mnoha buňkami v těle, je fruktóza téměř výhradně rozkládána játry, kde je přeměněna na energii nebo uložena jako glykogen. Játra však mohou uložit jen omezené množství glykogenu, přebytečné množství se změní na tuk. Velká množství přidaného cukru ve formě fruktózy přetěžují játra, což vede k nealkoholické steatóze jater, což je stav charakterizovaný nadměrným

hromaděním tuku v játrech¹⁵⁷. Studie u více než 5.900 dospělých ukázala, že lidé, kteří pili denně slazené nápoje, měli o 56 % vyšší riziko rozvoje steatózy ve srovnání s lidmi, kteří tak nedělali¹⁵⁸.

4.6.5.11 Zubní kaz

Cukr je jako magnet pro špatné bakterie. Dvě destruktivní bakterie nalezené v ústní dutině jsou *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sorbrinus*. Obě se živí cukrem, který jíme, a vytvářejí zubní plak, což je lepkavý bezbarvý film, který se vytváří na povrchu zubů¹⁵⁹. Pokud se plak neodmyje slinami nebo kartáčkem, prostředí v ústech se stává kyslejší a mohou se začít tvořit dutiny v zubech. Když pH plaku klesne pod normální hladinu, tak kyselost začne rozpouštět minerály a ničit zubní sklovinu. Přitom se vytvoří malé díry nebo eroze. Postupem času se zvětšují, dokud se neobjeví jedna velká díra^{160,161}.

4.7 *Využití ve farmacii a medicíně*

Jihoameričtí indiáni používali SR dlouho před námi. Listy z rostliny mají mnoho využití. V tradiční medicíně sloužila SR k léčbě popálenin, koliky, žaludečních potíží a někdy jako antikoncepce¹. SG nejvíce přispívají k léčivému významu SR. Kromě nich mají význam i další metabolity jako je β -karoten, riboflavin, thiamin, inulin, různé terpeny a flavonoidy¹⁶². SR se doporučuje k podpoře léčby mnoha nemocí například diabetu, zubního kazu, obezity a střevních infekcí¹⁶³.

V Mexiku používají SR při kolikách tak, že svaří listy a květy rostliny ve vodě se solí. Rozdrcené kořeny smíchané s vodou snižují teplotu, pomáhají při bolestech zad a nevolnostech. Nasekané listy používají jako obklad při infekcích, revmatu a zánětech. V zemích Jižní Ameriky se SR používá jako tonikum, proti únavě, k harmonizaci krevního tlaku, na podporu trávení, k posílení jater, slinivky břišní a páteře. V některých zemích se předepisují preparáty ze SR jako léky pro diabetiky. Rostlinu používají také zevně při ekzémech, akné, lupénce nebo k hojení ran. SR chrání proti karies. V Brazílii a Japonsku jsou produkty se SR pečující o ústní dutinu a zuby rozšířené. Mají tam zubní pasty, ústní vody, přípravky na bolest v krku a žvýkačky.¹⁶⁴

4.7.1 **Účinky SG**

4.7.1.1 *Antidiabetický účinek*

Diabetes typu 2 je celosvětovým zdravotním problémem, který souvisí s inzulínovou rezistencí a relativním nebo absolutním nedostatkem inzulínu.^{64,165}

Dysfunkce buněk Langerhansových ostrůvků brání aktivitě beta buněk kompenzovat inzulínovou rezistenci a snižuje uvolňování glukagonu z alfa buněk. Důležitým faktorem, který také způsobuje cukrovku, je stále častější ukládání mastných kyselin mimo tukovou tkáň. Ektopická depozice tuků ve slinivce, játrech, srdci, kosterních svalech a krevních cévách se děje hlavně u obézních pacientů. Je známo, že dlouhodobá expozice mastných kyselin na beta buňky narušuje jejich činnost a výsledkem je diabetes. O účincích působení mastných kyselin na aktivitu alfa buněk a geny ovlivňující metabolismus mastných kyselin se však mnoho neví. V této souvislosti byl studován steviosid a bylo zjištěno, že steviosid nejen že vyvažoval hypersekreci alfa buněk způsobenou mastnými kyselinami, ale také došlo k upregulaci aktivity genů ovlivňujících metabolismus mastných kyselin¹⁶⁶. Steviosid také při vysokých hladinách glukózy chrání funkčnost beta buněk regulací acetylkoenzym A karboxylázy⁶⁴.

Inzulinotropní aktivita steviosidu a steviolu závisí na koncentraci glukózy. Obě sloučeniny mají dlouhodobou a reverzibilní inzulinotropní aktivitu v přítomnosti 16,7 mmol/l glukózy. Tyto SG mají také vliv na sekreci inzulínu přímým působením na beta buňky.⁴

V jiných studiích bylo zjištěno, že rebaudiosid A a steviosid stimulují sekreci inzulínu z pankreatických beta buněk a také interferují s metabolismem glukózy v adipocytech.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

Udržení nízkokalorické diety a kontrola příjmu sacharidů je nedílnou součástí úspěšného zvládnání diabetu 2. typu. V tradičním léčitelství jsou léčivé rostliny používané již dlouhou dobu pro kontrolu diabetických komplikací. Dosud bylo identifikováno přes 1200 léčivých rostlin s antidiabetickými vlastnostmi, mezi které patří i SR¹⁶⁹. Bylo prokázáno, že je velmi účinná při léčbě diabetu¹⁷⁰.

SG získané ze SR nejsou absorbovány tělem, a proto nezvyšují hladinu glukózy v krvi. Klinické studie prokázaly, že listový extrakt ze SR snižuje hladinu glukózy v krvi u pacientů s diabetem 2. typu.¹⁷⁰

Saravanan a kol. studovali účinky rebaudiosidu A na antioxidační stav a profil lipidů u diabetických potkanů. Diabetes byl indukován u potkanů Wistar jediným intraperitoneálním podáním streptozotocinem (STZ). Diabetičtí potkani vykazovali zvýšené hladiny glukózy v plazmě, látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS), hydrogenperoxidů (radikál) a sníženou hladinu inzulínu. Také u nich byla pozorována snížená aktivita enzymatických antioxidantů (superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza a kataláza) a hladiny neenzymatických antioxidantů (vitamin C, vitamin E a redukovaný glutathion (GSH)). Hladiny celkového cholesterolu, triglyceridů, volných mastných kyselin, fosfolipidů, LDL a VLDL v plazmě se významně zvýšily, zatímco hladiny HDL byly sníženy. Perorální podání rebaudiosidu A (200 mg/kg TH) přivedlo téměř k normálu hladiny glukózy, inzulínu, produkty peroxidace lipidů, hladiny lipidů, enzymatické a neenzymatické antioxidanty. Výsledky výzkumu naznačují, že rebaudiosid A má antihyperlipidemické a antioxidační vlastnosti.¹⁷¹

Stručně řečeno SG, zejména steviosid, rebaudiosid A a steviol, mají znatelné antihyperglykemické účinky a mohou být užitečné při léčbě diabetu 2. typu.⁶⁴

4.7.1.2 Účinek na krevní tlak

Studie ukázaly, že SG mohou pomoci snížit krevní tlak. Jeppesen a kol. uvádí, že steviosid má dvojitý antihyperglykemický a hypotenzní účinek¹⁷². Bylo prokázáno, že u normotenzních myši intravenózní podávání steviosidu snižuje krevní tlak, ale nemá žádný vliv na výkon srdce a plazmatické hladiny katecholaminů¹⁷³.

V jiné studii bylo pozorováno, že intraperitoneální podání steviosidu může uvolnit vazokonstrikci indukovanou vazopresinem prostřednictvím inhibice influxu vápníku do krevních cév potkana¹⁷⁴. V podobné studii bylo zjištěno, že isosteviol snižuje vazokonstrikci u potkanů otevřením ATP senzitivního draslíkového kanálu a Ca²⁺ senzitivního draslíkového kanálu s malou vodivostí¹⁷⁵.

Abychom to shrnuli, SG by mohly snížit krevní tlak modulací vápníkových

a draslíkových kanálů bez jakýchkoliv vedlejších účinků. Tyto přírodní sloučeniny by proto mohly sloužit jako slibné terapeutické látky pro snížení krevního tlaku.⁶⁴

4.7.1.3 Účinek na ledviny

Melis hodnotil účinek steviosidu na výkonnost zdravé ledviny a vysoký krevní tlak. Studie probíhala na dvou skupinách myši. První skupinou byly myši s normálním krevním tlakem, druhou byly hypertenzní myši. Bylo zjištěno, že steviosid způsobuje vasodilataci a současně dochází ke zvýšení diurézy, čímž se snižuje objem krevní plazmy, což vede ke snížení krevního tlaku. Navíc dlouhodobé podávání steviosidu u normotenzních a hypertenzních skupin vedlo ke zvýšené rychlosti glomerulární filtrace a renálního plazmatického průtoku.¹⁷⁶

Yuajit a kol. studovali účinky steviolu a jeho derivátů na růst cyst při polycystické nemoci ledvin pomocí modelu cyst z Madin-Darbyho psích ledvinných buněk (MDCK). Výsledky ukázaly, že steviol prodlužuje vývoj MDCK cysty přímým řízením transmembránového regulátoru vodivosti u cystické fibrózy (CFTR) a tedy i ovlivnění chloridového kanálu, dále redukcí CFTR exprese prostřednictvím rozkladu CFTR proteasomu. Na základě výsledků výše uvedené studie jsou steviol a jeho analogy potenciálními kandidáty na léčbu polycystické nemoci ledvin.¹⁷⁷

4.7.1.4 Protinádorové účinky

Chemická karcinogeneze je vícestupňový proces vedoucí k malignitě. Důležitou roli při chemoprevenci nádorových onemocnění má inhibice promoční fáze. Konoshima a Takasaki zkoumali *in vivo* chemopreventivní účinek steviosidu, steviolu a isosteviolu ve srovnání s glycyrrhizinem, což je sloučenina se známou protinádorovou aktivitou při chemické karcinogenezi. Výsledky ukázaly, že tyto tři sloučeniny vykazovaly silnější inhibiční účinek ve srovnání s glycyrrhizinem ve dvoustupňovém modelu karcinogeneze myši kůže. Karcinogeneze byla vyvolaná 7, 12-dimethylbenzanthracenem a 12-O-tetradekanoylfoorbol-13-acetátem.^{162,178}

V souladu s tímto zjištěním bylo hlášeno, že steviosid, steviol, isosteviol a jejich metabolity mohou zpomalit vývoj nádoru prostřednictvím potlačení aktivace časného antigenu viru Epstein-Barrové^{178,179}. V *in vitro* studii provedené Mizushinou a kol. bylo prokázáno, že isosteviol potlačuje mnoho lidských rakovinných buněk (buněčná linie T akutní lymfoblastické leukémie, buněčná linie B akutní lymfoblastické leukémie, buněčná linie karcinomu žaludku) inhibicí replikace DNA¹⁸⁰.

Dále Jayaraman a kol. hodnotili protinádorové účinky acetonového extraktu SR listu s použitím MTT ((3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid) testu a uvedli, že tento extrakt je cytotoxický proti lidským epiteliálním buňkám hrtnu (HEp-2). Extrakt by tedy mohl vykazovat selektivní cytotoxicitu, ale je nutné získat ještě

mnoho informací z *in vivo* studií a ze studií jiných buněčných linií k prokázání cytotoxického účinku extraktu ze SR listů.¹⁸¹

Wang a kol zjistili že, rebaudiosid A chrání před oxidačním poškozením indukovaným tetrachlormethanem (CCl₄) v lidském hepatocelulárním karcinomu (HepG2). Rebaudiosid A vykazoval antioxidační aktivitu na buněčné reaktivní formy kyslíku a malondialdehydové hladiny při současném zvyšování hladin GSH, superoxidodismutázy a katalázy. Podání rebaudiosidu A vyvolalo aktivaci jaderného erythroidního faktoru 2 (Nrf2), antioxidační odpověď, dále vyvolalo exprese hemoxygenázy-1 (HO-1) a NAD(P)H chinon oxireduktázy-1 (NQO1). Další studie ukázaly, že byla upregulována c-Jun N-terminální kináza (JNK), extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza (ERK), mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK) a proteinkináza C epsilon (PKCε). Tato studie *in vitro* přesvědčivě prokázala, že rebaudiosid A je aktivátor Nrf2 a je potenciálním kandidátem hepatoprotektivního činidla.¹⁸²

Stručně řečeno SG jsou potenciální chemopreventivní činidla v karcinogenezi a dobré přírodní sloučeniny pro léčbu rakoviny.⁶⁴

4.7.1.5 Protizánětlivé a imunomodulační účinky

Prozánětlivé cytokiny jako IL-1β (interleukin 1β), TNF-α (tumor nekrotizující faktor α) a IL-6 jsou nadměrně exprimovány v rakovinových buňkách a způsobují zánětlivé onemocnění. Zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů je zprostředkována kaskádou MAPK (mitogeny aktivovaných proteinkináz), TLR2 (toll-like receptor 2), NF-κB (nukleární faktor kappa B) a je inhibována inhibítoem NF-κB (IκBα).¹⁸³

Wang a kol. zjistili, že steviosid zmírňuje zánět v mléčných žlázách myši, které byly infikovány zlatým stafylokokem (*Staphylococcus aureus*), prostřednictvím snížení genové exprese cytokinů IL-6, TNF-α a IL-1β. Bylo zjištěno, že steviosid inhibuje genovou expresi cytokinů inaktivací MAPK dráhy, TLR2 a NF-κB.¹⁸³

Tyto výsledky podporuje několik důkazů. Bylo popsáno, že steviosid inhibuje prozánětlivé cytokiny prostřednictvím podobných mechanismů v buněčné linii RAW 264,7 (myši makrofág), u akutního poranění plic a v epididymálních, epiteliálních a střevních buňkách.¹⁸⁴⁻¹⁸⁷

Boonkaewwan a Burodom uvedli, že steviol a steviosid snižují expresi IL-6, TNF-α a IL-1β inaktivací NF-κB a aktivací IκBα v lidském karcinomu tlustého střeva a THP-1 buněčné linii *in vitro*. Bylo zjištěno, že steviol a steviosid inhibují prozánětlivé cytokiny zvyšováním hladiny IκBα.^{188,189}

V další studii Ahirwal a kol. ukázali, že extrakt z listu SR může modulovat imunitní odpověď¹⁹⁰. Sehar a kol. potvrdili stejný účinek steviosidu modulací reakce B a T buněk a zvýšení fagocytární funkce¹⁹¹.

Závěrem lze říci, že steviosid může snížit zánět a zprostředkovat imunomodulaci inhibicí prozánětlivých cytokinů na úrovni genové exprese.⁶⁴

4.7.1.6 Účinek na ústní dutinu

Neustálé používání potravinářských sladidel, stejně jako sacharidů s vysokým obsahem kalorií, by mohlo vést k růstu škodlivých bakterií v ústech, což by vedlo k zvýšené tvorbě zubního plaku, zánětu dásní a zubního kazu. Proto je nezbytná náhrada sacharózy jinými přírodními a méně škodlivými sacharidy.¹⁹²

SR je bezkalorické sladidlo, které může působit jako bakteriostatická a baktericidní látka zabráňující tvorbě zubního kazu a zánětu dásní. Listový extrakt a většina sekundárních metabolitů, včetně steviolu, isosteviolu, steviosidu a rebaudiosidů A, B, C, D, E a F nezpůsobují zubní kaz a omezují hromadění glukozů mikroorganismy, které jsou zodpovědné za tvorbu zubního kazu.¹²

Bylo publikováno, že přidavek steviosidu v kultivačním médiu omezuje růst a také produkci kyseliny u *Streptococcus mutans*, což je hlavní mikroorganismus způsobující zubní kaz.¹⁹³

4.7.1.7 Antibakteriální účinky

Průjem je patologický stav se zvýšenou frekvencí vyprazdňování vodnaté stolice. Může způsobit poškození střeva a v závažných případech až střevní selhání. Průjem je většinou bakteriálního nebo virového původu¹⁹⁴. Steviosid má antibakteriální a antivirové účinky. Zpomaluje peristaltiku a pomáhá při dráždivém tračníku a zánětlivému onemocnění střev. Steviol a jeho analogy byly také zkoumány z hlediska jejich úlohy proti průjmovým infekcím. Během průjmu některé bakteriální terotoxiny zvyšují hypersekreci aktivních chloridových iontů a ztrátu střevní tekutiny. Tato sekrece chloridového aniontu je umožněna prostřednictvím CFTR. Bylo popsáno, že steviol a jeho různé analogy účinně inhibují CFTR. Z různých analogů bylo zjištěno, že dihydrosteviol inhibuje CFTR tím, že se zaměřuje na tyto chloridové kanály a snižuje ztrátu střevní tekutiny¹⁹⁵.

Puri a kol. zjistili, že extrakt z listů SR a čištěný steviosid má antibakteriální účinky na potravinové patogeny. Extrakty z listů SR (1.000 mg/ml) vykazovaly antibakteriální aktivitu vůči *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes denitrificans* a *Salmonella typhimurium*. Ze šesti rozpouštědel vykazoval ethanolový a acetonový extrakt nejširší inhibiční zónu. Čištěný steviosid bránil růstu testovaných bakteriálních druhů tj. *B. subtilis*, *K. pneumoniae* a *S. typhimurium*. Také byla pozorována významná inhibiční zóna (12 mm) proti *B. cereus*. Steviosid se tedy může přidávat do potravin ke zvýšení jejich trvanlivosti.¹⁹⁶

4.7.1.8 Zlepšení paměti

Sharma a kol. provedli studii za účelem prozkoumání potenciálu steviosidu při poruchách paměti u potkanů. Poškození paměti bylo u zvířat vyvoláno skopolaminem. K hodnocení učení a paměti byl použit test Morrisova vodního bludiště. Pro stanovení centrální cholinergní aktivity byla měřena aktivita enzymu acetylcholinesterázy v mozku. Hladiny látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) a redukovaného GSH byly odhadnuty pro hodnocení stupně oxidačního stresu. Podávání skopolaminu vyvolalo u potkanů významné zhoršení paměti a schopnosti učení, jak ukazuje výrazné snížení výkonu v Morrisově vodním bludišti. Podávání skopolaminu také způsobilo významné zvýšení aktivity acetylcholinesterázy a zvýšení oxidačního stresu v mozku (zvýšení TBARS a snížení GSH). Předběžná léčba steviosidem (perorální dávka 250 mg/kg) významně zvrátila účinky vyvolané skopolaminem. Došlo ke snížení aktivity acetylcholinesterázy, ke snížení oxidačního stresu a ke zlepšení paměti a schopnosti učení. Lze učinit závěr, že steviosid má ochranný účinek na paměť potkanů u kognitivních poruch.¹⁹⁷

4.7.2 Další možná využití

Hou a kol. zkoumali pevnou disperzi založenou na rebaudiosidu A, která se měnila na nanomicely. K rebaudiosidu byl přidán hydrofóbní kurkumin (RA-KUR). RA-KUR se dá snadno vyrobit a po rozpuštění ve vodě se sám sestavit v nanomicely (velikost částic kolem 4 nm). Kurkumin byl snadno zapouzdřen do micel z rebaudiosidu A, což zlepšilo jeho rozpustnost ve vodě (na $14,34 \pm 1,66$ mg/ml), jakož i jeho *in vitro* uvolňování a membránovou permeabilitu. Významně se také zlepšila antioxidační aktivita kurkuminu. Biodistribuce ve střevním traktu potvrdila významné zvýšení absorpce kurkuminu v duodenu, jejunu a ileu. Farmakokinetické testy RA-KUR na potkanech odhalily dramatické 19,06 násobné zvýšení perorální biologické dostupnosti ve srovnání se samotným kurkuminem. Ještě důležitější je, že perorální podávání RA-KUR myšímú modelu by mohlo zmírnit ulcerativní kolitidu indukovanou dextransulfátem sodným. Samonanomicelizující pevné disperze na bázi rebaudiosidu A mají velký potenciál pro perorální podávání hydrofobních léčiv, například kurkuminu.¹⁹⁸

Uchiyama a kol. použili transglykosylovanou SR a hesperidin jako farmaceutické pomocné látky pro zvýšení biologické dostupnosti u flurbiprofenu a probukolu, tedy léků, které jsou špatně rozpustné ve vodě. Výsledkem bylo dramatické zlepšení rozpustnosti a biologické dostupnosti léčiv¹⁹⁹. Podobnou problematikou se zabýval Letchmanan a kol., kteří místo flurbiprofenu a probukolu použili antimalarický lék artemisinin. Výsledky také ukázali významné zlepšení rozpustnosti léku²⁰⁰.

5. ZÁVĚR

V této práci jsem se snažil nastínit, že *Stevia rebaudiana* Bertoni a stéviové glykosidy urazily dlouhou cestu, než se mohly začít legálně používat v Evropské unii, USA a dalších zemích. Bylo provedeno mnoho toxikologických studií, které ukázaly bezpečnost SR a SG, což následně reflektovaly i oficiální autority jako například JECFA, EFSA a FDA. V Evropě bylo povoleno omezené používání SG v potravinářství teprve v roce 2008. Trendem v posledních letech je zvýšený zájem o zdravý životní styl a i díky tomu se použití SR a SG stále rozšiřuje.

V dnešní době se zvyšuje počet lidí s kardiovaskulárními problémy, diabetem, nadváhou a obezitou. Jeden z faktorů způsobujících tyto nemoci je špatná strava. Předpokládám, že se SG budou stále více přidávat do potravin a nahradí cukr (a jiná sladidla), aby se omezil tento narůstající trend počtu onemocnění.

SG mají ale i jiné benefity. Jak potvrdily mnohé studie, tak SG mají antihypertenzivní, antidiabetické, antibakteriální, protizánětlivé, imunomodulační a protinádorové účinky. Dokonce zlepšují paměť? Mají tedy velký potenciál stát se lékem nebo složkou nějakého léku.

6. POUŽITÉ ZKRATKY

ADI	acceptable daily intake, přijatelná denní dávka
AGEs	advanced glycation end products, konečné produkty pokročilé glykace
AK	aminokyseliny
BAS	bioaktivní sloučeniny
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, transmembránový regulátor vodivosti u cystické fibrózy
CGA	kyselina chlorogenová
DDD	doporučená denní dávka
DESI-MS	hmotností spektrometrie s desorpční elektrosprejovou ionizací
DMAPP	dimethylallyl pyrofosfát
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EFSA	European Food Safety Authority, Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ERK	extracellular signal-regulated kinase, extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza
FAO	Food and Agriculture Organization, Organizace pro výživu a zemědělství
FOS	fruktooligosacharidy
GGDP	geranylgeranyl difosfát
GI	glykemický index
Glc	glukóza
GSH	glutathion
HepG2	hepatocelulární karcinom
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HO-1	hemoxygenáza-1
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
I κ B α	inhibitor nukleárního faktoru kappa B
IPP	isopentenyl pyrofosfát
JECFA	The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva
JNK	c-Jun N-terminální kináza
KAH	hydroxyláza kyseliny kaurenové
LC-TOF	kapalinová chromatografie s analyzátozem doby letu
LD	lethal dose, letální dávka
MAPK	mitogen-activated protein kinase, mitogeny aktivovaná proteinkináza
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney, Madin-Darbyho psí ledvinné buňky
MEP	methylerythritol

MS	hmotnostní spektrometrie
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NIRS	blízká infračervená spektroskopie
NOEL	No observed effect level, hladina nepozorovaného účinku
NQO1	NAD(P)H chinon oxireduktáza-1
Nrf2	jaderný erythroidní faktor 2
OECD	Organisation for Economic Co-Operation and Development, Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PHWE	tlaková extrakce horkou vodou
PKC ϵ	proteinkináza C epsilon
QS	quantum satis, kolik je třeba
RA-KUR	rebaudiosid A s kurkuminem
Rha	rhamnóza
SCF	Scientific Committee on Food, Vědecký výbor pro potraviny
SFE	extrakce superkritickou tekutinou
SPE	extrakce na pevné fázi
SG	steviol-glykosidy (steviolglykosidy)
SR	Stevia rebaudiana Bertoni
STZ	streptozotocin
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances, látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TLR2	Toll-like receptor 2
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TPA	12-O-tetradekanoyl-forbol-13-acetát
WHO	Světová zdravotnická organizace
Xyl	xylóza

7. SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1:</i> Složení usušených SR listů, podle jednotlivých autorů, přeloženo z (15)....	11
<i>Tabulka 2:</i> Složení stéviových listů v závislosti na metodě sušení, přeloženo z (15)	11
<i>Tabulka 3:</i> Aminokyseliny v usušeném listu SR, přeloženo z (22).....	13
<i>Tabulka 4:</i> Obsah MK v oleji z SR listu, přeloženo z (15)	13
<i>Tabulka 5:</i> Obsah minerálních látek v usušeném SR listu, přeloženo z (15).....	14
<i>Tabulka 6:</i> Obsah vitamínů rozpustných ve vodě v extraktu z usušených listů SR, přeloženo z (16)	15
<i>Tabulka 7:</i> Steviol-glykosidy, přeloženo z (16)	16
<i>Tabulka 8:</i> Steviol-glykosidy se změnou v základní struktuře, přeloženo z (16).....	17
<i>Tabulka 9:</i> Podmínky použití SG v kategoriích potravin, upraveno dle (112).....	33
<i>Tabulka 10:</i> Navrhované vyhodnocení označení ¹¹⁴	37
<i>Tabulka 11:</i> Srovnání sladivosti jednotlivých sladidel. Vztaženo k sacharóze (ekvivalent sladivosti = 1) ¹²¹	40
<i>Tabulka 12:</i> Přehled sladivosti vybraných SG, přeloženo z (123)	40

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1:</i> Americké státy (vyznačeny žlutě), které pěstují SR ¹¹	9
<i>Obrázek 2:</i> Evropské státy (vyznačeny žlutě), které pěstují SR ¹¹	9
<i>Obrázek 3:</i> Asijské státy (vyznačeny žlutě), které pěstují SR ¹¹	9
<i>Obrázek 4:</i> <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni – stévie sladká ¹⁴	10
<i>Obrázek 5:</i> Čtyři základní struktury SG ¹⁶	16
<i>Obrázek 6:</i> Steviosid ³⁵	18
<i>Obrázek 7:</i> Rebaudiosid A ³⁵	18
<i>Obrázek 8:</i> Biosyntéza SG ⁴	19
<i>Obrázek 9:</i> Chemická struktura CGA ⁴⁶	20
<i>Obrázek 10:</i> β -sitosterol ⁵¹	21
<i>Obrázek 11:</i> STÉVIE SLADKÁ sypaný bylinný čaj Centrum bylin ⁹⁸	30
<i>Obrázek 12:</i> Sladidlo ze stévie, prášek ⁹⁹	30
<i>Obrázek 13:</i> SÜSSINA STEVIA TEKUTÁ 220 ML ¹⁰⁰	30
<i>Obrázek 14:</i> STEVIA IN 100% přírodní sladidlo 200 tablet ¹⁰¹	30
<i>Obrázek 15:</i> Definice „nových potravin“ ¹⁰⁸	33

9. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Rozdíl ve složení čerstvého a usušeného listu, přeloženo z (17).....12

10. POUŽITÁ LITERATURA

1. Djaja Djendoel Soejarto. Botany of Stevia and Stevia rebaudiana. In: *Stevia: The Genus Stevia*. London: Taylor & Francis e-Library; 2004:18-39.
2. Navrátilová Zdeňka. Stevia rebaudiana – přírodní nekalorické sladidlo. *Praktik lékařství*. 2015;11(6):217-219.
3. Carakostas MC, Curry LL, Boileau AC, Brusick DJ. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem Toxicol*. 2008;46:S1-S10.
4. Yadav SK, Guleria P. Steviol Glycosides from Stevia: Biosynthesis Pathway Review and their Application in Foods and Medicine. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012;52:988-998.
5. Bursac Kovačević D, Maras M, Barba FJ, et al. Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from Stevia rebaudiana Bertoni leaves: A review. *Food Chem*. 2018;268:513-521.
6. Simonsohn B. Úvod: Stévie - tajemství medového lístku. In: *Stévie - Přírodní Alternativa Cukru a Sladidel*. 1. Praha: Euromedia Group, k. s. - Ikar; 2013:21-42.
7. Anonym. Classification for Kingdom Plantae Down to Species Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni. <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=STRE2>. Accessed March 29, 2019.
8. Anonym. Stévia sladká (Stevia rebaudiana Bertoni). <https://www.herbar.org/liecive-rastliny/rastlina/stevia-sladka/>. Accessed March 29, 2019.
9. Segura-Campos M, Barbosa-Martín E, Matus-Basto Á, et al. Comparison of Chemical and Functional Properties of Stevia rebaudiana (Bertoni) Varieties Cultivated in Mexican Southeast. *Am J Plant Sci*. 2014;5:286-293.
10. Brandle JE, Starratt AN, Gijzen M. Stevia rebaudiana : Its agricultural, biological, and chemical properties. *Can J Plant Sci*. 1998;78:527-536.
11. Ferrazzano GF, Cantile T, Alcidi B, et al. Is stevia rebaudiana bertoni a non cariogenic sweetener? A review. *Molecules*. 2016;21(38):1-12.
12. Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Kong AH. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem*. 2012;132:1121-1132.
13. Stévie sladká - Stevia rebaudiana Bertoni. <http://stevia.hys.cz/>. Accessed April 2, 2019.
14. ANONYM. About Stevia | Sweet Green Fields. <https://sweetgreenfields.com/our-story/about-stevia/>. Accessed April 2, 2019.
15. Marcinek K, Krejpcio Z. Stevia Rebaudiana bertoni - chemical composition and functional properties. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2015;14(2):145-152.
16. Wölwer-Rieck U. The leaves of Stevia rebaudiana (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: A review. *J Agric Food Chem*. 2012;60:886-895.

17. Snehal P, Madhukar K. QUANTITATIVE ESTIMATION OF BIOCHEMICAL CONTENT OF VARIOUS EXTRACTS OF STEVIA. 2012;5(1):115-117.
18. Spilková J, Martin J, Siatka T. *Farmakognozie*. 1st ed. Prague: Charles university in Prague, Karolinum Press; 2016.
19. Sabaté-Molina M, E L, F T, Zamora S. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *J Physiol Biochem*. 2009;65(3):315-328.
20. Příspěvatelé WikiSkript. Chemie živin. https://www.wikiskripta.eu/w/Chemie_živin. Published 2016. Accessed April 5, 2019.
21. Lněničková L, Pučová J, Švandová V. Aminokyseliny - Webchemie. <https://www.webchemie.cz/aminokyseliny.html>. Published 2014. Accessed April 5, 2019.
22. Abou-Arab AE, Abou-Arab AA, Abu-Salem MF. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana bertonii plant. *African J Food Sci*. 2010;4(5):269-281.
23. Příspěvatelé WikiSkript. Lipidy (1. LF UK, NT). [https://www.wikiskripta.eu/w/Lipidy_\(1._LF_UK,_NT\)](https://www.wikiskripta.eu/w/Lipidy_(1._LF_UK,_NT)). Published 2017. Accessed April 5, 2019.
24. Calcium in diet: MedlinePlus Medical Encyclopedia. <https://medlineplus.gov/ency/article/002412.htm>. Accessed April 6, 2019.
25. Phosphorus in diet: MedlinePlus Medical Encyclopedia. <https://medlineplus.gov/ency/article/002424.htm>. Accessed April 6, 2019.
26. Potassium in diet: MedlinePlus Medical Encyclopedia. <https://medlineplus.gov/ency/article/002413.htm>. Accessed April 6, 2019.
27. Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, et al. 2013 AHA/ACC Guideline on Lifestyle Management to Reduce Cardiovascular Risk. *Circulation*. 2014;129(2):S76-S99.
28. Magnesium in diet: MedlinePlus Medical Encyclopedia. <https://medlineplus.gov/ency/article/002423.htm>. Accessed April 6, 2019.
29. Příspěvatelé WikiSkript. Vitaminy – WikiSkript. <https://www.wikiskripta.eu/w/Vitaminy>. Published 2018. Accessed April 5, 2019.
30. Příspěvatelé WikiSkript. Kyselina askorbová. https://www.wikiskripta.eu/w/Kyselina_askorbova. Published 2018. Accessed April 5, 2019.
31. Příspěvatelé WikiSkript. Kyselina listová - WikiSkript. https://www.wikiskripta.eu/w/Kyselina_listova. Published 2019. Accessed April 5, 2019.
32. Příspěvatelé WikiSkript. Riboflavin. <https://www.wikiskripta.eu/w/Riboflavin>. Published 2018. Accessed April 5, 2019.
33. Hojden B. Stevia rebaudiana - źródłem naturalnych substancji słodzących. *Wiadomości Zielarskie*. https://przychodnia.pl/pisma_zdrowie/wz/slodzi.htm. Published 2000. Accessed August 7, 2019.
34. Kroyer G. Stevioside and Stevia-sweetener in food: Application, stability and interaction with food ingredients. *J Consum Prot Food Saf*. 2010;5:225-229.

35. Rajasekaran T, Ramakrishna A, Udaya Sankar K, Giridhar P, Ravishankar GA. Analysis of predominant steviosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Biotechnol.* 2008;22(2):179-188.
36. Kumar H, Kaul K, Bajpai-Gupta S, Kaul VK, Kumar S. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene.* 2012;492:276-284.
37. Li W, Zhou Y, You W, et al. Development of Photoaffinity Probe for the Discovery of Steviol Glycosides Biosynthesis Pathway in *Stevia rebaudiana* and Rapid Substrate Screening. *ACS Chem Biol.* 2018;13:1944-1949.
38. Zheng J, Zhuang Y, Mao HZ, Jang IC. Overexpression of SrDXS1 and SrKAH enhances steviol glycosides content in transgenic *Stevia* plants. *BMC Plant Biol.* 2019;19(1):1-16.
39. Geuns JMC. Stevioside. *Phytochemistry.* 2003;64:913-921.
40. Koyamaa E, Kitazawaa K, Ohoria Y, et al. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:359-374.
41. Wingard RE, Brown JP, Enderlin FE, Dale JA, Hale RL, Seitz CT. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia.* 1980;36:519-520.
42. HUTAPEA AM, TOSKULKAO C, BUDDHASUKH D, WILAIRAT P, GLINSUKON T. Digestion of Stevioside, a Natural Sweetener, by Various Digestive Enzymes. *J Clin Biochem Nutr.* 1997;23:177-186.
43. Anonym. Speciální stanovení látkových složek. https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52971. Accessed August 5, 2019.
44. Kim IS, Yang M, Lee OH, Kang SN. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Sci Technol.* 2011;44:1328-1332.
45. Karaköse H, Jaiswal R, Kuhnert N. Characterization and quantification of hydroxycinnamate derivatives in *Stevia rebaudiana* leaves by LC-MS n. *J Agric Food Chem.* 2011;59:10143-10150.
46. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:67-74.
47. Nabavi SF, Braidy N, Gortzi O, et al. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Res Bull.* 2015;119:1-11.
48. Tang D, Chen K, Huang L, Li J. Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017;13(3):323-330.
49. Carullo G, Cappello AR, Frattaruolo L, Badolato M, Armentano B, Aiello F. Quercetin and derivatives: Useful tools in inflammation and pain management. *Future Med Chem.* 2017;9(1):79-93.

50. Feng S, Dai Z, Liu A, et al. β -Sitosterol and stigmasterol ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice fed a high fat Western-style diet. *Food Funct.* 2017;8(11):4179-4186.
51. Lomenick B, Shi H, Huang J, Chen C. Identification and characterization of β -sitosterol target proteins. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2015;25(21):4976-4979.
52. Upadhyay A, Amanullah A, Mishra R, Kumar A, Mishra A. Lanosterol Suppresses the Aggregation and Cytotoxicity of Misfolded Proteins Linked with Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2018;55(2):1169-1182.
53. Nogueira AO, Oliveira YIS, Adjafre BL, de Moraes MEA, Aragão GF. Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyirin from *Protium heptaphyllum*: a literature review. *Fundam Clin Pharmacol.* 2019;33:4-12.
54. Rodriguez Furlán LT, Pérez Padilla A, Campderros M. Development of a functional beverage formulation with high protein content, inulin and Stevia. *Int J Food Eng.* 2011;7(3):1-16.
55. Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J, Nuñez MJ. A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: Catechin, resveratrol and grape extract cases. *Eur Food Res Technol.* 2005;221:284-290.
56. Conde E, Moure A, Domínguez H, Parajó JC. Extraction of natural antioxidants from plant foods. In: *Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*. 1st ed. Abington Hall: Woodhead Publishing Limited; 2010:506-594.
57. Putnik P, Kovačević DB, Penić M, Fegeš M, Dragović-Uzelac V. Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Dalmatian Sage Leaves for the Optimal Yield of Polyphenols: HPLC-DAD Identification and Quantification. *Food Anal Methods.* 2016;9(8):2385-2394.
58. Barba FJ, Grimi N, Vorobiev E. Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *J Food Eng.* 2015;149:222-228.
59. JECFA. COMPENDIUM OF FOOD ADDITIVE SPECIFICATIONS. In: *STEVIOLE Glycosides*. Rome; 2008:75-78. <http://www.fao.org/3/a-i0345e.pdf>.
60. Wölwer-Rieck U, Tomberg W, Wawrzun A. Investigations on the stability of stevioside and rebaudioside A in soft drinks. *J Agric Food Chem.* 2010;58(23):12216-12220.
61. Vanek T, Nepovim A, Valicek P. Determination of Stevioside in Plant Material and Fruit Teas. *J Food Compos Anal.* 2001;14:383-388.
62. Gardana C, Scaglianti M, Simonetti P. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2010;1217:1463-1470.
63. Geuns J. Validation of Steviol Glycoside Analysis by an External Standard. *Adv Food Process Technol.* 2018;2018(03):1-11.
64. Momtazi-Borojeni AA, Esmaeili S-A, Abdollahi E, Sahebkar A. A Review on the Pharmacology and Toxicology of Steviol Glycosides Extracted from *Stevia rebaudiana*. *Curr Pharm Des.* 2017;23(11):1616-1622.

65. Geuns JMC. SAFETY EVALUATION OF STEVIA AND STEVIOSIDE. *Stud Nat Prod Chem.* 2002;27:299-319.
66. Toskulkao C, Chaturat L, Temcharoen P, Glinsukon T. Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, AND ITS METABOLITE, STEVIOL, IN SEVERAL ANIMAL SPECIES. *Drug Chem Toxicol.* 1997;20(1&2):31-44.
67. Bazotte RB, Lonardoni MTC, Alvarez M, Gaeti WP, Amado CAB. Determination of the lethal dose (LD50) of isosteviol in laboratory animals. *Arq Biol e Tecnol.* 1986;29(4):711-722.
68. Xili L, Chengjians B, Eryi X, et al. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food Chem Toxicol.* 1992;30(11):957-965.
69. Curry LL, Roberts A. Subchronic toxicity of rebaudioside A. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:11-20.
70. Nikiforov AI, Eapen AK. A 90-day oral (dietary) toxicity study of rebaudioside A in Sprague-Dawley rats. *Int J Toxicol.* 2008;27:65-80.
71. Nikiforov AI, Rihner MO, Eapen AK, Thomas JA. Metabolism and toxicity studies supporting the safety of rebaudioside D. *Int J Toxicol.* 2013;32(4):261-273.
72. Yodyingyud V, Bunyawong S. Effect of stevioside on growth and reproduction. *Hum Reprod.* 1991;6(1):158-165.
73. Usami M, Sakemi K, Kawashima K, Tsuda M, Ohno Y. Teratogenicity study of stevioside in rats. *Bull Natl Inst Hyg Sci.* 1995;113:31-35.
74. Curry LL, Roberts A, Brown N. Rebaudioside A: Two-generation reproductive toxicity study in rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:S21-S30.
75. Urban JD, Carakostas MC, Brusick DJ. Steviol glycoside safety: Is the genotoxicity database sufficient? *Food Chem Toxicol.* 2013;51:386-390.
76. JECFA. Steviol glycosides. In: 63rd Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva: World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland. In: *WHO Technical Report Series 928.* Geneva; 2005:34-39.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43141/WHO_TRS_928.pdf;jsessionid=B75369A38F1490BA70C227947F91FECC?sequence=1.
77. Brusick DJ. A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:S83-S91.
78. Awney HA, Massoud MI, El-Maghrabi S. Long-term feeding effects of stevioside sweetener on some toxicological parameters of growing male rats. *J Appl Toxicol.* 2011;31:431-438.
79. Suttajit M, Vinitketkaumnun U, Meevatee U, Buddhasukh D. Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Environ Health Perspect.* 1993;101(SUPPL. 3):53-56.
80. Klongpanichpak S, Temcharoen P, Toskulkao C, Apibal S, Glinsukon T. Lack of Mutagenicity of Stevioside and Steviol in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100. *J Med Assoc Thail.* 1997;80(1):S121-128.

81. M. M, K. M, M. S, et al. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis*. 1996;11(6):573-579.
82. Williams LD, Burdock GA. Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:1831-1836.
83. Hagiwara A, Fukushima S, Kitaori M, Shibata M, Ito N. Effects of three sweeteners on rat urinary bladder carcinogenesis initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. *Gann*. 1984;75(9):763-768.
84. Aze Y, Toyoda K, Imaida K, et al. Subchronic oral toxicity study of stevioside in F344 rats. *Eisei Shikenjo Hokoku*. 1991;109:48-54.
85. Toyoda K, Matsui H, Shoda T, Uneyama C, Takada K, Takahashi M. Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. *Food Chem Toxicol*. 1997;35:597-603.
86. JECFA. Sweetening agent: stevioside. In: 51st Meeting Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). World Health Organization, Geneva, Switzerland. In: *WHO Food Additive Series*. ; 2000:33-35.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42245/WHO_TRS_891.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
87. JECFA. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Prepared by the 68th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Food Addit Ser*. 2007;59:183-220.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43870/9789241209472_eng.pdf;jsessionid=97A4FC9BF79DFBA70CE24A2CDD47FB5E?sequence=1.
88. JECFA. STEVIOL GLYCOSIDES. <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=267>. Published 2019. Accessed June 24, 2019.
89. JECFA. STEVIOL GLYCOSIDES. <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=267>. Published 2019. Accessed June 21, 2019.
90. SCF. Food - Science and Techniques. *Reports Sci Comm Food*. 1985:1-20.
http://aei.pitt.edu/40825/1/16th_food.pdf.
91. SCF. Food - Science and Techniques. *Reports Sci Comm Food*. 1989:19-37.
http://aei.pitt.edu/40830/1/21st_food.pdf.
92. SCF. Opinion on Stevioside as a sweetener. 1999:1-7.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out34_en.pdf.
93. EFSA. Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA J*. 2010;8(4):1-84.
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1537>.
94. Kolková L, Křížová J. Cukrovka v číslech a faktech - HlídějíSiZdraví.cz. <http://www.hlidejsizdravi.cz/vse-o-diabetu/tipy-pro-zivot-s-diabetem/cukrovka-v-cislech-a-faktech/>. Accessed July 20, 2019.
95. WHO. Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Published 2018. Accessed August 3, 2019.
96. SZÚ. Nadváha a obezita. <http://www.szu.cz/tema/prevence/nadvaha-a-obezita?highlightWords=nadvaha>. Published 2013. Accessed July 20, 2019.

97. Simonsohn B. Stévie - produkty k zakoupení i k vlastní výrobě. In: *Stévie - Přírodní Alternativa Cukru a Sladidel*. 1. Praha: Windpferd Verlagsgesellschaft mbH; 2013:43-47.
98. Bylin C. STÉVIE SLADKÁ sypaný bylinné čaj | Centrum bylin. <https://www.centrum-bylin.cz/STEVIE-SLADKA-sypany-bylinne-caj-Centrum-bylin>. Accessed July 20, 2019.
99. Plodů S. Sladidlo ze stévie prášek. https://www.svetplodu.cz/stevie-sladidlo-prasek-vareni-nevareni/?variantId=6692&gclid=EAIaIQobChMIvM6A7v7D4wIVSeh3Ch1j7QOREAQYBCABEgI2VvD_BwE. Accessed July 20, 2019.
100. Kaumy E. SÜSSINA STEVIA TEKUTÁ 220ML. https://www.eshop.kaumy.cz/e-shop/sussina-stevia-tekuta-220ml-detail?gclid=EAIaIQobChMIvM6A7v7D4wIVSeh3Ch1j7QOREAQYBSABEgKkXvD_BwE. Accessed July 20, 2019.
101. ANONYM. STEVIA IN 100% přírodní sladidlo 200 tablet - Lékárna.cz. https://www.lekarna.cz/stevia-in-100-prirodni-sladidlo-200-tablet/?gclid=EAIaIQobChMIqYGz4P7D4wIVQ-h3Ch0HfgYJEAQYDyABEgIEy_D_BwE. Accessed July 20, 2019.
102. Patočková M. Cukrový strašák obchází Evropu. S nadváhou mají zatočit lehké coly - iDNES.cz. https://www.idnes.cz/ekonomika/domaci/cola-bez-cukru-sladidla-obezita.A180109_375020_ekonomika_are. Published 2018. Accessed July 20, 2019.
103. Volnerová J. Sladká revoluce jménem stévie: Proč ještě nenahradila cukr. <https://www.stoplusjednicka.cz/sladka-revoluce-jmenem-stevie-proc-jeste-nenahradila-cukr>. Published 2014. Accessed July 21, 2019.
104. Homayouni Rad A, Delshadian Z, Arefhosseini SR, Alipour B, Asghari Jafarabadi M. Effect of inulin and stevia on some physical properties of chocolate milk. *Heal Promot Perspect*. 2012;2(1):42-47.
105. Alizadeh M, Azizi-Lalabadi M, Kheirouri S. Impact of Using Stevia on Physicochemical, Sensory, Rheology and Glycemic Index of Soft Ice Cream. *Food Nutr Sci*. 2014;05(04):390-396.
106. Hergesell L, Schoene F, Greiling A, Schaefer U, Jahreis G. Possibilities and Limitations of Sugar Reduction by Steviol Glycosides in Yoghurt. *Ernahrungs Umschau*. 2014;61(12):181-187.
107. SZPI. Stevia rebaudiana – je, nebo není potravinou nového typu? <https://www.szpi.gov.cz/clanek/stevia-rebaudiana-je-nebo-neni-potravinou-noveho-typu.aspx>. Published 2018.
108. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) 2015/2283 ze dne 25. listopadu 2015 o nových potravinách, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 a o zrušení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/97 a nařízení Komise (ES) č. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32015R2283&from=CS>.
109. IFOAM. Regulation: On stevia rebaudiana | IFOAM EU. <https://www.ifoam-eu.org/en/news/2017/09/01/regulation-stevia-rebaudiana>. Published 2017. Accessed July 21, 2019.

110. 330/1997 Sb. Prováděcí vyhláška zákona o potravinách a tabákových výrobcích pro čaj, kávu a kávoviny. <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-330>. Accessed July 21, 2019.
111. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32008R1333&from=CS>.
112. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1131/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, pokud jde o steviol-glykosidy. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011R1131&from=CS>.
113. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 231/2012 ze dne 9. března 2012, kterým se stanoví specifikace pro potravinářské přídatné látky uvedené v přílohách II a III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32012R0231&from=CS>.
114. SZPI. Označování steviolglykosidů na obalech výrobků. <https://www.szpi.gov.cz/clanek/oznacovani-steviolglykosidu-na-obalech-vyrodku.aspx>. Published 2018. Accessed July 21, 2019.
115. Simonsohnová B. Situace v Japonsku. In: *Stévie - Přírodní Alternativa Cukru a Sladidel*. 1. Praha: Euromedia Group, k. s. - Ikar; 2013:99-102.
116. *Public Law 103-141*.; 1994. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/STATUTE-108/pdf/STATUTE-108-Pg4325.pdf>.
117. *GRAS Notice No. 000252 on the Use of Rebaudioside A Purified from Stevia Rebaudiana (Bertoni) Bertoni*. FDA; 2008. <https://wayback.archive-it.org/7993/20171031031304/https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm154988.htm>. Accessed August 4, 2019.
118. *GRAS Notices*. FDA; 2019. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&showAll=true&type=advanced&search=□□□□. Accessed August 4, 2019.
119. *GRAS Notices - Steviol Glycosides*.; 2019. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=stevi. Accessed August 4, 2019.
120. Perrier JD, Mihalov JJ, Carlson SJ. FDA regulatory approach to steviol glycosides. *Food Chem Toxicol*. 2018;122:132-142.
121. Doležal M. Sladidla používaná ve farmacii a potravinářství - 1. přírodní sladidla. *Prakt lékárenství*. 2008;4(6):306-309.
122. Doležal M. Sladidla používaná ve farmacii a potravinářství - 2. syntetická sladidla. *Prakt lékárenství*. 2009;5(1):29-31.
123. AHA. Sugar 101. <https://www.heart.org/en/healthy-living/healthy-eating/eat-smart/sugar/sugar-101>. Published 2018. Accessed July 29, 2019.

124. Luo S, Monterosso JR, Sarpelleh K, Page KA. Differential effects of fructose versus glucose on brain and appetitive responses to food cues and decisions for food rewards. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(20):6509-6514.
125. Vasselli J, Scarpace P, Harris R, Banks W. Dietary Components in the Development of Leptin Resistance. *Adv Nutr.* 2013;4:164-175.
126. Malik VS, Pan A, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2013;98:1084-1102.
127. Amato MC, Guarnotta V, Giordano C. Body composition assessment for the definition of cardiometabolic risk. *J Endocrinol Invest.* 2013;36(7):537-543.
128. Pagidipati NJ, Gaziano TA. Estimating Deaths From Cardiovascular Disease: A Review of Global Methodologies of Mortality Measurement. *Circulation.* 2013;127(6):749-756.
129. DiNicolantonio JJ, Lucan SC, O'Keefe JH. The Evidence for Saturated Fat and for Sugar Related to Coronary Heart Disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2016;58(5):464-472.
130. Seneff S, Wainwright G, Mascitelli L. Is the metabolic syndrome caused by a high fructose, and relatively low fat, low cholesterol diet? *Arch Med Sci.* 2011;7(1):8-20.
131. Yang Q, Zhang Z, Gregg EW, Flanders WD, Merritt R, Hu FB. Added sugar intake and cardiovascular diseases mortality among us adults. *JAMA Intern Med.* 2014;174(4):516-524.
132. Kucharska A, Szmurło A, Sinska B. Significance of diet in treated and untreated acne vulgaris. *Adv Dermatology Allergol.* 2016;XXXIII(2):81-86.
133. Smith RN, Mann NJ, Braue A, Mäkeläinen H, Varigos GA. The effect of a high-protein, low glycemic-load diet versus a conventional, high glycemic-load diet on biochemical parameters associated with acne vulgaris: A randomized, investigator-masked, controlled trial. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(2):247-256.
134. Koku Aksu AE, Metintas S, Saracoglu ZN, et al. Acne: Prevalence and relationship with dietary habits in Eskisehir, Turkey. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2011;26(12):1-7.
135. Campbell CE, Strassmann BI. The blemishes of modern society? Acne prevalence in the Dogon of Mali. *Evol Med Public Heal.* 2016;2016(1):325-337.
136. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet.* 2011;378:31-40.
137. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci.* 2014;11(11):1185-1200.
138. Xi B, Li S, Liu Z, et al. Intake of fruit juice and incidence of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(3):e93471.
139. Wang M, Yu M, Fang L, Hu RY. Association between sugar-sweetened beverages and type 2 diabetes: A meta-analysis. *J Diabetes Investig.* 2015;6:360-366.

140. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes*. 2013;2013:1-11.
141. Orgel E, Jaques J, Mittelman SD. The Links Between Insulin Resistance, Diabetes, and Cancer. *Curr Diab Rep*. 2013;13(2):213-222.
142. Tasevska N, Jiao L, Cross AJ, et al. Sugars in diet and risk of cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study Nataša. *Int J cancer*. 2012;130(1):159-169.
143. Friberg E, Wallin A, Wolk A. Sucrose, high-sugar foods, and risk of endometrial cancer - A population-based cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(9):1831-1837.
144. Guo X, Park Y, Freedman ND, et al. Sweetened beverages, coffee, and tea and depression risk among older US adults. *PLoS One*. 2014;9(4):e94715.
145. Akbaraly TN, Brunner EJ, Ferrie JE, Marmot MG, Kivimaki M, Singh-Manoux A. Dietary pattern and depressive symptoms in middle age. *Br J Psychiatry*. 2009;195:408-413.
146. Kivimäki M, Shipley MJ, Batty GD, et al. Long-term inflammation increases risk of common mental disorder: A cohort study. *Mol Psychiatry*. 2014;19(2):149-150.
147. Knüppel A, Shipley MJ, Llewellyn CH, Brunner EJ. Sugar intake from sweet food and beverages, common mental disorder and depression: Prospective findings from the Whitehall II study. *Sci Rep*. 2017;7(6287):1-10.
148. Gangwisch JE, Hale L, Garcia L, et al. High glycemic index diet as a risk factor for depression: Analyses from the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr*. 2015;102:454-463.
149. Gkogkolou P, Böhm M. Advanced glycation end products: Keyplayers in skin aging? *Dermatoendocrinol*. 2012;4(3):259-270.
150. Aragno M, Mastrocola R. Dietary sugars and endogenous formation of advanced glycation endproducts: Emerging mechanisms of disease. *Nutrients*. 2017;9(385):1-16.
151. MC C, OH F, SP G, PG M, AE M. Dietary nutrient intakes and skin-aging appearance among middle-aged American women. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:1225-1231.
152. Boccardi V, Paolisso G, Mecocci P. Nutrition and lifestyle in healthy aging: the telomerase challenge. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(1):12-15.
153. Lee D, Hwang W, Artan M, Jeong DE, Lee SJ. Effects of nutritional components on aging. *Aging Cell*. 2015;14:8-16.
154. Leung CW, Laraia BA, Needham BL, et al. Soda and cell aging: Associations between sugar-sweetened beverage consumption and leukocyte telomere length in healthy adults from the national health and nutrition examination surveys. *Am J Public Health*. 2014;104(12):2425-2431.
155. Spruijt-Metz D, Belcher B, Anderson D, et al. A high sugar, low fiber meal leads to higher leptin and physical activity levels in overweight Latina females as opposed to a low sugar, high fiber meal. *J Am Diet Assoc*. 2009;109(6):1058-1063.

156. Reilly GAO, Belcher BR, Davis JN, et al. Effects of high sugar and high fiber meals on physical activity behaviors in Latino and African American adolescents Gillian. *Obes (Silver Spring)*. 2015;23(9):1886-1894.
157. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, et al. Liver Fructose and Sugar: A Major Mediator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Hepatol*. 2018;68(5):1063-1075.
158. Ma J, Fox CS, Jacques PF, et al. Sugar-sweetened beverage, diet soda, and fatty liver disease in the Framingham Heart Study cohorts. *J Hepatol*. 2015;63(2):462-469.
159. Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr*. 2004;7(1a):201-226.
160. Touger-Decker R, Loveren C van. Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr*. 2003;78:881S-92S.
161. Hujuel PP, Lingström P. Nutrition, dental caries and periodontal disease: a narrative review. *J Clin Periodontol*. 2017;44(18):S79-S84.
162. Konoshima T, Takasaki M. Cancer-chemopreventive effects of natural sweeteners and related compounds. *Pure Appl Chem*. 2002;74(7):1309-1316.
163. Debnath M. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *J Med Plants Res*. 2008;2(2):45-51.
164. Simonsohn B. Přednosti stévie z hlediska zdraví. In: *Stévie - Přírodní Alternativa Cukru a Sladidel*. 1. Praha: Euromedia Group, k. s. - Ikar; 2013:118-158.
165. Přispěvatelé WikiSkrip. Diabetes mellitus 2. typu (endokrinologie). [https://www.wikiskripta.eu/w/Diabetes_mellitus_2._typu_\(endokrinologie\)](https://www.wikiskripta.eu/w/Diabetes_mellitus_2._typu_(endokrinologie)). Published 2019. Accessed April 5, 2019.
166. Hong J, Chen L, Jeppesen PB, Nordentoft I, Hermansen K. Stevioside counteracts the α -cell hypersecretion caused by long-term palmitate exposure. *Am J Physiol Metab*. 2005;290(3):E416-E422.
167. Starratt AN, Kirby CW, Pocs R, Brandle JE. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*. 2002;59:367-370.
168. Abudula R, Matchkov V V., Jeppesen PB, Nilsson H, Aalkjær C, Hermansen K. Rebaudioside A directly stimulates insulin secretion from pancreatic beta cells: A glucose-dependent action via inhibition of ATP-sensitive K⁺-channels. *Diabetes, Obes Metab*. 2008;10:1074-1085.
169. Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*. 1995;2(2):137-189.
170. Gregersen S, Jeppesen PB, Holst JJ, Hermansen K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*. 2004;53(1):73-76.
171. Saravanan R, Ramachandran V. Modulating efficacy of Rebaudioside A, a diterpenoid on antioxidant and circulatory lipids in experimental diabetic rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;36:472-483.
172. Jeppesen PB, Gregersen S, Rolfsen SED, et al. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism*. 2003;52(3):372-378.
173. Chan P, De-Yi X, Ju-Chi L, et al. the Effect of Stevioside on Blood Pressure and Plasma. *Life Sci*. 1998;63(19):1679-1684.

174. Lee CN, Wong KL, Liu JC, Chen YJ, Cheng JT, Chan P. Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. *Planta Med.* 2001;67:796-799.
175. Wong KL, Chan P, Yang HY, et al. Isosteviol acts on potassium channels to relax isolated aortic strips of Wistar rat. *Life Sci.* 2004;74:2379-2387.
176. Melis MS. Stevioside effect on renal function of normal and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol.* 1992;36:213-217.
177. Yuajit C, Homvisasevongsa S, Chatsudthipong L, Soodvilai S, Muanprasat C, Chatsudthipong V. Steviol Reduces MDCK Cyst Formation and Growth by Inhibiting CFTR Channel Activity and Promoting Proteasome-Mediated CFTR Degradation. *PLoS One.* 2013;8(3):e58871.
178. Takasaki M, Konoshima T, Kozuka M, et al. Cancer preventive agents. Part 8: Chemopreventive effects of stevioside and related compounds. *Bioorganic Med Chem.* 2009;17:600-605.
179. Akihisa T, Hamasaki Y, Tokuda H, Ukiya M, Kimura Y, Nishino H. Microbial Transformation of Isosteviol and Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation of the Transformation Products. *J Nat Prod.* 2004;67(3):407-410.
180. Mizushina Y, Akihisa T, Ukiya M, et al. Structural analysis of isosteviol and related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors. *Life Sci.* 2005;77:2127-2140.
181. Jayaraman S, Manoharan MS, Illanchezian S. In-vitro Antimicrobial and Antitumor Activities of Stevia Rebaudiana (Asteraceae) Leaf Extracts. 2008;7(4):1143-1149.
182. Wang Y, Li L, Wang Y, et al. New application of the commercial sweetener rebaudioside a as a hepatoprotective candidate: Induction of the Nrf2 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2018;822:128-137.
183. Wang T, Guo M, Song X, et al. Stevioside Plays an Anti-inflammatory Role by Regulating the NF- κ B and MAPK Pathways in *S. aureus*-infected Mouse Mammary Glands. *Inflammation.* 2014;37(5):1837-1846.
184. Fengyang L, Yunhe F, Bo L, et al. Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by downregulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-Stimulated RAW264.7 cells. *Inflammation.* 2012;35(5):1669-1675.
185. Boonkaewwan C, Ao M, Toskulkao C, Rao MC. Specific immunomodulatory and secretory activities of stevioside and steviol in intestinal cells. *J Agric Food Chem.* 2008;56:3777-3784.
186. Yingkun N, Zhenyu W, Jing L, Xiuyun L, Huimin Y. Stevioside protects LPS-induced acute lung injury in mice. *Inflammation.* 2013;36(1):242-250.
187. Zhao YT, Guo JH, Wu ZL, Xiong Y, Zhou WL. Innate immune responses of epididymal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection. *Immunol Lett.* 2008;119:84-90.
188. Boonkaewwan C, Burodom A. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and steviol on colonic epithelial cells. *J Sci Food Agric.* 2013;93:3820-3825.

189. Boonkaewwan C, Toskulkao C, Vongsakul M. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and its metabolite steviol on THP-1 cells. *J Agric Food Chem.* 2006;54(3):785-789.
190. Ahirwal L, Singh S, Dubey MK, Bharti V, Mehta A, Shukla S. In vivo immunomodulatory effects of the methanolic leaf extract of *Gymnema sylvestre* in Swiss albino mice. *Arch Biol Sci.* 2015;67(2):561-570.
191. Sehar I, Kaul A, Bani S, Pal HC, Saxena AK. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chem Biol Interact.* 2008;173:115-121.
192. Matsukubo T, Takazoe I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *Int Dent J.* 2006;56(3):119-130.
193. Grenby T. Update on low. *Int Dent J.* 1991;41(4):217-224.
194. Petri Jr WA, Miller M, Binder HJ, Levine MM, Dillingham R, Guerrant RL. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development William. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1277-1290.
195. Chatsudthipong V, Muanprasat C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Ther.* 2009;121:41-54.
196. Puri M, Sharma D. Antibacterial activity of stevioside towards food-borne pathogenic bacteria. *Eng Life Sci.* 2011;11(3):326-329.
197. Singh N, Jaggi A, Sharma D, Puri M, Tiwary A. Antiamnesic effect of stevioside in scopolamine-treated rats. *Indian J Pharmacol.* 2010;42(3):164-167.
198. Hou Y, Wang H, Zhang F, et al. Novel self-nanomicellizing solid dispersion based on rebaudioside A: A potential nanoplatform for oral delivery of curcumin. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:557-571.
199. Uchiyama H, Tozuka Y, Imono M, Takeuchi H. Transglycosylated stevia and hesperidin as pharmaceutical excipients: Dramatic improvement in drug dissolution and bioavailability. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;76(2):238-244.
200. Letchmanan K, Shen SC, Ng WK, Tan RBH. Application of transglycosylated stevia and hesperidin as drug carriers to enhance biopharmaceutical properties of poorly-soluble artemisinin. *Colloids Surfaces B.* 2018;161:83-93.