



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI
E AMBIENTE
Dipartimento di SCIENZE CHIMICHE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Glicosidi steviolici: valutazione della sicurezza e loro utilizzo come edulcoranti alimentari

Relatore
Prof. Fernando Formaggio

Laureando
Filippo Tacchella
Matricola n.
1028716

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

Indice

1.	Introduzione	7
2.	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	9
	6.1 La Storia	9
	6.2 Il Genere	9
3.	I Glicosidi Steviolici	11
	3.1 La Struttura	11
	3.2 Lo Stevioside	12
	3.3 Il Rebaudioside A	12
4.	Il Prodotto Commerciale	13
	4.1 Usi In Campo Alimentare	13
5.	Produzione	17
	5.1 Passaggi chiave nel processo di estrazione	18
	5.1.1 Estrazione	18
	5.1.2 Scambio ionico	18
	5.1.3 Coagulazione e precipitazione	19
	5.1.4 Cristallizzazione o Spry Dryng	19
6.	Valutazione Dei Glicosidi Steviolici	21
	6.1 Prima valutazione del <i>Scientific Committee on Food</i>	21
	6.2 Seconda valutazione del <i>Scientific Committee on Food</i>	22
	6.3 Terza valutazione del <i>Scientific Committee on Food</i>	23
	6.4 Prima valutazione JECFA	25
	6.5 Seconda valutazione JECFA	26
	6.6 Terza valutazione JECFA	28
	6.7 Quarta valutazione JECFA	29
	6.8 Prima valutazione dell' <i>European Food Safety Authority</i>	30
	6.9 Seconda valutazione dell' <i>European Food Safety Authority</i>	31
	6.10 Autorizzazione all'uso dei glicosidi steviolici come additivi alimentari	32
7.	Conclusioni	33
	APPENDICE I	35
	Bibliografia	41

Dedicato ai miei genitori e ai miei fratelli...

1. Introduzione

Da alcuni anni si sente parlare insistentemente dei glicosidi steviolici, sostanze estratte dalle foglie di una pianta originaria dell'*Amambay Cordillera* conosciuta con il nome di *Stevia rebaudiana* Bertoni, impiegati come edulcoranti alimentari all'interno di alimenti ipocalorici e senza zuccheri aggiunti.

Peculiarità di questo additivo è l'intenso potere dolcificante, fino a trecento volte superiore a quello del saccarosio, correlato a un bassissimo apporto calorico, il che lo rende ideale per quelle classi di consumatori che vogliono aggirare il problema dell'aumento di peso senza rinunciare ai cosiddetti dolci piaceri della vita; la buona tolleranza da parte dei soggetti affetti da diabete mellito di tipo due lo rende inoltre un buon sostituto del saccarosio.

Grazie a queste sue particolarità, ma probabilmente anche a causa di una maggiore predilezione da parte dei consumatori per i prodotti di origine naturale, le aziende del settore alimentare stanno facendo largo uso di questo nuovo edulcorante proponendo prodotti sempre nuovi all'insegna della naturalità e dell'ipocaloricità.

Tutto questo in Europa non sarebbe stato possibile se la Commissione Europea non avesse autorizzato l'uso dei glicosidi steviolici mediante la modifica del Regolamento in materia di additivi alimentari N.1333 del 2008. L'autorizzazione, avvenuta nel 2011, a sua volta, è stato il risultato di un lungo percorso di studi e valutazioni che ha coinvolto prima il Comitato Scientifico per l'Alimentazione Umana (*Scientific Committee on Food*) poi il Comitato Comune FAO/WHO di Esperti sugli Additivi Alimentari (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) e infine l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*), incaricati di verificare l'idoneità d'impiego dei glicosidi come additivi alimentari e l'assenza di rischi per la salute derivanti da un loro uso all'interno degli alimenti.

Il seguente elaborato si propone di illustrare dapprima la storia e le caratteristiche dell'arbusto dalle cui foglie sono estratti i glicosidi steviolici, nei capitoli successivi di affrontare i glicosidi dal punto di vista chimico, illustrandone le proprietà chimico fisiche e le diverse strutture, e dal punto di vista commerciale, attraverso la definizione del prodotto e del suo impiego previsto secondo la normativa. Un'ulteriore capitolo affronta le modalità di produzione dell'edulcorante illustrandone un processo tipo di estrazione. Nell'ultimo capitolo, infine, si fa riferimento a tutte le valutazioni sulla sicurezza dei glicosidi steviolici susseguitesi nel corso degli anni: la prima pubblicata nel 1985 e l'ultima antecedente l'autorizzazione all'uso del prodotto in Europa, pubblicata nel 2011.

2 *Stevia rebaudiana* Bertoni

Stevia rebaudiana Bertoni (Figura 2.1) è la più conosciuta tra le specie botaniche contenenti glicosidi steviolici, prodotti che troviamo soprattutto all'interno degli apparati fogliari e dei fiori.



Figura 2.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni (Lemus-Mondaca, 2012)

botanicamente da Moisés Santiago Bertoni che la battezzò con il nome di *Eupatorium rebaudianum*, mentre nel 1905 assunse il nome con cui è tuttora conosciuta di *Stevia rebaudiana* Bertoni (Lemus-Mondaca, 2012). Il sapore dolce caratteristico delle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni fu dapprima associato alla presenza di glicirrizina (Figura 2.2) negli apparati fogliari. In seguito, esso fu invece collegato alla presenza di glicosidi steviolici, identificati per la prima volta nel 1931 proprio all'interno della pianta grazie agli studi di due ricercatori francesi, Bridel e Lavielle (Ceunen, 2013; Puri, 2011).

2.1 La Storia

La specie, della famiglia delle *Asteraceae*, è originaria della *Amambay Cordillera* (Ceunen, 2013). Per secoli fu utilizzata come dolcificante dalle popolazioni native del Sud America (Kroger, 2006), tuttavia viene prescritta anche come ipoglicemico da alcuni medici paraguaiani e impiegata come contraccettivo naturale da alcune popolazioni del Matogrosso (Mazzei-Planas, 1968). Nel 1887 venne scoperta dalla scienza occidentale (Ceunen, 2013) e nel 1899 fu classificata

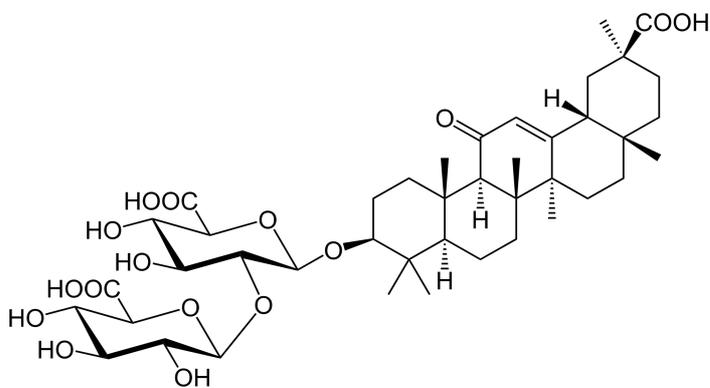


Figura 2.2 Struttura molecolare della glicirrizina (Glicirrizina, wikipedia.org)

2.2 Il Genere

Il genere *Stevia* conta tra le 220 e le 230 specie vegetali diverse, tra queste solo *Stevia rebaudiana* Bertoni e *Stevia phlebophylla* A. Gray contengono glicosidi steviolici (Ceunen, 2013; Markovic, 2008). Le specie appartenenti al genere *Stevia* hanno struttura arbustiva e

sono caratterizzate da crescita che non supera il metro di altezza (Figura 2.3) (Mishra, 2010). Le foglie sono sessili, hanno forma ellittica con margini seghettati, lunghezza di 3-4 cm, pubescenza caratteristica nella pagina superiore (Figura 2.4) e si dipartono da steli connessi a un apparato radicale rizomatoso particolarmente esteso (Ceunen, 2013; Lemus-Mondaca, 2012; Shock, 1982). Le infiorescenze sono corimbiformi e costituite da piccoli fiorellini bianchi o violacei con cinque petali (Figura 2.5); da questi si sviluppano i frutti costituiti da un achenio fusiforme (Blumenthal, 1996; Katayama, 1976).



Figura 2.3 Pianta di *Stevia rebaudiana* Bertoni (logostevia)



Figura 2.4 Foglia di *Stevia rebaudiana* Bertoni (logostevia)



Figura 2.3 Fiori di *Stevia rebaudiana* Bertoni (LeMiePiante)

3 I Glicosidi Steviolici

I glicosidi steviolici sono dei diterpeni glicosidici caratterizzati da un intenso potere dolcificante. Sono metaboliti secondari di un numero molto limitato di specie vegetali. Tra queste possiamo citare la *Stevia rebaudiana* Bertoni e la *Stevia phlebophylla* A. Gray, entrambe della famiglia delle Asteraceae, il *Rubus savissimus* S. Lee della famiglia delle Rosaceae e l'*Angelica keiskei* della famiglia delle Apiaceae (Ceunen, 2013).

3.1 La Struttura

I Glicosidi steviolici sono costituiti da una subunità diterpenica, detta aglicone, e da una o più subunità saccaridiche chiamate gliconi.

La subunità diterpenica presenta una struttura policiclica e contiene un numero variabile di gruppi funzionali ossidrilici, carbonilici, carbossilici o doppi legami carbonio-carbonio (Figura 3.1).

L'aglicone è uno steviolo (Figura 3.1A) o, in alternativa, un suo isomero, come ad esempio l'isosteviolo visibile in Figura 3.1B.

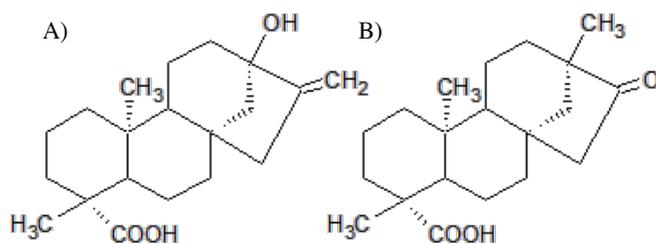


Figura 3.1 Alcuni esempi di subunità agliconiche. A) steviolo
B) isosteviolo (Ceunen, 2013)

I gruppi carbossilici e ossidrilici delle subunità diterpeniche sono legati a subunità gliconiche, (costituite da mono-, di- o oligosaccaridi) mediante legami glicosidici, da cui deriva appunto il nome di glicosidi steviolici. Agliconi diversi legati a saccaridi diversi danno origine a glicosidi steviolici con nomenclature differenti; ognuna di queste molecole è esclusiva di un'unica specie botanica o è contenuta in quantità e rapporti differenti all'interno di specie vegetali diverse.

Nelle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni si trovano molti glicosidi steviolici differenti tra loro principalmente per le subunità gliconiche diverse, ma anche per la subunità agliconica (Ceunen, 2013). Dal 5 al 10% del peso secco delle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni è costituito da stevioside mentre dal 2 al 5% da rebaudioside A (Ceunen, 2013); con tali percentuali queste due molecole costituiscono la frazione principale di glicosidi steviolici contenuti nella pianta (Markovic, 2008). Altri composti minoritari della stessa classe rintracciabili nelle foglie di *Stevia* sono il rebaudioside C (1%), il dulcoside A (0,5%), i rebaudiosidi D, E e F (0,2%), lo steviolbioside (0,1%) e molti altri in quantità ancora più piccole (Ceunen, 2013).

3.2 Lo Stevioside

Lo stevioside è il principale glicoside steviolico contenuto nelle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni ed è una molecola caratterizzata da un potere dolcificante circa trecento volte superiore a quello del saccarosio (M.C. Geuns, 2003). La subunità agliconica è uno steviolo, legato mediante legame glicosidico a un β -glucosio e a un soforosio (Puri, 2011), disaccaride costituito da due β -glucosio legati con legame 1-2 glicosidico (Figura 3.2) (Ceunen, 2013).

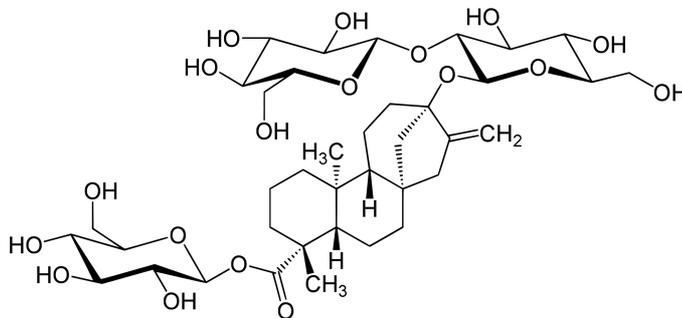


Figura 3.2. Struttura chimica dello Stevioside (Stevioside, wikipedia.org)

Lo stevioside è termicamente stabile alle temperature di processo per la preparazione degli alimenti e non partecipa ai processi di imbrunimento dovuti alla reazione di Maillard (Wallin, 2007).

3.3 Il Rebaudioside A

Il rebaudioside A, dopo lo stevioside, è il glicoside steviolico contenuto in quantità maggiore all'interno delle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni. La molecola si differenzia dallo stevioside per un β -glucosio in più sulla subunità gliconica (Figura 3.3) (Ceunen, 2013).

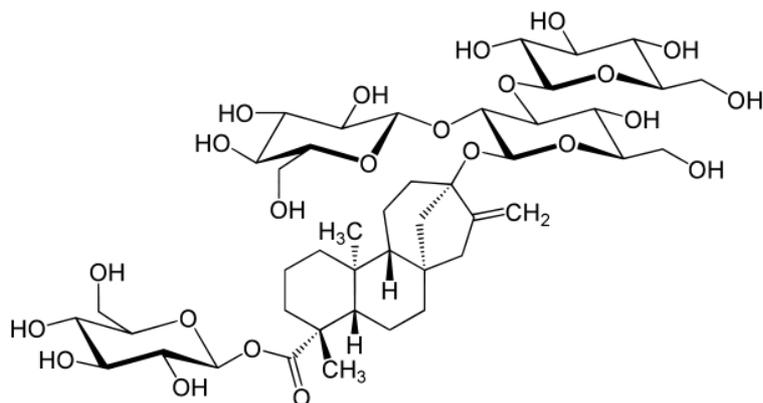


Figura 3.3. Struttura chimica del Rebaudioside A (Rebaudioside A, wikipedia.org)

Come lo stevioside anche il rebaudioside A è termicamente stabile alle temperature di processo per la produzione di alimenti e non partecipa alla reazione di Maillard (Wallin, 2007). Prima della definizione di una nomenclatura univoca con cui riferirsi ai glicosidi steviolici intesi come additivo alimentare, un prodotto contenente rebaudioside A come glicoside predominante veniva comunemente chiamato “rebiana” (Carakostas, 2008).

4 Il Prodotto Commerciale

Le specifiche del prodotto commerciale “glicosidi steviolici” furono proposte nel corso del sessantatreesimo meeting JECFA e modificate nel corso del sessantottesimo e sessantanovesimo meeting. Il nome fa riferimento al prodotto ottenuto dall'estrazione delle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni contenente almeno il 95% di glicosidi steviolici (JECFA, 2007). Un massimo del 5% di prodotto va a costituire le impurità, sostanze di derivazione fogliare quali *n*-alcani e *n*-alcheni, acidi grassi e alcuni terpeni (Markovic, 2008). Secondo quanto definito il prodotto non deve presentare una perdita di peso per essiccamento superiore al 6%, i limiti massimi di metanolo ed etanolo residuo non devono superare rispettivamente i 200 mg/Kg, 5000 mg/Kg e il limite massimo rispettivamente di piombo e arsenico è pari 1 mg/Kg (Wallin, 2007). Il prodotto appare come una polvere di colore bianco o giallo tenue tipicamente inodore o con un flebile odore caratteristico (Wallin, 2004).

4.1 Usi In Campo Alimentare

In Europa l'utilizzo di glicosidi steviolici come additivi alimentari è concesso da Dicembre 2011 con l'entrata in vigore del Regolamento (UE) n.1131/2011 che modifica l'allegato II del Regolamento (CE) 1333/2008 relativo agli additivi alimentari. Questa modifica introduce i glicosidi steviolici tra gli edulcoranti alimentari autorizzati, limitandone tuttavia l'utilizzo solo all'interno di alcune categorie di alimenti e regolandone il livello massimo ammissibile. Le quantità tollerate indicate nel regolamento sono espresse in equivalenti steviolici su chilogrammo (o su litro) di prodotto, riferendosi quindi alla quantità di steviolo, espressa in milligrammi, contenuta in un chilogrammo di prodotto alimentare.

La conversione da glicosidi steviolici a equivalenti steviolici si basa sulla formula seguente (SteviaCouncil, internationalsteviacouncil.org):

$$mg \text{ equivalenti steviolici} = SG \times \sum_{n=1}^N (FC_n \times \%SG_n)$$

In cui *SG* si riferisce alla quantità di estratto di stevia espressa in milligrammi, *FC_n* è il fattore di conversione specifico per ogni *n* glicoside steviolico, *%SG_n* è la percentuale di ogni *n* glicoside steviolico contenuto nell'estratto.

I fattori di conversione (Tabella 4.1) sono dati dal rapporto tra la massa molare dello steviolo e la massa molare del glicoside steviolico specifico, come qui di seguito riportato:

$$FC_n = \frac{MM_s}{MM_n}$$

Oltre alle sigle note, MM_s indica la massa molare dello steviolo mentre MM_n si riferisce alla massa molare di ogni n glicoside steviolico.

Glicosidi Steviolici	Numero CAS	Formula	Peso Molecolare	Fattore di Conversione
Steviolo	471-80-7	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318,45	1,00
Stevioside	57817-89-7	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804,38	0,40
Rebaudioside A	58543-16-1	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	967,01	0,33
Rebaudioside B	58543-17-2	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804,87	0,40
Rebaudioside C	63550-99-2	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	951,01	0,34
Rebaudioside D	63279-13-0	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	1129,15	0,29
Rebaudioside E	63279-14-1	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	967,01	0,33
Rebaudioside F	438045-89-7	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	936,99	0,34
Dulcoside A	64432-06-0	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	788,87	0,40
Rubusoside	63849-39-4	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642,73	0,50
Steviolbioside	41093-60-1	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642,73	0,50

Tabella 4.1 Steviolo e suoi glicosidi, numero CAS, formula, peso molecolare e fattore di conversione per il calcolo degli stevioli equivalenti (EFSA, 2010)

Il Regolamento di modifica prevede che il prodotto commerciale conosciuto come “glicosidi steviolici” possa essere utilizzato entro le quantità previste solo all’interno di prodotti alimentari a ridotto valore energetico o senza zuccheri aggiunti, oppure possa essere impiegato come additivo all’interno di alimenti dietetici o integratori alimentari e come edulcorante da tavola. In prodotti alimentari di categorie specifiche non contrassegnati dalle diciture “a ridotto valore energetico” e “senza zuccheri aggiunti” e non rientranti nella categoria degli alimenti dietetici, degli integratori alimentari o degli edulcoranti da tavola come quelli illustrati in Tabella 4.2 possono essere utilizzati glicosidi steviolici nei limiti quantitativi indicati nella tabella stessa.

Al di fuori dei confini europei troviamo situazioni differenti circa l’utilizzo di *Stevia rebaudiana* Bertoni e dei suoi derivati all’interno dei prodotti alimentari. Negli Stati Uniti l’utilizzo di estratto di foglie di *Stevia* come edulcorante alimentare non è consentito. Tuttavia, esso può essere impiegato come integratore alimentare o come componente di prodotti destinati alla cura della pelle (Lemus-Mondaca, 2012). In altre regioni, tra cui in Giappone, Cina, Corea, Brasile, Argentina e Paraguay, l’utilizzo di glicosidi steviolici all’interno di prodotti alimentari è consentito per legge già da prima che fosse accettato in Europa. In particolare, in Giappone l’utilizzo di questi prodotti è autorizzato da più di trent’anni (Kroger, 2006).

Numero categoria	Numero E	Denominazione	Livello massimo (mg/L o mg/Kg, a seconda dei casi)	Note	Restrizioni/eccezioni
Ortofrutticoli sott'aceto, sott'olio o in salamoia					
04.2.2	E 960	Glicosidi steviolici	100	(60)	Solo conserve agrodolci di frutta e ortaggi
Prodotti di panetteria fine					
07.2	E 960	Glicosidi steviolici	330	(60)	Solo wafer paper – carta di riso commestibile
Pesce e prodotti della pesca trasformati, compresi molluschi e crostacei					
09.2	E 960	Glicosidi steviolici	200	(60)	Solo conserve, semiconserve agrodolci di pesce e marinate di pesce, crostacei e molluschi
Salse					
12.6	E 960	Glicosidi steviolici	120	(60)	Tranne le salse di semi di soia (fermentata e non fermentata)
	E 960	Glicosidi steviolici	175	(60)	Solo salse di semi di soia (fermentata e non fermentata)
Birra e bevande a base di malto					
14.2.1	E 960	Glicosidi steviolici	70	(60)	Solo birre analcoliche o con contenuto alcolico non superiore a 1,2% vol.; bière de table/Tafelbier/table beer (contenuto di mosto di malto inferiore al 6%), tranne Obergäriges Einfachbier; birre con acidità minima pari a 30 milliequivalenti espressa in NaOH; birre scure di tipo oud bruin
Snack a base di patate, cereali, farina o amido					
15.1	E 960	Glicosidi steviolici	20	(60)	
Frutta a guscio trasformata					
15.2	E 960	Glicosidi steviolici	20	(60)	

(60): espressi in equivalenti steviolici

Tabella 4.2 Prodotti non contrassegnati dalle diciture “a ridotto valore energetico” e “senza zuccheri aggiunti” e non rientranti nella categoria degli alimenti dietetici, degli integratori alimentari o degli edulcoranti da tavola in cui è concesso l'utilizzo di glicosidi steviolici (Reg. (UE) n.1131/2011)

5 Produzione

I glicosidi steviolici sono ottenuti per estrazione dalle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni. A seconda delle modalità di estrazione e purificazione del prodotto e delle caratteristiche compositive delle foglie otteniamo prodotti finiti diversi in termini di purezza, quantità e tipologia di glicosidi steviolici presenti (Wallin, 2007). Metodi di estrazione più o meno complessi, basati su principi fisici e chimici diversi, sono utilizzati o studiati con l'intento di ottenere rese maggiori, prodotti più puri o concentrazioni maggiori di alcuni specifici glicosidi. Sono allo studio anche metodiche di produzione che non prevedano l'ausilio di solventi chimici. In Tabella 5.1 sono visibili alcune delle tecniche di estrazione dello stevioside studiate nello scorso decennio.

Tabella 5.1 Estrazione dello stevioside da *S. rebaudiana* con differenti metodi (Puri, 2011)

Method	Yeld	Treatment Time (min)	Reference
SFE (CO2-Methanol, 80:20)	2,51 mg/g	Nd	Choi, 2002
SFE (CO2-Methanol-Water, 80:16:4)	3,56 mg/g	Nd	
Organic Solvent	2,36	Nd	
Chromatographic Separation (Hexane, dichloroethane, ethyl acetate, methanol)	35,3 mg/600g	24 h	Pol, 2007 Ostra, 2007
PFE (Methanol)	5,2%	50	Pol, 2007
PFE (Water)	4,7%	50	
PHWE (Water)	13,90 mg/g	50	Teo, 2009
Microwave Assisted Extraction	21,37 mg/g	20	
Microwave	8,64%	1	
Ultrasound	4,20%	30	Jaitak, 2009
Supercritical Fluid Extraction	36,66 mg/g	100	
Ethanol	48,6	100	
Ultrasonic Assisted Extraction	43,62%	32	Liu, 2010
High Speed Counter Current Cromatography	26 µg/mg	270	Huang, 2010
Enzyme (Emy cellulase)	369 µg/mg	45	Puri, 2011
Combination of three Enzyme (Emy cellulase, Pectinase, Cellulase)	975 µg/mg	76	

Buona parte delle metodiche di estrazione si basano su quattro passaggi chiave, qui di seguito illustrati, consistenti in estrazione, scambio ionico, coagulazione e cristallizzazione del prodotto finito (Puri, 2012).

5.1 Passaggi chiave nel processo di estrazione

Le foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni costituiscono il prodotto di partenza da sottoporre al processo di estrazione. La materia prima può essere preventivamente essicata e macinata così da ottenere un prodotto polverulento (Markosyan, 2014) con un rapporto superficie/volume elevato quanto basta per aumentare l'efficienza dell'operazione successiva.

5.1.1 Estrazione

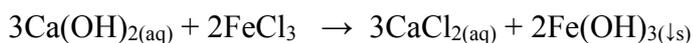
L'estrazione può avvenire in acqua, alcool etilico o metilico a pressione atmosferica e a temperature inferiori alle rispettive temperature di ebollizione (Ostra, 2007). Se l'estrazione solido-liquido è avvenuta in acqua, spesso ne segue una seconda liquido-liquido mirata a purificare il prodotto (Pasquel, 2000). In questa seconda estrazione i pigmenti e i principi dolcificanti si raccolgono in un solvente organico non miscibile con l'acqua, costituito da una miscela di butanolo o isobutanolo e un solvente apolare come benzene, cloroformio o esano (Wallin, 2004). In alcuni casi, prima dell'estrazione solido-liquido, le foglie vengono pretrattate con solventi non polari, come cloroformio o esano, per rimuovere oli essenziali, clorofilla, lipidi e altre componenti non polari (Pasquel, 2000).

5.1.2 Scambio ionico

L'estratto viene separato dal solido esausto (le foglie) mediante filtrazione (Markosyan, 2014). Nel caso di un'unica estrazione si sottopone la soluzione acquosa o alcolica a una serie di processi mirati a separarne le componenti indesiderate, in modo da ottenere una soluzione contenente glicosidi steviolici il più possibile pura. Il trattamento con zeoliti, resine a scambio ionico o acidi di- o tricarbossilici ad azione chelante permette di eliminare dalla soluzione gli ioni metallici (Puri, 2011). Tuttavia, se il prodotto derivante dalla prima estrazione ha subito anche un secondo processo di estrazione liquido-liquido, quindi con il trasferimento dei glicosidi steviolici in una fase organica non idrosolubile, gli ioni rimangono all'interno della fase acquosa e questo trattamento risulta quindi superfluo.

5.1.3 Coagulazione e Precipitazione

L'utilizzo di sali e prodotti flocculanti, quali idrossido di calcio o solfati di alluminio (Wallin, 2004), permettono di interferire con le cariche superficiali delle sostanze colloidali in sospensione favorendone la flocculazione e la successiva precipitazione. Successivamente, per neutralizzare la basicità generata dall'idrossido di calcio o dal solfato di alluminio, si ricorre all'aggiunta di acidi (Puri, 2011) o di cloruro ferrico (Markosyan, 2014) in grado di neutralizzare gli ioni ossidrilici secondo la reazione:



Anche in questo caso se il prodotto di prima estrazione ha subito un secondo processo di estrazione liquido-liquido, questo trattamento risulta superfluo.

5.1.4 Cristallizzazione o Spray Drying

Le componenti precipitate al termine della fase precedente vengono eliminate mediante filtrazione (Markosyan, 2014). Quindi, evaporando a pressione ridotta parte del solvente (Wallin, 2004) si ha un aumento di concentrazione dei glicosidi steviolici nella soluzione e, a seguire, attraverso il processo di *spray drying* si ottiene il prodotto finito in forma di cristalli (Markosyan, 2014).

Nel caso di glicosidi steviolici in fase organica, questa viene dapprima concentrata fino a formare una massa solida, poi ridisciolta in metanolo caldo e infine sottoposta a processo di cristallizzazione mediante raffreddamento. Il prodotto ottenuto subisce una serie di lavaggi con metanolo freddo e infine viene ricristallizzato da una soluzione metanolo-acqua (Wallin, 2004).

6. Valutazione dei glicosidi steviolici

Nella Comunità Europea una prima allusione all'utilizzo dei glicosidi steviolici come additivi alimentari si rinviene all'interno del rapporto, pubblicato nel 1985, che raccoglie i pareri espressi nel Settembre del 1984 dal *Scientific Committee on Food* (SCF) in materia di prodotti dolcificanti. Questa prima valutazione fu tuttavia limitata ad un unico derivato di *Stevia rebaudiana* Bertoni, ovvero lo stevioside. Si continuerà a parlare di stevioside fino al 2005, quando il *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) pubblica un rapporto dove definisce una nomenclatura univoca a cui fare riferimento per i derivati glicosilati dello steviolo, ovvero i glicosidi steviolici. Nel medesimo rapporto viene proposto per la prima volta un *Acceptable Daily Intake* (ADI) provvisorio per la sostanza, pari a 0-2 mg/Kg bw/d (espressi come steviolo), dato dal rapporto tra il *No Observed Effect Level* (NOEL) e due fattori di sicurezza, il primo pari a 100 e immutabile, il secondo pari a 2 e temporaneo fino a completamento di alcuni studi che potessero rispondere adeguatamente ad alcune perplessità emerse nel corso della valutazione dell'additivo. Prima del 2005, rispettivamente tre rapporti dell'SCF e un rapporto JECFA valutarono lo stevioside inaccettabile sotto il profilo tossicologico per mancanza o inadeguatezza dei dati forniti.

Il secondo fattore di sicurezza decadrà nel 2009, innalzando l'ADI fino a 0-4 mg/Kg bw/d (espressi come steviolo). L'anno seguente tre firmatari presentarono all'*European Food Safety Authority* (EFSA) una serie di dossier dove richiesero il riconoscimento dei risultati emersi nel corso delle valutazioni del JECFA. Tali risultati saranno condivisi dall'EFSA e nel 2011 la Commissione Europea introdusse i glicosidi steviolici tra gli additivi alimentari autorizzati all'interno dell'Unione Europea mediante la pubblicazione di un Regolamento di modifica nei confronti del Regolamento 1333/2008 in materia di additivi alimentari e ne venne concesso l'impiego negli alimenti con la sigla E960.

6.1 Prima valutazione del *Scientific Committee on Food*

La Commissione Europea nel 1984 richiese alla *Scientific Committee on Food* (SCF) di valutare lo stevioside sotto il profilo tossicologico e dell'idoneità ad un suo utilizzo come additivo alimentare. L'obiettivo della Commissione era l'emanazione di una normativa, concretizzata poi con la Direttiva N.35 del 94 in materia di edulcoranti destinati ad essere utilizzati nei prodotti alimentari. Nel 1985 esce la sedicesima serie di relazioni del Comitato Scientifico per l'Alimentazione Umana, nella quale lo stevioside e una gamma di altri prodotti dolcificanti vennero valutati.

Al termine di questa prima valutazione lo stevioside venne giudicato inaccettabile sotto il profilo tossicologico a causa di studi nei quali la sostanza presa in esame, lo stevioside, non fu adeguatamente identificata, ovvero non furono specificati né le modalità di ottenimento del prodotto né la sua purezza, come invece richiesto nelle linee direttrici per la valutazione sulla sicurezza d'impiego degli additivi alimentari stabilite dall'SCF stesso in una relazione pubblicata nel 1980 (Appendice I). Lo studio sulla fertilità fu giudicato non conforme in quanto gli effetti dello stevioside furono esaminati solo sulla prima generazione discendente, mentre la prassi prevedeva che interessassero almeno due generazioni di discendenti.

Infine, scarsi dati sul metabolismo e studi sulla tossicità cronica e carcinogenicità non ancora conclusi portarono il comitato a valutare negativamente la sicurezza dell'additivo fino a quando non fosse stato possibile reperire materiale sufficiente e adeguato per una valutazione più approfondita.

6.2 Seconda valutazione del *Scientific Committee on Food*

La ventunesima serie di relazioni del Comitato Scientifico per l'Alimentazione Umana, pubblicata nel 1989, raccoglie la seconda valutazione dell'SCF nei confronti dello stevioside.

Nuovi studi, tra cui studi sul metabolismo e sulla funzione riproduttiva, furono consegnati al Comitato che poté così cercare di dare una valutazione adeguata sulla sostanza.

Uno studio sul metabolismo dello stevioside e del rebaudioside A nei ratti (Nakayama, 1986) evidenziò la capacità della microflora intestinale presente nel colon dell'animale di biotrasformare queste due molecole in steviolo e glucosio. A differenza dei glicosidi, non assorbiti dall'organismo, steviolo e glucosio sono facilmente assorbiti dall'ultima parte del tratto intestinale entrando nel sistema circolatorio dell'animale. Il glucosio assorbito viene metabolizzato ed escreto in anidride carbonica ed acqua per mezzo della respirazione, mentre lo steviolo entra nel cosiddetto circolo entero-epatico, subendo dapprima una coniugazione con acido glucuronico o solfato a livello del fegato e venendo poi rilasciato nell'intestino per mezzo dei succhi biliari. Una volta liberato nell'intestino lo steviolo coniugato viene nuovamente idrolizzato, in parte eliminato per mezzo delle feci e in parte riassorbito.

Studi sulla mutagenesi dimostrarono l'assenza di mutagenicità dello stevioside, tuttavia si riscontrò attività mutagena dello steviolo su esperimenti *in vitro* con *Salmonella typhimurium* TM667 in presenza di attivatori metabolici (Pezzuto, 1985).

Uno studio di tossicità cronica (Yamada, 1985) evidenziò una forte incidenza di adenomi ai testicoli e di altre patologie neoplastiche e non neoplastiche in ratti F344, tuttavia tale studio

fu definito discutibile per l'alta incidenza di patologie riscontrata anche sugli animali di controllo a cui non fu somministrata la sostanza da sperimentare.

Lo studio sulla fertilità e sulla teratogenesi (Mori, 1981) anche in questo caso non interessò più di una generazione discendente e fu giudicato non conforme ai principi di buona prassi di laboratorio a causa di dati non sufficientemente precisi e dose somministrata non comparabile a quella di altri studi a medio-lungo termine.

Sulla base dei risultati l'SCF richiese ulteriori studi di tossicocinetica sull'uomo per verificare se anche nell'essere umano avveniva la biotrasformazione dello stevioside in steviol e, in caso affermativo, di ulteriori studi *in vitro* su cellule di mammifero e *in vivo* sulla mutagenicità dello steviol. Venne inoltre richiesto un secondo studio sugli effetti a lungo termine dello stevioside impiegando ratti diversi dagli F344 e uno studio sulla fertilità e sulla teratogenesi che interessasse due generazioni discendenti, oltre a maggiori specifiche nei confronti di quegli studi poco chiari nel definire le caratteristiche della sostanza impiegata per le prove che, in alcuni casi, pareva non coincidere con la sostanza di cui venne richiesta l'approvazione.

In conclusione, vista la necessità di approfondimenti e la presenza di studi non ancora adeguati, il Comitato valutò anche questa volta lo stevioside inaccettabile sotto il profilo tossicologico.

6.3 Terza valutazione del *Scientific Committee on Food*

Nel 1999, in seguito a ulteriore richiesta di autorizzazione per l'utilizzo dell'estratto raffinato delle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni come additivo alimentare, venne pubblicata quella che sarà l'ultima valutazione dell'SCF sullo stevioside.

Grazie alla disponibilità di nuovi studi sull'argomento il Comitato aggiornò la precedente valutazione, tuttavia, anche questa volta gli esiti non furono diversi dai precedenti.

Nel medesimo periodo il Comitato diede parere negativo anche sull'uso delle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni come *novel food*.

Uno studio sul metabolismo (Hutapea, 1997) effettuato *in vitro* impiegando la microflora ottenuta da feci umane confermò come questa fosse in grado di idrolizzare lo stevioside a steviol e steviol-16,17 α -eposside, cosa che non fu riscontrata in prove con saliva, succhi gastrici, o enzimi di derivazione gastrica, salivare o pancreatica di origine umana.

Uno studio sulla mutagenicità effettuato *in vivo* e *in vitro* (Matsui, 1996) sia su stevioside che su steviol confermò la non mutagenicità dello stevioside ma anche la mutagenicità dello steviol; l'aglicone mostrò, come nello studio di Pezzuto, attività mutagena nei test *in vitro* su

Salmonella typhimurium TM677 in presenza di attivatori metabolici, ma anche su test impiegando cellule di mammifero. Paradossalmente ai test *in vitro* fu appurato che in test *in vivo* su topi lo stevioside non manifestava attività mutagena.

Per quanto riguarda la tossicità acuta (Toskulkae, 1997), uno studio effettuato su topi, ratti e criceti di ambo i sessi evidenziò la non letalità dello stevioside a dosi superiori a 15 g/Kg bw su tutte e tre le specie, mentre per lo steviolo un LD₅₀ pari a 5,20 e 6,10 g/Kg bw rispettivamente in maschi e femmine di criceto, superiore a 15 g/Kg bw in entrambi i sessi delle altre due specie.

Sulla tossicità subcronica dello stevioside il Comitato reperì tre studi (Lee, 1979; Aze, 1991; Asaki, 1975), tuttavia non fu in grado di impiegarli per un'adeguata valutazione della sostanza, le poche informazioni utilizzabili evidenziarono necrosi delle cellule epatiche di ratto F344 in seguito a somministrazione di 155mg/Kg BW di stevioside per 13 settimane.

Due studi sulla tossicità cronica e carcinogenicità furono esaminati dal Comitato. Nel primo studio (Xili, 1992) alcuni ratti furono sottoposti a regimi di dieta contenenti tenori differenti di stevioside puro all'85% per 24 mesi. Benchè non furono osservati effetti avversi derivanti dal consumo di stevioside il Comitato non ritenne lo studio adeguato a causa della scarsa purezza della sostanza utilizzata e dell'inadeguata descrizione delle impurezze presenti.

Nel secondo studio (Toyoda, 1997), effettuato su ratti F344, non furono riscontrati effetti avversi sugli animali a parte un'elevata incidenza di neoplasie a livello dei testicoli. La medesima problematica venne riscontrata anche in uno studio valutato anni prima (Yamada, 1984), il che suggerì al Comitato di richiedere uno studio su animali diversi dai ratti F344, evidentemente suscettibili di problematiche ai testicoli.

Uno studio sulla fertilità (Mazzei-Planas, 1968) e sulla teratogenesi evidenziò una drastica diminuzione della fertilità di ratti femmina nel cui regime alimentare fu inserito estratto di *Stevia rebaudiana* Bertoni. Il calo di fertilità compreso tra il 57 e il 79% rimase evidente per oltre due mesi dalla sospensione della somministrazione dell'estratto.

Uno studio effettuato su criceti e altri due effettuati su ratti permisero di escludere effetti teratogeni ed embriotossici dello stevioside (Yodyingyuad, 1991; Mori, 1981; Usami, 1995), tuttavia, la somministrazione di steviolo in quantità comprese tra 0,75 e 1,0 g/Kg bw/d a criceti gravidi evidenziò un importante effetto tossico della sostanza nei confronti dei feti e anche una forte mortalità delle madri (Wasuntarawat, 1998).

Effetti vasodilatatori dello stevioside (Melis, 1991) e di induzione metabolica nei confronti del glucosio (Ishii, 1987) furono infine messi in evidenza in alcuni studi effettuati sui ratti. Mentre nel primo caso l'effetto sembrava spiegarsi con un possibile comportamento calcio

antagonista dello stevioside, come nel caso del verapamil, nel secondo caso le modalità d'azione della molecola non erano ben chiare, nel complesso per entrambi i casi furono richiesti ulteriori approfondimenti.

Il comitato non soddisfatto degli studi presentati richiese ulteriori approfondimenti sulla farmacocinetica dello stevioside e studi adeguati sulla fertilità. Lo studio sulla fertilità di Mazzei-Planas fu considerato inadeguato perchè il prodotto somministrato alle cavie, estratto o decotto di foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni al 5%, non garantiva che gli effetti riscontrati sugli animali potessero essere attribuibili solo allo stevioside o ad altre sostanze contenute nelle foglie.

Sufficienti gli studi sulla tossicità acuta mentre per la tossicità subcronica gli studi furono giudicati inadeguati.

Sulla base dei dati pervenuti lo stevioside fu ancora una volta dichiarato inaccettabile sotto il profilo tossicologico.

6.4 Prima valutazione del JEFCA

Il *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) è un comitato di esperti amministrati in modo congiunto dalla *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e dalla *World Health Organization* (WHO) che si occupa di valutare diverse sostanze rientranti nella categoria degli additivi alimentari, dei coadiuvanti tecnologici, degli aromatizzanti, dei contaminanti, delle tossine naturali e dei residui di farmaci veterinari su prodotti animali. Il JECFA dà la sua prima valutazione dello stevioside nel corso di un meeting svoltosi a Ginevra dal 9 al 18 Giugno 1998. I risultati del meeting vennero poi raccolti all'interno del cinquantunesimo rapporto JECFA pubblicato nel 2000.

La base delle informazioni di cui si serve il JECFA per valutare lo stevioside è data dai medesimi studi considerati anche dall'SCF nei suoi rapporti, quindi, parte delle conclusioni di questo rapporto, quali il percorso metabolico dello stevioside e la sua bassa tossicità acuta o la tossicità *in vitro* riscontrata nello steviolo, sono condivise con quelle espresse nell'ultimo rapporto dell'SCF. In aggiunta il JECFA analizza altri studi che saranno qui illustrati.

Lo studio di Toyoda sulla tossicità cronica e carcinogenicità, valutato anche dall'SCF, consistette nella somministrazione di una quantità di stevioside equivalente a 970 e 1100 mg/Kg bw/d, rispettivamente a maschi e femmine di ratto, per un periodo di tempo di due anni. (Toyoda, 1997) Nessun effetto di significativa importanza fu osservato dal comitato e nessuna correlazione tra il consumo di stevioside ed effetti cancerogeni emersero dai risultati dello studio.

Lo studio di Mazzei-Planas, che evidenziò un sostanziale calo di fertilità su ratti in seguito a somministrazione di estratto di *Stevia*, citato dall'SCF, compare anche nel rapporto JECFA. Tuttavia, un ulteriore studio considerato dal JECFA, nel quale si riportava la somministrazione di 2500 e 3000 mg/Kg bw/d di stevioside rispettivamente a criceti e ratti, non evidenziava rilevanti effetti tossici sulla fertilità (Yodyingyuad,1991; Mori, 1981); nemmeno effetti teratogeni ed embriotossici furono riscontrati in ratti somministrando loro 1000 mg/Kg bw/d di stevioside (Usami, 1995).

La mutagenicità dello steviolo, emersa negli studi in *vitro* di Pezzuto e Matsui fu associata alla presenza di un gruppo idrossilico in posizione C13 e a un'insaturazione tra i carboni 16 e 17 della molecola; nello stevioside, nel rebaudioside A e negli altri glicosidi steviolici di *Stevia*, non mutagenici, il gruppo idrossilico è impegnato nella glicosilazione con una molecola di glucosio mentre, nell'isosteviolo, anch'esso non mutagenico, non compare il gruppo idrossilico in C13 e presenta invece in C16 un gruppo carbonilico.

Il rapporto JECFA parla anche di alcuni effetti biochimici attribuibili al consumo di stevioside o di steviolo ad alte dosi, quali l'inibizione della fosforilazione ossidativa (Ishii, 1987), verificata in *vitro*, la capacità dello steviolo di ridurre l'assorbimento di glucosio nel tratto intestinale e l'effetto ipotensivo e diuretico dello stevioside, verificato su ratti (Melis, 1991).

La presenza di studi carenti dal punto di vista delle specifiche delle sostanze sperimentate, come l'inadeguata descrizione della purezza e dei contaminanti presenti sullo stevioside e sullo steviolo impiegato, l'assenza di studi sul metabolismo dello stevioside e dello steviolo sull'organismo umano, insufficienti studi su tossicità cronica e carcinogenicità perché effettuati su un'unica specie e, infine, insufficienti studi di mutagenicità dello stevioside in *vivo*, non permisero al JECFA di dare un'adeguata valutazione tossicologica dello stevioside e quindi di determinarne un'ADI adeguata.

6.5 Seconda valutazione del JECFA

Nel corso del sessantatreesimo meeting JECFA, avvenuto a Ginevra tra l'8 e il 17 Giugno del 2004 (JECFA, 2005), si cercò di fissare una nomenclatura univoca con cui riferirsi alla miscela di derivati glicosilati dello steviolo, fino a quel momento non definita se non mediante nomi convenzionali. Sulla base delle linee guida stabilite nel trentatreesimo meeting JECFA fu proposto di riconoscere il prodotto commercializzabile con il nome di "glicosidi steviolici" e ne furono specificate le seguenti prerogative (Compendium JECFA, 2004):

- ottenimento per estrazione dalle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni;
- almeno il 95% del prodotto costituito da glicosidi steviolici;

- almeno il 70% dei glicosidi steviolici dato dalla somma di stevioside e rebaudioside A;
- impurezze costituite da sostanze di derivazione fogliare di *Stevia rebaudiana* Bertoni;
- perdita di peso del prodotto in seguito ad essiccamento non superiore al 4%;
- limite residuo di solvente non superiore a 100 mg/Kg di prodotto;
- limiti massimi di arsenico e piombo non superiori a 1 mg/Kg di prodotto.

Nuovi studi su stevioside, rebaudioside A e glicosidi permisero di dare una valutazione esauriente su quasi tutti gli aspetti tossicologici del prodotto, non più inteso come stevioside, ma come glicosidi steviolici.

Nei riguardi del metabolismo i glicosidi steviolici difficilmente sono assorbiti nelle prove *in vivo* su animali e sull'uomo. Tuttavia, l'idrolisi del prodotto per opera della microflora enterica porta alla formazione di steviolo, facilmente assorbito dall'ultima parte del tratto intestinale (JECFA, 2000). In seguito a somministrazione di stevioside sull'uomo per via orale fu riscontrato che solo una piccola parte di questo era rilevabile nel plasma sottoforma di steviolo e che la via metabolica preferenziale seguita dalla frazione assorbita era la coniugazione a livello del fegato con acido glucuronico o solfato (JECFA, 2005).

Nel rapporto del JECFA del 2000 venne notificata la non genotossicità dello stevioside e del rebaudioside A, *in vivo* e *in vitro*, e la genotossicità dello steviolo *in vitro* in presenza di attivatori metabolici ma non *in vivo*. Un nuovo studio effettuato *in vivo* su topi, ratti e criceti confermò che tale attività dello steviolo non era espressa a dosi superiori di 8000 mg/Kg bw (Temcharoen, 2000).

Approfondimenti sugli effetti farmacologici dello stevioside evidenziarono proprietà ipotensive della sostanza nei confronti di soggetti ipertesi, mediante la somministrazione della stessa per periodi di tempo medio-lunghi (Chan, 2000), e la capacità di una singola dose da un grammo di ridurre la concentrazione postprandiale di glucosio nel sangue in soggetti affetti da diabete mellito di tipo due, senza effetti sulla pressione sanguigna (Gregersen, 2004). L'assenza di studi sugli effetti ipotensivi nei confronti di soggetti normotesi e ipotesi e l'inadeguatezza dello studio effettuato su diabetici suggerì al JECFA di richiedere ulteriori approfondimenti in merito.

In base agli studi valutati fu decretata la non mutagenicità di stevioside e rebaudioside A e la non espressione di attività mutagena dello steviolo *in vivo*. Il NOEL per lo stevioside fu estrapolato dallo studio a lungo termine di Toyoda valutato nel meeting del 1998 e fu stabilito pari a 970 mg/Kg bw/d.

Sulla base di simulazioni e con l'ausilio del database GEMS/Food venne valutata l'esposizione pro-capite media a glicosidi steviolici che in Europa venne stimata in 3,5 mg/Kg

bw/d, espressi come steviolo. Fu anche stabilito un ADI provvisorio di 0-2 mg/Kg bw/d per i glicosidi steviolici dato dal rapporto tra NOEL, un fattore di sicurezza pari a cento, considerando differenze inter- e intraspecie, e un fattore temporaneo pari a due, in attesa di ulteriori approfondimenti sugli effetti farmacologici dello stevioside.

Infine, allo scopo di rimuovere la designazione provvisoria per il prodotto commerciale il JECFA richiese che entro il 2007 fossero resi disponibili:

- composizione e concentrazione di tutti i glicosidi steviolici costituenti il prodotto commerciale;
- metodiche di analisi per la determinazione dei diversi glicosidi steviolici;
- natura e concentrazione della frazione non contenente glicosidi steviolici;
- quantità residua di solvente rimanente in seguito al processo di estrazione e purificazione;
- valutazione della stabilità dei glicosidi steviolici in alimenti e bevande acide.

6.6 Terza valutazione del JECFA

Dopo il meeting di Ginevra del 2004 furono compiuti nuovi studi per rispondere alle richieste del JECFA affinché fosse possibile calcolare un ADI non più provvisoria e dare una designazione commerciale definitiva di glicosidi steviolici. Nel corso di questo meeting, svoltosi a Ginevra tra il 19 e il 28 Giugno 2007 (JECFA, 2007), fu richiesto al comitato di rimuovere il requisito che la somma di stevioside e rebaudioside A dovesse costituire necessariamente il 70% dei glicosidi steviolici presenti nel prodotto, attributo non essenziale al fine della sicurezza tossicologica del prodotto. Infatti, il valore ADI, essendo espresso come quantità di steviolo, è dato dal contributo dell'idrolisi di tutti i glicosidi steviolici e non solo di stevioside e rebaudioside A.

Un nuovo studio di mutagenicità effettuato *in vivo* mise in evidenza probabili effetti tossici dello stevioside (Nunes, 2007); tra le cinque e le sei settimane dopo l'inizio della somministrazione di stevioside a ratti si evidenziò un incremento di danni al DNA nelle cellule nucleate del sangue periferico. Lo studio tuttavia non fu giudicato attendibile dal JECFA per l'assenza di controlli positivi nel test e per l'alta incidenza di danni al DNA nelle medesime tempistiche anche nei ratti di controllo.

Ulteriori studi di farmacocinetica furono esaminati dal JECFA per chiarire gli effetti dello stevioside e del rebaudioside A di cui si sospettavano proprietà ipotensive e ipoglicemiche.

In un primo studio (Barriocanal, 2006) della durata di tre mesi, nel quale a soggetti affetti da diabete mellito di tipo 1, diabete mellito di tipo 2 e non diabetici furono somministrati ogni giorno per tre volte al giorno glicosidi steviolici, non fu riscontrato alcun effetto sulla

pressione sanguigna, sul glucosio nel sangue e sulle funzioni renali ed epatiche. Tuttavia, non furono rispettati i requisiti di purezza per la sostanza stabiliti nel sessantatreesimo meeting JECFA.

Un secondo studio (Ferri, 2006) effettuato su due gruppi di pazienti soggetti a ipertensione non mostrò effetti ipotensivi riconducibili alla sostanza. Tuttavia, anche in questo caso il prodotto utilizzato non soddisfaceva pienamente i requisiti di purezza proposti per la sostanza. In un terzo studio (Jeppesen, 2006) si riportava la somministrazione di 500 mg di stevioside, senza alcuna specifica sulla purezza, o di un placebo, rispettivamente, a due gruppi di soggetti affetti da diabete di tipo 2, per tre volte al giorno per tre mesi. Nessuna differenza fu riscontrata nei livelli di glucosio e nemmeno sulla pressione sanguigna di entrambi i gruppi di soggetti.

Nell'ultimo studio (Kimata, 2007), finalizzato a verificare possibili risposte allergiche causate dallo stevioside negli infanti, fu evidenziato attraverso un prik test una maggiore sensibilizzazione nei confronti dello stevioside per quei bambini già soggetti a patologie allergiche nei confronti di altre sostanze.

Il comitato reputò i glicosidi steviolici termicamente e idroliticamente stabili alle normali condizioni di utilizzo negli alimenti.

Gli studi sulla mutagenicità e sugli effetti farmacologici non destarono particolari preoccupazioni. Tuttavia, alcuni studi ancora in sospeso, in grado di rispondere adeguatamente alle richieste fatte nel sessantatreesimo meeting JECFA, portarono il comitato a mantenere l'ADI temporanea di 0-2 mg/Kg bw/d fino al completamento dei suddetti studi. Come da richiesta il comitato acconsentì ad eliminare tra i requisiti dei glicosidi steviolici che la somma di stevioside e rebaudioside A dovesse essere almeno il 70% dei glicosidi steviolici costituenti il prodotto. Tra le altre modifiche la perdita di peso in seguito ad essiccazione passò dal 4 al 6% e il limite massimo di metanolo residuo nel prodotto fu innalzato da 100 a 200 mg/Kg di prodotto.

6.7 Quarta valutazione del JECFA

Nuovi studi tossicologici sui glicosidi steviolici disponibili dal 2008 e ulteriori studi di farmacocinetica utili a rispondere alle richieste presentate nel corso del sessantatreesimo meeting JECFA furono valutati nel corso di un meeting svoltosi a Roma tra il 17 e il 26 Giugno 2008. I risultati furono raccolti nel sessantanovesimo rapporto JECFA, pubblicato nel 2009.

Studi di tossicocinetica mostrarono che la modalità di eliminazione dello steviolo nell'uomo, dopo sua coniugazione con acido glucuronico o solfato a livello del fegato, avviene solo in piccola parte per via fecale, come avviene invece nel topo (Nakayama, 1986), e in parte preponderante attraverso le urine (JEFCA, 2009).

Fu verificata l'assenza di tossicità subcronica e di effetti avversi sulle capacità riproduttive del rebaudioside A mediante uno studio di tredici settimane nel quale ratti furono sottoposti al consumo di una quantità di rebaudioside A pari a 4161 mg/Kg bw/d (maschi) e 4645 mg/Kg bw/d (femmine) (Roberts, 2008) e uno studio multigenerazionale effettuato sempre su ratti sottoposti al consumo di dosi comprese tra 2048 e 4066 mg/Kg bw/d di rebaudioside A (Brown, 2008).

Non furono riscontrati effetti avversi sulla pressione sanguigna in seguito alla somministrazione orale giornaliera di rebaudioside A a soggetti normotesi e ipotesesi per quattro settimane (Curry, 2008). Infine, in soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2, non furono riscontrati effetti sulla pressione sanguigna o problemi sul controllo della patologia a seguito della somministrazione di una dose media di 10,2 mg/Kg bw/d di rebaudioside A per sedici settimane (Maki, 2008); tuttavia, laddove il glucosio non era più in grado di stimolare la secrezione di insulina, fu osservata una certa correlazione tra il consumo di glicosidi steviolici e una più marcata secrezione dell'ormone.

Il JECFA fece un'ulteriore stima dell'esposizione media pro capite a glicosidi steviolici, anche nei confronti di bambini e adulti diabetici, mediante l'impiego del sistema GEMS/Food. Ne scaturì una dose media espressa come steviolo rispettivamente di 1,5 mg/Kg bw/d per adulti e bambini diabetici e di 1,7 mg/Kg bw/d per bambini non diabetici.

A seguito della valutazione il comitato JECFA decise di far decadere il fattore di sicurezza temporaneo pari a 2 introdotto precedentemente e si passò quindi da un ADI temporanea di 0-2 mg/Kg bw/d a un'ADI definitiva di 0-4 mg/Kg bw/d.

Nel corso del meeting venne introdotto un nuovo limite residuale per l'etanolo il cui valore limite fu fissato a 5000 mg/Kg di prodotto (Compendium JECFA, 2008).

6.8 Prima valutazione dell'European Food Safety Authority

L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*), istituita nel 2002 con il Regolamento della Comunità Europea N.178/2002, sostituisce il Comitato Scientifico per l'Alimentazione Umana (*Scientific Committee on Food*) e si occupa tra l'altro di fornire alla Commissione Europea pareri scientifici e valutazioni di rischio circa la sicurezza degli alimenti, dei mangimi e di tutte quelle componenti che ne sono direttamente o

indirettamente correlate, come additivi alimentari, coadiuvanti tecnologici, imballi alimentari ed altro.

La prima valutazione sulla tossicologia dei glicosidi steviolici effettuata dall'EFSA venne fatta nel 2010 a seguito della presentazione di alcuni dossier da parte di tre richiedenti, che volevano che l'Unione Europea riconoscesse le specifiche adottate dal JECFA nel corso del suo sessantanovesimo meeting. Essi proposero l'utilizzo della sostanza all'interno di alcune categorie di alimenti e bevande, tra cui soft drink, confetture e marmellate, gelati ed altre classi di prodotti. Le quantità proposte all'interno degli alimenti da parte dei richiedenti rispecchiarono grossomodo le quantità autorizzate per l'aspartame nei medesimi alimenti, con l'eccezione di alcuni prodotti come latte, derivati del latte, bevande a base di succo di frutta, ha ridotto contenuto calorico o senza zuccheri aggiunti.

L'EFSA in questa valutazione esaminò tutti i risultati degli studi sui glicosidi steviolici avvenuti fino a quel momento e ripercorse la storiografia della sostanza dalla prima valutazione del SCF all'ultima valutazione JECFA, cercando di rinvenire le principali criticità legate alla sostanza emerse nel corso degli anni.

Alcune considerazioni emerse dagli ultimi studi (Geuns, 2007; Wheeler, 2008) sulla tossicocinetica *in vivo* dimostrarono che il principale metabolita dei glicosidi rinvenibile nel circolo sanguigno non era lo steviolo libero, come nel ratto, ma lo steviol-glucuronide.

Sulla base dei dati disponibili forniti dai dossier, dagli studi e dalle valutazioni del SCF e JECFA, l'EFSA accolse la richiesta fatta dai richiedenti e stabilì un'ADI per i glicosidi steviolici che non comportasse rischi per la salute del consumatore. Fu considerato un valore NOAEL pari a 967 mg/Kg bw/d di stevioside derivante da uno studio di carcinogenicità (Toyoda, 1997); con questo valore l'autorità calcolò un ADI per i glicosidi steviolici pari a 0-4 mg/Kg bw/d coerentemente al valore espresso dal JECFA nel corso del suo sessantanovesimo meeting.

Il comitato di esperti osservò tuttavia che, qualora i glicosidi steviolici fossero stati impiegati ai massimi livelli proposti dai richiedenti, la quantità assimilata sia da adulti che bambini avrebbe potuto facilmente superare la DGA stabilita.

6.9 Seconda valutazione dell'European Food Safety Authority

Questa valutazione, pubblicata nel Gennaio 2011, è in realtà un riesame della valutazione precedente in seguito a modifica, da parte dei richiedenti, degli impieghi e delle quantità di glicosidi steviolici da utilizzare come additivi alimentari all'interno di determinate classi di alimenti.

Questa revisione si rese necessaria in quanto con i precedenti livelli di impiego proposti emerse che, qualora i glicosidi steviolici fossero stati utilizzati nelle massime quantità proposte, la quantità di additivo assimilata sia da adulti che da bambini avrebbe potuto facilmente superare la DGA stabilita. Fu constatato che il maggior contributo all'esposizione dei consumatori europei nei confronti dell'additivo era dovuto, negli adulti, principalmente al consumo di bevande analcoliche, edulcoranti da tavola, birra e sidro, mentre nei bambini a bevande analcoliche ipocaloriche e dolci, inclusi i prodotti lattiero-caseari aromatizzati.

Nella prima valutazione EFSA l'esposizione media a glicosidi steviolici (espressa come steviolo) stimata negli adulti europei (età >18 anni) risultò pari a 2,2-2,7 mg/Kg bw/d con rispettivamente 8,0 e 9,7 mg/Kg bw/d al 95th e al 97,5th percentile, mentre nei bambini europei da uno a quattordici anni variabile da 0,7 a 7,2 mg/Kg bw/d con rispettivamente 3,3 e 17,2 mg/Kg bw/d al 95th e al 97,5th percentile. In seguito a modifica dei livelli di impiego l'esposizione media a glicosidi steviolici (espressa come steviolo) risultò pari a 1,9-2,3 mg/Kg bw/d con 95th e 97,5th percentile rispettivamente di 5,6 e 6,8 mg/Kg bw/d negli adulti e 0,4-6,4 mg/Kg bw/d con 95th e 97,5th percentile rispettivamente di 1,7 e 16,3 mg/Kg bw/d in bambini di età compresa tra uno e quattordici anni.

L'esposizione media all'additivo dopo la revisione risultò solo leggermente inferiore a quella calcolata nella prima valutazione ed emerse che in diverse regioni europee i forti consumatori di prodotti contenenti glicosidi steviolici avrebbero comunque potuto facilmente superare l'ADI stabilita.

6.10 Autorizzazione all'uso dei glicosidi steviolici come additivi alimentari

Considerate le valutazioni espresse dall'EFSA nel 2010, e in seguito alla revisione dell'esposizione a glicosidi steviolici avvenuta nel 2011, la Commissione Europea emanò a novembre 2011 il Regolamento (UE) N.1131/2011 recante disposizioni di modifica per l'allegato II del Regolamento (CE) N. 1333/2008 relativo agli additivi alimentari, introducendo i glicosidi steviolici tra gli additivi alimentari autorizzati in definite classi di alimenti. I glicosidi steviolici da quel momento furono classificati con il numero E 960 e le quantità autorizzate furono indicate in equivalenti steviolici. La Commissione, qualora lo avesse ritenuto opportuno, avrebbe richiesto all'EFSA una nuova valutazione sull'esposizione a glicosidi steviolici in base all'uso effettivo negli alimenti riscontrato in seguito all'autorizzazione.

7. Conclusioni

Pur già diffusi come additivi in diversi paesi extraeuropei, i glicosidi steviolici hanno seguito un lungo e difficile cammino prima che ne venisse autorizzato l'impiego come edulcoranti alimentari anche all'interno dell'Unione Europea. Studi non adeguatamente chiari, lunghi tempi morti, forti incertezze nei riguardi dello steviolo e studi con risultati a volte contrastanti tra loro hanno portato a un rinvio sulla decisione della Commissione di oltre vent'anni. Per i fautori della *Stevia* queste perplessità e continue proroghe sono da attribuirsi a lobby di produttori degli edulcoranti artificiali, per le quali la diffusione di glicosidi steviolici avrebbe rappresentato una scomoda concorrenza (Isenberg, 2013).

Le foglie della pianta sono da sempre utilizzate in Sud-America per le loro proprietà dolcificanti, tuttavia alcune popolazioni le impiegano anche come ipoglicemico o come contraccettivo, ciò dovrebbe suggerire una certa prudenza prima di dichiarare il prodotto sicuro. Queste proprietà, anche fossero solo presunte, dimostrano quanto sia importante che prima di consentire l'impiego di un nuovo prodotto sia necessario ricercarne a fondo tutti gli effetti. Inoltre, per verificare la sicurezza solo di una particolare componente di un prodotto complesso, in questo caso i glicosidi steviolici delle foglie di *Stevia*, è importante eliminare dal prodotto di partenza tutte le componenti che potrebbero falsare i risultati.

Sui glicosidi steviolici, i primi dubbi sulla sicurezza nacquero dalla mutagenicità dello steviolo riscontrata negli studi *in vitro* e dalla capacità della microflora del ratto di idrolizzare i glicosidi e permetterne l'assorbimento nell'ultimo tratto dell'intestino.

Gli effetti cancerogeni dei glicosidi, in particolare sui testicoli di ratto, furono screditati perchè gli animali impiegati per gli studi presentavano un'alta incidenza della patologia anche se non sottoposti a somministrazione dell'additivo.

L'effetto del calo di fertilità riscontrato su ratti femmine associato alla somministrazione di decotto delle foglie di *Stevia rebaudiana* Bertoni fu smentito da studi in cui si utilizzarono glicosidi steviolici a purezza maggiore.

Nonostante le perplessità iniziali, i glicosidi steviolici sono oggi considerati edulcoranti alimentari sicuri. Inoltre, sono forse gli unici additivi in grado di soddisfare contemporaneamente due tra le esigenze più diffuse oggi tra i consumatori: naturalità e ipocaloricità.

APPENDICE I

RELAZIONI DEL COMITATO SCIENTIFICO DELL'ALIMENTAZIONE UMANA LINEE DIRETTRICI PER LA VALUTAZIONE SULLA SICUREZZA D'IMPIEGO DEGLI ADDITIVI ALIMENTARI

(Opinione espressa il 22 Febbraio 1980)

Questa appendice costituisce una sintesi della relazione pubblicata nel 1980 dal comitato scientifico dell'alimentazione umana. Raccoglie le linee guida da applicare (i) per verificare la sicurezza dei nuovi additivi alimentari di cui viene chiesto alla Commissione Europea il riconoscimento, o (ii) per riesaminare l'assenza di effetti negativi sulla salute da parte di additivi già noti. Sono stati ripresi solo quei paragrafi ritenuti rilevanti per comprendere perché per molti anni i glicosidi steviolici siano stati considerati dal comitato scientifico dell'alimentazione umana, attivo fino alla costituzione dell'European Food Safety Authority, inaccettabili sotto il profilo tossicologico.

Ai fini degli obiettivi del documento, gli additivi alimentari sono definiti come “tutte [quel]le sostanze aggiunte agli alimenti in qualsiasi fase della produzione, allo scopo di modificarne le caratteristiche”.

I principi generali illustrati nella relazione sono analoghi ai principi elaborati nel corso della prima riunione del comitato congiunto FAO/OMS sugli additivi alimentari (JECFA) avvenuta a Roma nel 1956.

Per valutare l'idoneità di un prodotto ad essere utilizzato come additivo, questo deve essere sottoposto a una valutazione tossicologica il più possibile esauriente, presupponendo che la quantità utilizzata “non superi il minimo necessario a ottenere i risultati desiderati nella pratica di produzione dell'alimento”.

Ancora prima di valutare che il prodotto sia esente da effetti tossici sulla salute è indicato di verificare l'effettiva necessità di un suo impiego in campo alimentare, necessità identificata in una sua potenziale proprietà e peculiarità tecnologica o dovuta ad aspetti di tipo economico perché, ad esempio, in grado di aumentare i tempi di conservazione e di immagazzinabilità degli alimenti.

PRINCIPI GENERALI PER LA VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA DEGLI ADDITIVI ALIMENTARI

Stabilita l'effettiva necessità di autorizzare l'impiego dell'additivo, diventa fondamentale valutarne il profilo tossicologico per verificare l'assenza di suoi effetti negativi sulla salute umana. In particolare, occorre valutare la sicurezza dell'additivo "secondo le modalità e nelle quantità proposte" nei confronti delle classi di consumatori più vulnerabili a causa delle loro condizioni fisiologiche, come età o gravidanza, o a causa del loro regime alimentare.

Il lavoro di valutazione viene suddiviso in due fasi:

- La raccolta dei dati necessari alla valutazione della sicurezza dell'additivo estrapolati da studi effettuati su cavie da laboratorio e, se sono disponibili, "dati sugli esseri umani derivati dall'impiego medico [dell'additivo], dall'epidemiologia professionale o da studi specifici";
- L'interpretazione dei dati raccolti e, nel caso di un'idoneità di impiego della sostanza, la valutazione di una Dose Giornaliera Accettabile (DGA).

ASPETTI DA CONSIDERARE NELLA VALUTAZIONE DELLA SOSTANZA

Affinchè la sperimentazione permetta di ottenere dati credibili con cui fare una valutazione attendibile dal punto di vista del profilo tossicologico dell'additivo, il comitato sostiene sia necessario che lo studio metta in evidenza le modalità con cui si sono svolte le ricerche come, in particolare, la conoscenza delle caratteristiche della sostanza studiata, le condizioni di lavoro, le metodiche di analisi impiegate e altri criteri qui di seguito sintetizzati.

- Dati chimico-fisici: struttura chimica, caratteristiche chimico-fisiche e configurazione spaziale delle molecole sono indispensabili per definire adeguatamente le modalità di sperimentazione. In base a volatilità e solubilità della sostanza è ad esempio possibile definire le modalità di somministrazione del prodotto alla cavia.
- Caratteristiche della sostanza sottoposta a sperimentazione: la sostanza sottoposta a sperimentazione deve essere la medesima impiegata nell'industria alimentare. Conoscere il grado di purezza, le modalità di produzione e le sostanze costituenti le impurità della sostanza da sperimentare permette di verificare che eventuali effetti riscontrati in sede di sperimentazione siano effettivamente causati dalla sostanza in esame e non da impurezze presenti.
- Metodo di analisi: durante la sperimentazione è necessario identificare precisamente la quantità di additivo presente all'interno dell'alimento o sulla sua superficie mediante opportuni metodi analitici.

- Dieta e condizioni di mantenimento delle cavie: conoscere la dieta somministrata alle cavie, i possibili contaminanti tossici presenti all'interno dei prodotti alimentari somministrati e le condizioni di stabulazione sono dati importanti per valutare se gli effetti tossici eventualmente riscontrati siano da attribuirsi esclusivamente al prodotto sperimentato e non ad altre cause.
- Ricerche biologiche: ai fini della valutazione tossicologica è importante individuare le modalità di assorbimento e il percorso metabolico seguito dall'additivo, gli eventuali metaboliti prodotti, la farmacocinetica e gli eventuali organi bersaglio dove l'additivo, o i suoi metaboliti, esplicano la loro attività tossica.

STUDI SULLA TOSSICITÀ

Il comitato scientifico dell'alimentazione umana ritiene necessari diversi studi per valutare il profilo tossicologico degli additivi alimentari sperimentati. A partire dagli studi sulla tossicità acuta è opportuno poi seguire un percorso di ricerche che consenta di impostare nel modo opportuno i passaggi successivi sulla base dei risultati emersi negli studi precedenti. Qui di seguito vengono illustrati gli studi richiesti nell'ordine in cui devono essere svolti, così come illustrato nel documento originale.

- Studi sulla tossicità acuta: prove di tossicità acuta permettono di comparare il prodotto oggetto di studio con altre sostanze affini dal punto di vista strutturale o biologico. Nel caso in cui già in questa fase di sperimentazione si evidenzino un livello di tossicità non tollerabile si ha la sospensione degli esperimenti. Nel caso in cui i risultati siano tollerabili, sulla base di questi studi è possibile individuare gli organi bersaglio e le modalità d'azione della sostanza in esame, nonché ottenere dati utili a definire i dosaggi da impiegare nelle sperimentazioni a lungo termine.
- Studi sulla tossicità genetica: questi studi, *in vivo* e *in vitro*, ricercano eventuali proprietà mutagene delle sostanze oggetto di studio, ovvero la loro capacità di modificare il materiale genetico delle cellule somatiche o germinali, sia attraverso modificazioni di singoli geni, sia attraverso alterazioni a livello cromosomico.
- Studi metabolici, compresa la farmacocinetica: seguendo il percorso metabolico e la farmacocinetica della sostanza è possibile identificare i metaboliti prodotti. Se risultano sostanze normalmente presenti nell'organismo, possono condurre a un giudizio di innocuità del prodotto; se vengono invece identificati come sostanze con proprietà tossiche o con attività biologica sconosciuta impongono un proseguimento degli studi con prove relative agli effetti cronici e subcronici.

- Studi subcronici: ricercano effetti fisiologici in seguito a una somministrazione continua della sostanza in esame per periodi di tempo che coprono una parte significativa della vita della cavia (almeno il 10% della durata della vita delle specie scelte per la sperimentazione). Questi studi consentono di valutare la necessità di studi supplementari sul profilo tossicologico della sostanza in esame e di definire opportunamente i dosaggi da impiegare nelle sperimentazioni sulla tossicità cronica.
- Studi sulla riproduzione e sulla teratogenesi: i primi forniscono dati circa l'aumento di sensibilità alla sostanza ed effetti pre-, peri- e postnatali, inclusi effetti teratogeni e mutageni, sull'embrione, sul feto e sugli individui delle generazioni seguenti rispetto alla generazione esposta alla sostanza studiata. I secondi ricercano danni strutturali o funzionali durante la fase embrionale che portano a malformazioni congenite o disfunzioni. Gli studi sulla riproduzione devono interessare almeno due generazioni discendenti, mentre la sostanza studiata deve essere somministrata alla I generazione lungo tutto il corso della sperimentazione a partire dallo svezzamento. Gli studi dal punto di vista della tossicità teratogena devono essere svolti su almeno due specie animali diverse.
- Studi sulla tossicità cronica e sul potere cancerogeno: la tossicità cronica si valuta a seguito di esposizioni a dosi contenute della sostanza sperimentata per periodi di tempo che coprono la maggior parte del periodo di vita della cavia. Questo tipo di tossicità, non sempre evidente durante gli studi subcronici, può dare origine a cancri e fenomeni di sensibilizzazione di alcuni tessuti, variabili in funzione dell'età. La scelta della cavia, oltre a considerazioni di tipo pratico, deve ricadere su specie il cui metabolismo e farmacocinetica della sostanza si avvicinano il più possibile a quelle dell'uomo. Le dosi massime da somministrare corrispondono alle dosi che negli studi subcronici non provocano effetti tossici né abbreviano la vita delle cavie, salvo che non insorgano neoplasie.

INTERPRETAZIONE E VALUTAZIONE DEI DATI

Il termine “innocuo” riferito agli additivi alimentari non indica la sicurezza assoluta del prodotto, impossibile da dimostrare, bensì una classe di rischio accettabile in funzione alle modalità e ai valori di consumo normale del prodotto. Effetti indesiderati sono riscontrabili in questi prodotti principalmente quando sono consumati in dosi eccessive. Per questo si ritiene importante verificare se le dosi di additivo normalmente assunte con la dieta dal consumatore possano presentare valori di rischio inaccettabili o al contrario tollerabili.

Stabilita la quantità totale di additivo assunta con la dieta e valutata la completezza e l'adeguatezza degli studi ai fini della valutazione, è importante stabilire la natura reversibile o irreversibile degli effetti osservati. Si deve stabilire se essi siano cumulativi, se interessino aspetti funzionali dell'organismo, morfologici o entrambi.

Le indagini tossicologiche permettono di stabilire la cosiddetta Dose Giornaliera Accettabile (DGA) per l'uomo, intesa come la quantità di sostanza, espressa in mg/Kg, che può essere ingerita quotidianamente per tutto il corso della vita, senza la manifestazione di evidenti effetti negativi sulla salute.

La DGA viene estrapolata sulla base del NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), identificato nella dose di prodotto, espressa in mg/Kg che non provoca effetti tossici evidenti nella salute degli animali. Il valore di NOAEL, diviso per un fattore di sicurezza variabile a seconda delle differenze di sensibilità delle varie specie, dell'eterogeneità della popolazione e di altri aspetti, permette di individuare la DGA.

Bibliografia

- 1994. Direttiva (CE) 30.06.1994 n.35. *Sugli edulcoranti destinati ad essere utilizzati nei prodotti alimentari*. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L237/3 .
- 2002. Regolamento (CE) 28.01.2001 n.178. *che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare*. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L31
- 2008. Regolamento (CE) 16.12.2008 n.1333. *Relativo agli additivi alimentari*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L354 .
- 2011. Regolamento (UE) 11.11.2011 n.1131. *Modifica allegato II del regolamento (CE) n. 1333/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i glicosidi steviolici*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L295 .
- Abdalbasit, A., Yang, R., & Hua, X. (2014). Stevia rebaudiana Bertoni: An alternative Sugar Replacer and Its Application in Food Industry. *Food Engineering Reviews* , 6 (4), 150-162.
- Asaki, H., & Yokoyama. (1975). Dried-leaf extracts of Stevia. Toxicological tests. *Shokukin Kogyo* , 18, 34-43.
- Aze, Y., Toyoda, K., Imaida, K., Hayashi, S., Imazawa, T., Hayashi, Y., et al. (1991). Subchronic oral toxicity of stevioside in F344 rats. *Eisei Shikenjo Hokoku - Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences* (109), 48-54.
- Barriocanal, L., Palacios, M., Benitez, S., Canete, F., Jimenez, J., Jimenez, N., et al. (Novembre 2006). Lack of pharmacological effect of steviol glycosides as a sweetener in humans. *Studies on repeated exposures in normotensive and hypotensive individuals and Type 1 and Type 2 diabetes. Presented at the 2nd International Symposium on Steviol*.
- Blumenthal, M. (1996, Febraury). Perspectives of FDA'S new Stevia Policy, After four years, the agency lifts its ban-but only partially. *Whole Foods Magazine* , pp. 1-5.
- Brown, N., Curry, L., Roberts, A. (2008). Rebaudioside A: Two-generation reproductive toxicity study in Rats. *Food and Chemical Toxicology* , 46 (7), S21-S30
- Carakostas, M., L.L., C., Boileau, A., & Brusick, D. (2008). Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology* , 46 (7), S1-S10.
- Ceunen, S., & M.C.Geuns, J. (2013). Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *Journal Of Natural Products* , 6 (76), 1201-1228.
- Chan, P., Tomlinson, B., Chen, Y., Liu, J., Hsieh, M., & Cheng, J. (2000). A double-blind placebo controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *The British Journal of Clinical Pharmacology* , 50 (3), 215-220.

Choi, Y., Kim, I., Yoon, K., Lee, S., C.Y., K., Yoo, K., et al. (2002). Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from *Stevia rebaudiana* leaves. *Chromatographia* , 55 (9-10), 617-620.

Compendium of Food Additive Specifications (2004), Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Sixty-third meeting JECFA

Compendium of Food Additive Specifications (2008), Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Sixty-ninth meeting JECFA

Curry, L., Maki, K., Carakostas, M., Tarka, S., Reeves, M., Farmer, M., et al. (2008). The hemodynamic effects of rebaudioside A in healthy adults with normal and low-normal blood pressure. *Food and Chemical Toxicology* , 46 (7), S40-S46.

EFSA, European Food Safety Authority (2011) Revised exposure assessment for steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. EFSA Journal

EFSA, European Food Safety Authority (2010) Scientific opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. EFSA Journal

Erkucuk, A., Akgun, I., & Yesil-Celiktas, O. (2009). Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. *The Journal of Supercritical Fluids* , 51 (1), 29-35.

Ferri, L., Alves-Do-Prado, W., Yamada, S., Gazola, S., Batista, M., & Bazotte, R. (2006). Investigation of the antihypertensive effect of oral crude stevioside in patients with mild essential hypertension. *Phytotherapy Research* , 20 (9), 732-736.

Geuns, J., Buyse, J., Vankeirsbilck, A., & Temme, E. (2007). Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Experimental Biology and Medicine* , 232 (1), 164-173.

Gregersen, S., Jeppensen, P., Holst, J., & Hermansen, K. (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism Clinical and Experimental* , 53 (1), 73-76.

Huang, X., Fu, J., & Di, D. (2010). Preparative isolation and purification of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni using high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology* , 71 (2), 220-224.

Hutapea, A. M., Toskulkao, C., Buddhasukh, D., Wilairat, P., & Glinsukon, T. (1997). Digestion of Stevioside, a Natural Sweetener, by Various Digestive Enzyme. *Journal of Chemical Biochemistry and Nutrition* , 23 (3), 177-186.

Iögo. Visto Gennaio 16, 2015, da Iögo: <http://www.iogostevia.ca/en/>

Isenburg, T., Baratti, D., & Candolfi, P. (2013). Dal ticino al Paraguay. *Altre Modernità* (10), p. 256-262.

Ishii, E., Schwab, A., & Bracht, A. (1987). Inhibition of monosaccharide transport in the intact rat liver by stevioside. *Biochemical Pharmacology* , 36 (9), 1417-1433.

Jaitak, V., Bandna, Singh, B., & Kaul, V. (2009). An Efficient Microwave-assisted Extraction Process of Stevioside and Rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Phytochemical Analysis* , 20 (3), 240-245.

JECFA, *Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Evaluation of Certain Food Additives (2000)

JECFA, *First report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives*. General principles governing the use of food additives (1957)

JECFA, *Sixty-eight report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants (2007)

JECFA, *Sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Evaluation of Certain Food Additives (2009)

JECFA, *Sixty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Evaluation of Certain Food Additives (2005)

JECFA, *Thirty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants (1989)

Jeppesen, P., Barriocanal, L., Meyer, M., Palacios, M., Canete, F., Benitez, S., et al. (2006). Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with type 2 diabetes—a long-term randomized, double blinded, placebo-controlled study. *Diabetologia* , 49 (1), 511-512.

Katayama, O., Sumida, T., Hayashi, H., & Mitsuhashi, H. (1976). The practical application of *Stevia* and research and development data. *Japan: I.S.U.* , 747.

Kimata, H. (2007). Anaphylaxis by stevioside in infants with atopic eczema. *Allergy* , 62 (5), 565-566.

Kroger, M., Meister, K., & Kava, R. (2006). Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety* , 5 (2), 35-47.

Lee, S., Lee, K., Park, J., Kim, K., & Tchae, B. (1979). A study on the safety of stevioside as a new sweetening source. *Korean Journal of Food Science and Technology* , 11 (4), 224-231.

LeMiePiante.it. Visto Gennaio 16, 2015, da *Stevia rebaudiana*:
<http://www.lemiepiante.it/enciclopedia-1288/compositae/stevia-rebaudiana/stevia-rebaudiana.html>

Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* , 132 (3), 1121-1132.

Liu, J., Li, J., & Tang, J. (2010). Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food and Bioprocess Processing* , 88 (C2-3), 215-221.

- M.C.Geuns, J. (2003). Stevioside. *Phytochemistry* , 64 (5), 913-921.
- Maki, K., Curry, L., Reeves, M., Toth, P., McKenney, J., Farmer, M., et al. (2008). Chronic consumption of Rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology* , 46 (7), S47-S53.
- Markovic, I. S., Darmati, Z. A., & Abramovic, B. F. (2008). Chemical composition of leaf extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown experimentally in Vojvodina. *Journal Of The Serbian Chemical Society* , 72 (3), 283-297.
- Markosyan, A., Purkayastha, S., & Malsagov, M. (2014). *Patent No. USOO8790730B2*. US.
- Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y., et al. (1996). Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis* , 11 (6), 573-579.
- Mazei-Planas, G., & Kuc, J. (1968). Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Science* , 162 (3857), 1007.
- Melis, M., & Sainati, A. (1991). Effects of calcium and verapamil on renal functions of rats during treatment with stevioside. *Journal of Ethnopharmacology* , 33 (3), 257-262.
- Mishra, P. K., Singh, R., Kumar, U., & Prakas, V. (2010). *Stevia rebaudiana* – A magical sweetener. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* , 5 (1), 62-74.
- Mori, N., Sakanoue, M., Takeuchi, M., Shimpo, K., & Tanabe, T. (1981). Effect of Stevioside on Fertility in Rats. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* , 22 (5), 409-414.
- Nakayama, K., Kasahara, D., & Yamamoto, F. (1986). Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of Stevioside in Rats. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* , 27 (1), 1-8.
- Nunes, A., Ferreira-Machado, S., Nunes, R., Dantas, F., De Mattos, J., & Caldeira-de-Araújo, A. (2007). Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. *Food and Chemical Toxicology* , 45 (12), 662-666.
- Ostra, E., Pol, J., & Pavel, K. (2007). Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* , 388 (8), 1847-1857.
- Pasquel, A., Meireles, M., Marques, M., & Petenate, A. (2000). Extraction of stevia glycosides with CO₂ + Water, CO₂ + Ethanol and CO₂ + Water + Ethanol. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* , 17 (3), 271-282
- Pezzuto, J., Compadre, C., Swanson, S., Dhammika, N., & Kinghorn, D. (1985). Metabolically Activated Steviol, the Aglycone of Stevioside, is Mutagenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 82 (8), 2478-2484.

- Pol, J., Hohnova, B., & Hyotylainen, T. (2007). Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Science Direct* , 1150, 85-92.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends In Biotechnology* , 30 (1), 37-44.
- Puri, M., Sharma, D., & Tiwari, A. K. (2011). Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances* , 29 (6), 781-791.
- Roberts, A., & Curry, L. (2008). Subchronic toxicity of rebaudioside A. *Food and Chemical Toxicology* , 46 (7), S11-S20.
- SCF, Relazione del Comitato Scientifico dell'Alimentazione Umana concernente le linee direttrici per la valutazione sulla sicurezza d'impiego degli additivi alimentari. *Relazioni del Comitato scientifico dell'alimentazione umana (1980), Decima serie.*
- SCF, Relazioni del Comitato Scientifico dell'Alimentazione Umana concernente prodotti dolcificanti. *Relazioni del Comitato scientifico dell'alimentazione umana (1985), Sedicesima serie.*
- SCF, Relazioni del Comitato Scientifico dell'Alimentazione Umana concernente prodotti dolcificanti. *Relazioni del Comitato scientifico dell'alimentazione umana (1989), Ventunesima serie.*
- SCF, Scientific Committee on Food (1999) Opinion on Stevioside as a Sweetener
- SCF, Scientific Committee on Food (1999) Opinion on *Stevia rebaudiana* Bertoni plants and leaves
- Shock, C. C. (1982). *Experimental cultivation of Rebaudi's stevia in California*. University of California, Davis.
- Simonetti, P., Gardana, C., Bramati, L., & Pietta, P. (2004, Aprile 16). Bioavailability of stevioside from *Stevia rebaudiana* in humans: preliminary report. In: Geuns, J.M.C., Buyse, J., eds. "Safety of Stevioside": Proceedings of the First Symposium Sponsored by KULeuven. Belgio.
- SteviaCouncil*. (s.d.). Tratto il giorno Gennaio 16, 2015 da FAQ: <http://www.internationalsteviacouncil.org/index.php?id=30>
- Temcharoen, P., Klopanichpah, S., Glinsukon, T., Suwannatrai, M., Apibal, S., & Toskulkao, C. (2000). Evaluation of the effect of steviol on chromosomal damage using micronucleus test in three laboratory animal species. *Journal of the Medical Association of Thailand* , 83 (1), S101-S108.
- Teo, C., Tan, S., & Yong, J. (2009). Validation of green- solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal Of Separation Science* , 32 (4), 613-622.

Toskulkao, C., Chaturat, L., Temcharoen, P., & Glinsukon, T. (1997). Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species. *Drug and Chemical Toxicology* , 20 (1-2), 31-44.

Toyoda, K., Matsui, H., Shoda, T., Uneyama, C., Takada, K., & Takahashi, M. (1997). Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology* , 35 (6), 597-603.

Usami, M., Sakemi, K., Kawashima, K., & Tsuda, M. O. (1995). Teratogenicity study of stevioside in rats. *Eisei Shikenjo Hokoku - Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences* (113), 31-35.

Wasuntarawat, C., Temcharoen, P., Toskulkao, C., Mungkornkarn, P., Suttajit, M., & Glusukon, T. (1998). Developmental toxicity of steviol, a metabolite of stevioside, in the hamster. *Drug & Chemical Toxicology* , 21 (2), 207-222.

Wallin, H. (2004). *Steviol Glycosides*. Chemical and Technical Assessment for the 63rd JECFA.

Wallin, H., Kuznesof, P. (2007). *Steviol Glycosides*. Chemical and Technical Assessment for the 68th JECFA.

Wallin, H., Kuznesof, P. (2009). *Steviol Glycosides*. Chemical and Technical Assessment for the 69th JECFA.

Wheeler, A., Boileau, A., Winkler, P., Compton, J., Prakash, I., Jiang, X., et al. (2008). Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food and Chemical Toxicology* , 46 (7), S54-S60.

Wikipedia.org. Visto Gennaio 16, 2015, da Glicirrizina:
<http://it.wikipedia.org/wiki/Glicirrizina>

Wikipedia.org. Visto Gennaio 16, 2015, da Rebaudioside A:
<http://nl.wikipedia.org/wiki/Rebaudioside>

Wikipedia.org. Visto Gennaio 16, 2015, da Stevioside:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Stevioside>

Xili, L., Chengjiany, B., & Eryi, X. e. (1992). Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food and Chemical Toxicology* , 30 (11), 957-965.

Yamada, A., Ohgaki, S., Noda, T., & Shimizu, M. (1985). Chronic Toxicity Study of Dietary Stevia Extracts in F 344 Rats. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* , 26 (2), 169-183.

Yodyingyud, V., & Bunyawong, S. (1991). Effect of stevioside on growth and reproduction. *Human Reproduction* , 6 (1), 158-165.