



Stevia en Steviolglycosiden: veilige zoetstoffen, interessante farmacologische effecten

“Te goed om waar te zijn?”

Prof. Jan M.C. Geuns

Lab Functional Biology, KULeuven

Kasteelpark Arenberg 31

3001 Heverlee-Leuven

BELGIUM

Jan.Geuns@bio.kuleuven.be

STEVIA





STEVIA:
nacht
onderbreking
5 min rode
LEDs

Gebruikte techniek:

- Stevia: korte-dag-plant: bloei na ± 10 weken
- Onderbreking van de nacht door 5 min rood licht (660 nm); band LEDs (light emitting diodes)
- In het midden van de nacht
- Rode licht wordt geabsorbeerd door fytochroom waardoor uitstel van bloei
- Productie van meer bladeren en meer zoetstof
- Gemakkelijker om stekken te nemen

**Floral
induction**

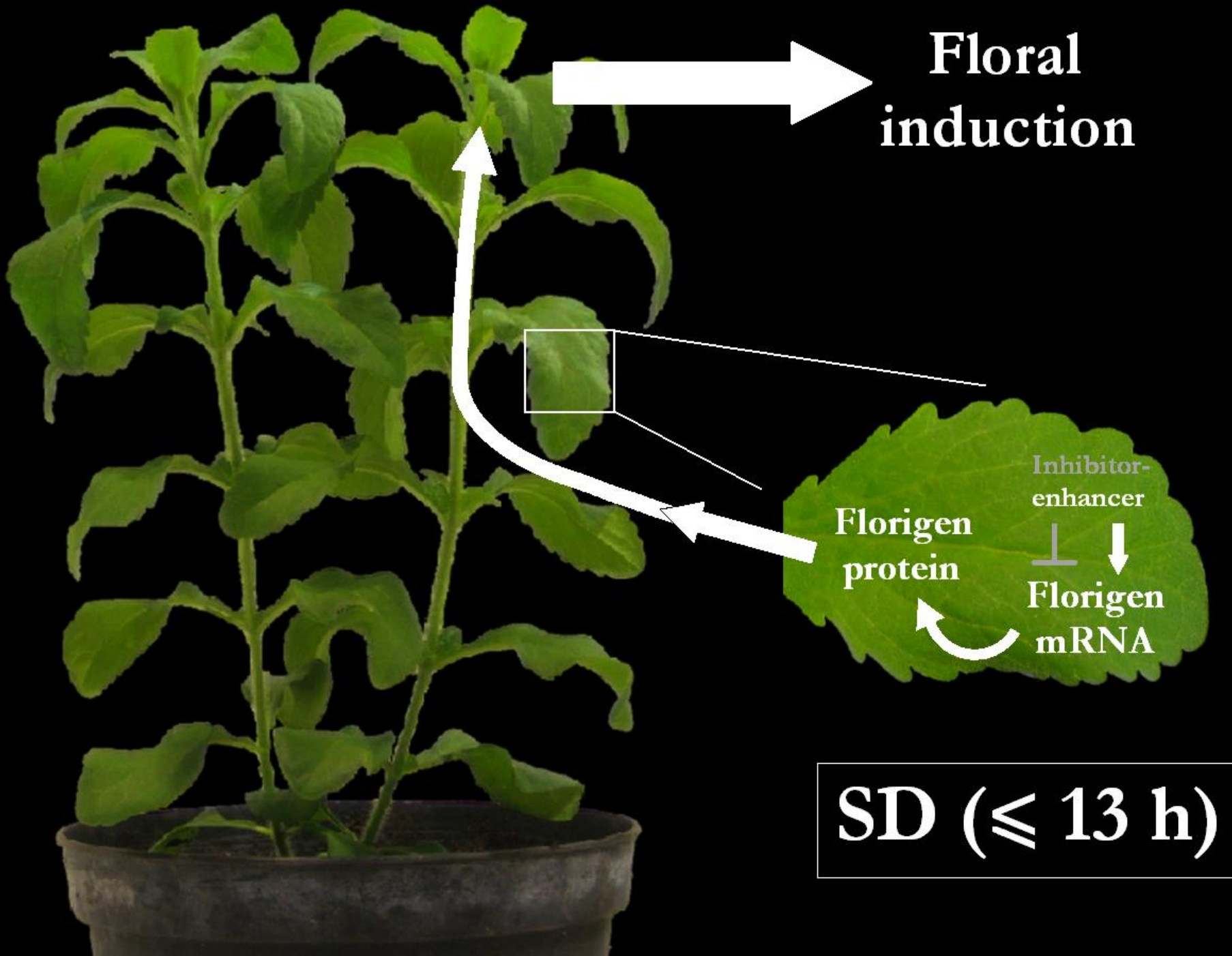
**Florigen
protein**

**Inhibitor-
enhancer**



**Florigen
mRNA**

SD (≤ 13 h)



**Floral
induction**

RED

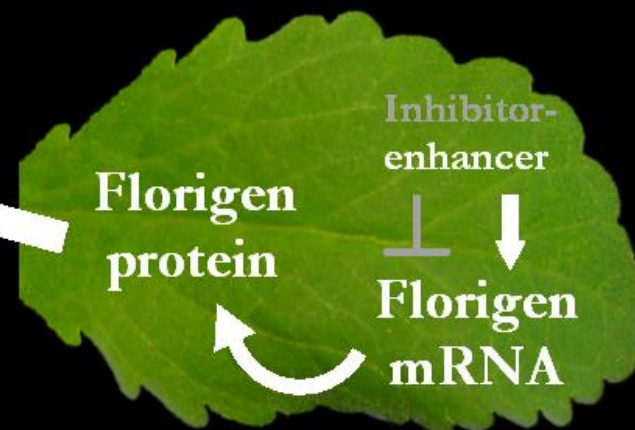
**Florigen
protein**

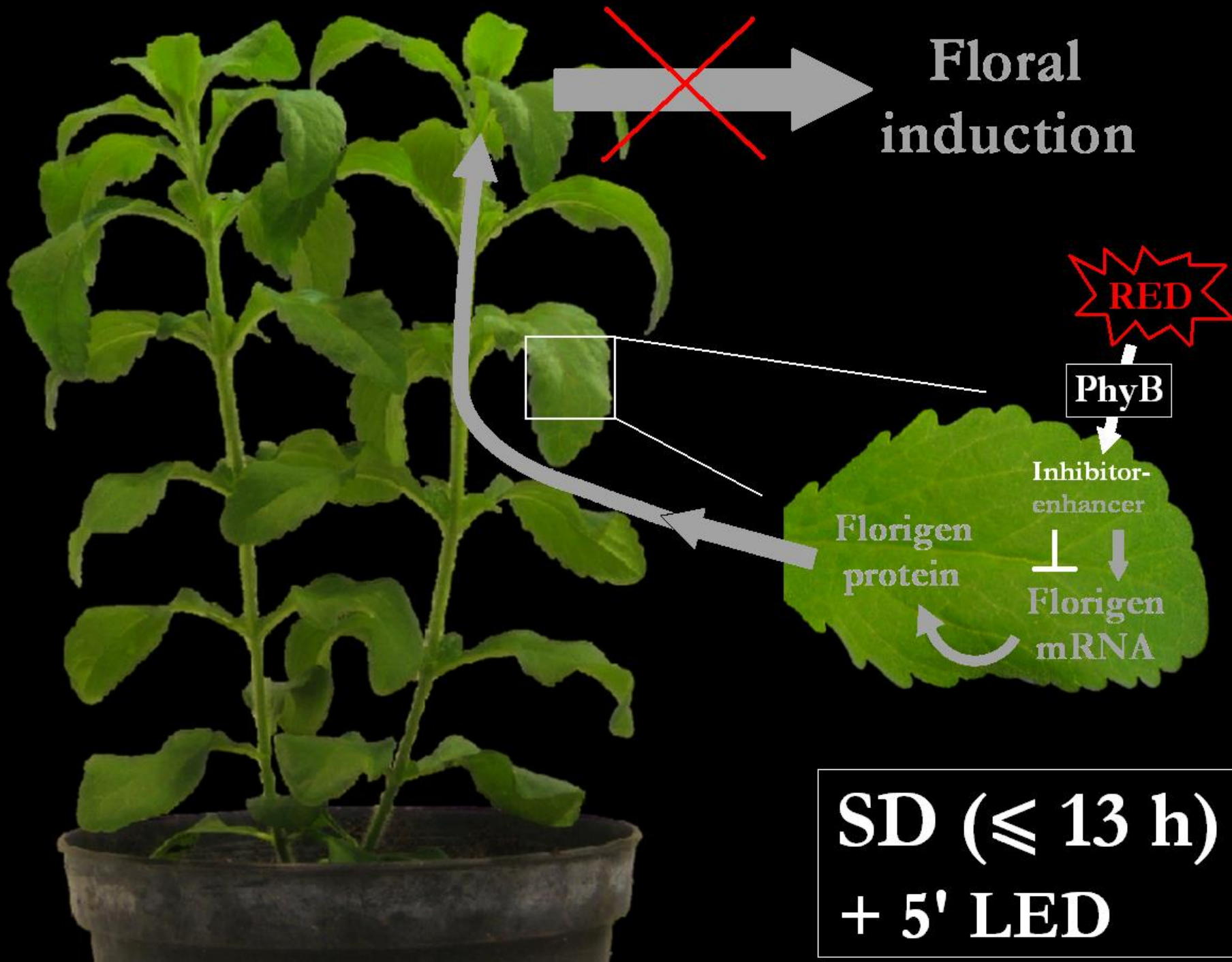
**Inhibitor-
enhancer**



**Florigen
mRNA**

**SD (≤ 13 h)
+ 5' LED**





SD*

20 cm

**SD*
+ 5' LED**

W0

W3

W4

W5

W6

W7

W8

* 8h photoperiod

Stevia – Steviolglycosiden

1) STEVIA: blaadjes en plant:
NOVEL FOOD: onterecht!

2) Steviolglycosiden:

- stevioside

- rebaudioside A:

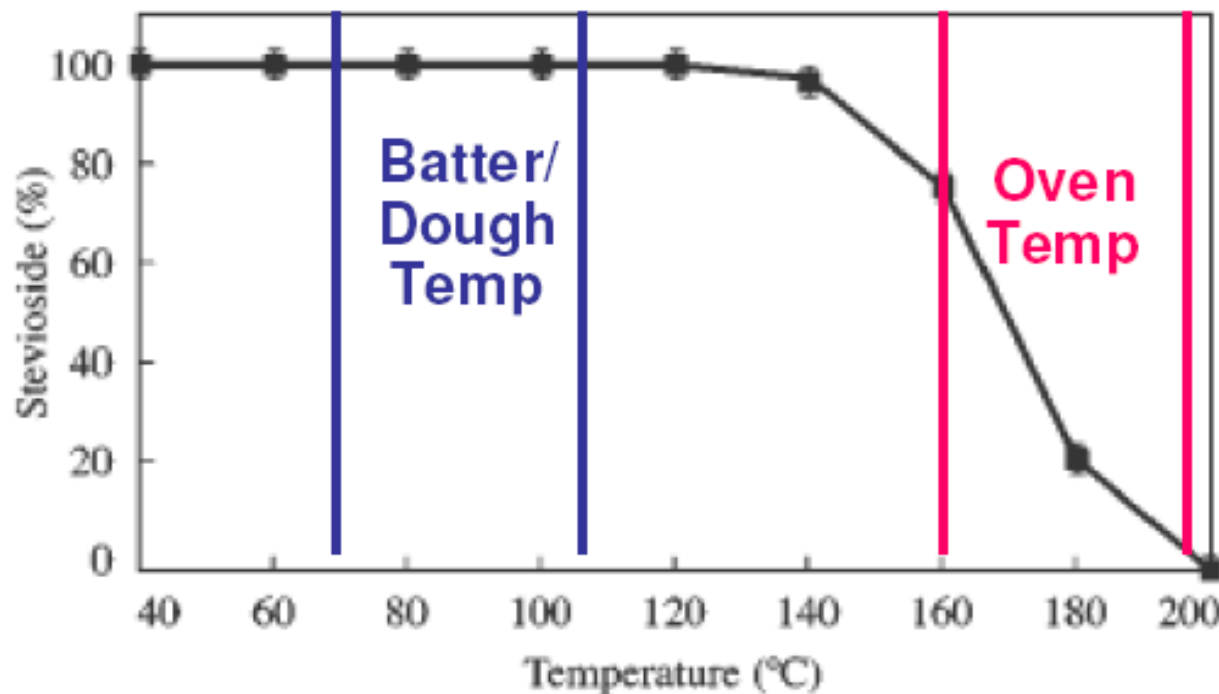
VOEDSELADDITIEF

Stevioside/Rebaudioside A

1. Als zoetstof: LAGE doses
(200-300 mg/d)
2. Farmacologische effecten: HOGE
doses (750 – 1500 mg/d)

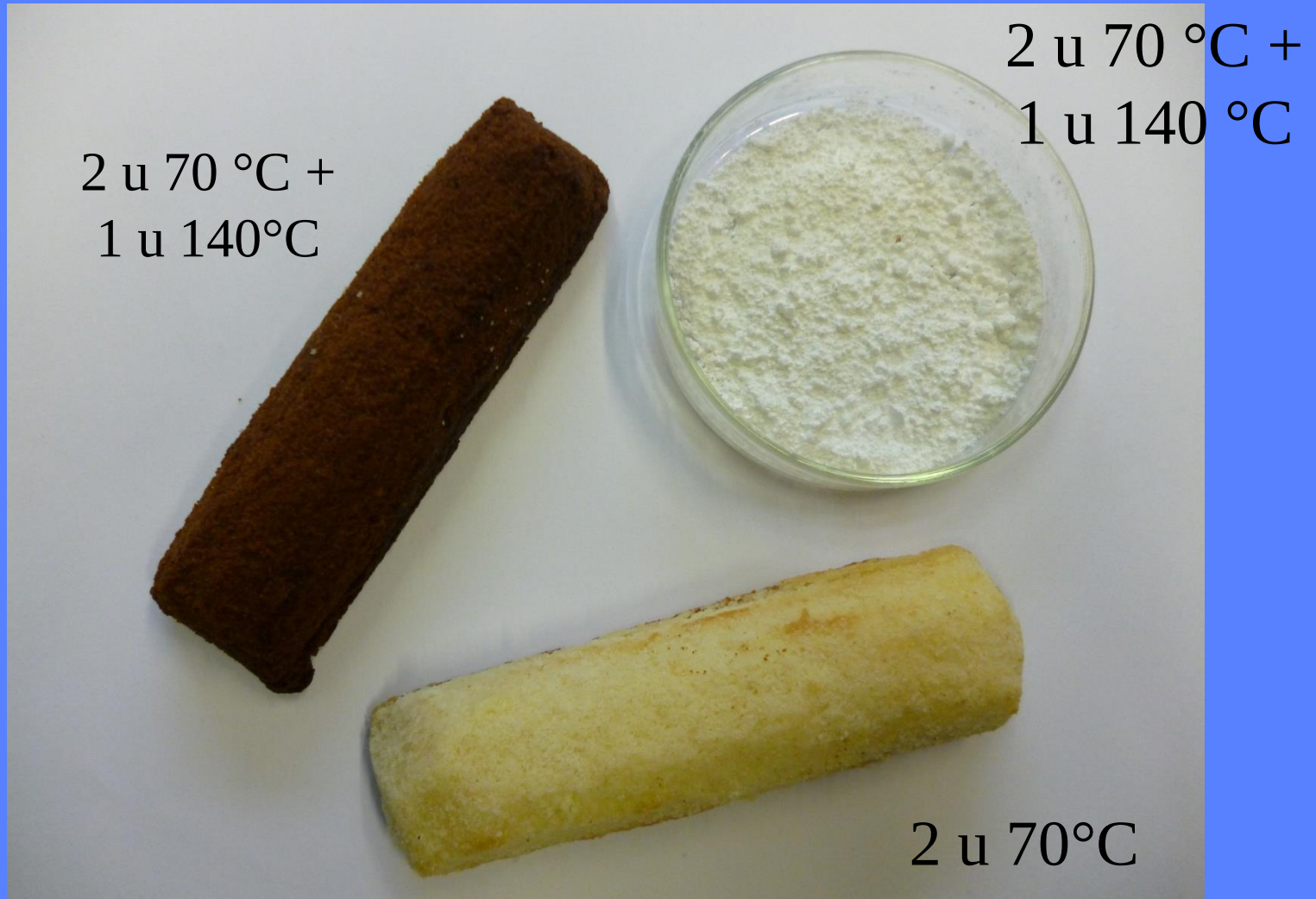
Stability of Stevia Extracts

- Reb A stable to typical baking conditions (20-25 minutes at 180 °C; 99.9% remained)²



Stability of stevia at elevated temperatures¹

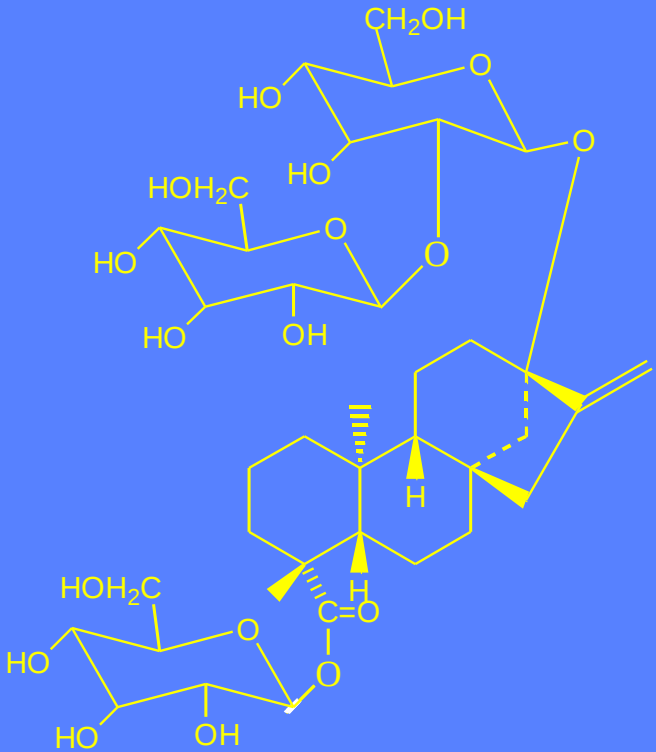
Geen afbraak bij bakprocessen



Gebruik Stevia-blaadjes

- Hoofdzakelijk in thee
- Mogelijk te gebruiken in confituur etc. na toevoegen van pec+
- toevoeging in slaatjes
- mogelijk in puddinkjes etc., doch probleem: zwarte puntjes = fijngemalen blaadjes

Voornaamste zoetstoffen



Stevioside

Rebaudioside A

Veiligheid

- Alle in betrouwbare laboratoria uitgevoerde testen tonen aan dat er geen enkel negatief effect is van het gebruik van steviolglycosiden als zoetstof!
- Geruchten over onveiligheid: te wijten aan onbekwame wetenschappers van zowel Hoge Gezondheidsraad als vroegere Wetenschappelijke Comité voor voeding van EU.

Risico Inschatting Inname

- Suikerverbruik in België: 131 g/d
- 131 g $\approx$ 436 mg Stevioside. Doch: er zal minder gebruikt worden. Bv. Jam: 800 mg ST/kg vruchten i.p.v. 3.3 g!
- Verwachte inname: max. 200-300 mg/dag
- Thailand: gemeten: $\pm$ 100 mg/dag
- ADI: $\pm 10 * 60 = 600$ mg/dag (240 mg SV eq.)

Stevioside als zoetstof

- Momenteel: ± 30000 ha Stevia-velden
- Productie: ± 90000 ton Stevia-blaadjes
- Oftewel: ± 9000 ton zuivere zoetstof
- Gebruik in Thailand: ± 92 mg/dag
- dwz.: dagelijks gebruiken ongeveer 280 miljoen mensen Stevia in al zijn vormen
- Nooit melding van schadelijke effecten!
- Stevia: win-win situatie!

SVgly als zoetstof

- Zoetheid: 200-350 x die van 0.4% suiker (=sucrose)
- Zoetheid: functie van voedselmatrix
- Kleine hoeveelheden nodig / aanpassing van gerechten (sucrose als vulmiddel afwezig)
- Vulmiddelen: Inuline, dextrose, erythritol.....

Compound	Sweetness	Glycaemic index of the mixture	Glycaemic index “end-use”
Pure SVgly	300 x	0	0
Maltodextrine	Function of degree of polymerisation	100	100
10 % SVgly in maltodextrine	30 x	90	3
Sucrose 0.4 %	1	70	70
10 % SVgly in sucrose	30 x	63	2.1
Erythritol	± 0.7 x	<10	<10
10 % SVgly in erythritol	30 x	<9	<0.3
Inuline	Function of degree of polymerisation, e.g., DP=4, sweetness 30 %	4	4
10 % SVgly in inuline	30 x	3.6	0.12

Waarschuwing

Vermijd combinaties met fructose omdat hoge fructose-hoeveelheden ($> 10 - 75$ g/d):

- insuline resistentie induceren!! ($\rightarrow$ type 2 diabetes) (omwille van productie verzadigde vetten)

EN

- alvleesklier (pancreas) kanker!! (Liu *et al.*, 2010)

Aanbevelingen suikerverbruik

- WHO: Max. 10 % energie-inname (2000 Kcal), dus max. 200 Kcal of 50 g toegevoegde suiker.
- AHA: Amerikaanse Hart Associatie
 - mannen: max. 36 g suiker
 - vrouwen: max. 20 g suiker
 - kinderen: max. 12 g suiker

Suikerverbruik in België: 131 g/d !!!
toegevoegde suiker

Misleiding door grote bedrijven

- Hanteren **eigen** en hogere normen voor dagelijkse suikerinname!
- Coca-Cola: blikje = 33 cl bevat 35 g suiker en noemen dit 39% van dagelijkse voedingsrichtlijn (GDA), die ze dus op 90 g plaatsen !!!
- GEEN RESPECT voor gezondheid van consument!
- Geldgewin: belangrijker dan gezondheid!

Coke®

FRISDRANK MET PLANTENEXTRACTEN. Ingrediënten: sprankelend water; suiker; kleurstof: E150d; voedingszuur: E338; plantenextracten; aroma cafeïne.
 BOISSON RAFRAÎCHISSANTE AUX EXTRAITS VÉGÉTAUX. Ingrédients: eau pétillante; sucre; colorant: E150d; acidifiant: E338; extraits végétaux; arôme caféine.

VOEDINGSWAARDE PER / VALEUR NUTRITIONNELLE POUR 100 ml

Energetische waarde / Valeur énergétique:	180 kJ, 42 kcal
Eiwitten / Protéines:	0 g
Koolhydraten / Glucides:	10.6 g
waarvan suikers / dont sucres:	10.6 g
Vetten / Lipides:	0 g
waarvan verzadigde vetzuren / dont acides gras saturés:	0 g
Voedingsvezels / Fibres alimentaires:	0 g
Natrium / Sodium:	0 g

330ml bevat / contient

kcal	Suikers Sucres	Vetten Lipides	Verzadigd vet Lipides saturés	Natrium Sodium
139	35 g	0 g	0 g	0 g
7%	39%	0%	0%	0%

% van de Dagelijkse Voedingsrichtlijn (GDA) / % des Repères Nutritionnels Journaliers (GDA). Op basis van / Sur base de: 2000 kcal

Ten minste houdbaar tot: zie bodem
 A consommer de préférence avant:
 voir fond boîte. Coca-Cola Enterprises
 Belgium sprl/bvba BP/PB 400 B-1070
 Bruxelles/Brussel 7. Geproduceerd met
 toestemming van - Conditionné avec
 l'autorisation de: The Coca-Cola Company.

INFOLINE NL: 0800-COCACOLA
 (0800-26222652) www.coca-cola.nl,
 B: 078-156156. www.coca-cola.be,
 L: 26 102 102 www.coca-cola.lu
 © 2008 The Coca-Cola Company.
 Uit de zon bij gematigde temperatuur in
 een droge en schone omgeving.



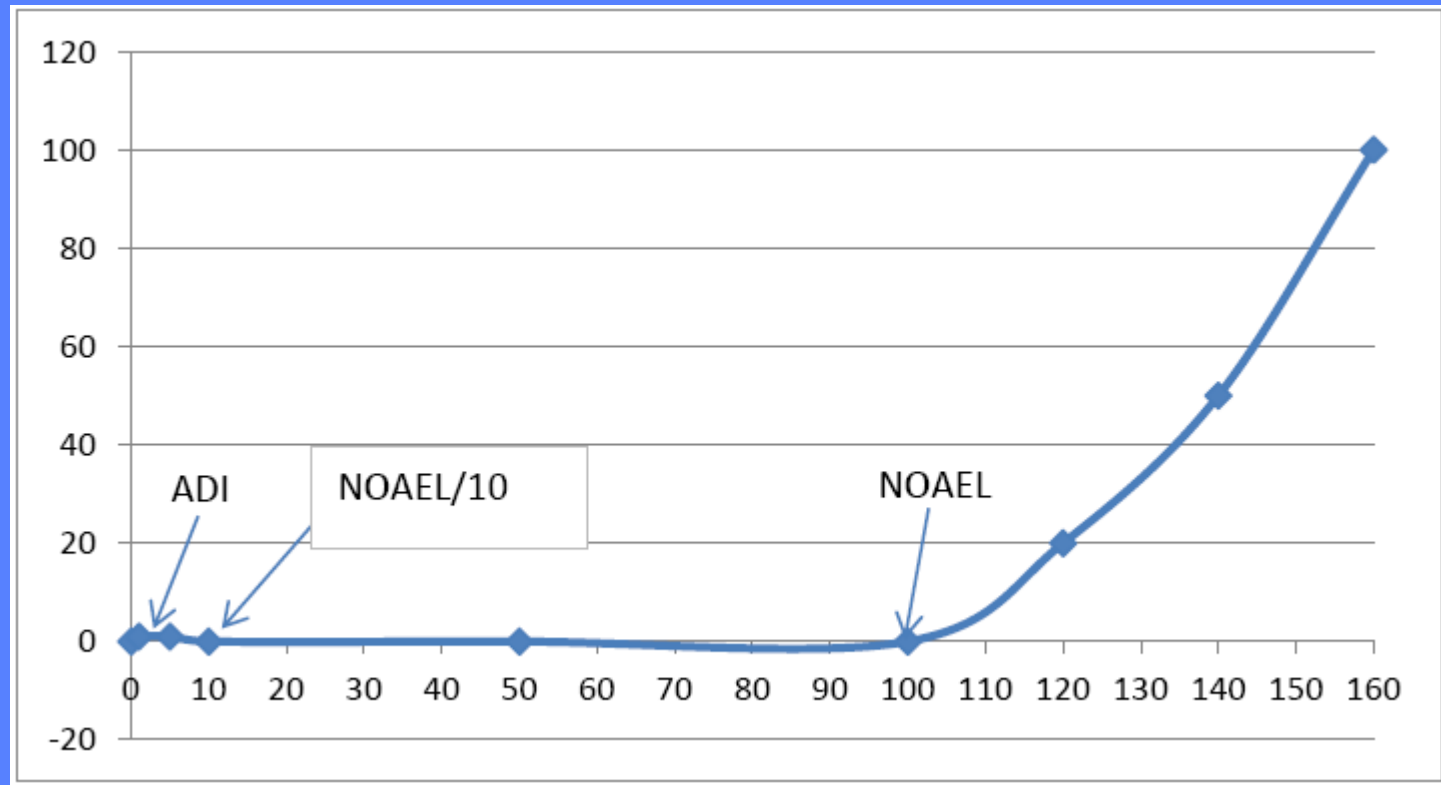
GDA of dagelijkse voedingsrichtlijn

- Als u op een frisdrank-verpakking ziet staan:
bevat **35 g suiker** en dit is **39% van de dagelijkse voedingsrichtlijn**. Wat denkt u dan?(meerdere antwoorden mogelijk):
 - 1) Door het drinken van 1 frisdrank is er voor 39% aan de dagelijkse basisbehoefte voor suiker voldaan, (70 %)
 - 2) Ik mag gerust nog eentje drinken, (25 %)
 - 3) Ik besluit hieruit wij dagelijks 90 g **toegevoegde** suiker nodig hebben ($35/0.39 = 90$), (55 %)
 - 4) Dit ziet eruit als een richtlijn van de overheid, (55 %)
 - 5) Ik vertrouw erop dat de voedingsindustrie duidelijke en correcte informatie verstrekt, (50 %)
 - 6) Ik heb al die toegevoegde suiker niet nodig. (45 %)

De suikerlobby geeft zich bloot



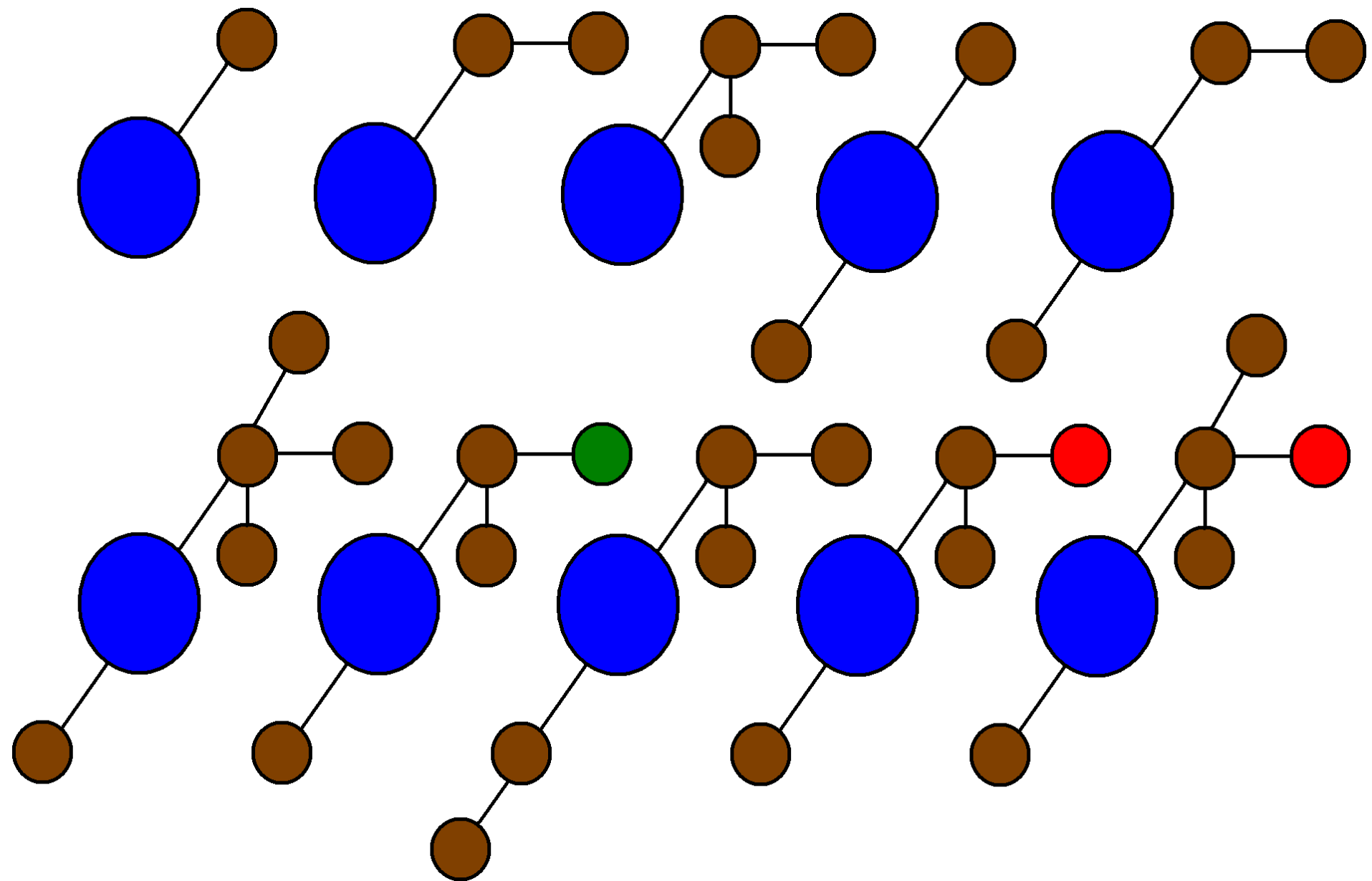
ADI en S_Vequivalenten

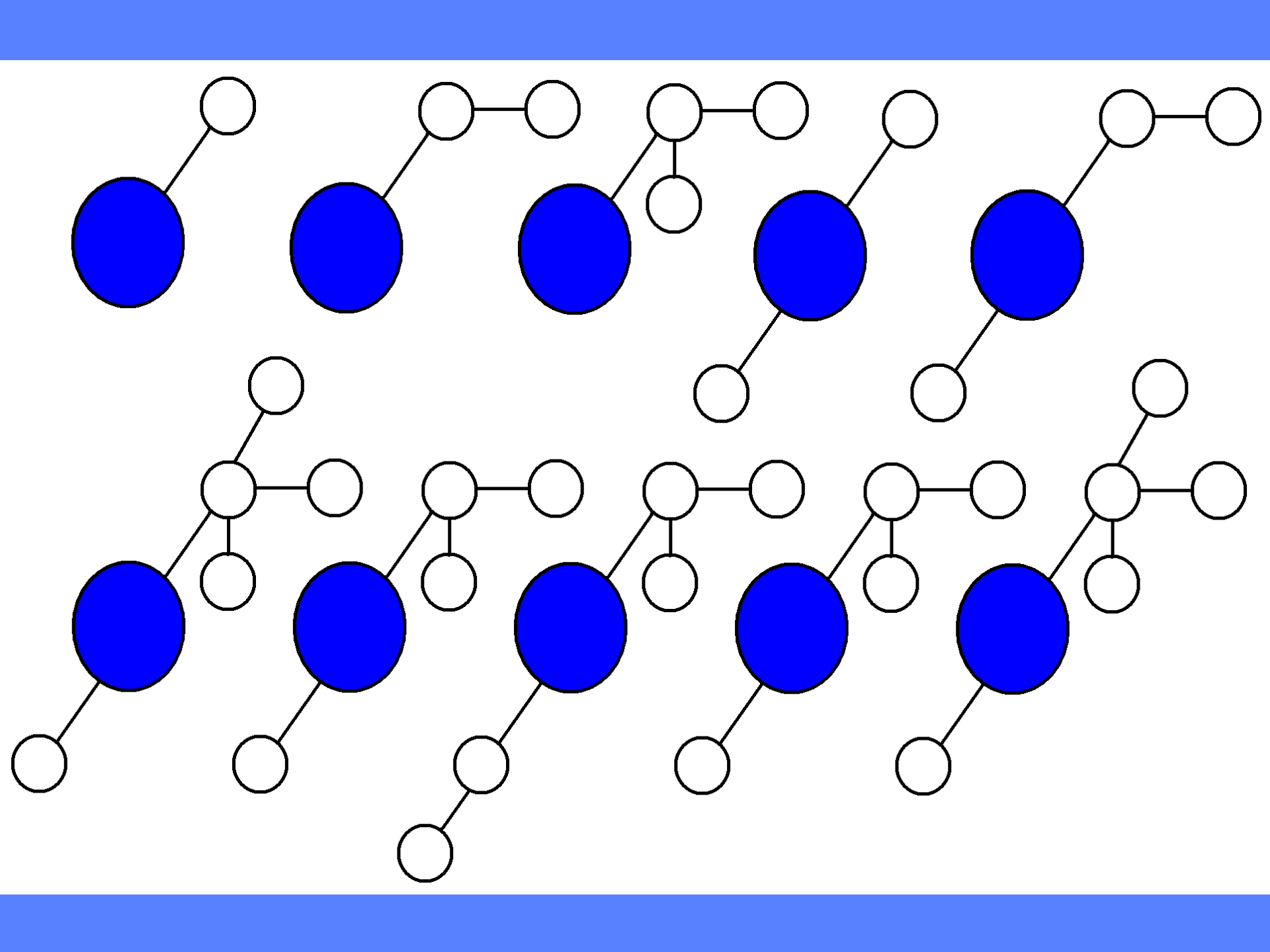


ADI en SVEquivalenten

- ADI: Allowable Daily Intake (Toegestane Dagelijkse Inname) in mg/kg
- $ADI = NOAEL/100$ ($100 = 10 * 10$)

Steviolglycosiden: uitgedrukt als Steviolequivalenten, omwille van verschillende moleculegewichten (grootte)





ADI vs. EDI

ADI: Aanvaardbare dagelijkse inname

EDI: Geschatte dagelijkse inname

- Consumptie van verschillende voedingsmiddelen door verschillende groepen van bevolking
- Bv. Kinderen 0-4; 4-10; 10-14; 14-18 etc.
- Berekening van het risico om ADI te overschrijden

ADI (mg/kg BW)	SVeq. (mg/kg)	Organism	NOAEL (mg/kg)	Reference
7.938*	3.13	Wistar rat	794	Xili et al. 1992
25	9.9	rat	2500	Akashi & Yokoyama, 1975
25	9.9	rat	2500	Mitsuhashi, 1981
25	9.9	rat	2500	Aze et al., 1991
25	9.9	rat	2500	Yodyingyad & Bunyawong 1991
41.61 rebA	13.7	rat ♂	4161	Curry & Roberts, 2008
46.45 rebA	15.3	rat ♀	4645	Curry & Roberts, 2008
20.48 rebA	6.7	rat ♂	2048	Cury et al., 2008
22.73 rebA	7.5	rat ♀	2273	Cury et al., 2008
20 rebA	6.6	rat	2000	Nikiforov & Eapen, 2008
6.25**	-	hamster	-	Wasuntarawat <i>et al.</i> , 1998
≈ 12.5***	4.94	man	≈ 12.5	Chan et al., 2000
≈ 25***	9.9	man	≈ 25	Hsieh et al., 2003
10	4	man		FSANZ 2008
10	4	man		JECFA 2008
10	4	man		EFSA 14 april 2010

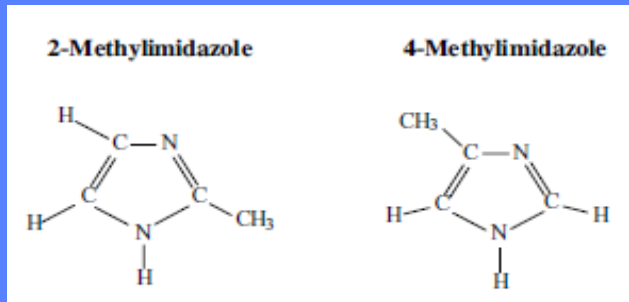
Aspartaam

- ADI: EU: 40 mg/kg; USA: 50 mg/kg
- Metabolisme aspartaam: geeft 11 % methanol
- Vb: persoon van 70 kg
- ADI: $70 \times 40 \text{ mg} = 2800 \text{ mg} \rightarrow 308 \text{ mg MeOH}$
- $10 \times \text{ADI}: 28000 \text{ mg} \rightarrow 3080 \text{ mg} = 3.08 \text{ g}$
- $100 \times \text{ADI}: 280000 \text{ mg} \rightarrow 30.8 \text{ g MeOH}$
- Lethale dosis zeker vanaf 15 g MeOH; blindheid: treedt veel eerder op
- Vergiftigingen door MeOH: Italiaanse maffia (Russische Wodka + MeOH); Dec. 2011: India: 130 doden; zomer 2012: Slovakije: 30 doden
- vermijd ook de methanol uit conserven, vruchtensappen etc.

Methanol

- “Een paard van Troje”!
- Formaline (formol in oplossing):
 - Slecht opgenomen
 - In dierstudies: relatief onschadelijk
 - **Dieren** kunnen formol gemakkelijk omzetten in mierzuur dat wordt afgebroken
- Methanol: - opname zeer gemakkelijk en later omvorming in formol.
- - Afbraak van formol zeer moeilijk bij de mens (>100 x gevoeliger).

Waarom is Cola ongezond?



- bevat 4-methyl-imidazole (103-153 µg/l; max limit=29 µg/l): kankerverwekkend (eis etikettering Californië!)
- teveel suiker → ROS → kanker
- teveel suiker: → obesitas → gerelateerde ziekten
- indien grote hoeveelheden **fructose**: insuline resistentie en pancreas kankers
- Cola light: aspartaam → formol: blindheid, MS, dood; interactie met methylimidazole?
- Cola zero: sucralose: gechloreerde suiker

Sucralose

- “Children with Cancer Conference”, London
- Dr. Soffriti, European Ramazzini Foundation
- 134 ♂ et ♀ Swiss ratten
- Sucralose induceert meer leukemie bij mannetjes, gerelateerd aan dosis
- Heftige kritiek uit voedingsindustrie, bv. Tate & Lyle
- Sinds 1973: zwarte lijst EU; 2004: toegelaten als voedingsadditief

Sucralose

- Slechts 20 % wordt geabsorbeerd
- De rest: uitgescheiden; wordt niet afgebroken in zuiveringsinstallaties; is aanwezig in oppervlaktewaters
- Gedurende jaren in milieu
- Bv. Zweedse Fjorden
- Alle waterorganismen continu in contact.
Effect ???
- In verbrandingsovens: vorming van dioxines !!!

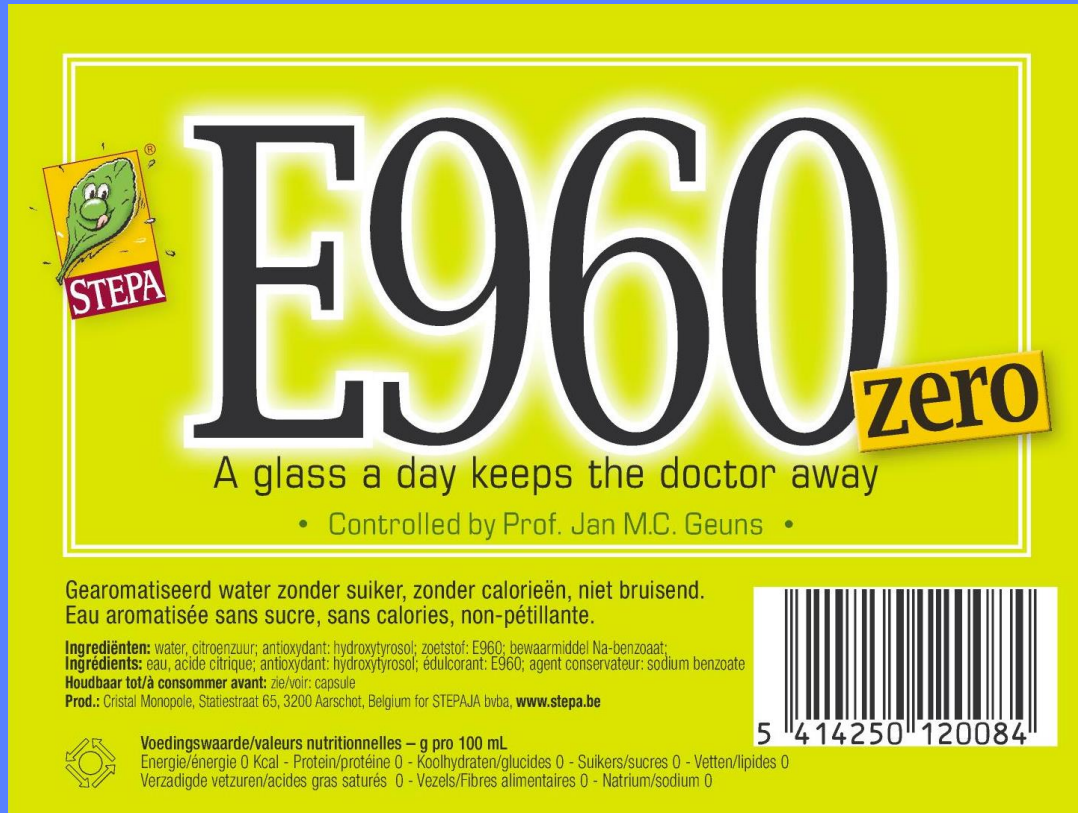
EUSTAS Stevia Label



Voorbeelden gebruik



Gezondheidsdrinkje



The image shows the packaging for E960 zero, a health drink. The packaging is yellow with a white border. At the top left is a logo featuring a green leaf with a face and the word 'STEPA' in a red box. The text 'E960' is in large, bold, black letters with a white outline. To the right of 'E960' is a yellow tag with the word 'zero' in black. Below the main text is the slogan 'A glass a day keeps the doctor away' and a line 'Controlled by Prof. Jan M.C. Geuns'. At the bottom left, there is a small logo and text in Dutch and French describing the product as sugar-free and calorie-free. At the bottom right is a barcode with the number 5 414250 120084.

STEPA

E960

zero

A glass a day keeps the doctor away

• Controlled by Prof. Jan M.C. Geuns •

Gearomatiseerd water zonder suiker, zonder calorieën, niet bruisend.
Eau aromatisée sans sucre, sans calories, non-pétillante.

Ingrediënten: water, citroenzuur; antioxidant: hydroxytyrosol; zoetstof: E960; bewaarmiddel Na-benzoaat;
Ingédients: eau, acide citrique; antioxidant: hydroxytyrosol; édulcorant: E960; agent conservateur: sodium benzoate
Houdbaar tot/à consommer avant: zie/voir: capsule

Prod.: Cristal Monopole, Statiestraat 65, 3200 Aarschot, Belgium for STEPAJA bvba, www.stepa.be

Voedingswaarde/valeurs nutritionnelles – g pro 100 mL
Energie/énergie 0 Kcal - Protéine/protéine 0 - Koolhydraten/glucides 0 - Suikers/sucres 0 - Vetten/lipides 0
Verzadigde vetzuren/acides gras saturés 0 - Vezels/Fibres alimentaires 0 - Natrium/sodium 0

5 414250 120084

- Voorkomt aderverkalking: SVglys en hydroxytyrosol

Verskil met andere frisdranken

- STEP A-producten: zonder toegevoegde suikers!
- Geen misbruik van “Stevia” om toch nog 6% suiker toe te voegen!

Suiker-vrij STEP A bier



Alle dranken te koop bij:

Alternative Healing, Koolmeesstraat 42

8400 Oostende

059 33 42 69/71 GSM 0495 35 50 75

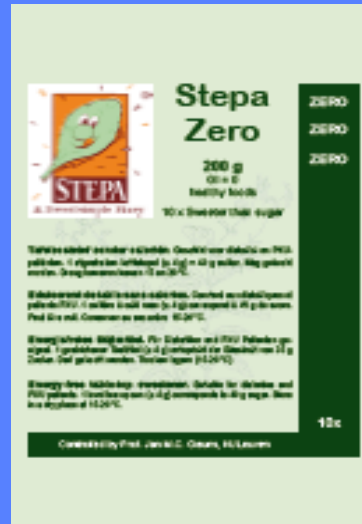
Bieren binnenkort:

Beershop 't Koelschip; Van Iseghemlaan 101

8400 Oostende

Tel: 0493-634538

Tabs, Sticks, Tafelsuikers



Waar te koop?

- 9000 Gent Bioshop, Ch. de Kerckhovenlaan 423
- 9000 Gent, De hopduvel, Coupure Links
- 9040 St-amandsberg, Pimpernel, Antwerpsestw.450
- 9041 Oostakker, Dranken Geers, Ledergemstr. 7
- 9041 Oostakker, Goossens dranken, Goedlevenstr 124
- 9080 Lochristi, 't Lang Leven, Dorp-West 1
- 9080 Lochristi, De Clercq & zoon, Dorp-Oost 133
- 9080 Lochristi, Nico' Drinkmarket, Dorp-West 134
- 9080 Melle, Bierhalle, Hovenierstraat 36A
- 9100 Nieuwkerken-Waas, Jacob Kris, Pastorijsstraat 17
- 9100 Sint-Niklaas, Van Goethem, Sparrenhofstraat 99B
- 9120 Haasdonk, De Moor, Ropstraat 4
- 9160 Eksaarde, Kruidenchalet, Eksaarde Dorp 26

CONCLUSIE 1

Stevioside
gebruikt als zoetstof is
veilig!

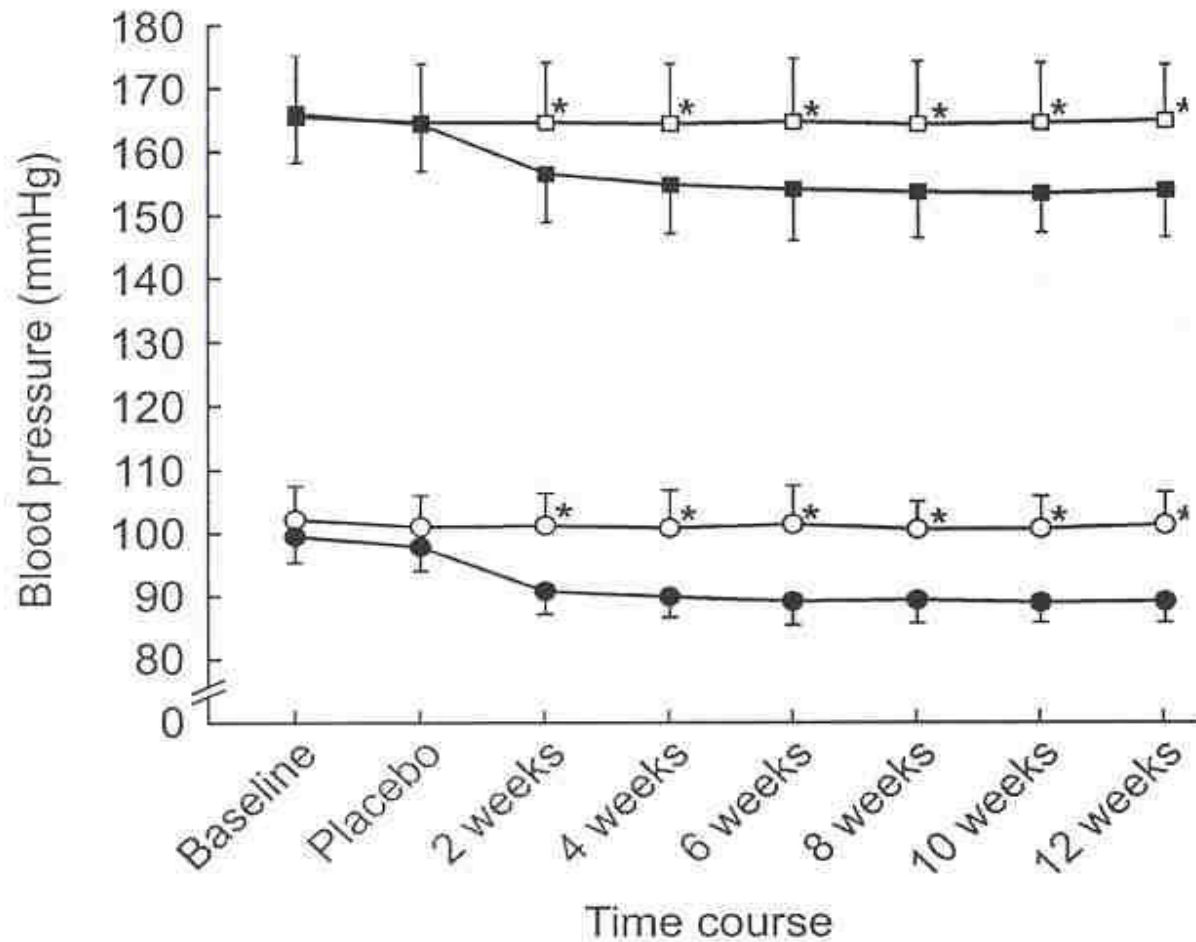
2. Farmacologische doses (HOGE DOSES)

- 1) Verlaging van bloeddruk: enkel bij hoge bloeddruk
- 2) Diabetes type 2
 - Verlaging bloed-glucose
 - Verhoging insuline-secretie door β -cellen (stadium!)
 - Effect: [glucose] afhankelijk
 - Verhoging insuline-gevoeligheid
 - Remming glucagon afscheiding uit α -cellen
- 3) Anticarcinogene effecten
- 4) Anti-atherosclerose effecten (aderverkalking)
- 5) Opvangers van reactieve zuurstofradicalen

Nota

- Hierna volgende effecten:
 - bekomen met Stevioside (RebA ??)
 - zeker in proefdieren
 - zeker in geïsoleerde systemen
 - gewenst: proeven met grote groepen mensen

1) Hoge bloeddruk



Chan et al., 2000; Hsu et al., 2002; Hsieh et al., 2003 (750/1500 mg daily for 1 or 2 y); Gregersen et al., 2004;

Conclusie 2

Hoge dosis Stevioside is heilvol in hypertensie

Normo- en Hypotensie: geen effect

2) Type 2 Diabetes

- Research by P. Jeppesen, Aarhus, Denmark
- Ch. Toskulkao, Bangkok, Thailand
- E.J. Henriksen, Tucson, AZ
- R.B. Bazotte, Maringá, Brazil
- P. Holvoet, M. Geeraert, J. Geuns
KULeuven

Type 1 Diabetes

- Gewoonlijk vóór leeftijd 25 j
- Patiënt kan plots zeer ziek worden
- Geen insuline productie, nutriënten kunnen cellen niet bereiken
- Bloedglucose te hoog
- Insuline-afhankelijk (injecties)

Type 2 Diabetes

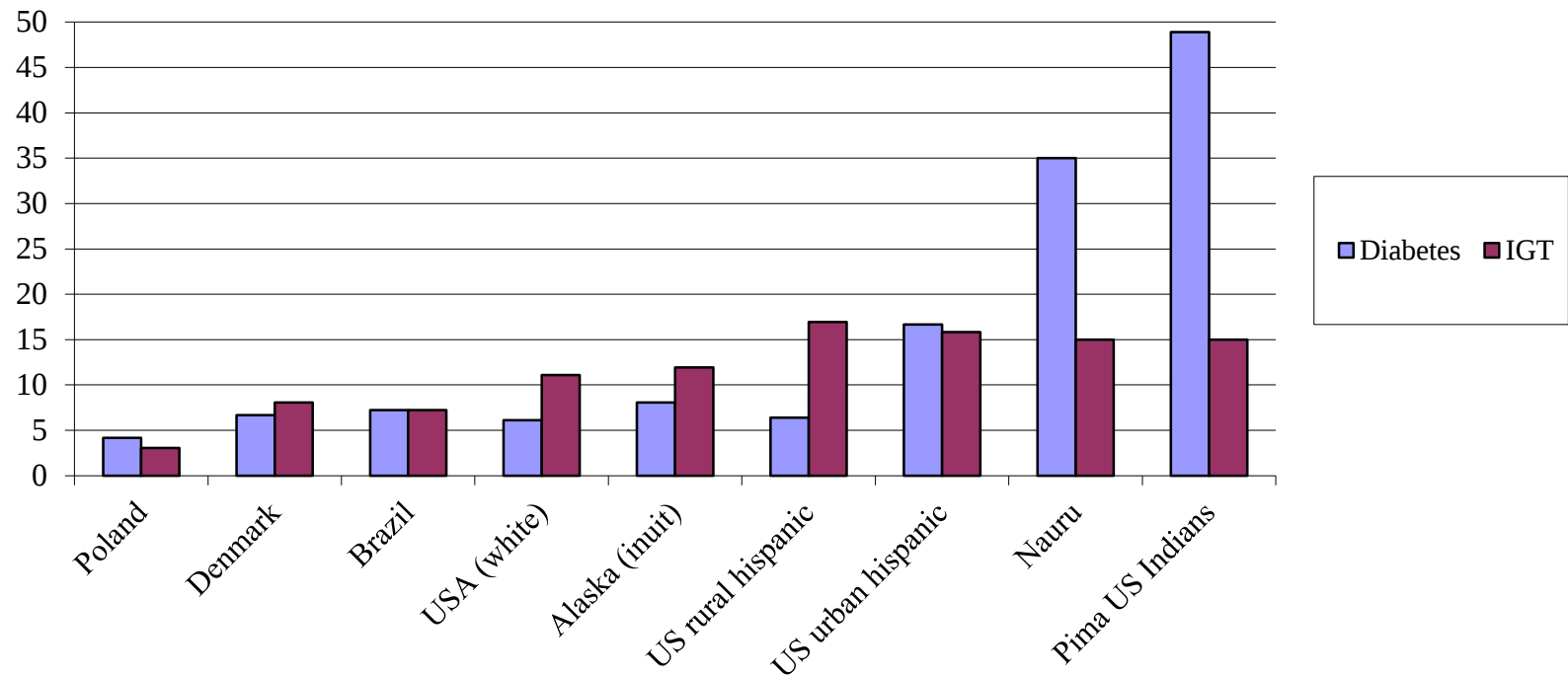
- Patiënten meestal ouder dan 45, overgewicht, te weinig beweging
- Vroeg stadium: gebrek aan symptomen
- Soms ontdekt tijdens routine bloed-onderzoek
- “Insuline resistentie”
- Dieet, gewichtsverlies, orale medicatie, insuline
- Momenteel: type2 vanaf 10 à 12 jaar!!!

WHO, rapport 1997, 2010

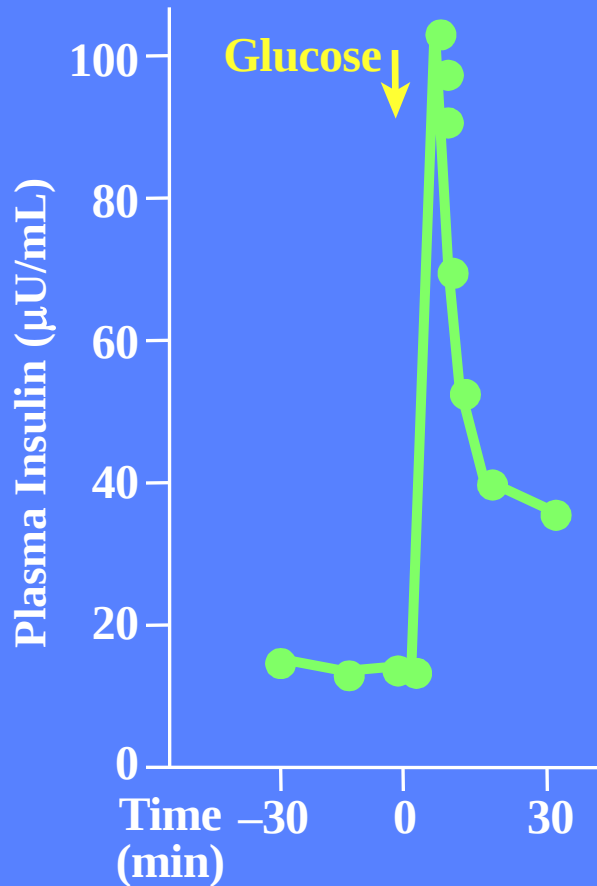


% Diabetici en IGT (impaired glucose Tolerance) (WHO)

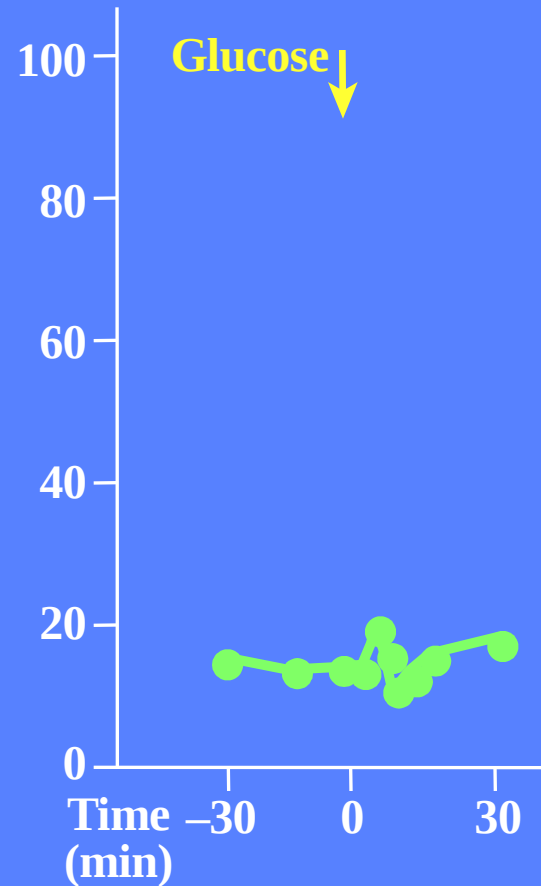
Diabetes and IGT age 35-65



Acute Insuline Respons op Intra-veneus Glucose:



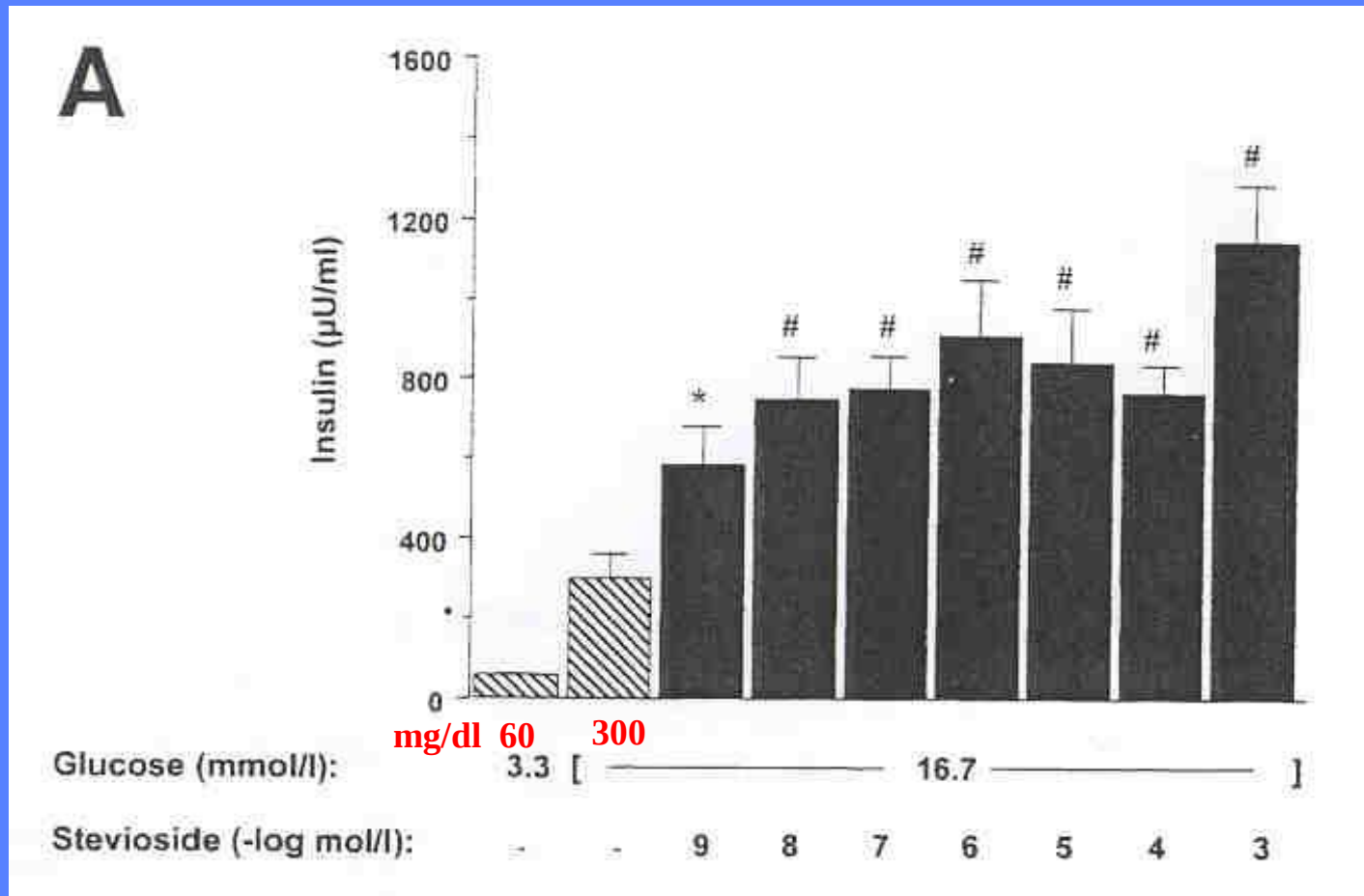
Normal



Type 2 Diabetes

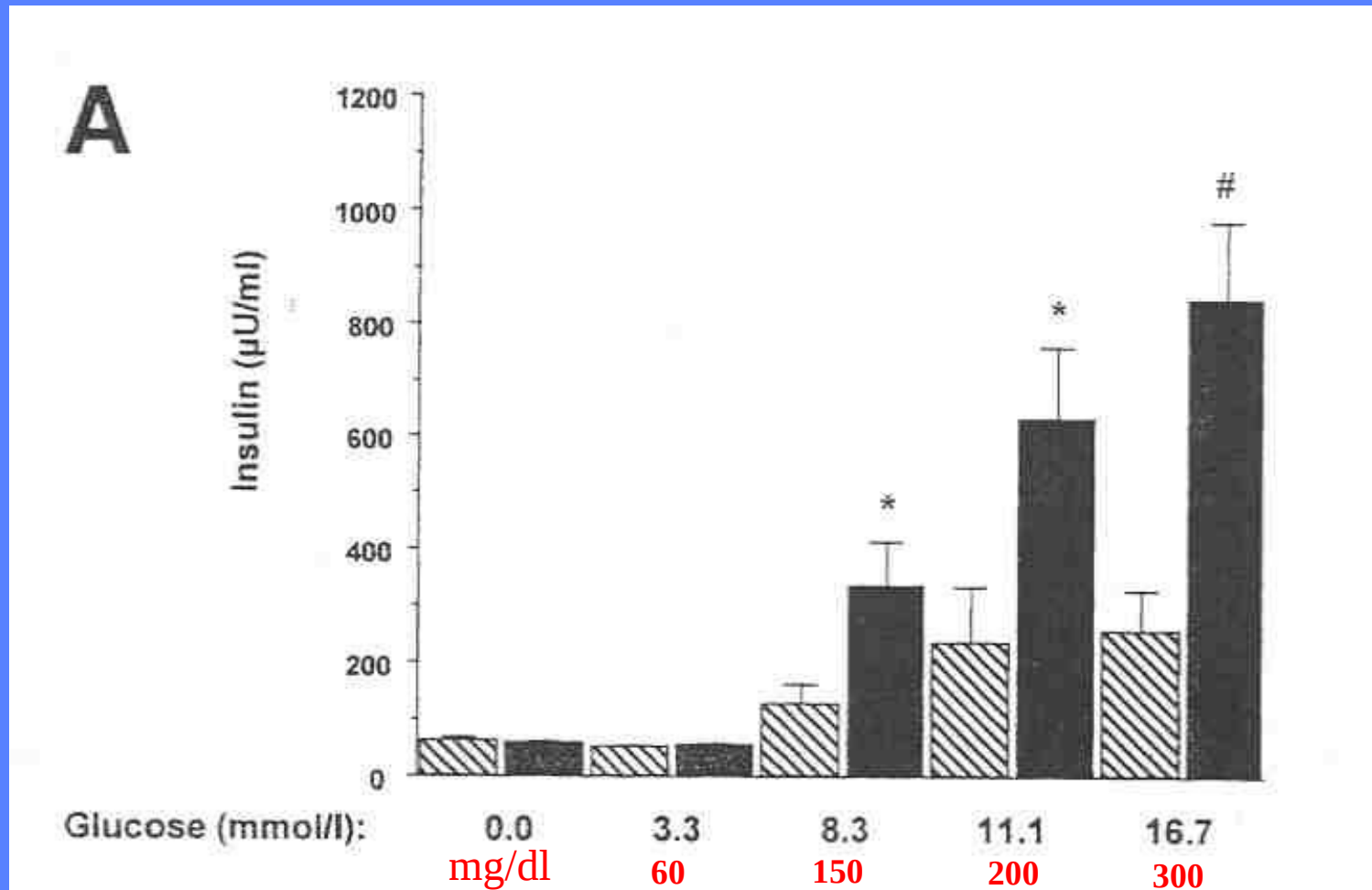
Effect van ST op Insuline Afscheiding

Jeppesen et al., Metabolism 49, 208-214 (2000) (Mouse
islands of Langerhans/ β -Cells INS-1)



Glucose concentratie-afhankelijk

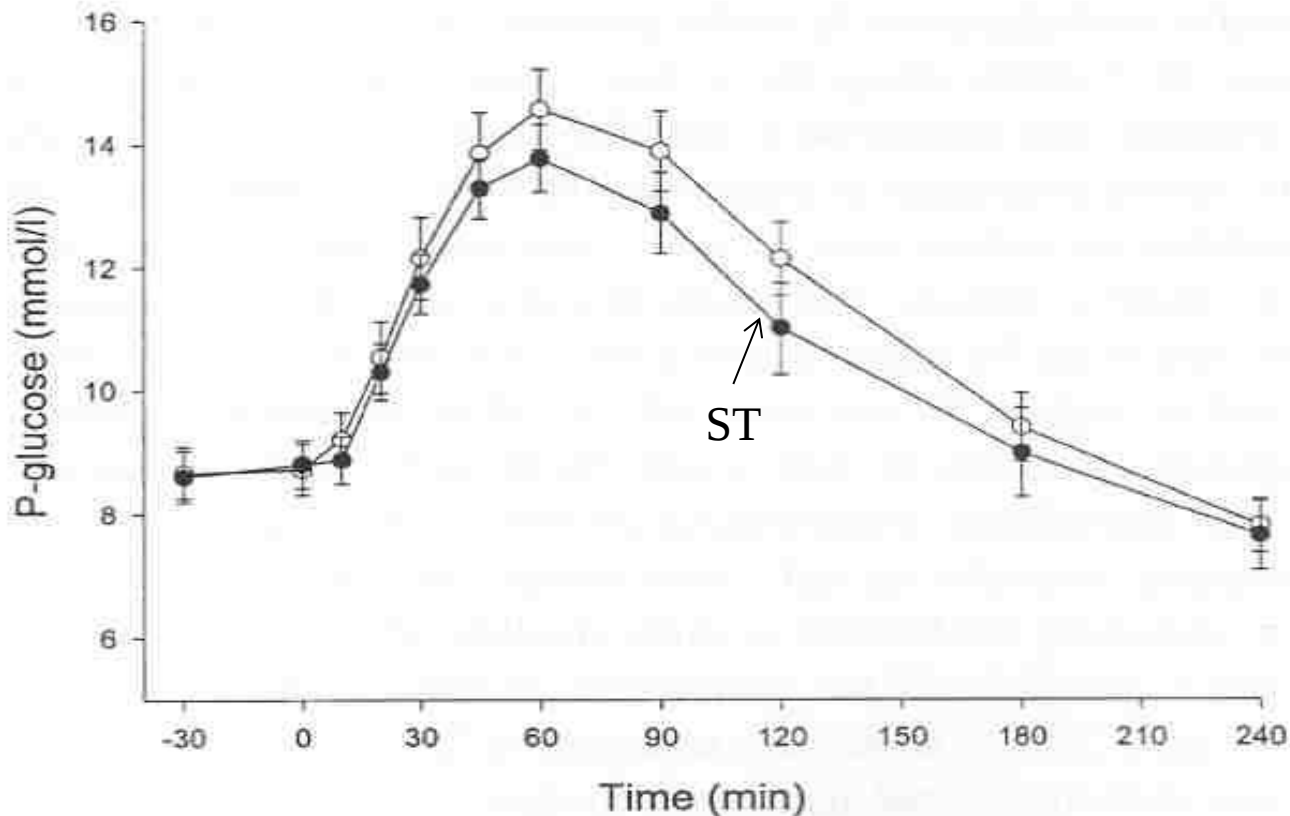
ST: 1 mM (Mouse islands of Langerhans/ β -Cells INS-1)



Afname van bloed glucose

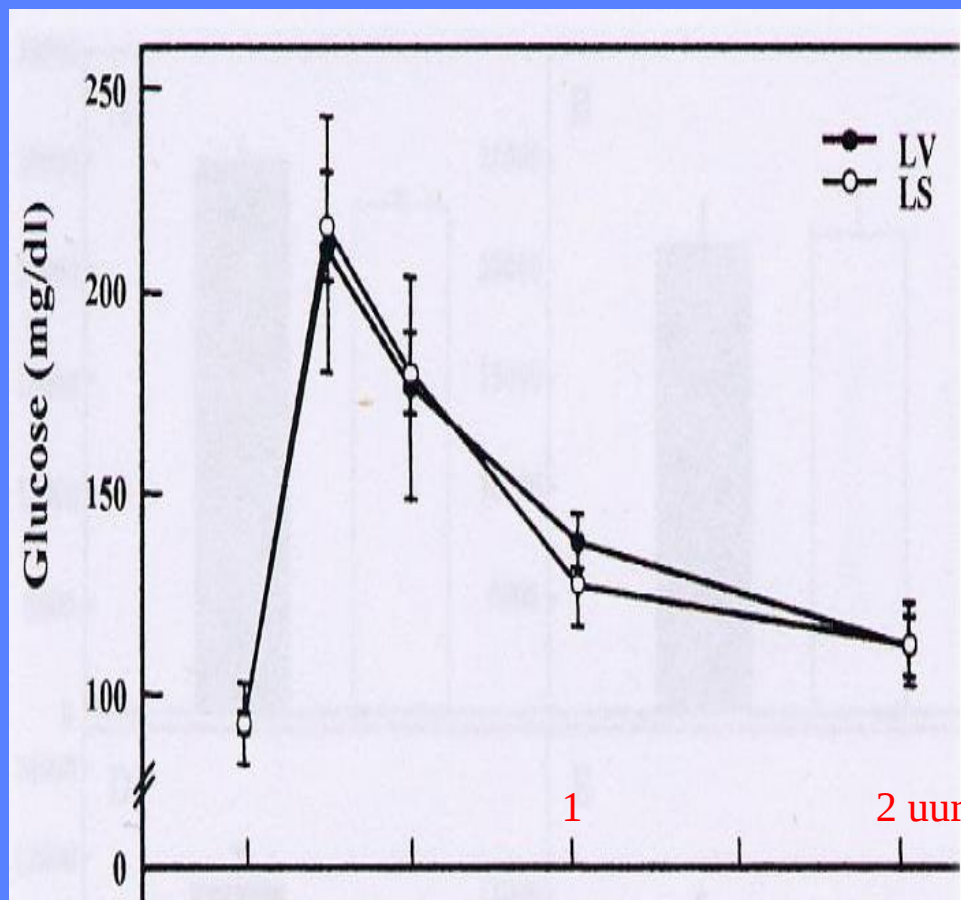
Gregersen et al., *Metabolism* 53, 73-76 (2004).

Volunteers Type2



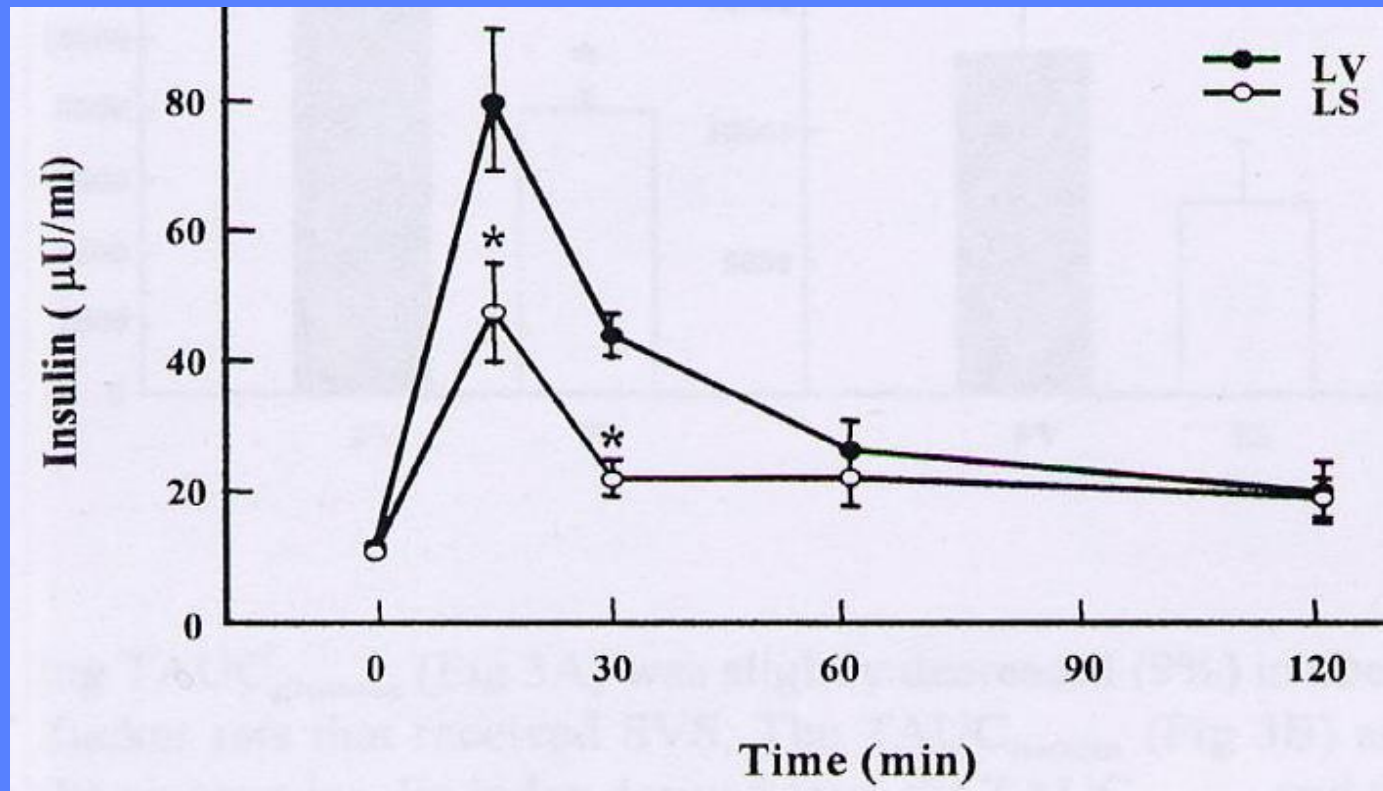
Toename Insuline Gevoeligheid

Lailerd et al, Metabolism 53, 101-107 (2004)



- Magere Zucker ratten
- Oraal ST (-2 h) (500mg/kg BW)
- Oraal GTT (2h)
- Glucose gehalte

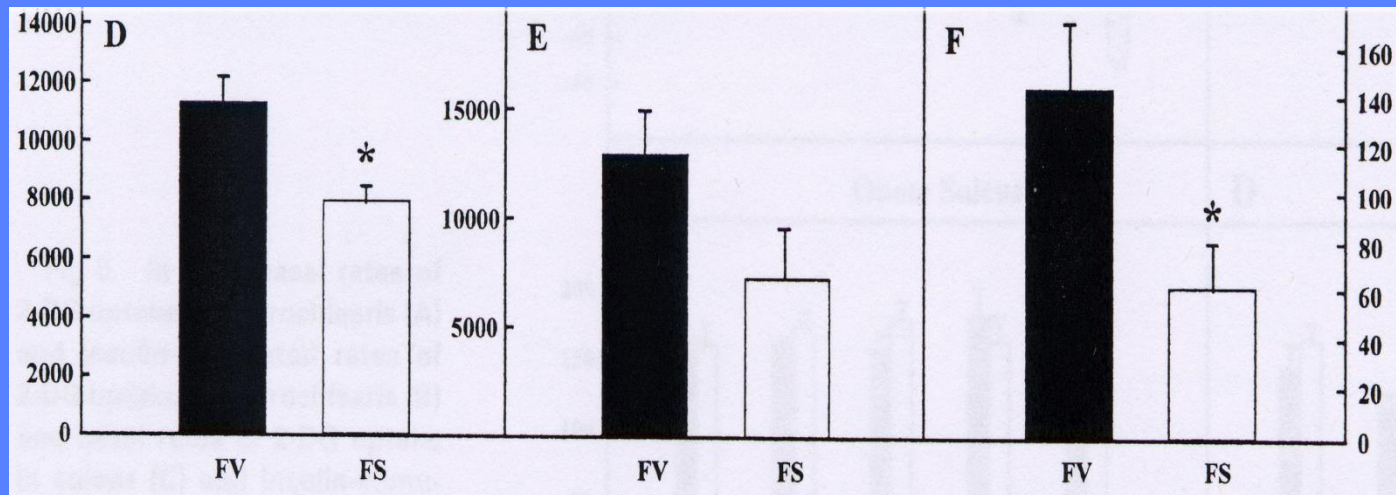
Toename Insuline Gevoeligheid



Minder insuline heeft dezelfde activiteit op bloedglucose

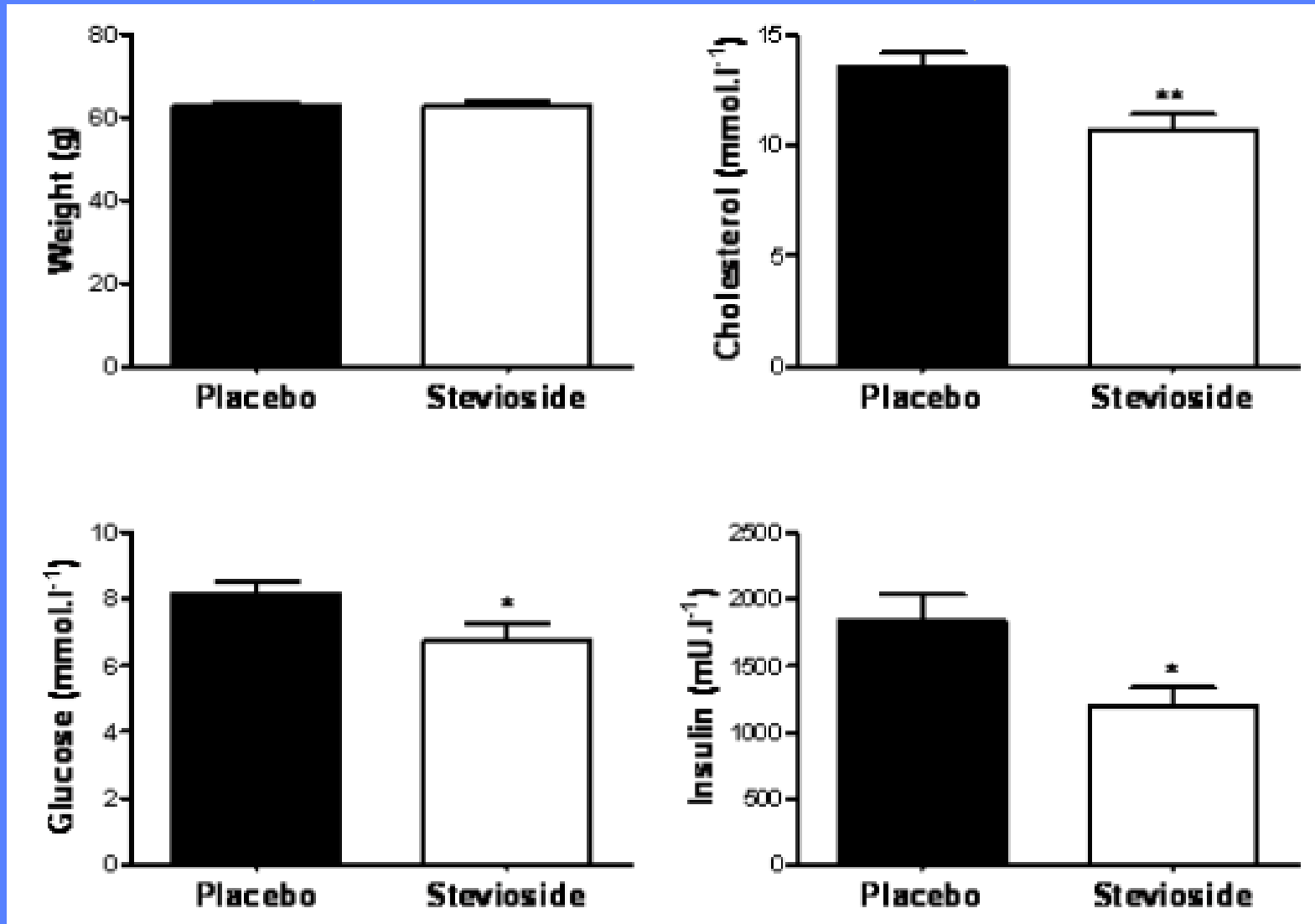
Toename Insuline Gevoeligheid

Vette Zucker ratten

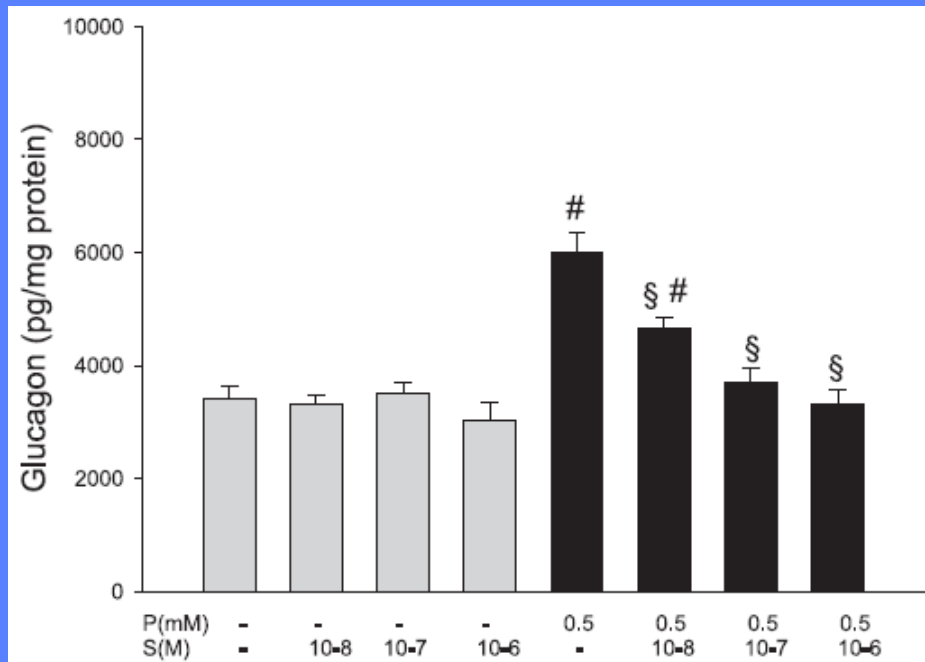


- D: IAUC glucose, mg/dL/min
- E: IAUC insuline, μ U/mL/min
- F: IAUC glucose-insuline index, die negatief gecorreleerd is met insuline gevoeligheid

Gelijkaardige resultaten in obese muizen (Geeraert et al., 2010)



Afname glucagon afscheiding: α -cellen



0.5 mM palmitate

- Hong et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 290, E416-E422 (2006)

- Alpha-Cell line TC1-6

- 0.5 mM Palmitaat en $\neq$ conc. ST (10^{-8} – 10^{-6} M)

Toename Gen Expressie α -Cellen

- CPT1 (Carnitine Palmitoyl Transferase): toename FA oxidatie, verbetert insuline respons en beschermt tegen insuline-resistentie
- PPAR γ : stimuleert verschillende metabole wegen $\rightarrow$ wegwerken van FAs
- SDC (Stearoyl-CoA Desaturase): oleaat (18:1) en palmitoleaat (16:1) $\rightarrow$ protectie van β -cell apoptosis geïnduceerd door verzadigde FAs

Conclusie 3

- ST verlaagt bloedglucose
- Effect is glucose-concentratie afhankelijk, dus geen risico voor HYPOglycemie
- ST verhoogt insuline-afscheiding afhankelijk van stadium!!!
- ST verhoogt insuline-gevoeligheid
- ST vermindert glucagon-afscheiding

Anti-Carcinogene effecten

- Toyoda et al., *Food & Chem. Toxicol.* 35, 597-603, 1997

F344 ratten, 1 of 2 g ST/kg BW

- mannelijke: tumors testes:
tendens om te verminderen
- vrouwelijke: adenomas van
borstklieren: significante
vermindering (80%)

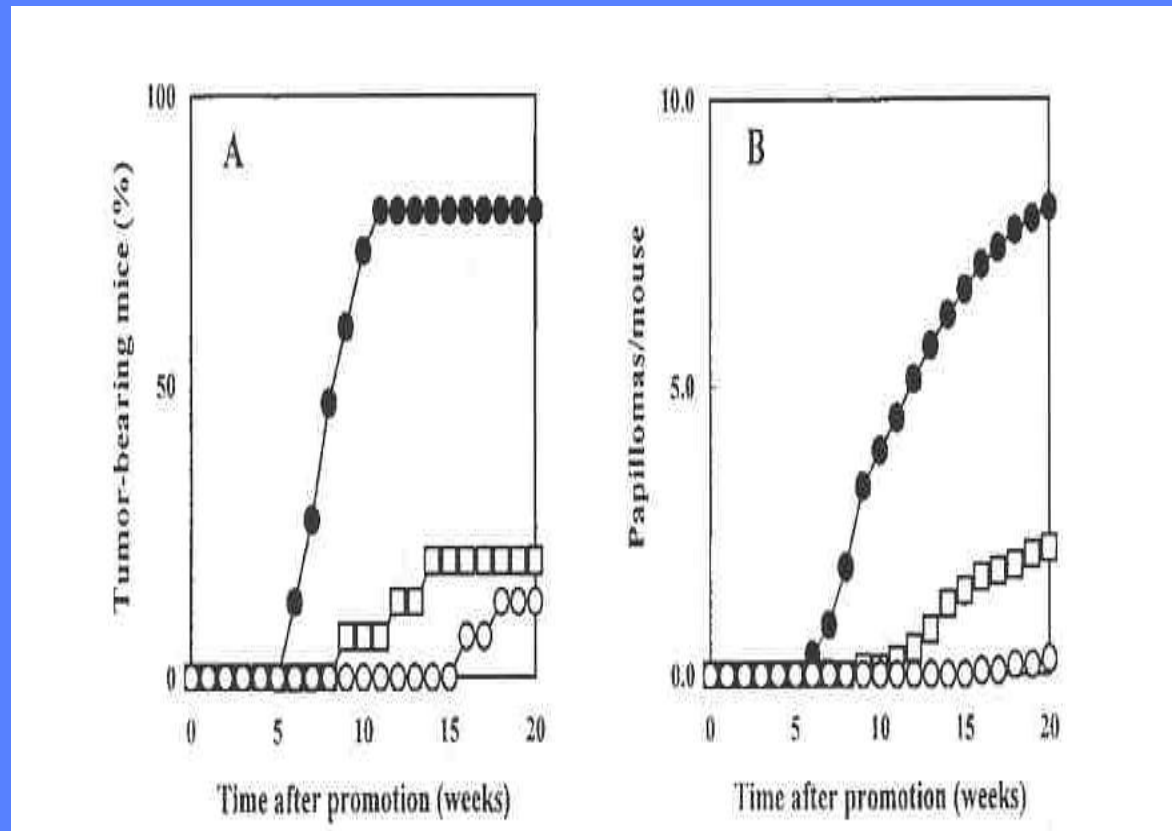
3) Anti-Carcinogene effecten

- Yasukawa et al., *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1488-1490, 2002

Two-stage carcinogenesis test in huid van muis: remming

- initiatie: 7,12-dimethyl-benz[a]-anthracene (DMBA)
- promotie: door 12-O-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetaat (TPA)

Anti-Carcinogene effecten

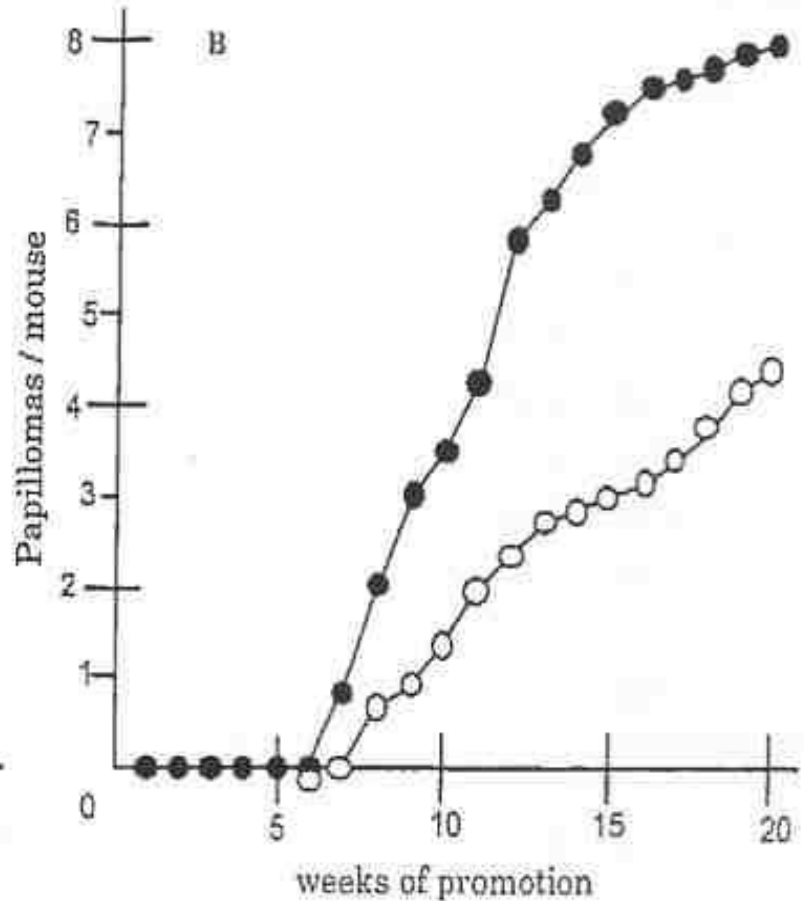
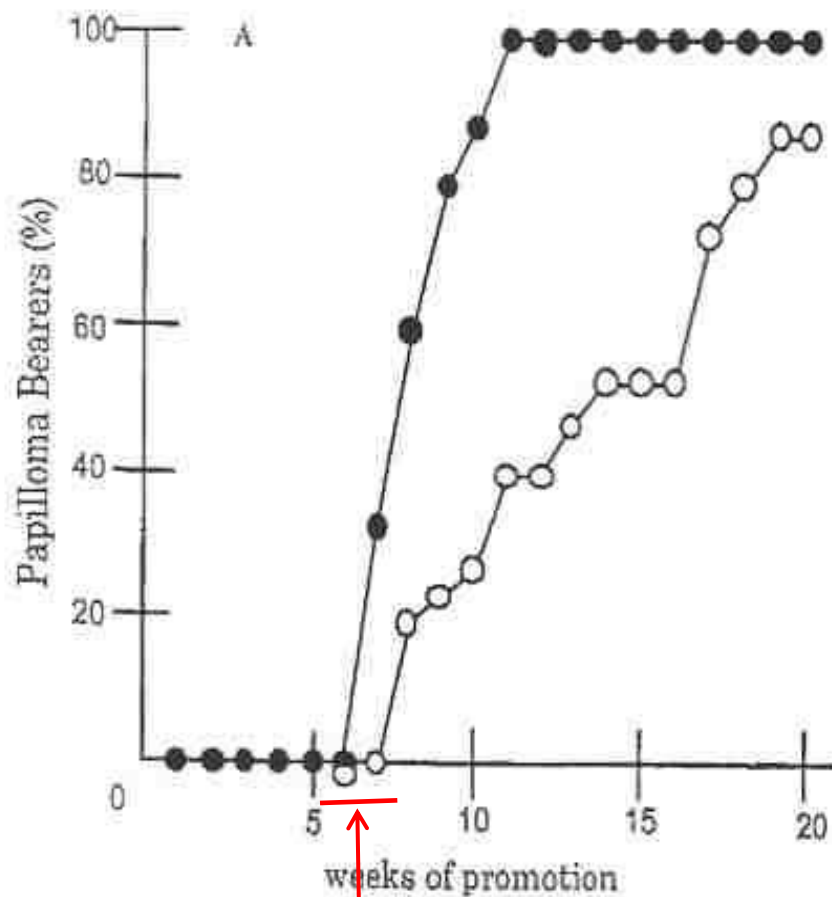


Stevioside: Remming van promotie van huid-papillomas door TPA (phorbol esters) in DMBA-geïnitieerde muizen, Topicale toediening

Anti-Carcinogene effecten

- Konishima & Takasaki, *Pure Appl. Chem.* 74, 1309-1316, 2002
- Initiatie: DMBA of peroxinitriet (ONOO^-)
- Stimulerend door TPA
- Oraal Stevioside!

Anti-Carcinogene effecten



oraal stevioside

Conclusie 4

- ST bezit anti-carcinogene activiteit in dier-modellen
- Te zien in zowel topicale als orale toediening

4) Reductie van Atherosclerosis

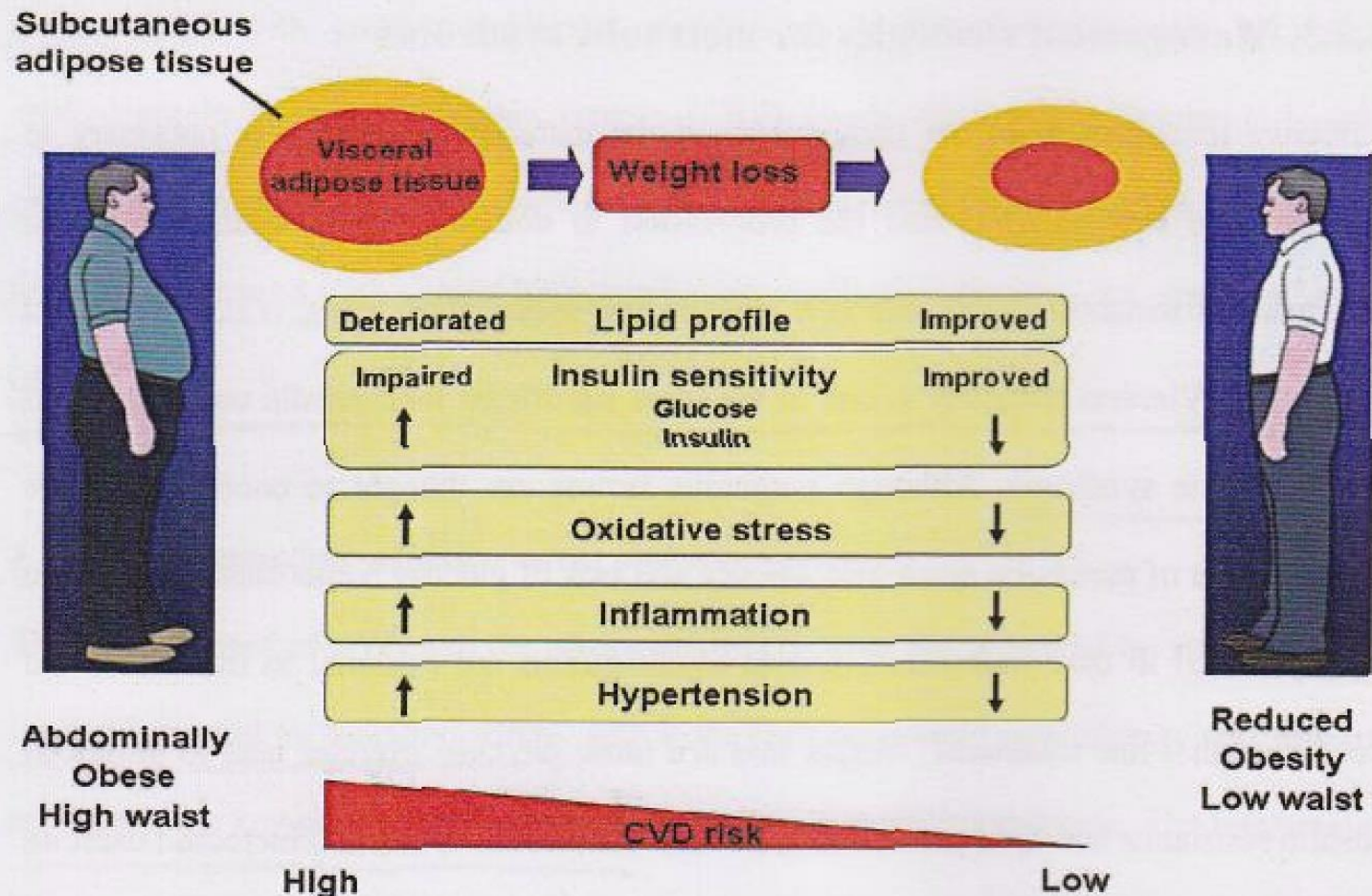
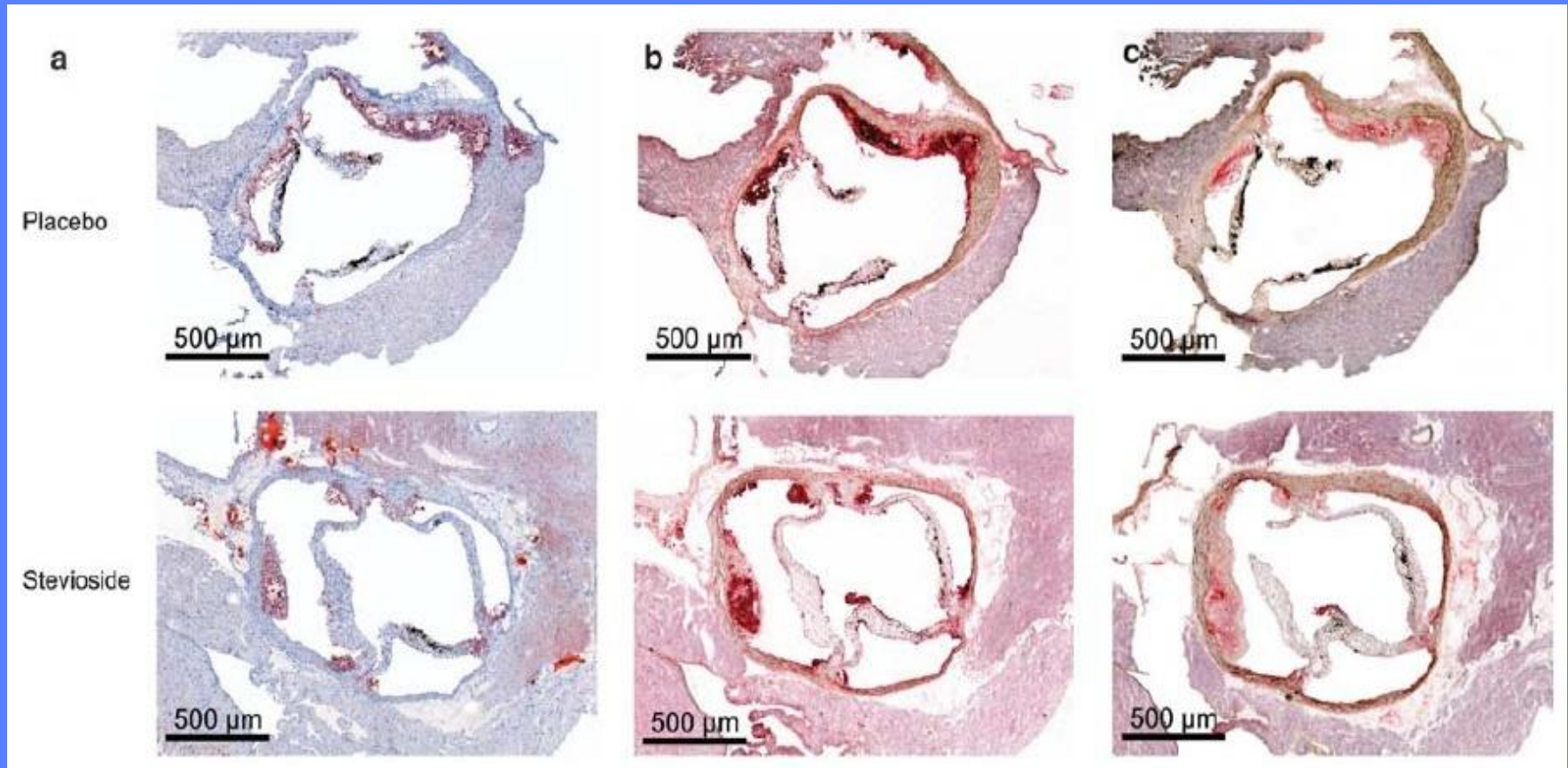


Figure 1.5: Visceral adiposity is one of the most significant mechanistic components of the metabolic syndrome. Weight loss is the cornerstone of the treatment of the metabolic syndrome. (Adapted from Deprés et al, BMJ, 2001)

Aorta boog DKO muis

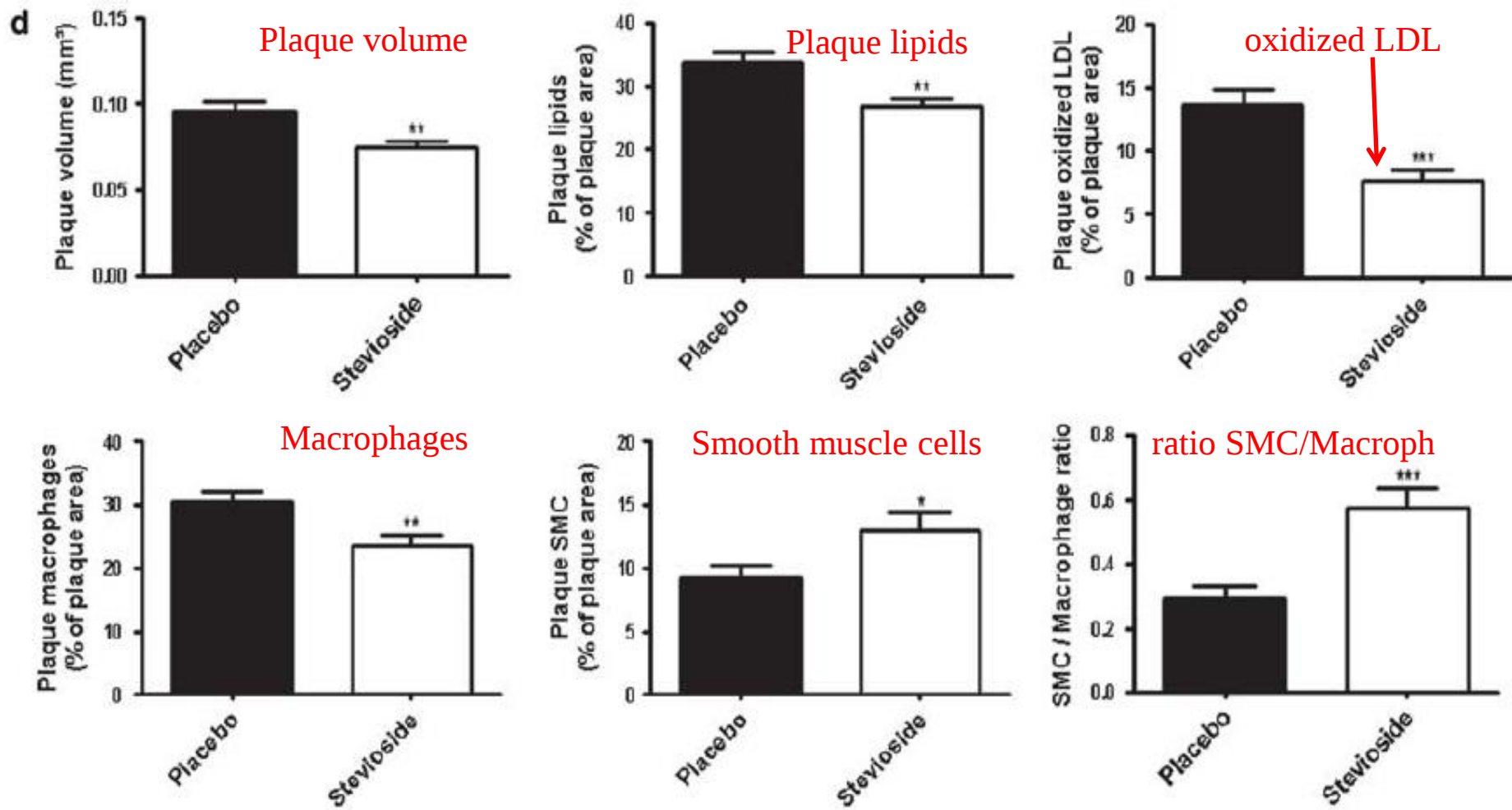
(Geeraert et al., 2010 Deficient in leptin and LDLR)



Red Oil O

Anti-bodies
macrophagen

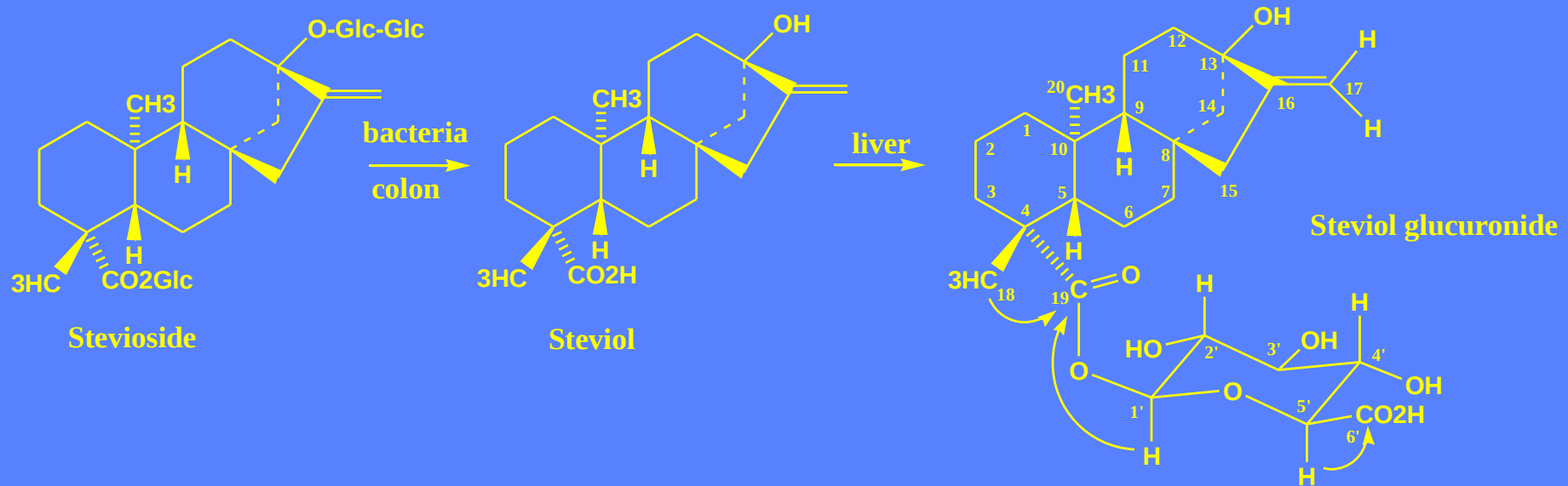
Ab Ox.LDLs



Conclusie 5

- Stevioside voorkomt atherosclerosis, vooral door vermindering van geoxideerde LDL's (lage dichtheits-lipoproteïnen, zgn. “slechte cholesterol”)
- Stimuleren van mechanismen die radicalen ontgiftigen

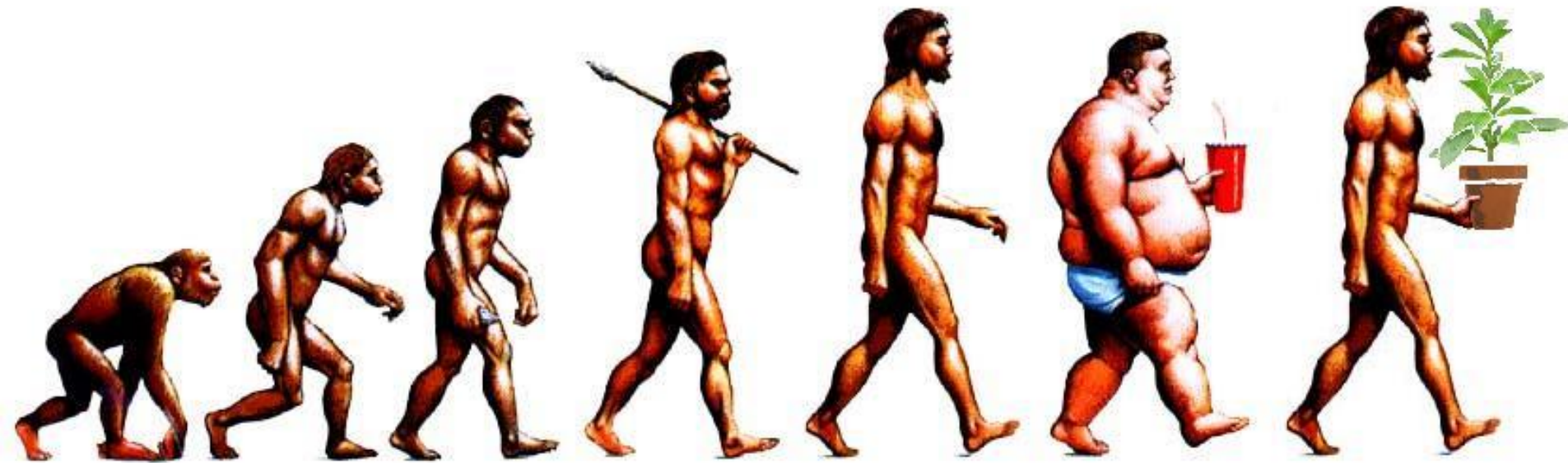
5) SV glucuronide: Vorming en Excretie



- ST $\rightarrow$ SV $\rightarrow$ Lever: SV glu $\rightarrow$ perifeer bloed $\rightarrow$ nieren $\rightarrow$ urine

5) Steviol glucuronide

- Actieve component voor farmacologische effecten ?
 - Stevioside: opname zeer laag
 - Rebaudioside A: Metabolisme zeer traag in rat- en menselijke feces
 - Rebaudioside A: niet actief in *in vivo* studies
 - Steviol glucuronide: aanwezig in bloed in concentraties 1.5 – 38 µg/mL (3 – 77 µM)



Evolutie van de mens!

Hoe kunnen farmacologische effecten verklaard worden?

6) ROS-scavenging by steviol glycosides



Reactieve Zuurstof Species

- Reactive Oxygen Species (ROS)
- Toxisch: oxidatieve celdood, kanker, atherosclerosis, diabetes, ontsteking, veroudering
- Controle van biologische processen
- ROS-ontgiftigingsmechanismen
 - Gluthation peroxidase
 - Catalase
 - Superoxide dismutase (SOD)
 - Ascorbic acid peroxidase
 - Peroxyredoxine
- kunnen enkel H_2O_2 en superoxide ontgiftigen
- Plants: $\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH}$



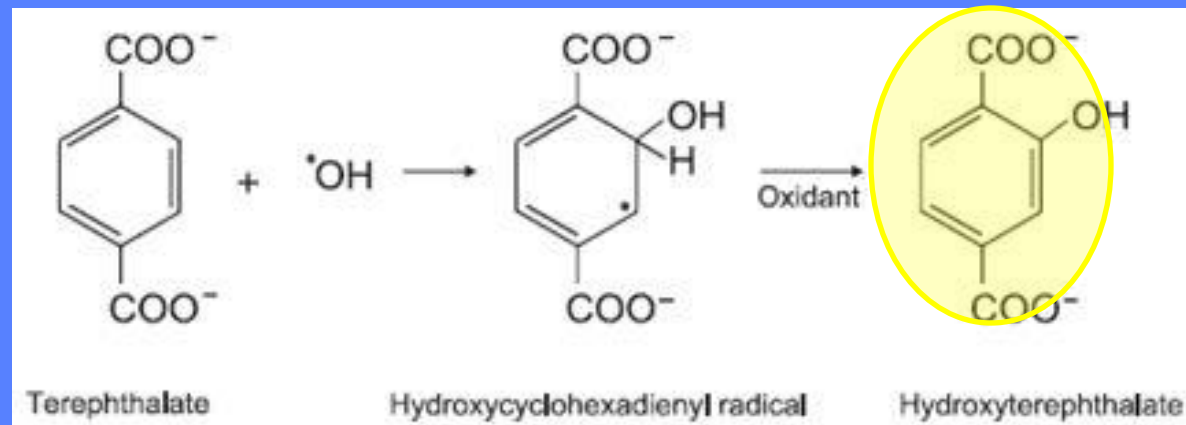
Materiaal en Methode (Linxiang et al. 2004)

- Reaction cocktail
 - 500 μM TPA
 - 10 μM EDTA
 - 10 μM FeSO_4
 - 100 μM ascorbic acid
 - Scavenger
 - 100 μM H_2O_2
 - in 50 mM potassium phosphate buffer (pH = 7.2)

• Fenton-reaction:



• Addition of TPA





Hydroxylradicalen

- Scavengers studied:

- Stevioside
- Rebaudioside A
- Rubusoside
- SVglucuronide
- Glucose
- Sucrose

0mM , 0.25mM , 0.5mM , 1mM , 1.5mM , 2mM

1,25mM – 2,5mM – 5mM – 7,5mM – 10mM

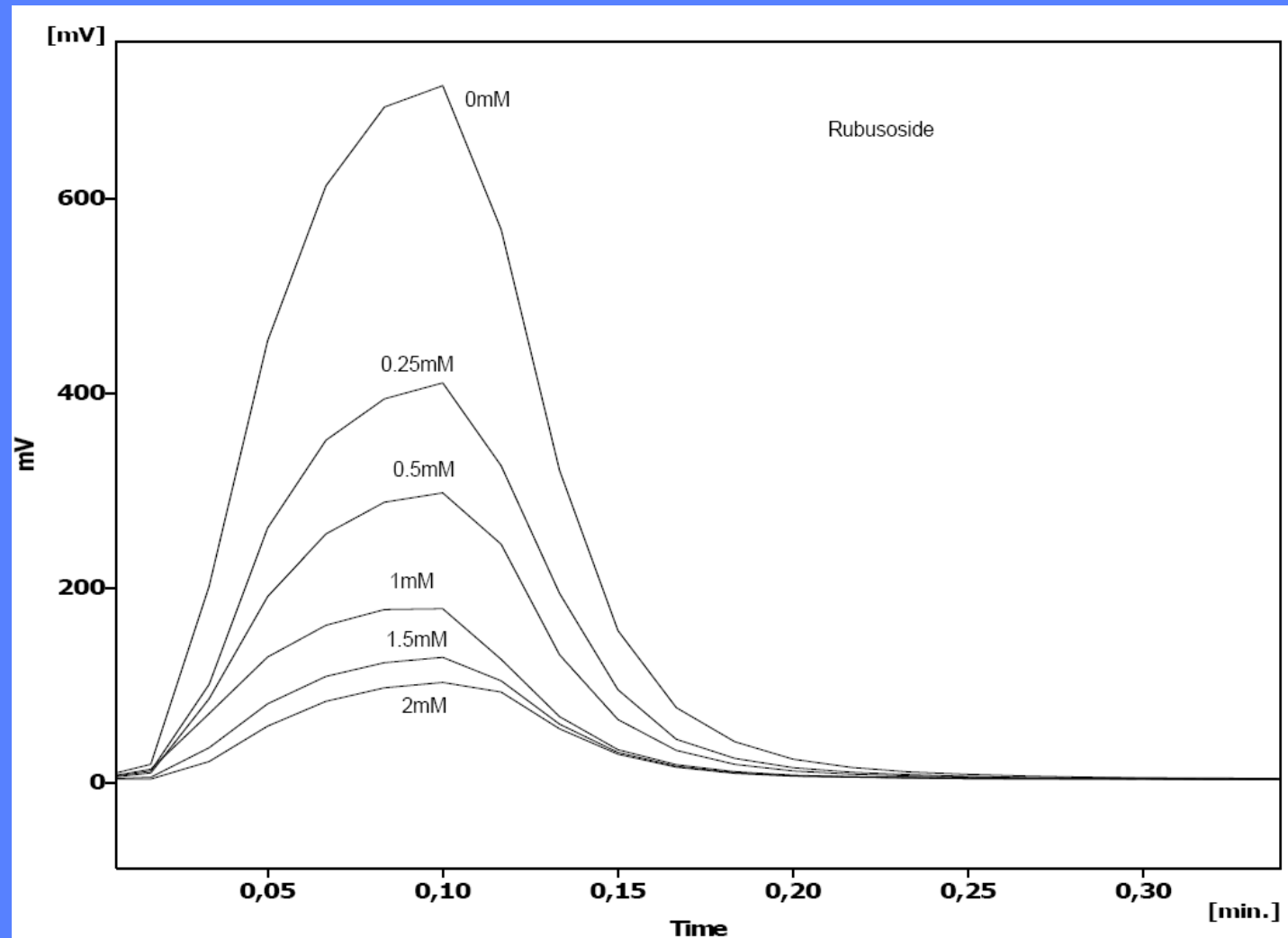


- HPLC – fluorescentie detector
 - Lege buis op normale HPLC met fluorescentie detector
 - Excitatie: bij 315 nm
 - Emissie bij 420 nm
 - solvent: water aan debiet van: 1 mL/min
 - Piek oppervlakte = fluorescentie



Resultaten

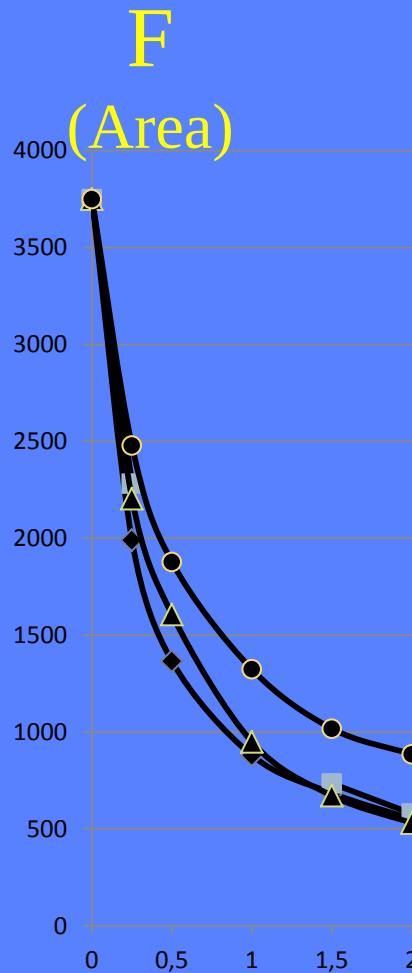
- HPLC – fluorescentie detectie



•OH scavenging activity

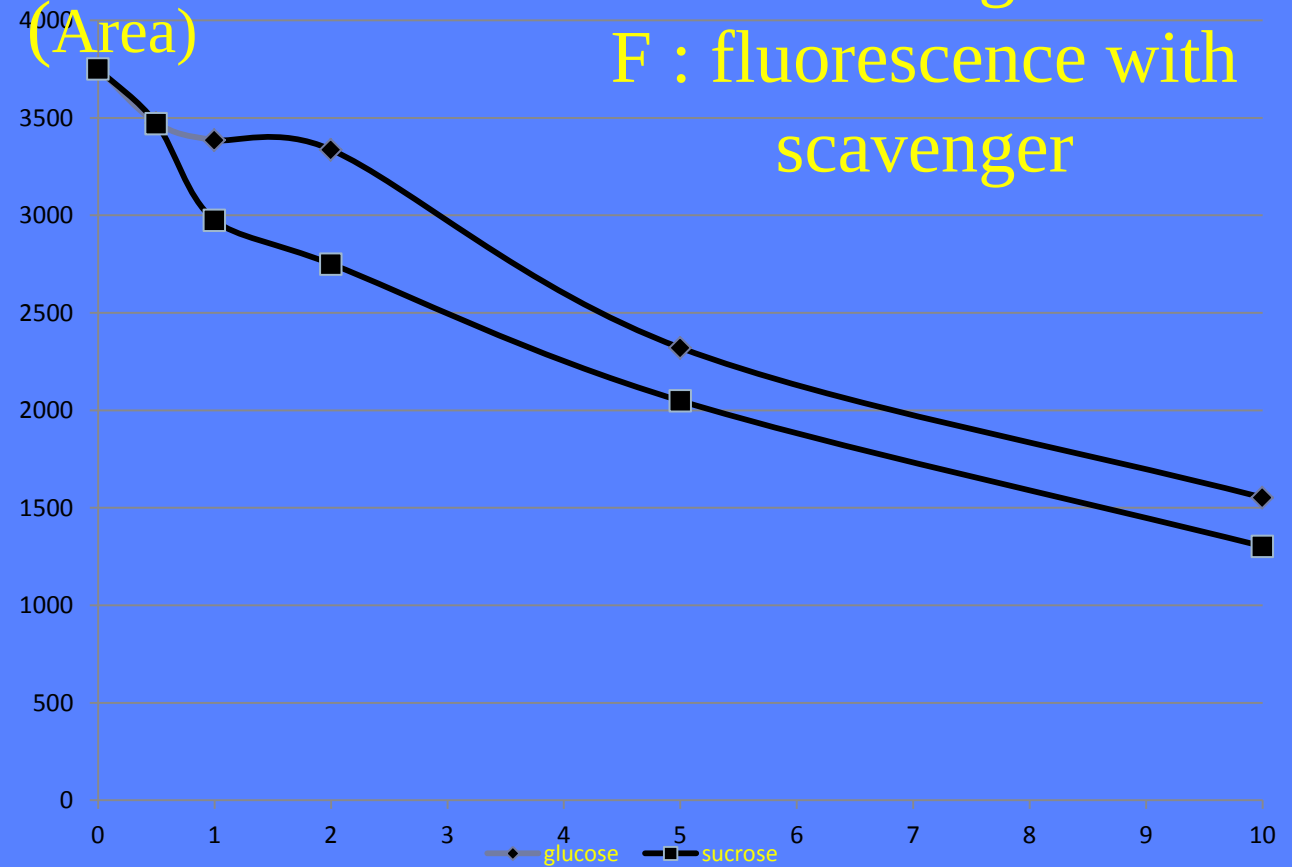
F° : fluorescence without scavenger

F : fluorescence with scavenger



mM

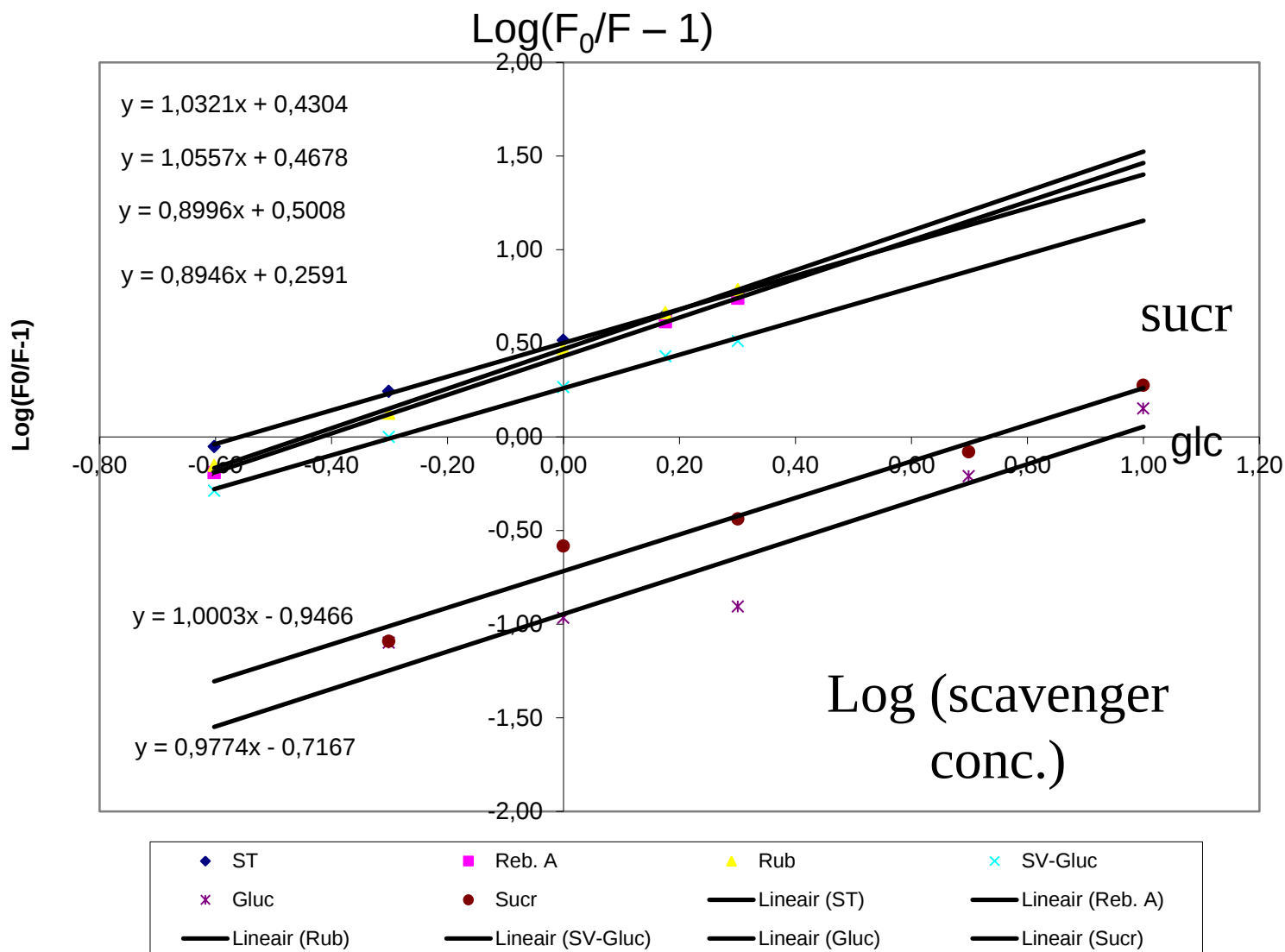
—◆— ST —■— RebA
—▲— Rub —○— SVglu



mM

—◆— glucose —■— sucrose

Log-log plot of the inhibition of HTPA formation by different scavengers





Resultaten: Hydroxylradicalen

- From $\log((F^\circ/F)-1)$ vs. $\log \text{conc}$: calculation of IC_{50} when $y=0$ or when $F^\circ = 2 \cdot F$
 - $IC_{50} \cdot ^\bullet OH$ values: half-inhibitory conc. of HTPA-formation

Table 2: Half-inhibitory concentrations ($IC_{50} \cdot ^\bullet OH$) for hydroxyterephthalate formation of the different scavengers.

scavenger	Equation	r^2	$IC_{50} \cdot ^\bullet OH$ in mM	# sugar units
Ascorbic acid	$y = 1.134x - 0.071$	0.953	1.154	0
Quercetine	$y = 0.678x + 0.638$	0.912	0.115	0
ST	$y = 1.452x + 0.956$	0.980	0.219	3
RebA	$y = 1.253x + 0.885$	0.983	0.196	4
Rub*	$y = 1.056x + 0.468$	0.999	0.278	2
SVglu	$y = 1.090x + 0.747$	0.970	0.206	1

* values from a preliminary experiment (Geuns and Struyf, 2010).

Superoxide radicalen

Table 3: Radical scavenging of superoxide radical

Scavenger	Equation	R ²	IC50 in mM	# sugar units
Ascorbic acid	$y = 1.053x + 1.290$	0.9685	0.059	0
Quercetine	$y = 1.005x + 0.497$	0.9345	0.320	0
ST	$y = 0.447x - 0.078$	0.9205	1.491	3
RebA	$y = 0.3246x - 0.131$	0.9315	2.529	4
SVglu	$y = 0.6124x + 0.413$	0.9843	0.211	1

TBA-reactief materiaal: ± niet actief

Table 4: IC₅₀ values of TBA reactive material

scavenger	Equation	r ²	IC ₅₀ in mM	# sugar units
Ascorbic acid	$y = 0.400x - 0.421$	0.911	11.3	0
Quercetine	$y = 0.893x + 0.036$	0.942	0.912	0
ST	$y = 0.234x - 0.589$	0.917	323	3
RebA	$y = 0.239x - 0.587$	0.905	288	4
SVglu	$y = 0.259x - 0.564$	0.908	149	1

DPPH en NO: geen activiteit

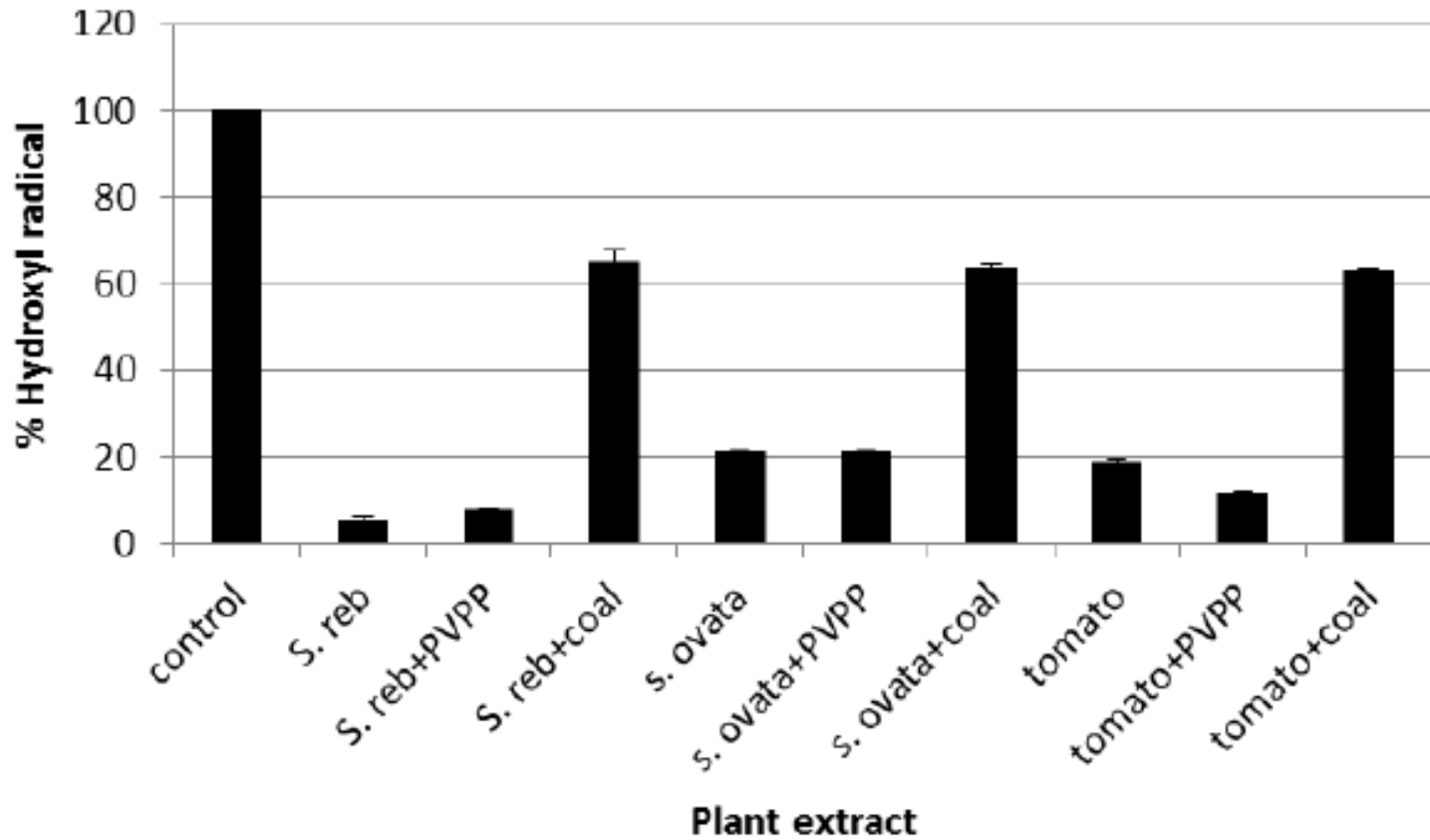
Table 5: Scavenging activity of DPPH

scavenger	Equation	r^2	IC ₅₀ in mM	# sugar units
Ascorbic acid	$y = 0.352x + 0.444$	0.935	0.055	0
Quercetine	$y = 1.180x - 1.346$	0.995	13.817	0

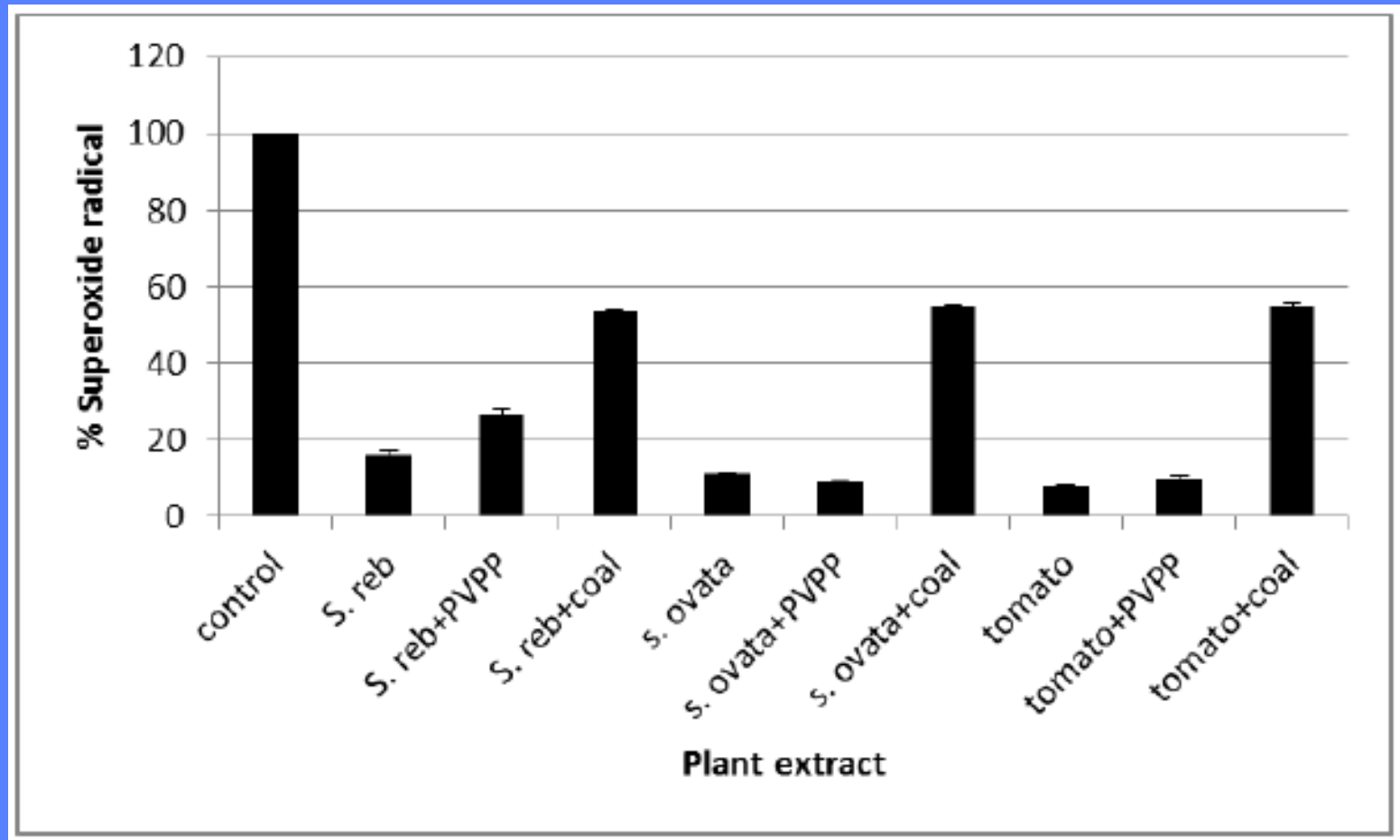
Table 6: NO scavenging activity

scavenger	Equation	r^2	IC ₅₀ in mM	# sugar units
Ascorbic acid	$y = 0.204x + 0.381$	0.970	0.013	0
Quercetine	$y = 0.922x + 1.253$	0.995	0.184	0

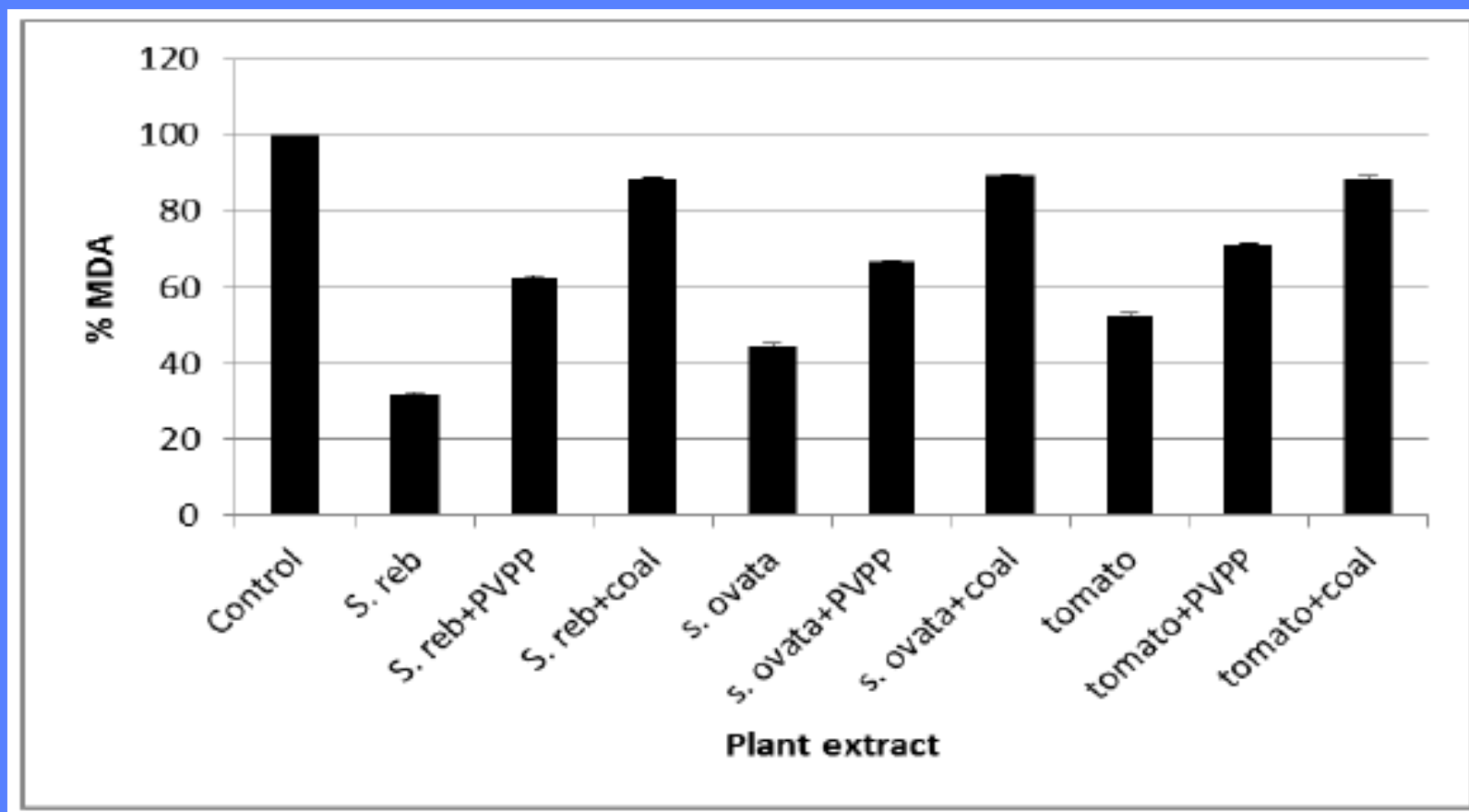
Ruwe bladextracten: hydroxyl



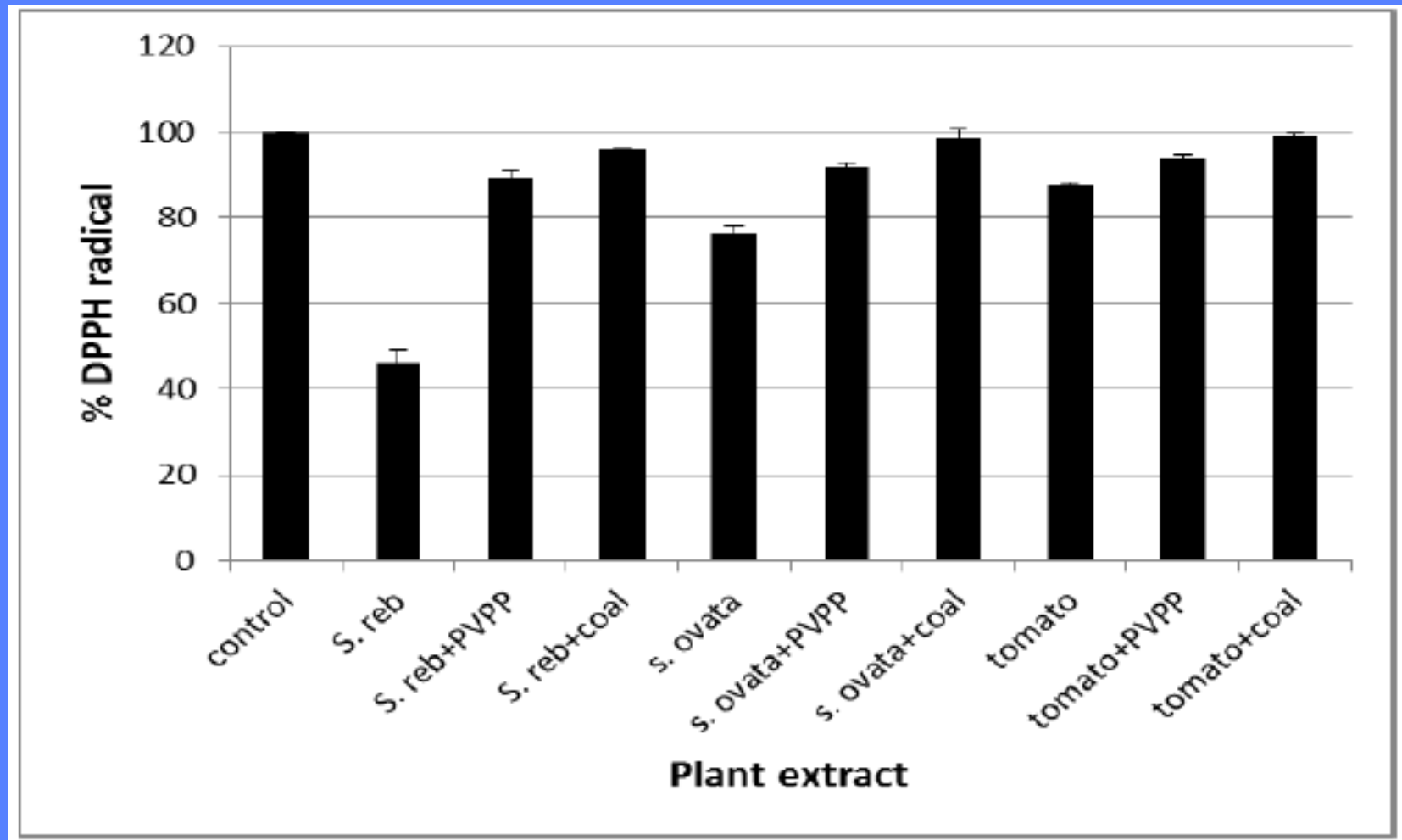
Ruwe bladextracten: superoxide



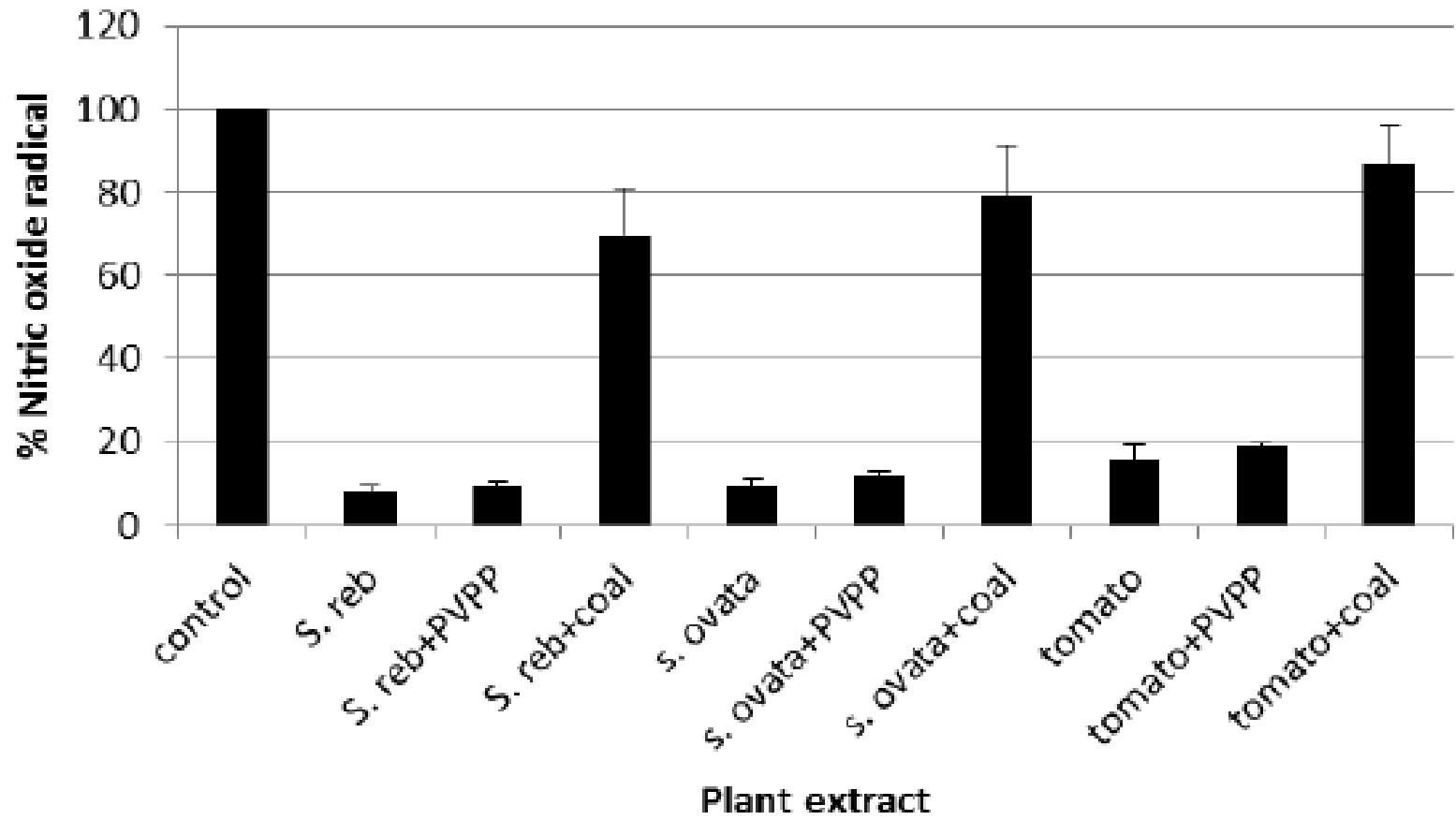
TBA-reactief materiaal (MDA)



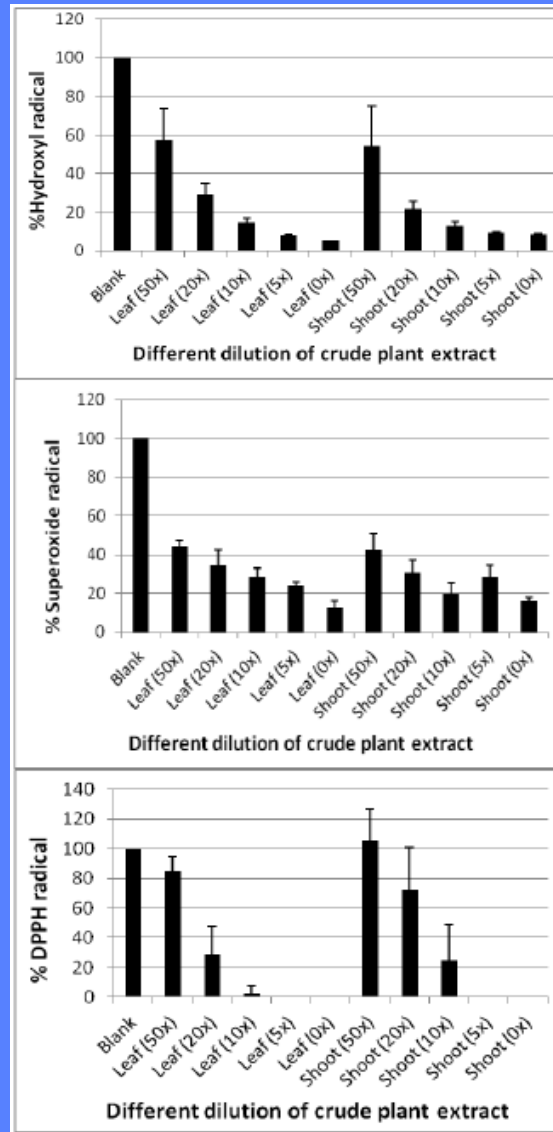
DPPH: nota: 10 x meer verdund



NO



Leaf vs. stem extracts



Leaf vs. stem extracts

- To better compare leaf and stem extracts, arbitrarily a molecular weight of 100 was assumed.
- Calculation of IC_{50} possible
- Similar activity: waste product (stems) becomes a very valuable by-product!

	Leaf extracts	Stem extracts
Total dry wt. (no dilution)	500 mg	444 mg
$IC_{50} \cdot OH$	0.104	0.142
$IC_{50} O_2^{\bullet -}$	0.163	0.181
$IC_{50} DPPH$	0.0134	0.0403

Conclusie 6

- SV glycosiden: zeer efficiënte •OH en superoxide radical scavengers
- SV glucuronide: zeer efficiënte •OH en superoxide radical scavenger
- Activiteit: geen verband met aantal glucose eenheden
- Ruwe plantenextracten: zeer efficiënte scavengers van hydroxyl-, superoxide, DPPH, TBA-reactief materiaal, NO radicalen, waarschijnlijk 10 meer actief dan SVgly en SVglu

Conclusie

- ROS en RNS gerelateerde ziekten:
 - hypertensie
 - type 2 diabetes
 - atherosclerosis
 - Vette leverziekte, steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis
 - hersenziekten: Parkinson, Alzheimer
 - inflammatie, kanker

ST: farmacologische effecten

- Verlaagt bloeddruk
- Verlaagt glucose in type 2 diabetes
- Effect: [glucose] afhankelijk
- Verbetert insuline signalering
- Voorkomt atherosclerosis
- Voorkomt ontstekingen
- Voorkomt ontwikkeling van sommige kankers

- **“Common trigger” “gemeenschappelijke schakelaar”** is vereist om alle effecten te kunnen verklaren

- Is radical scavenging door SVglu deze common trigger?

SVglu: DE actieve component?

Voordelen van SVglu

- relatief stabiel
- getransporteerd in perifere bloed → alle organen en celtypen worden bereikt
- scavenging van ROS voorkomt vele ziekten

Meer onderzoek moet nog worden gedaan in dit interessant domein

Dankwoord

- Hilde Verlinden & Tom Struyf voor technische bijstand
- De vrijwilligers die grote hoeveelheden stevioside slikten om hun urine te verzamelen
- Mijn vrouw Christine om “Stevia Weduwe” te zijn.