



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΥ
ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΕΒΙΑΣ (STEVIA REBAUDIANA)
ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΑΠΟΞΗΡΑΜΕΝΑ ΦΥΛΛΑ**

**STUDY OF ANTIOXIDANT AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITY OF
STEVIA (STEVIA REBAUDIANA) EXTRACTS ISOLATED FROM
DRIED LEAVES**



ΦΟΙΤΗΤΗΣ: ΚΟΝΙΔΑΡΗΣ ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κωνσταντίνος Πετρωτός: Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Λάρισας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Μηχανικής Τροφίμων και Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας.

Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, όπως επίσης και για όσα πολύτιμα μου δίδαξε κατά τη διάρκεια της τετραετούς φοίτησής μου στο τμήμα.

Ευχαριστώ τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο για την συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό για τη στήριξή του, την παροχή οδηγιών, την αποδοχή μου στο εργαστήριό του και για τη βοήθεια του προσωπικού που εργάζεται σε αυτό .

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
Abstract	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Ελεύθερες ρίζες – Οξειδωτικό στρες.....	10
1.1.1 Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών	10
1.1.2 Οξειδωτικό στρες.....	12
1.1.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	14
1.2 Στέβια.....	15
1.2.1 Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΣΤΕΒΙΑΣ.....	16
1.2.2 Γλυκοζίτες στέβιας	17
1.3 Πολυφαινόλες	20
1.3.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	24
1.3.2 Πολυφαινόλες στέβιας	25
1.4 Σκοπός του πειράματος.....	29
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
2.1 Υλικά	30
2.1.1 Πλασμιδιακό DNA	30
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	30
2.1.3 Εκχυλίσματα.....	31
2.1.4 Εκχύλισμα που προήλθε από επεξεργασία με μεμβράνες υπερδιήθησης και spray dryer.....	33
2.1.4. Spray Dryer (Ξήρανση με ψεκασμό)	33
2.2Μέθοδοι	35
2.2.1 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu	35
2.2.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH	36
2.2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS ⁺	38
2.3 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA.....	41
2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	42
2.3.2 Επαγόμενη από ρίζες ROO [*] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	44
2.3.3 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH [•]).....	46

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
3.1 Αποτελέσματα Folin ciocalteu	49
3.2 Αποτελέσματα DPPH	49
3.3 Αποτελέσματα ABTS	56
3.4 Αποτελέσματα AAPH.....	58
3.5 Αποτελέσματα OH	60
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62
5. Βιβλιογραφία	65

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1	: Η δραστηριότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας	10
Εικόνα 2	: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS)	11
Εικόνα 3	: Ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS)	11
Εικόνα 4	: Οξειδωτικό στρες	12
Εικόνα 5	: Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών	13
Εικόνα 6	: Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS (Lee et al., 2003).	13
Εικόνα 7	: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού	14
Εικόνα 8	: (A) Φύλα στέβιας σε σακουλάκια για τσάι και (B) ποτό στέβιας.	16
Εικόνα 9	: Στεβιοσίδη	18
Εικόνα 10	: ρεμπαουδιοσίδη A	18
Εικόνα 11	: Χημική δομή πολυφαινολών	19
Εικόνα 12	: λιγνάνες	21
Εικόνα 13	: Quercetin	24
Εικόνα 14	: quercetin-3-O-β-D-arabinoside	24
Εικόνα 15	: kaempferol-3-O-rhamnoside	25
Εικόνα 16	: Apigenin	25
Εικόνα 17	: apigenin-4-O-β-D-glycoside	25
Εικόνα 18	: luteolin	26
Εικόνα 19	: Δεξαμενή	29

Εικόνα 20	: πίνακα κυκλωμάτων	29
Εικόνα 21	: διάτρητο καλάθι	30
Εικόνα 22	: Στήλη αποχρωματισμού	30
Εικόνα 23	: Εφαρμογή ρητίνης	31
Εικόνα 24	: spray dryer	31
Εικόνα 25	: σκόνη στέβιας	32
Εικόνα 26	: Αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)	38
Εικόνα 27	: : αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του 1ου δείγματος που προέκυψε από spray dryer σε πήκτωμα αγαρόζης.	42
Εικόνα 28	: αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του 2ου δείγματος που προέκυψε από spray dryer σε πήκτωμα αγαρόζης.	54
Εικόνα 29	: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του 1ου δείγματος που προέκυψε από spray dryer σε πήκτωμα αγαρόζης	55
Εικόνα 30	: αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του 2ου δείγματος που προέκυψε από spray dryer σε πήκτωμα αγαρόζης	56

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1	: Γλυκοζίτες στέβιας	17
Πίνακας 2	: Τα φλαβονοειδή	20
Πίνακας 3	: Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων	21
Πίνακας 4	: Φλαβονοειδή	26
Πίνακας 5	: Χλωρογενικό οξύ και άλλες φαινολικές ενώσεις	27
Πίνακας 6	: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων	34
Πίνακας 7	: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη	34
Πίνακας 8	: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων	37
Πίνακας 9	: προσθήκη εκχυλίσματος	37
Πίνακας 10	: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη	37
Πίνακας 11	: Ποσότητες αντιδραστηρίων	42
Πίνακας 12	: Ποσότητες αντιδραστηρίων	44
Πίνακας 13	: Αποτελέσματα folin	45
Πίνακας 14	: Αποτελέσματα folin	45

Περιεχόμενα διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1	DPPH δείγματος 15 λεπτών	46
Διάγραμμα 2	DPPH δείγματος 30 λεπτών	46
Διάγραμμα 3	DPPH δείγματος 45 λεπτών	46
Διάγραμμα 4	DPPH δείγματος 1 ώρας	47
Διάγραμμα 5	DPPH δείγματος 1,5 ώρας	47
Διάγραμμα 6	DPPH δείγματος 2 ωρών	47
Διάγραμμα 7	DPPH δείγματος 2,5 ωρών	48
Διάγραμμα 8	DPPH δείγματος 3 ωρών	48
Διάγραμμα 9	DPPH δείγματος 3,5 ωρών	48
Διάγραμμα10	DPPH δείγματος 4 ωρών	49
Διάγραμμα11	DPPH δείγματος 4,5 ωρών	49
Διάγραμμα12	DPPH δείγματος 5 ωρών	49
Διάγραμμα13	DPPH δείγματος 5,5 ωρών	50
Διάγραμμα14	DPPH δείγματος 6 ωρών	50
Διάγραμμα15	DPPH δείγματος σκόνης (1)	50
Διάγραμμα16	DPPH δείγματος σκόνης (2)	51
Διάγραμμα17	ABTS δείγματος σκόνης (1)	52
Διάγραμμα18	ABTS δείγματος σκόνης (2)	52
Διάγραμμα19	Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 1 στις επαγόμενες από ρίζες AAPH ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA	53
Διάγραμμα20	Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 2 στις επαγόμενες από ρίζες AAPH ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA	54
Διάγραμμα21	Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 1 στις επαγόμενες από ρίζες OH ρήξεις σε πλασμιδιακό	55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εποχή μας, γίνεται ιδιαίτερος λόγος για την βελτίωση της φυσικής κατάστασης των ανθρώπων και για την προώθηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής. Το ενδιαφέρον των ερευνητών εστιάζεται μεταξύ άλλων και στη δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών. Μια κατηγορία εξ αυτών, αποτελεί αυτή των πολυφαινολών, των οποίων οι ευεργετικές βιολογικές ιδιότητες είναι πολύ σημαντικές. Τα τελευταία δέκα χρόνια παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον οι βιολογικές ιδιότητες του φυτού στέβια, και εκχυλίσματα του οποίου χρησιμοποιούνται από πολλές εταιρείες αναψυκτικών και τροφίμων. Το ιδιαίτερο ενδιαφέρον αυτού του φυτού είναι ότι περιέχει φυσικά σάκχαρα των οποίων γλυκαντική δράση είναι 300 φορές πιο ισχυρή από της ζάχαρης. Επίσης, επιστημονικές αναφορές έχουν δείξει ότι η στέβια περιέχει κάποια ποσότητα πολυφαινολών, ουσίες με υψηλή αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση. Έτσι, στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια απομόνωσης πολυφαινολών από φύλλα στέβιας και εξέταση της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Για τη μελέτη λοιπόν της πολυφαινολικής δράσης, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από αποξηραμένα φύλλα στέβιας. Το εκχύλισμα συλλέχτηκε μετά από βρασμό των φύλων σε εκχυλιστήρα. Έγινε συλλογή δειγμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έως και έξι ώρες από την έναρξη της διαδικασίας του βρασμού. Έπειτα μέρος του δείγματος πέρασε από μεμβράνες υπερδιήθησης για κατακράτηση χρωστικών κυρίως. Μετά από περαιτέρω επεξεργασία, ξήρανση με ψεκασμό (spray drying), του εκχυλίσματος αυτού προέκυψε και εκχύλισμα σε στερεή μορφή. Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης εξετάστηκε η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων σε πολυφαινόλες και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων με πέντε *in vitro* μεθόδους. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων, η μέθοδος Folin ciocalteau για τον προσδιορισμό της ποσότητας πολυφαινολών και τέλος, εξετάστηκε η ικανότητά των εκχυλισμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων που οφείλονται στην δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των ριζών περοξυλίου (ROO[•]) και ριζών υδροξυλίου (OH[•]). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων δεν έδειξαν τόσο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση για τα δείγματα που συλλέχτηκαν από τον εκχυλιστήρα όσο για αυτά που υπέστησαν περαιτέρω επεξεργασία. Η παρούσα μελέτη είναι μια από τις λίγες που εξετάζουν τη βιολογική δράση των πολυφαινολών της στέβιας, οι οποίες πιθανώς να μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα σε τρόφιμα και ποτά μαζί με τους γλυκοζίτες της.

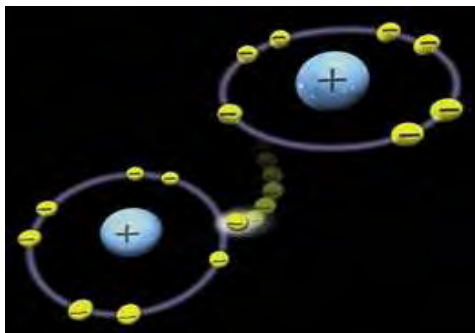
Abstract

In our days, there is a special need to improve the physical conditions of people and promote a healthy lifestyle. The interest of researchers is focused, among others, on the actions of antioxidants. One category of these is the plant polyphenols whose biological properties are very important. The last ten years, there is a particular interest on the biological properties of stevia plant and its extracts are being used by many beverage and food companies. The essential interest of this plant is that it contains natural sugars whose sweetness effect is 300 times stronger than sugar. In addition, scientific reports have shown that stevia contains some polyphenolic substances with high antioxidant and chemopreventive action. Therefore, in this study there was made an effort to isolate polyphenols from stevia leaves and examine their antioxidant action. For the study of the polyphenolic action, extracts from dried stevia leaves were used. The extract was collected after boiling the leaves in an extractor. The collection of the samples was made at different time points up to six hours after the start of boiling. Then, part of the sample was passed through ultrafiltration membranes for colors retention. After further processing, with spray drying, extracts in solid form were obtained. During this study, the concentrations of polyphenols in the extracts and antioxidant properties of the extracts were examined with five in vitro methods. Specifically, these methods were DPPH and ABTS for determining the antioxidant activity of samples the folin ciocalteu for determining the amount of polyphenols and finally the ability of the extract to protect DNA from single stranded fragments caused by peroxy radicals (ROO^{\bullet}) and hydroxyl radicals (OH^{\bullet}). The results of the experiments did not showed the samples collected from the extractor did not have high polyphenolic content and antioxidant activity. However, the extracts obtained from the membranes processing exhibited high polyphenolic content and antioxidant activity. This study examined the biological activity of stevia polyphenols which propably could be used with their glycosides as additives in food and beverages.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες – Οξειδωτικό στρες

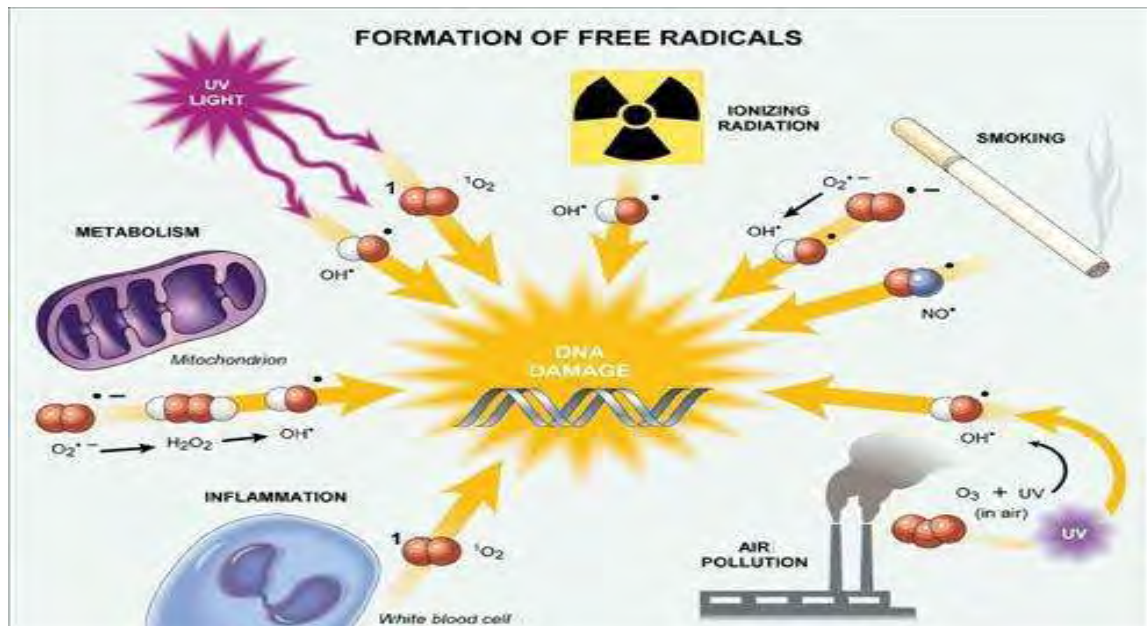
Στα μόρια και τα άτομα, τα ηλεκτρόνια βρίσκονται συνήθως σε ζευγάρια, και κάθε ζευγάρι ηλεκτρονίων κινείται σε μία καθορισμένη περιοχή (σε ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό). Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή μόριο, που φέρει ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα του (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989). Όσο σταθερότερη είναι μία ελεύθερη ρίζα, τόσο πιο εύκολος είναι ο σχηματισμός της (Valavanidis, 2006). Οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται αντιδρώντας μεταξύ τους ή με άλλες ρίζες, επειδή το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο τους προσδίδει αστάθεια και μεγάλη χημική δραστικότητα (Εικόνα 1). Έτσι, αν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, τότε θα παραχθεί μια νέα ρίζα. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις (Halliwell & Gutteridge, 1990; Cammac 1987). Αν όμως μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους θα ζευγαρώσουν και η ένωση που θα προκύψει δε θα είναι πλέον ελεύθερη ρίζα (Cheeseman et al, 1993; Wilson, 1978).



Εικόνα 1: Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας

1.1.1 Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών

Οι διάφορες ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν στα βιολογικά συστήματα με διάφορους τρόπους κατά την αναπνευστική αλυσίδα, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, κατά τη λιπιδική οξείδωση, από την ακτινοβολία, τη φλεγμονή, το κάπνισμα και από την μολυσμένη ατμόσφαιρα. (Εικόνα 2) [Halliwell B, 2001]. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ειδικά για να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ, σε άλλες περιπτώσεις, αυτές παράγονται σαν παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών.

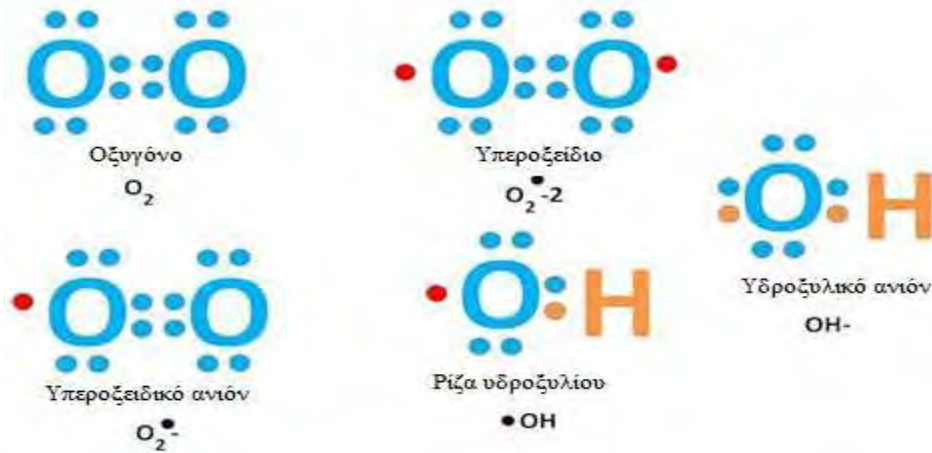


Εικόνα 2: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών που συναντώνται στον οργανισμό είναι η ρίζα του υδροξυλίου (OH^\bullet), του σουπεροξειδίου (O_2^\bullet), του μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet), του αλκοξυλίου (RO^\bullet), του υδροπεροξυλίου (HO_2^\bullet), του τριγλωρομεθυλίου (CCl_3^\bullet) και οι θειούχες ρίζες (RS^\bullet). Από το σύνολο των ελευθέρων ριζών εκείνες, που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στα βιολογικά συστήματα είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις (εικόνα 3), που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman et al, 1993; Gutteridge, 1995). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υπογλωριώδες οξύ (COCl) (Halliwell 2001)

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

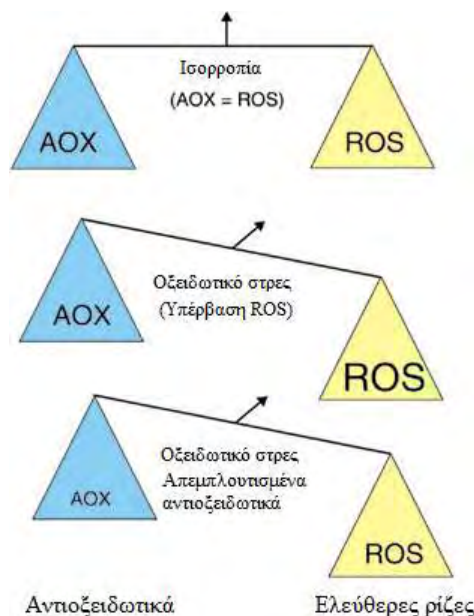
● = Μονήρη ηλεκτρόνια



Εικόνα 3: Ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS).

1.1.2 Οξειδωτικό στρες

Στο υγιές ανθρώπινο σώμα, υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας. Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας (Εικόνα 4) ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, 2004).



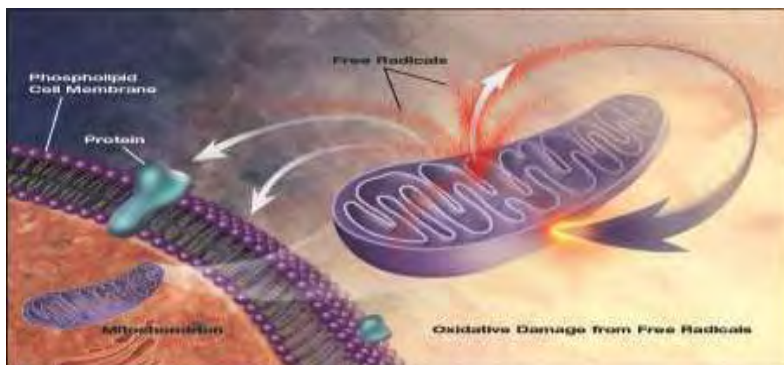
Εικόνα 4: Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται στις παρακάτω περιπτώσεις:

- Παρουσία τοξικών ουσιών, που μεταβολίζονται και παράγουν ROS
- Υπερβολική ενεργοποίηση των συστημάτων παραγωγής ROS

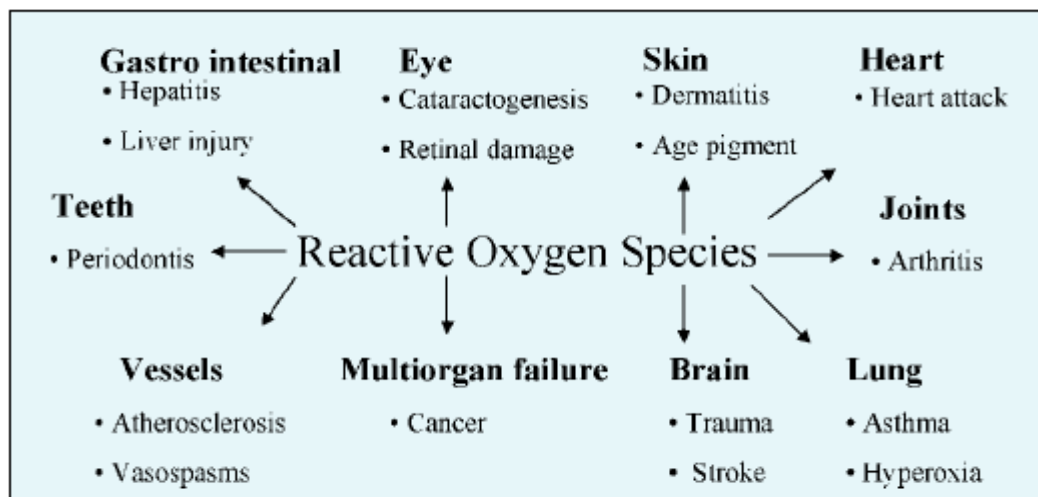
- Σχετική ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών παραγόντων

Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με όλα τα βιομόρια, που είναι βασικά συστατικά του κυττάρου με αποτέλεσμα να συμβαίνουν αλυσιδωτές αντιδράσεις με συνέπεια την ολοκληρωτική καταστροφή του βιολογικού υποστρώματος. (Εικόνα 5). Έτσι οι πρωτεΐνες, που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν εύκολα με ελεύθερες ρίζες, προσβάλλονται πιο εύκολα και μετουσιώνονται (Lyras et al, 1977). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με το DNA, και να προκαλέσουν βλάβες τόσο στις βάσεις (πουρίνες, πυριμιδίνες) όσο και στη D –ριβόζη του DNA με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεταλλάξεις. Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξειδωση και σχετίζονται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994).



Εικόνα 5: Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών

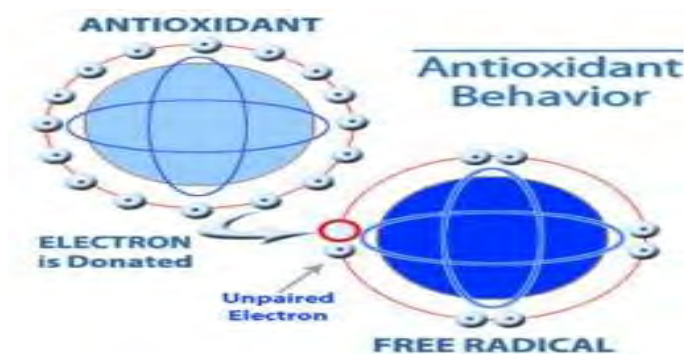
Ο κατάλογος των ασθενειών, που ξεπερνούν τις 100 (Halliwell, 2001) , για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς (εικόνα 6) και περιλαμβάνει τον καρκίνο (Toyokuni1998), τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992), την ηπατίτιδα (Elliot and Strunin, 1993) και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα (Parke et al., 1991) και κ.ά.).



Εικόνα 6: Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS (Lee et al., 2003).

1.1.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος [Halliwell B, 2001]. Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους, είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών [Scalbert A. et al, 2005]. Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και έτσι εμποδίζουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα [Halliwell B, 2001] (Εικόνα 13).



Εικόνα 7: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και μη ενζυμικούς. Στους ενζυμικούς ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνοντας την παραγωγή τους. Τα πιο σημαντικά, αυτής της κατηγορίας είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και η καταλάση (CAT). Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνονται συστατικά των τροφών όπως οι βιταμίνες C και E, οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σε εκχυλίσματα φυτών, η γλουταθειόνη, οι χηλικοί δεσμευτές μεταβατικών μετάλλων, το ουρικό οξύ και ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος καθώς και λιποδιαλυτοί παράγοντες, όπως η χολερυθρίνη και το συνένζυμο Q₁₀.

1.2 Στέβια

Στα πλαίσια αναζήτησης από το Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων νέων αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών παραγόντων έχουν μελετηθεί στο παρελθόν υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα από ένα πλήθος ελληνικών φυτικών ποικιλιών. Από τη μελέτη μεγάλου αριθμού εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών, όπως τσάι, μέντα, φασκόμηλο, όλα σχεδόν τα εκχυλίσματα επέδειξαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με ελεύθερες ρίζες παρουσιάζοντας έντονη αντιοξειδωτική δράση (Apostolou A, et al). Τα αποτελέσματα αυτά λειτούργησαν σαν έναυσμα για την μελέτη ενός νεοεισερχόμενου στην ελληνική αγορά φυτού, της στέβιας. Έρευνες έχουν δείξει ότι το φυτό αυτό περιέχει πολυφαινόλες και μεγάλες ποσότητες σακχάρων. Οι πολυφαινόλες είναι ουσίες με υψηλή αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση. Οι γλυκοζίτες της στέβιας αποτελούν ανταγωνιστή και μελλοντικό αντικαταστάτη της ζάχαρης.

Το φυτό της στέβιας χαρακτηρίζεται από πολλούς ως "το φυτό της νέας χιλιετίας" και η ζάχαρή του ως "η ζάχαρη του μέλλοντος". Είναι ένα εντελώς νέο είδος φυτού για την Ελλάδα, άγνωστο στη χώρα μας μέχρι το 2005, όταν το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας άρχισε συστηματική επιστημονική έρευνα, την οποία και συνεχίζει σε συνεργασία με διάφορους φορείς, με σκοπό το φυτό αυτό να αποτελέσει μια εναλλακτική καλλιέργεια για τους Έλληνες γεωργούς. Η στέβια αποτελεί πηγή πολύ χρησίων φυσικών χημικών ουσιών, όπως η στεβιοσίδη (φυσική γλυκαντική ουσία), η γιββερελλίνη (φυτοορμόνη), η χλωροφύλλη (φυσική χρωστική), οι φυτοστερόλες, η ισοστεβιόλη κ.α. Σπουδαιότερη από αυτές και για την οποία κυρίως καλλιεργείται σήμερα η στέβια είναι η στεβιοσίδη μία φυσική γλυκαντική ουσία, έως και 300 φορές πιο γλυκιά από τη ζάχαρη, το ίδιο γλυκιά με συνθετικές γλυκαντικές ουσίες αλλά χωρίς τα προβλήματα για την υγεία που έχουν αυτές, με σχεδόν μηδενική θερμιδική περιεκτικότητα. Τα φύλλα της στέβιας χρησιμοποιούνται ως χλωρά ή ξηρά, τριμμένα ή αλεσμένα. Η στεβιοσίδη χρησιμοποιείται κυρίως από τη βιομηχανία τροφίμων-ποτών-ζαχαροπλαστικής (υποκαθιστά τη ζάχαρη), ενώ παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους διαβητικούς. Σε ορισμένες χώρες (ΗΠΑ. κ.α.) επιτρέπεται μόνο ως διαιτητικό συμπλήρωμα, ενώ σε άλλες χώρες (Ιαπωνία από το 1971, Βραζιλία, κ.α.) ως υποκατάστατο της ζάχαρης, ως συμπλήρωμα διατροφής και ως διαιτητικό συμπλήρωμα. Η στέβια μπορεί να χρησιμοποιηθεί φρέσκια αλλά και αποξηραμένη, στο φαγητό, σε σαλάτες, σε γλυκά ακόμη και σε ποτά. Η ποσότητα που απαιτείται είναι ελάχιστη λόγω της μεγάλης γλυκαντικής της δράση οπότε ουσιαστικά προσθέτει μηδενικές θερμίδες στο σκεύασμα ή στο αφέψημα στο οποίο προστίθεται. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων και χρήσεων η στέβια εξελίσσεται σε έναν ισχυρό πρωταγωνιστή στο χώρο των γλυκαντικών ουσιών και αποτελεί πλέον ανταγωνιστή της ασπαρτάμης και της ίδιας της ζάχαρης.

Η στέβια στην άγρια της κατάσταση στο ιθαγενές της περιβάλλον είναι ένα πολυετές φυτό που φυτρώνει σε αμμώδη, μικρής γονιμότητας εδάφη στις άκρες ποταμών και ρεμάτων. Αυτό μας δείχνει ότι δεν είναι ένα ιδιαίτερα απαιτητικό φυτό όσον αφορά τις συνθήκες ανάπτυξης του. Είναι ένας πολυετής μικρός θάμνος με

περίπου 30 cm ύψος, με φύλα επιμηκυσμένα με 3-4 cm μήκος, και πριονωτά όρια. Η επάνω επιφάνεια των φύλων είναι ελαφρά κοκκιώδης και χνουδωτή. Ο κορμός είναι αδύναμος, χνουδωτός με λεπτοκαμωμένο ρίζωμα και μικρά σύνθετα ελαφρώς μωβ άνθη. Ανθίζει το φθινόπωρο.

1.2.1 Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΣΤΕΒΙΑΣ

Ο τόπος καταγωγής της στέβιας είναι η βορειανατολική Παραγουάη στα σύνορα με τη Βραζιλία, όπου βλαστούσε από τα αρχαία χρόνια και βρίσκεται ακόμη αυτοφυής σε άγρια κατάσταση σε όχθες ποταμών. Οι εντόπιοι ιθαγενείς Γκουαράνοι της Παραγουάης (Guarani) κατανάλωναν αυτό το φυτό σαν τσάι και σαν γλυκαντικό για πολλούς αιώνες. (Άκης Αδαμόπουλος 2012).

Το 1576 για πρώτη φορά είχαν γίνει γνωστές στην Ευρώπη οι θαυματουργές ιδιότητες και χρήσεις αυτού του «μαγικού» φυτού (ονομάστηκε αργότερα Στέβια) από το βιβλίο του Ισπανού ιατρού-βοτανολόγου Francisco Hernandez «Φυσική Ιστορία των φυτών της Νέας Ισπανίας», όπου αναφέρει τη χρήση του ως γλυκαντικό και ως φάρμακο με θεραπευτικές ιδιότητες. (Καπόγλου Παύλος 2009).

Το 1887 ο Sandiago Bertonι έκανε ξανά γνωστή τη Στέβια στο δυτικό κόσμο, όταν την «ανακάλυψε ξανά», την περιέγραψε, την εκθείασε για τις θαυμαστές ιδιότητες της και για την ολοφάνερη υπεροχή της έναντι της ζάχαρης και έκανε τη βοτανική ταξινόμηση της μαζί με τον παραγουανό συνάδελφο του Rebaudi, που της έδωσαν την σημερινή διεθνή επιστημονική βοτανική της ονομασία *Stevia rebaudiana bertonι*. Η λέξη "στέβια" για το γένος δόθηκε προς τιμήν του Παραγουανού καθηγητή Stevius και τα άλλα δύο ονόματα για την ονομασία του είδους προέρχονται από τα ονόματά τους.

Το 2005 οι πειραματικές καλλιέργειες άρχισαν και πάλι στην Ελλάδα, στην Πορτογαλία και στην Ιταλία και μάλιστα με επιδότηση της έρευνας από την Ε.Ε. Το 2008 είχαμε την έγκριση της στέβιας από τον FAO (Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ), αλλά και από την Αυστραλία και Ν. Ζηλανδία. Το 2011 δόθηκε η έγκριση από την Ευρωπαϊκή Ένωση στις 12/11/2011 για την χρησιμοποίηση της στέβιας σε τρόφιμα και ποτά.

Η στέβια καλλιεργείται στην Λατινική Αμερική, της οποίας είναι αυτοφυές φυτό, όμως στην παραγωγή της κυριαρχούν πλέον οι Ασιατικές χώρες. Η Κίνα αποτελεί τον μεγαλύτερο καλλιεργητή στέβιας στον κόσμο, ενώ η Ιαπωνία και η Κορέα διαθέτουν τη μεγαλύτερη αγορά εκχυλισμάτων στέβιας. Πρόσφατα, οι ΗΠΑ, η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία ενέκριναν ορισμένα παρασκευάσματα stevia ως συστατικά σε φαγητά και ροφήματα στις αγορές τους. (Καπόγλου Παύλος, 2008).



Εικόνα 8: (A) Φύλλα στέβιας σε σακουλάκια για τσάι και (B) ποτό στέβιας.

1.2.2 Γλυκοζίτες στέβιας

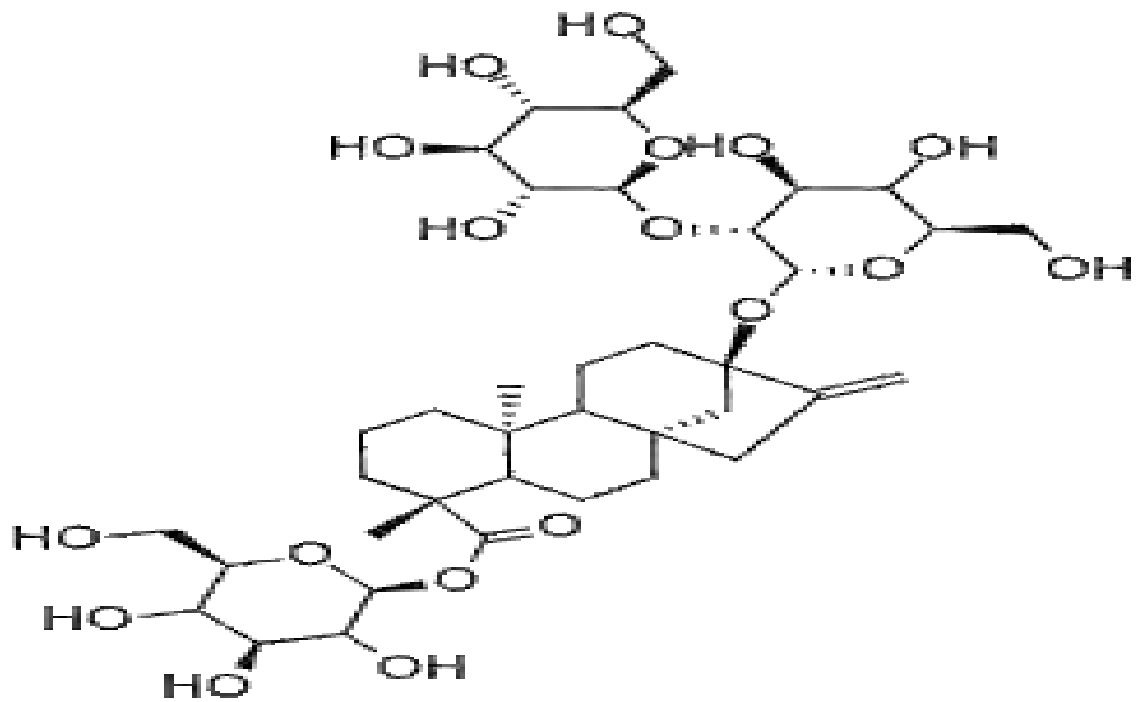
Αποξηραμένα φύλλα στέβιας έχουν χρησιμοποιηθεί ως φυσικές γλυκαντικές ουσίες για πολλά χρόνια, και τα εκχυλίσματά τους, οι γλυκοζίτες στεβιόλης, στεβιοσίδη και ρεβαουδιοζίτη A έχουν εγκριθεί ως πρόσθετα τροφίμων σε πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο. Περισσότερες από 100 ενώσεις έχουν εντοπιστεί στη στέβια, οι πιο γνωστές από τις οποίες είναι οι γλυκοζίτες στεβιόλης, (Kennelly, 2002). Η στέβια περιλαμβάνει πάνω από 30 γλυκοζίτες στεβιόλης ιδιαίτερα στεβιοσίδη και ρεβαουδιοζίτη A, οι οποίες είναι και οι πιο άφθονες σε ποικίλες συγκεντρώσεις. Ποσά του συνόλου των γλυκοζιτών στεβιόλης, έως και 20% του ξηρού βάρους φύλλων είναι γνωστά στους επιστήμονες (Brandle, J. E.; et all 1998). Οι συγκεντρώσεις των γλυκοζιτών ποικίλλουν ευρέως ανάλογα με το γενότυπο και τις συνθήκες καλλιέργειας. Για παράδειγμα, περιγράφεται ότι (Kennelly, 2002) η απόδοση στεβιοσίδης από αποξηραμένα φύλλα κυμαίνεται από 5 έως 22% και της ρεβαουδιοζίτης από 25-54%. Περιγράφεται ακόμα μία απόδοση 9% στεβιοσίδης και 61% ρεμπαουδιοσίδης A στο ειδικό είδος *S. rebaudiana* Morita, το οποίο παρήχθη από την επιλογή και αναπαραγωγή της *S. rebaudiana* Bertoni (Ohta et all, 2010).

Όνομασία ένωσης	R1	R2	Γλυκαντική ισχύς
Στεβιόλη	H	H	-
Στεβιολοβιοσίδη	H	β -Glc- β -Glc (2→1)	100 - 125
Στεβιοσίδη	β -Glc	β -Glc- β -Glc (2→1)	150 - 300
Ρεμπαουδιοσίδη Α	β -Glc	β -Glc- β -Glc (2→1) β -Glc (3→1)	250 - 400
Ρεμπαουδιοσίδη Β	H	β -Glc- β -Glc (2→1) β -Glc (3→1)	300 - 350
Ρεμπαουδιοσίδη C (Δουλκοσίδη Β)	β -Glc	β -Glc- α -Rha (2→1) β -Glc (3→1)	50 - 120
Ρεμπαουδιοσίδη D	β -Glc- β -Glc (2→1)	β -Glc- β -Glc (2→1) β -Glc (3→1)	250 - 450
Ρεμπαουδιοσίδη E	β -Glc- β -Glc (2→1)	β -Glc- β -Glc (2→1)	150 - 300
Ρεμπαουδιοσίδη F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl (2→1) β -Glc (3→1)	-
Δουλκοσίδη Α	β -Glc	β -Glc- α -Rha (2→1)	50 - 120

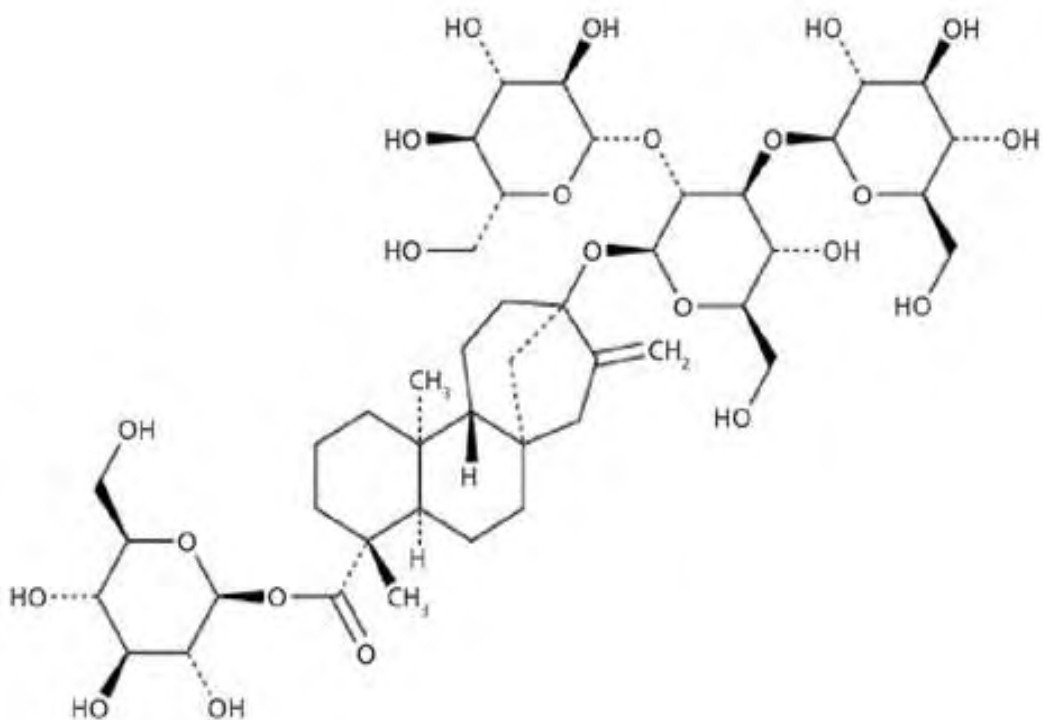
Πίνακας 1. Γλυκοζίτες στέβιας

Βέβαια, υπάρχει ο προβληματισμός ότι κάποιες από τις ενώσεις της στέβιας, κυρίως εκείνες που ανιχνεύονται σε καθαρισμένα εκχυλίσματα των φύλλων, είναι αποτέλεσμα των διαδικασιών καθαρισμού. Ορισμένα στοιχεία που υπάρχουν ήδη δείχνουν ότι η στεβιολοβιοσίδη η και ρεβαουδιοζίτη Β δεν είναι γνήσια συστατικά του *S. rebaudiana*, αλλά μάλλον σχηματίζονται με μερική υδρόλυση κατά την εξαγωγή τους. (Prakash, I.; et all, 2008), (Kennelly, E. J.2002). Θεωρείται ότι οι γλυκοζίτες της στέβιας δεν επηρεάζουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και λόγω των απαιτούμενων μικρών ποσοτήτων δεν επιβαρύνουν με θερμίδες τη διατροφή. Συχνά μάλιστα αναφέρεται ότι οι γλυκοζίτες της στέβιας έχουν μηδενικό θερμιδικό περιεχόμενο. Ωστόσο, αυτό είναι λάθος εφόσον περιέχουν σάκχαρα τα οποία προσλαμβάνει ο οργανισμός. Απλά, η διαιτητική τους αξία βασίζεται στην πολύ μικρή ποσότητά τους που χρειάζεται για την επίτευξη γλυκαντικού αποτελέσματος.

Ένα ακόμα πλεονέκτημα του κρυσταλλικού μίγματος των γλυκοζιτών της στέβιας είναι η σταθερότητά του σε θερμοκρασία έως και 200°C (δεν υφίσταται διάσπαση ή καραμελοποίηση), ιδιότητα που επιτρέπει τη χρήση του στη μαγειρική και ζαχαροπλαστική σε αντίθεση με τη συνθετική ασπαρτάμη.



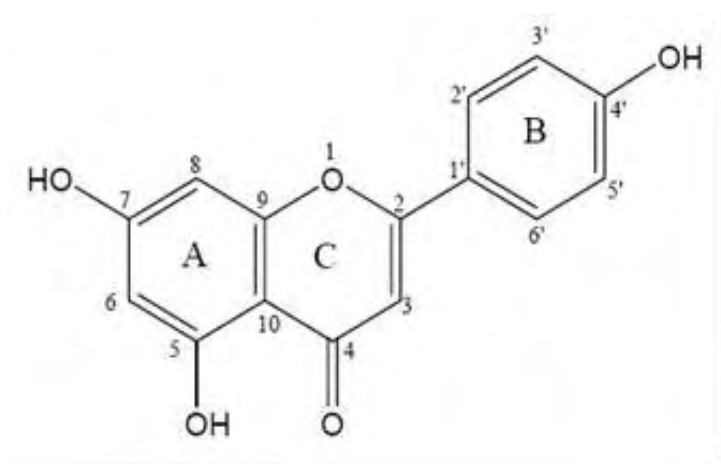
Εικόνα 9: Στεβιοσίδη Είναι 300 φορές γλυκύτερη από τη ζάχαρη.



Εικόνα 10: ρεμπαουδιοσίδη Α Είναι 250-400 φορές γλυκύτερη από τη ζάχαρη και ο δεύτερος σε αναλογία γλυκοζίτης της στεβιόλης και θεωρείται ως το ποιοτικά καλύτερο γλυκαντικό συστατικό του ξηρού εκχυλίσματος της στέβιας).

1.3 Πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες θεωρούνται από τις σημαντικότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια φυσικών ενώσεων που συναντάμε ευρέως σε φυτικούς οργανισμούς. Όσον αφορά την δομή τους, οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες και απαρτίζουν μια μεγάλη και ετερογενή κατηγορία χημικών ενώσεων. Μάλιστα, οι ενώσεις αυτές υπολογίζεται ότι είναι περισσότερες από 8000, όμως λίγες από αυτές είναι αντιοξειδωτικές. Όσον αφορά την δομή τους, βασικό τους χαρακτηριστικό, αποτελεί η ύπαρξη του αρωματικού δακτυλίου του βενζολίου, στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες.

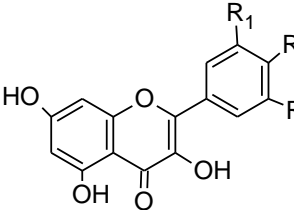
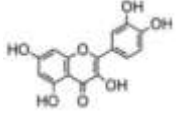
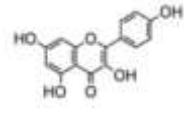
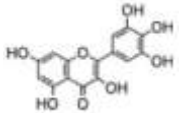
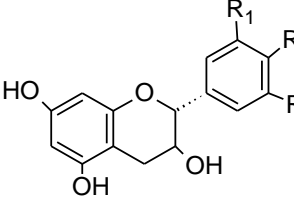
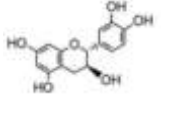
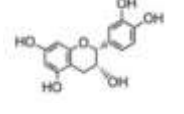
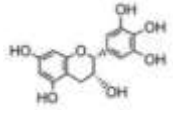
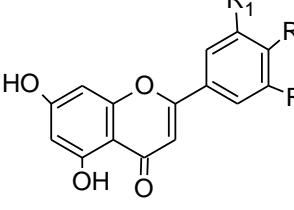
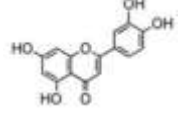
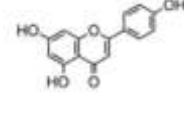
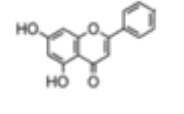
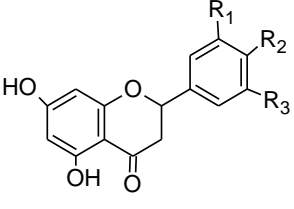
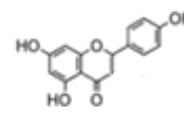


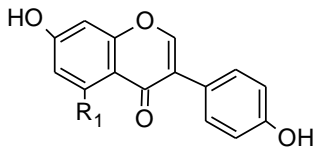
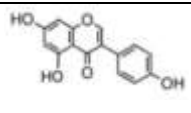
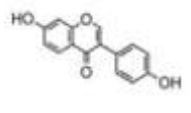
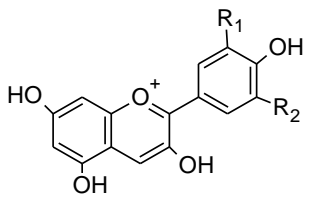
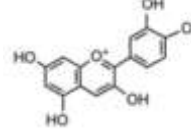
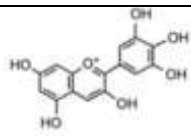
Εικόνα 11: Χημική δομή πολυφαινολών

Ανάλογα λοιπόν με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες με αυτούς. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο κριτήριο, σχηματίζονται οι εξής ομάδες (Manach et al., 2004):

- φλαβονοειδή,
- πολυφαινολικά οξέα,
- στιλβένια
- λιγνάνες

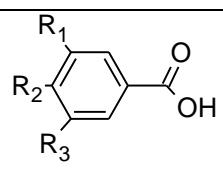
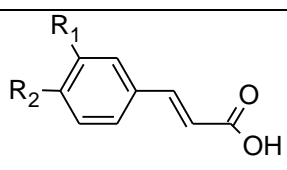
Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται αναλυτικά η κατηγορία των φλαβονοειδών:

Τάξη των φλαβονοειδών	Γενική χημική δομή $R_{1,2,3}$: -OH ή -H	Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή	
Φλαβονόλες		κερκετίνη	
		καμπφερόλη	
		μυρικετίνη	
Φλαβανόλες		(+) -κατεχίνη	
		(-) -επικατεχίνη	
		επιγαλλοκατεχίνη	
Φλαβόνες		λουτεολίνη	
		απιγενίνη	
		χρυσίνη	
Φλαβανόνες		ναριγενίνη	

Ισοφλαβόνες		γενιστεΐνη	
		ντετζεΐνη	
Ανθοκυανιδίνες		κυανιδίνη	
		δελφινιδίνη	

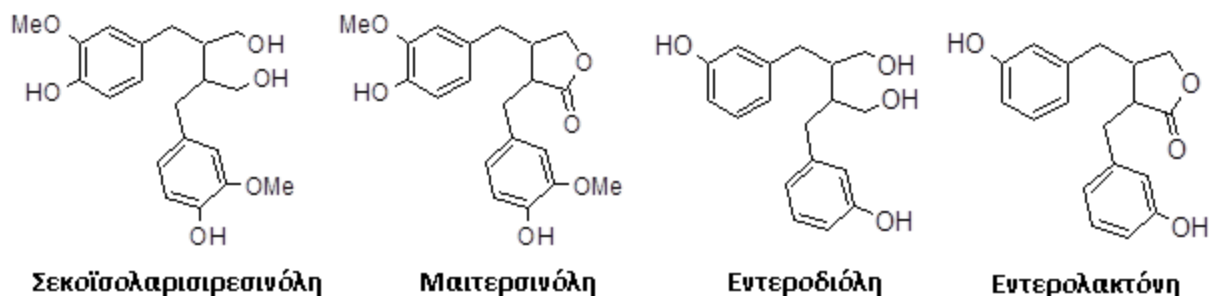
Πίνακας 2: Τα φλαβονοειδή

Ενώ στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται οι χημικές δομές των πολυφαινολικών οξέων:

Υδροξυβενζοϊκά οξέα		Υδροξυκινναμικά οξέα		
				
Γαλλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Κουμαρικό οξύ	Καφεϊκό οξύ	Φερουλικό οξύ
R ₁ OH	OH	R ₁ OH	OH	OCH ₃
R ₂ OH	OH	R ₂ -	OH	OH
R ₃ OH	H			

Πίνακας 3: Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων

Ακολουθούν παραδείγματα ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των λιγνανών:



Εικόνα 12: λιγνάνες

Τα φλαβονοειδή είναι μια κατηγορία ενώσεων με τεράστιο ενδιαφέρον από επιστημονική όσο και θεραπευτική άποψη, από την οποία η αντιοξειδωτική τους δράση έχει προσελκύσει τη μέγιστη προσοχή. Αυτή η ομάδα των πολυφαινολικών ενώσεων βρίσκεται στα φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, ξηρούς καρπούς, σπόρους, μπαχαρικά, φαρμακευτικά φυτά, και σε ορισμένα ποτά όπως το τσάι, το κόκκινο κρασί και η μπύρα. Φλαβονόλες όπως η quercetin, μυρικετίνη, isorhamnetin και kaempferol και οι αντίστοιχες φλαβόνες, απιγενίνη και luteolin, έχουν καθιερωθεί ως ισχυρά αντιοξειδωτικά που εμποδίζουν την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών και αναστέλλουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφών που είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο προσβολής από καρδιοπάθειες (Hertog et al., 1993; Knekt et al., 1996). Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτή η προστατευτική δράση όπως η αναστολή της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Frankel 1993). Η οξείδωση της LDL θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας στα αγγεία. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι πολυφαινόλες μειώνουν τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και έτσι μειώνεται ο σχηματισμός θρόμβων (Tzeng et al., 1991). Επιδημιολογικές μελέτες επίσης, έχουν δείξει ότι οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να προσφέρουν προστασία από ορισμένες μορφές καρκίνου όπως του προστάτη (Knekt et al., 2002), του στήθους (Dai et al., 2002), του γαστρεντερικού συστήματος (Garcia-Closas et al., 1999) και του πνεύμονα (Le Marchand et al., 2000).

Στις φυτικές πολυφαινόλες, έχουν επίσης αποδοθεί και μία σειρά από άλλες βιολογικές ιδιότητες, όπως προστασία έναντι της οστεοπόρωσης (Eaton-Evans 1994), δράση κατά του έλκους (Alarcon et al., 1994), αντιυικές (Chu et al., 1992), αντιαλλεργικές (Di Carlo et al., 1999) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Della Loggia et al., 1986), καθώς και δράση ανάλογη των οιστρογόνων (Manach et al., 2004).

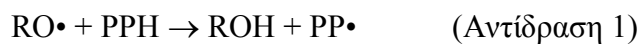
1.3.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Η πιο σημαντική ιδιότητα των φυτικών πολυφαινολών που αφορά την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες είναι ότι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών και χηλικών μετάλλων (Blokhina et al, 2003; Ferguson, 2001). Μια πολυφαινόλη για να θεωρηθεί ότι έχει αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις:

i) όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με μια άλλη ουσία να μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτής της ουσίας,

ii) η πολυφαινολική ρίζα που θα προκύψει μετά την αναστολή της οξείδωσης να είναι σταθερή.

Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν αυτές τις δύο προϋποθέσεις (Rice-Evans et al., 1996). Οι πολυφαινόλες μπορούν να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες λόγω της διαθεσιμότητας των φαινολικών υδρογόνων τους. Δρουν κυρίως ως δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες που οδηγούν στη δημιουργία φαινολικών ριζών (Αντίδραση 1).



RO• : ελεύθερη ρίζα

PPH : πολυφαινολική ένωση

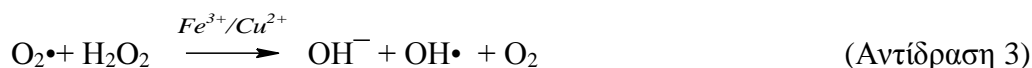
PP• : φαινολική ρίζα

Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινολικές ρίζες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο προσαυξάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της (Αντίδραση 2) οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001).



Μια ακόμη ένδειξη της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών, και ιδιαίτερα των φλαβονοειδών, είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν χηλικά ιόντα χαλκού και σιδήρου τα οποία μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (Αντίδραση 3) και της αντίδρασης Fenton (Αντίδραση 4) μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ελευθέρων ριζών (Nijveldt et al., 2001). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό, που καθιστά ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή, ισχυρά αντιοξειδωτικά

μόρια είναι ότι εκτός της χηλικής δέσμευσης ενός δισθενούς κατιόντος διατηρούν και την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Έτσι προστατεύουν διπλά, από τη μια δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες και από την άλλη εμποδίζοντας το σχηματισμό τους μέσω της αντίδρασης Fenton (Heim et al., 2002).

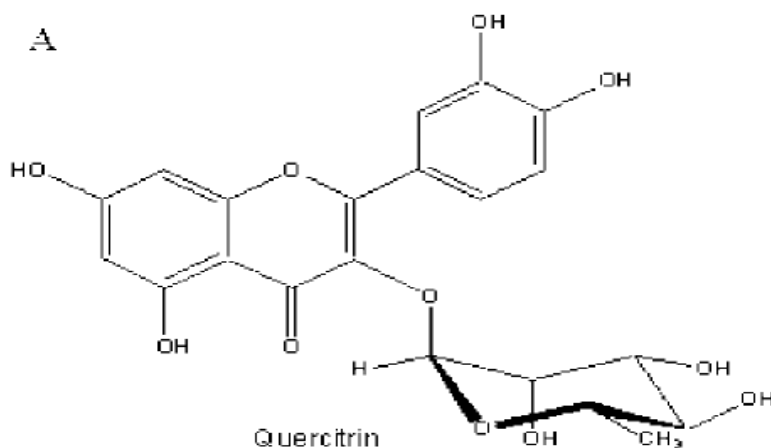


Οι φυτικές πολυφαινόλες όμως εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή μπορεί να προκαλούν το σχηματισμό ROS. Οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως προ-οξειδωτικά κυρίως παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως του Fe και του Cu (Li και Trush 1994; Rahman et al., 1989). Η παραγωγή ROS από τις φυτικές πολυφαινόλες πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να ανάγουν το Fe^{3+} ή το Cu^{2+} σε Fe^{2+} και Cu^{1+} αντίστοιχα (Yoshino et al., 1999). Στη συνέχεια οι ανηγμένες μορφές των μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγούν στο σχηματισμό OH^\bullet .

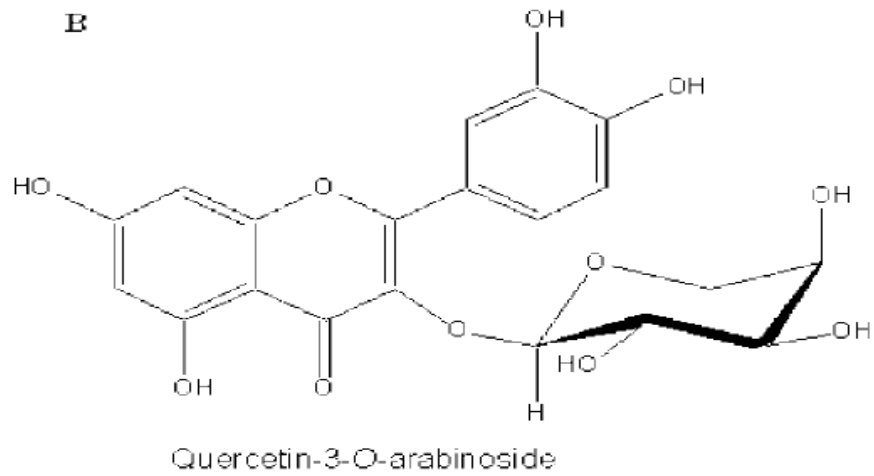
Αυτή η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι πιθανό να οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση (Yoshino και συν., 1999) και έχει προκαλέσει αμφιβολίες όσον αφορά τις θετικές επιδράσεις των πολυφαινολών. Από την άλλη πλευρά όμως πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες προκαλούν απόπτωση μέσω της προ-οξειδωτικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά (Yamamoto et al., 2003; Fukumoto και Mazza 2000).

1.3.2 Πολυφαινόλες στέβιας

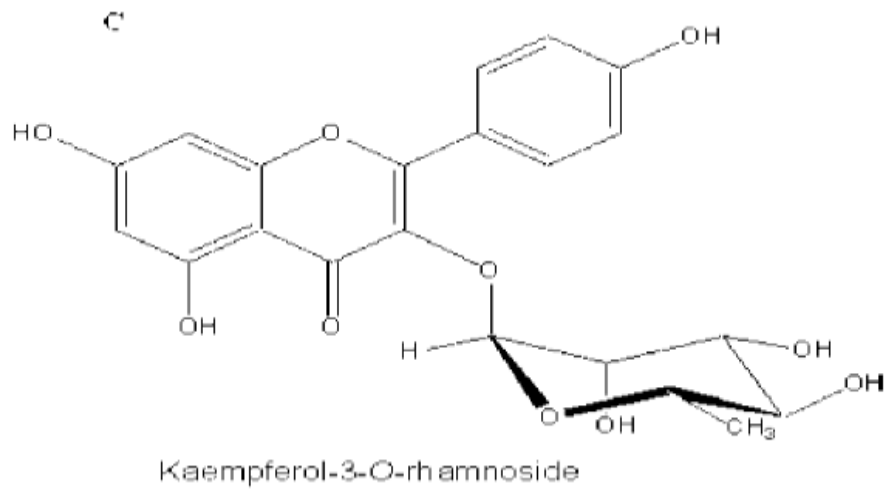
Τα αποξηραμένα φύλλα της στέβιας έχει βρεθεί ότι περιέχουν και μία σειρά πολυφαινολών σε ποσοστό 4-5% κ.β. με κυριότερες τις έξι ουσίες οι οποίες παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες. Επίσης, γίνεται μια αναφορά στα Φλαβονοειδή (πίνακας 4), Χλωρογενικό οξέα και άλλες φαινολικές ενώσεις (πίνακας 5) που εντοπίζονται στα φύλλα της στέβια rebaudiana.



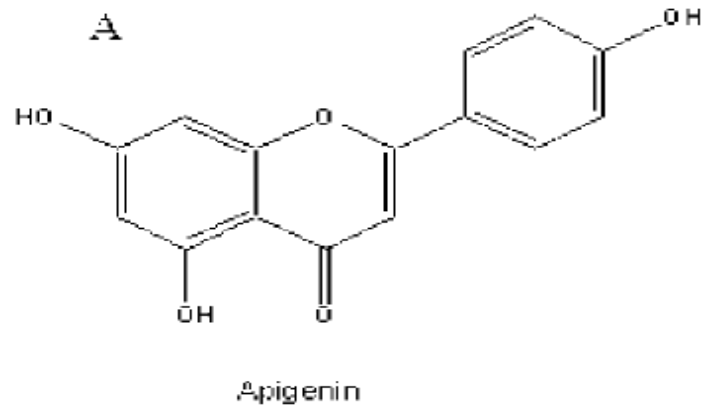
Εικόνα 13: Quercetin



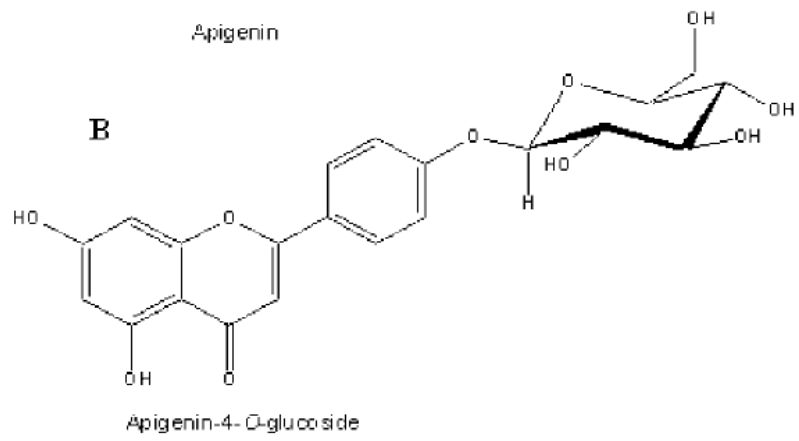
Εικόνα 14: quercetin-3-O-β-D-arabinoside



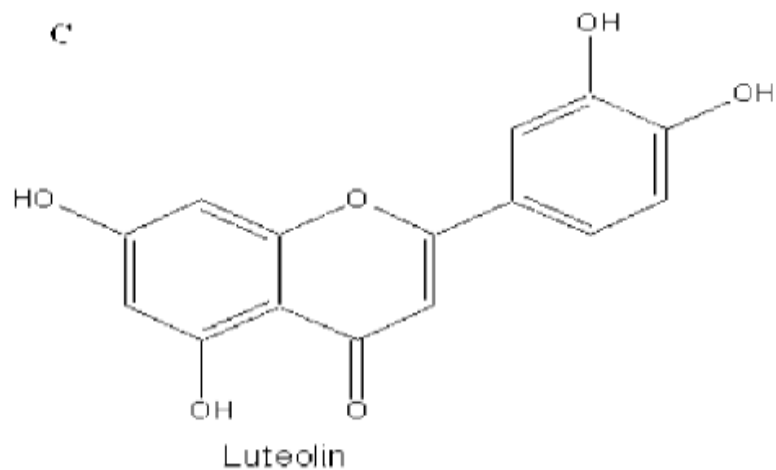
Εικόνα 15: kaempferol-3-O-rhamnoside



Εικόνα 16: Apigenin



Εικόνα 17: apigenin-4-O-β-D-glycoside



Εικόνα 18: luteolin

Flavonols
Quercetin
quercetin-3-O-β-D-arabinoside
quercetin-3-O-β-D-rhamnoside
quercetin-3-O-glucoside
quercetin-3-O-rutinoside
quercetin-3-O-(4-O-trans-caffeoyl)-α-L-rhamno- pyranosyl-(1-6)-β-D- galactopyranoside
kaempferol-3-O-rhamnoside
Flavones
Apigenin
apigenin-4-O-β-D-glycoside
apigenin-7-O-β-D-glycoside
luteolin
luteolin-7-O-β-D-glycoside

Πίνακας 4: Φλαβονοειδή

3-caffeoylquinic acid (3-CQA)
5-caffeoylquinic acid (5-CQA)
4-caffeoylquinic acid (4-CQA)
3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-diCQA)
3,4-dicaffeoylquinic acid (3,4-diCQA)
4,5-dicaffeoylquinic acid (4,5-diCQA) 1 + 5 + 5 Karakköse61 a cis-3,5-dicaffeoylquinic acid (a cis- 3,5-diCQA)
a cis-4,5-dicaffeoylquinic acid (cis-4,5-diCQA)
cis-4,5-dicaffeoylquinic acid (cis-4,5-diCQA)
a cis-4,5-dicaffeoylquinic acid (a cis-4,5-diCQA)
5-p-coumaroylquinic acid acid (5-p-CoQA)
caffeoyl-feruloylquinic acid (CFQA)
4-caffeoyl-5-feruloylquinic acid (4C,5FQA)
5-caffeoylshikimic acid (5-CSA)
4-caffeoylshikimic acid (4-CSA)
3-caffeoylshikimic acid (3-CSA)
5-feruloylquinic acid (5-FQA)
feruloylquinic acid (FQA)
feruloylquinic acid (FQA)
3,4,5-tricaffeoylquinic acid (3,4,5-triCQA)
1,3,5-tricaffeoylquinic acid (1,3,5-triCQA)
tricaffeoylquinic acid (triCQA)
3,4,5-tricaffeoylquinic acid (triCQA)
Pyrogallol
4-methoxybenzoic acid
4-coumaric acid
4-methylcatechol
sinapic acid
cinnamic acid

Πίνακας 5: Χλωρογενικό οξέα και άλλες φαινολικές ενώσεις

1.4 Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων στέβιας. Αρχικά απομονώθηκαν δείγματα από αποξηραμένα φύλλα στέβιας έπειτα από βρασμό. Στην συνέχεια, απομονώθηκαν και δείγματα έπειτα από περαιτέρω επεξεργασία (ξήρανση δια ψεκασμού). Για τον προσδιορισμό της ποσότητας των πολυφαινολών στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin ciocalteau. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS. Στο δεύτερο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων έναντι βλαβών στο πλασμιδιακό DNA που προκαλούνται από

ελεύθερες ρίζες. Ως τέτοιοι παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν η ρίζα του υδροξυλίου που παρήχθη από διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία UV ακτινοβολίας και οι ρίζα περοξυλίου ($ROO\bullet$) που παρήχθη από την θερμική διάσπαση του 2,2 -azobis-(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Πλασμιδιακό DNA

Πλασμίδιο Bluescript SK-(+) το οποίο απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα.

2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για τις πέντε μεθόδους ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

- Tris-HCl (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Panreac-Ισπανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)
- Αγαρόζη (agarose) (Seakem-Η.Π.Α)
- Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics-Η.Π.Α)
- Γλυκερόλη (Glycerol) (Panreac-Ισπανία)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl) (Merck-Γερμανία)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) (Merck-Γερμανία)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) (Merck-Γερμανία)
- DPPH (1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο) (Sigma- Germany)
- ABTS 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (Sigma-Germany)

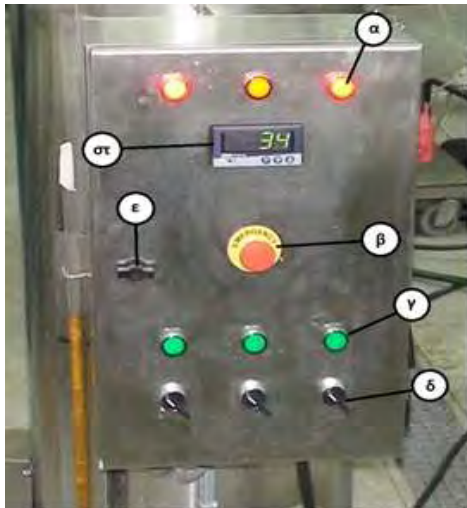
- Μεθανόλη (CH₃OH) (Merck- Germany)
- H₂O₂ (Υπεροξείδιο του Υδρογόνου) (Merck- Germany)
- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)

2.1.3 Εκχυλίσματα

Έγινε εκχύλιση αποξηραμένων φύλων στέβιας στο εργαστήριο μηχανικής τροφίμων και βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Λάρισας ως εξής: τοποθετήθηκαν 2 kg φύλα και 10 kg απεσταγμένο νερό σε εκχυλιστήρα που αποτελείται από τη δεξαμενή (Εικ. 19), τον πίνακα κυκλωμάτων (Εικ. 20), το διάτρητο καλάθι (Εικ.21), το καπάκι, το σύστημα ψήξεως και το σύστημα ανακυκλώσεως του νερού.



Εικόνα 19: α) Σφιγκτήρες συγκρατήσεως για το καπάκι. β) Βαλβίδα προσθήκης υλικού γ) Εσωτερικό μέρος της δεξαμενής δ) Αγωγός και βαλβίδα κενώσεως ε) Δεξαμενή ελαίου στ) Αντιστάσεις ζ) Βάσεις στηρίξεως της δεξαμενής η) Βάση στηρίξεως του πίνακα κυκλωμάτων.



Εικόνα 20: α) Ενδεικτικές λυχνίες παροχής ρεύματος στις αντιστάσεις β) Διακόπτης ασφαλείας γ) Ενδεικτικές λυχνίες για τη λειτουργία των αντιστάσεων δ) Διακόπτες παροχής ρεύματος για τις αντιστάσεις ε) Χειρομοχλός ανοίγματος εμπρόσθιου μέρους του πίνακα στ) Ψηφιακός ρυθμιστής θερμοκρασίας

Το διάτρητο καλάθι:



Εικόνα 21: διάτρητο καλάθι

Μόλις το νερό φτάσει την θερμοκρασία βρασμού, εξατμίζεται διαπερνώντας τα φύλλα και με αυτόν τον τρόπο γίνεται εκχύλιση των συστατικών των φύλλων της στέβιας συμπεριλαμβανομένων των πολυφαινολών.

Το νερό ανακυκλωνόταν και η διαδικασία κράτησε έξι ώρες. Συλλέχτηκαν δείγματα στα 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h, 3h, 3.5h, 4h, 4.5h, 5h, 5.5h, 6h. Τα δείγματα αυτά εξετάστικαν ως προς την απόδοσή τους σε σάκχαρα και

πολυφαινόλες και έπειτα έγινε επιλογή της κατάλληλης χρονικής στιγμής (μέγιστη ποσότητα πολυφαινολών) για παραλαβή δείγματος σε μεγάλη ποσότητα και περαιτέρω επεξεργασία.

2.1.4 Εκχύλισμα που προήλθε από επεξεργασία με μεμβράνες υπερδιήθησης και spray dryer

Το δείγμα υγρού εκχυλίσματος που απομονώθηκε από τον βραστήρα περάστηκε από μια στήλη με ενσωματωμένη μεμβράνη υπερδιήθησης με μία ρητίνη. Με τη βοήθεια αντλίας όλο το δείγμα πέρασε μέσα από τη στήλη και ακολούθησε αποχρωματισμός. Η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε για έξι ώρες. Συνέβη μερικός αποχρωματισμός διότι στη ρητίνη έγινε κατακράτηση των φυσικών χρωστικών, αλλά ταυτόχρονα παρατηρήθηκε και κατακράτηση ποσότητας γλυκοζιτών με αποτέλεσμα το υλικό να έχει υποκίτρινο χρώμα και ουδέτερη γεύση. Η στήλη και οι μεμβράνες φαίνονται στις εικόνες 22 και 23 αντίστοιχα.



Εικόνα 22: Στήλη αποχρωματισμού. Χρησιμοποιήθηκαν οι μεμβράνες υπερδιήθησης: CA 202, ESP 04, EM 006, PU 608)



Εικόνα 23: Εφαρμογή ρητίνης

Το συμπέρασμα είναι ότι η ρητίνη Amberlite FPX-66 που χρησιμοποιήθηκε κάνει κατακράτηση των χρωστικών του εκχυλίσματος αλλά και όλων των γλυκοζιτών. Έπειτα ακολούθησε η ξήρανση.

2.1.4. Spray Dryer (Ξήρανση με ψεκασμό)

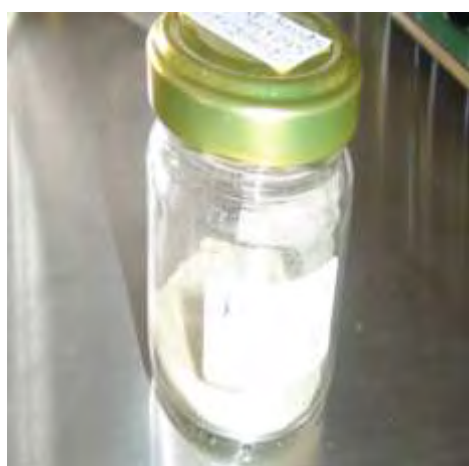
Η ξήρανση με ψεκασμό είναι μία μέθοδος παραγωγής σκόνης από ένα υγρό ή πολτό δια ταχείας ξηράνσεως με θερμό αέρα. Αυτή είναι η προτιμώμενη μέθοδος της ξήρανσης πολλών θερμικά ευαίσθητων υλικών, όπως τα τρόφιμα και τα

φαρμακευτικά προϊόντα. Η συσκευή του spray dryer αποτελείται από τα παρακάτω μέρη που φαίνονται στην εικόνα 24.



Εικόνα 24: α) Ψεκαστήρας β) Αντλία γ) Ψηφιακός πίνακας χειρισμού δ) Κυκλώνας ε) Δοχείο περισυλλογής στ) Θάλαμος ψεκασμού

Το δείγμα τοποθετείται πάνω από τον πίνακα χειρισμού και το προϊόν συλλέγεται από το δοχείο περισυλλογής και το θάλαμο ψεκασμού. Το αποτέλεσμα και το τελικό προϊόν που περισυλλέχτηκε από το spray dryer ήταν μια ανοιχτόχρωμη "σκόνη", (εικ. 25).



εικόνα 25: σκόνη στέβιας

2.2 Μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητας των εκχυλισμάτων και της σκόνης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά πέντε *in vitro* μέθοδοι.

2.2.1 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

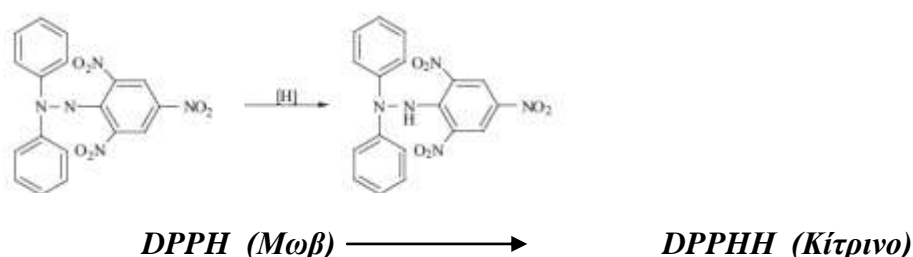
Ο προσδιορισμός βασίζεται σε μια φασματοφωτομετρική μέθοδο κατά την οποία μέσω μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC) (Vermeris & Nicholson, 2006; Singleton & Rossi, 1965). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 , και αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης.

Σε σωληνάρια falcon των 15 mL προστίθενται απιονισμένο νερό όγκου 5 mL και 100 μL του προς εξέταση δείγματος, φυτικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος. Στο τυφλό προστίθενται 100 μL απιονισμένου H_2O . Στην συνέχεια προστίθενται 500 μL του αντιδραστηρίου FC. Τα δείγματα ανακινούνται και μετά την πάροδο 3 min σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται 1,4 mL διαλύματος Na_2CO_3 25% w/v. Το μίγμα ανακινείται. Ακολουθεί συμπλήρωση του όγκου στα 10 mL με απιονισμένο νερό. Το μίγμα ανακινείται ξανά και επωάζεται για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1500 (San Jose, USA) ως προς το τυφλό δείγμα. Κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα δοκιμάστηκε εις τριπλούν. Εξετάστηκε ακόμη και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία του αντιδραστηρίου FC η οποία αφαιρείται από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης. Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0, 31.25, 62.5, 125, 250 και 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση $y = 0,001x - 0,0027$ με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman $r = 0,998$ με $p < 0,01$. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος.

2.2.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH

2.2.2i Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand- Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH[•] μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Αντίδραση 5). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Αντίδραση 5: Η αναγωγή του DPPH σε DPPH:H

2.2.2ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH[•] την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH[•]) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας (100 μM ρίζας DPPH) με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-

1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 7). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και το διάλυμα της ρίζας DPPH σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl
DPPH'	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 6: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 7: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

2.2.2iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της απορρόφησης στα 517nm για κάθε δείγμα καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_8) / A_0 \times 100$$

A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

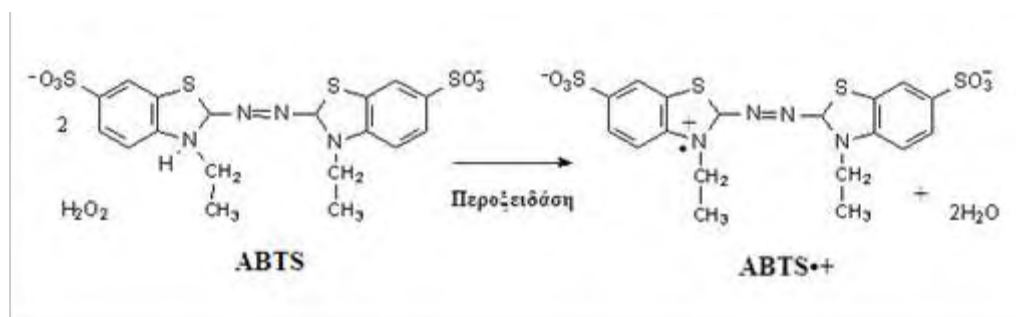
A_8 : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του σχηματισμού της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % αναστολής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.

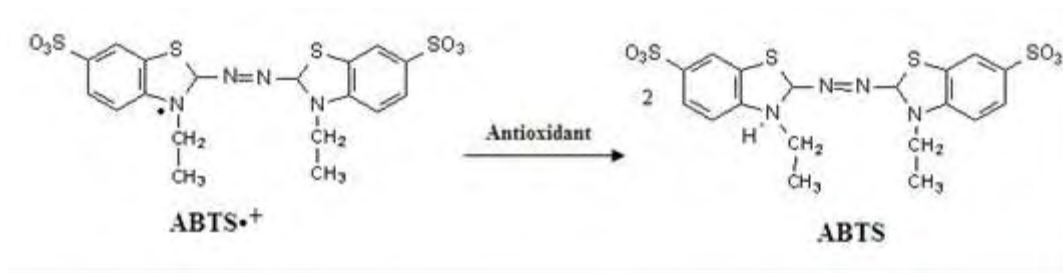
2.2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $ABTS^{+}$

2.2.3i Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από το Miller (Miller & Rice-Evans, 1993), βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα $ABTS^{+}$. Το $ABTS$ 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), έχει σαν αποτέλεσμα την οξείδωση του ($ABTS$) και την δημιουργία μιας δραστικής ρίζας, του κατιόντος $ABTS^{+}$ (Αντίδραση 6). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{+}$, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Αντίδραση 7) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999)



Αντίδραση 6: Η οξείδωση του $ABTS$ σε δραστική ρίζα



Αντίδραση 7: Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS

2.2.3ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 20, 80 μg/ml).

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H₂O.

Διάλυμα H₂O₂ (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H₂O₂ 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM. Από το stock διάλυμα H₂O₂ 30% 8,8 M αραιώνουμε με H₂O₂, ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM.

Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/20 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂ και το ένζυμο περοξειδάση. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 8). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H₂O₂, HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 10).

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400μl	400μl
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500μl	500μl
H₂O₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50μl	50μl
HRP	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50ml	50ml
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL

Πίνακας 8: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

Επώαση 45 min

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	50μl	50μl	-	-	-	-	-
V τελ	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl

Πίνακας 9: προσθήκη εκχυλίσματος

	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H₂O₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1 mL	1 mL
Εκχύλισμα	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Μεθανόλη	50 μL	-	-	-	-	-

Πίνακας 10: Έλεγχος απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

2.2.3iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της απορρόφησης στα 730nm για κάθε δείγμα καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_8) / A_0 \times 100$$

A₀: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730nm

A₈: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730nm

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του σχηματισμού της ρίζας του ABTS^{•+} που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης *r* κατά Spearman. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % αναστολής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.

2.3 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA

Για την εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι, όπου σε κάθε μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν οι ρίζες OH[•] και ROO[•] αντίστοιχα.

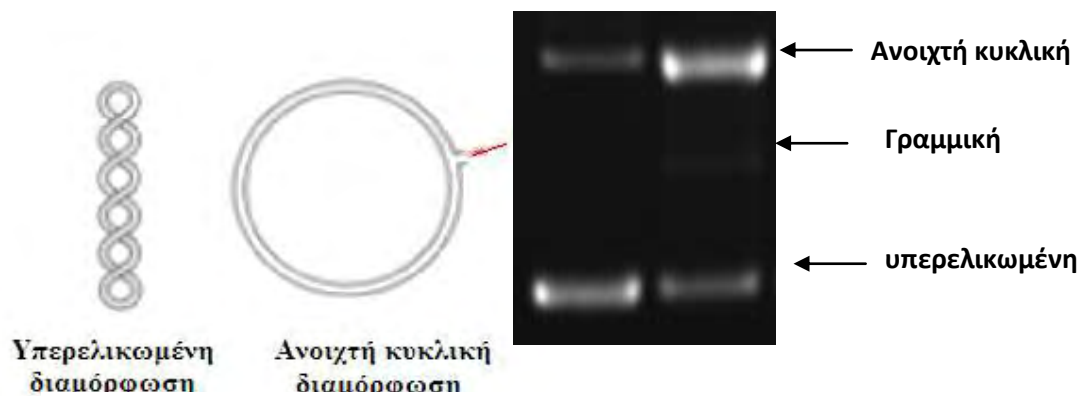
Γενικά

Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά δίκλιωνα κυκλικά μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, φέροντας συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 26).

- Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπακνωμένη του μορφή.

- Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλιωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
- Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλιωνα σπασίματα.

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αγαρόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική.



Εικόνα 26: Αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Με βάση την αρχή της μεθόδου, ως τώρα έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων και δραστικών μορίων απέναντι στην ικανότητα των ριζών OH^\bullet , ROO^\bullet να προκαλούν μονόκλιωνα σπασίματα στο DNA και να αλλάζουν την διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια, το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%) και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Το θρεπτικό μέσο LB Broth αποκτήθηκε από την Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ (Fermentas,

USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5A.

Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 µg/mL αμπικιλίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων *E. Coli* που φέρουν το πλασμίδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο, 100 mL. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνονται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 [(100mL)-50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, pH 8] και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 [(50mL) - 0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το πλασμιδιακό DNA και χρωμοσωμικού DNA. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 [(100 mL)- 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος]. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214g στους 4°C, στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε κινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται. Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνονται για 20 min στα 3214g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί ένζυμο RNase 10 µg/mL για τη διάσπαση του RNA. Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL (1OD₂₆₀→50 µg/mL). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα

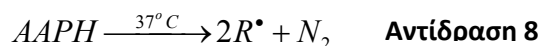
χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 μg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί έκθεση του ηλεκτροφόρου σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογράφιση του με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech γίνεται ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Το πλασμίδιο τελικά χωρίζεται σε aliquots (χωρισμένο σε πολλά eppendorfs) και τοποθετείται στους -20°C.

2.3.2 Επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

2.3.2i Αρχή της μεθόδου

Οι ρίζες ROO[•] είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξειδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται.

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO[•] χρησιμοποιείται το AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride). Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO[•] (Αντιδράσεις 8,9).



Εκτός από την ιδιότητα των ριζών ROO[•] να ξεκινούν την λιπιδική υπεροξειδωση έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO[•].

2.3.2ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 gr αγαρόζης σε 90 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

- **PBS** (pH=7,4) : NaCl 137mM (8gr/1000ml), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 ml), Na₂HPO₄ 8,1mM (1,44gr/1000ml), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **AAPH 100mM**: 13,56mg AAPH σε 500μl PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

- **AAPH 2,5mM**: Αραιώνεται το διάλυμα AAPH 100mM 16 φορές. Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε συγκεντρώσεις 200, 400, 800, 1600, 3200 μg/ml. Τα συστατικά της αντίδρασης (10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2μg, AAPH 2,5mM και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

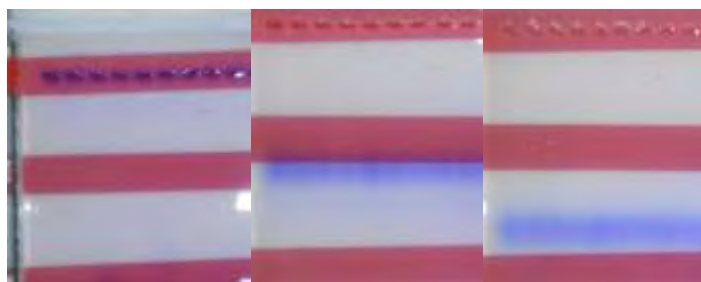
Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα.

PBS	αντιοξ. παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control	8μl	2μl	-
AAPH 2.5mM	4μl	-	2μl 4μl
Εκχ. (0.25 μg/ml)	1μl	3μl	2μl 4μl
Εκχ. (0.5 μg/ml)	1μl	3μl	2μl 4μl
Εκχ. (1 μg/ml)	1μl	3μl	2μl 4μl
Εκχ. (1,5 μg/ml)	1μl	3μl	2μl 4μl
Εκχ. (2 μg/ml)	1μl	3μl	2μl 4μl
Εκχ. (2,5 μg/ml)	1μl	3μl	2μl 4μl

Πίνακας 11: Ποσότητες αντιδραστηρίων.

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Στη συνέχεια η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl Loading Buffer (Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και η ανάλυση γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης στα 70 V για 1h. Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε 250ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ξεβαφόταν σε 250ml

απιονισμένο νερό για 30 min. Τελικά το gel φωτογραφιζόταν κάτω από UV. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.



Εικόνα 27: διαδικασία ηλεκτροφόρησης

2.3.2iii Στατιστικά ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO^{\bullet} , που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

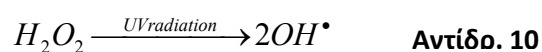
$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S)/(S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

όπου S_{control} το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control, S_0 το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 2,5mM AAPH) και S το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα (2,5mM AAPH). Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

2.3.3 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH^{\bullet})

2.3.3i Αρχή της μεθόδου

Οι ρίζες OH^{\bullet} είναι από τις πιο ισχυρές δραστικές μορφές οξυγόνου, προσβάλλοντας τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Παρουσία UV ακτινοβολίας η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) έχει την ικανότητα να διασπάται οδηγώντας στην παραγωγή ριζών OH^{\bullet} (Αντίδραση 2.4).



Μία από τις επιδράσεις των ριζών OH^{\bullet} στο DNA είναι η πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων. Η δράση αυτή σε πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα

την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική. Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών OH•.

2.3.3ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 gr αγαρόζης σε 90 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Για την εξέταση του κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκαν αρκετές αραιώσεις του (200, 400, 800, 1600, 3200 µg/ml). Πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης γίνεται η προετοιμασία του διαλύματος H₂O₂ συγκέντρωσης 40mM. Το stock διάλυμα H₂O₂ αλλά και το αντίστοιχο αραιωμένο είναι φωτοευαίσθητα, για το λόγο αυτό λαμβάνονται και τα κατάλληλα μέτρα προστασίας τυλίγοντας τα με αλουμινόχαρτο, ενώ πριν την χρησιμοποίησή του διατηρείται στον πάγο. Τα συστατικά της αντίδρασης (10µl) αποτελούνταν από: 10mM Tris-HCl – 1mM EDTA buffer (pH=7.5), DNA Bluescript plasmid 3,2µg, H₂O₂ 40mM, H₂O και το εξεταζόμενο υδατικό εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 12.

	Tris-HCl EDTA	H₂O	αντιοξ. παραγον	DNA plasmid	H₂O₂	UV
Control	2µl	6µl	-	-	2µl	(-)
H ₂ O ₂ +UV	2µl	4µl	-	2µl	2µl	(+)
Εκχ. (200 µg/ml)	2µl	1µl	3µl	2µl	2µl	(+)
Εκχ. (400 µg/ml)	2µl	1µl	3µl	2µl	2µl	(+)
Εκχ. (800 µg/ml)	2µl	1µl	3µl	2µl	2µl	(+)
Εκχ. (1600 µg/ml)	2µl	1µl	3µl	2µl	2µl	(+)
Εκχ.(3200 µg/ml)	2µl	1µl	3µl	2µl	2µl	(+)
Εκχ.μόνο	2µl	3µl	3µl	-	2µl	(-)

Πίνακας 12: Ποσότητες αντιδραστηρίων.

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (1μg πλασμίδιο), ένα θετικό control (1μg πλασμίδιο + 40mM H₂O₂-UV) και ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ώστε να παρατηρηθεί τυχόν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA. Τα δείγματα αναδεύονταν (spin-vortex-spin) και τοποθετούνταν κάτω από 300W λάμπα UV (Osram) σε απόσταση 52cm για 3 min ακριβώς. Στη συνέχεια η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl Loading Buffer (Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και η ανάλυση γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 0,8% στα 70 V για 1h. Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε 250ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ξεβαφόταν σε 250ml απιονισμένο νερό για 30 min. Τελικά το gel φωτογραφιζόταν κάτω από UV. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

2.3.3iii Στατιστικά ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών OH[•], που παράγονται από την φωτόλυση με UV ακτινοβολία του H₂O₂ αλλά και η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO[•], που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S) / (S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

όπου S_{control} το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control, S₀ το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 40mM H₂O₂ και UV ακτινοβολία ή DNA + 2,5mM AAPH) και S το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 40mM H₂O₂ και UV ακτινοβολία ή 2,5mM AAPH. Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα Folin ciocalteu

Στα υγρά εκχυλίσματα παρατηρούμε ότι η ποσότητα των πολυφαινολών είναι μικρή (0,049-0,072 µg/ml), ενώ παραμένει σχεδόν σταθερή και δεν επηρεάζεται από τον χρόνο βρασμού. Τα στερεά εκχυλίσματα όμως περιέχουν σχετικά μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολών (59 και 46 µg/ml για τα δείγματα 1 και 2 αντίστοιχα). Επίσης, παρατηρούμε ότι με τον αποχρωματισμό του δείγματος 2 κατακρατούνται εκτός από τις χρωστικές και πολυφαινόλες.

Δείγματα	Ποσότητα πολυφαινολών (µg/ml)
15 min	0,058
30 min	0,055
45 min	0,057
1h	0,058
1.5h	0,057
2h	0,049
2.5h	0,054
3h	0,066
3.5h	0,057
4h	0,061
4.5h	0,057
5h	0,066
5.5h	0,072
6h	0,060

Πίνακας 13

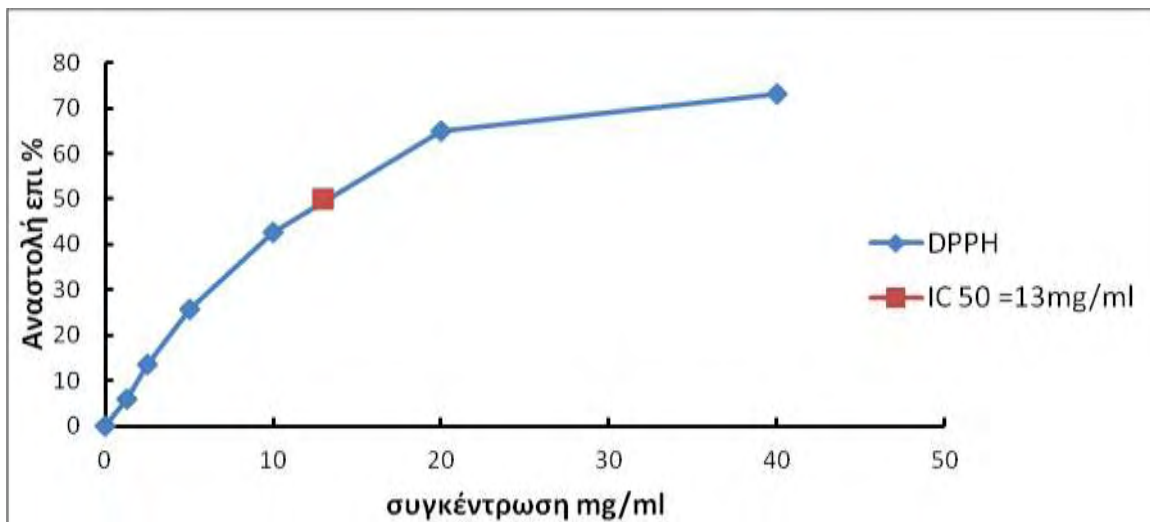
	Ποσότητα πολυφαινολών (µg γαλικού οξέος/mg ξηρού δείγματος)
Δείγμα σκόνης 1	59
Δείγμα σκόνης 2	46

Πίνακας 14

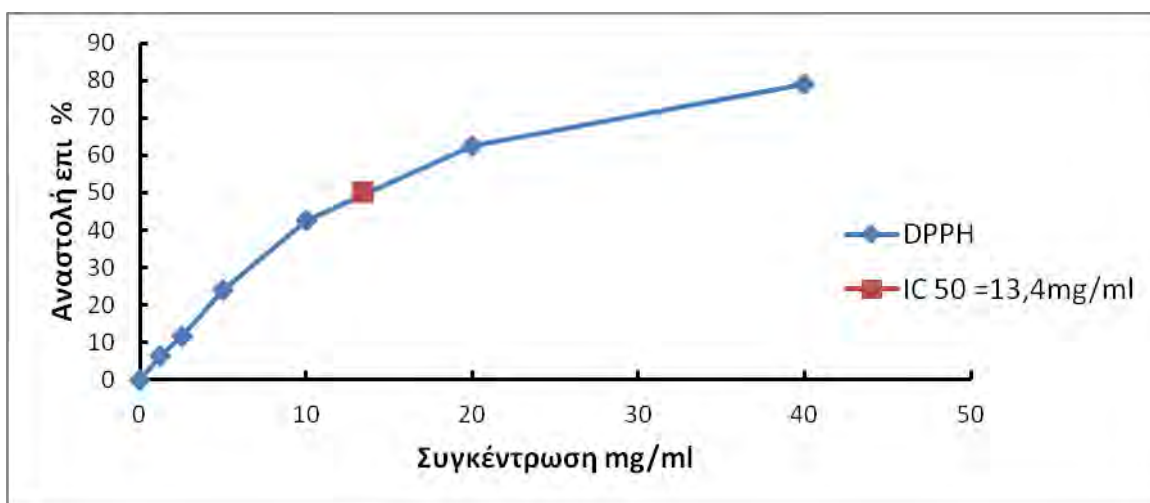
3.2 Αποτελέσματα DPPH

Συνολικά μελετήθηκαν 14 εκχυλίσματα στέβιας που συλλέχτηκαν σε (15, 30, 45min, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6h) κατά τη διαδικασία εκχύλισης με βρασμό και δυο δείγματα σκόνης που προέκυψαν από το spray dryer, όπου το 2^ο ήταν πιο καθαρό από χρωστικές και γλυκοζίτες, λόγω περάσματος από μεμβράνες υπερδιήθησης. Το IC50 μειώνεται καθώς αυξάνεται ο χρόνος βρασμού για τα υγρά εκχυλίσματα (13mg/ml για το δείγμα 15 λεπτών, 5 mg/ml για το δείγμα των 6 ωρών) πράγμα που σημαίνει πως αυξάνεται η αντιοξειδωτική ικανότητα. Το περισσότερο κατεργασμένο δείγμα "σκόνης" είχε μικρότερη αντιοξειδωτική δράση καθώς και ποσότητα

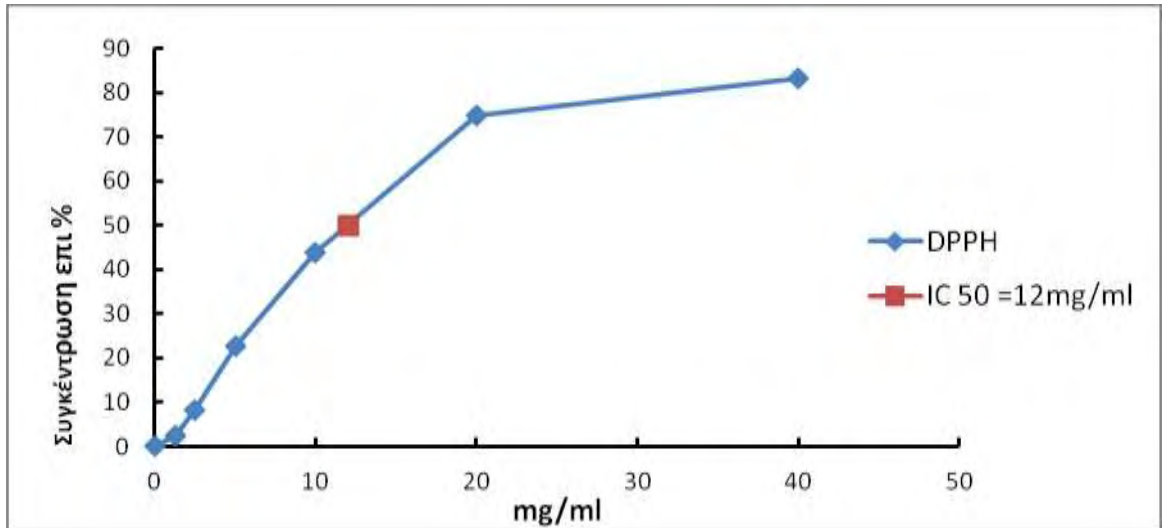
πολυφαινολών όπως φάνηκε από τη μέθοδο Folin. Συγκεκριμένα: το IC₅₀ του 1^{ου} δείγματος spray dryer υπολογίστηκε ίσο με 75μg/ml και αυτό του 2^{ου} δείγματος ίσο με 127μg/ml.



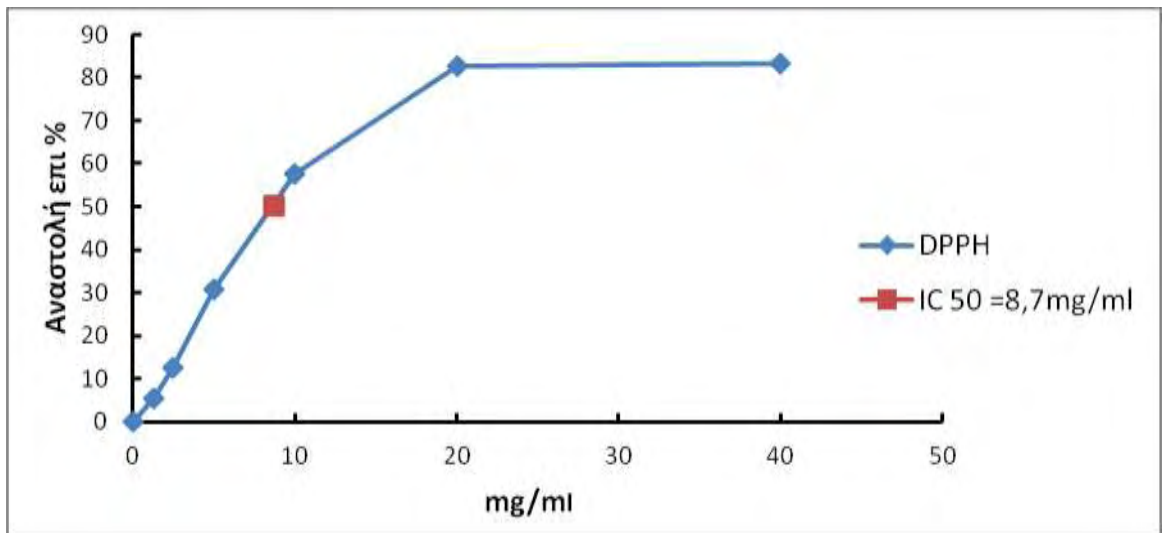
Διάγραμμα 1: DPPH δείγματος 15 λεπτών



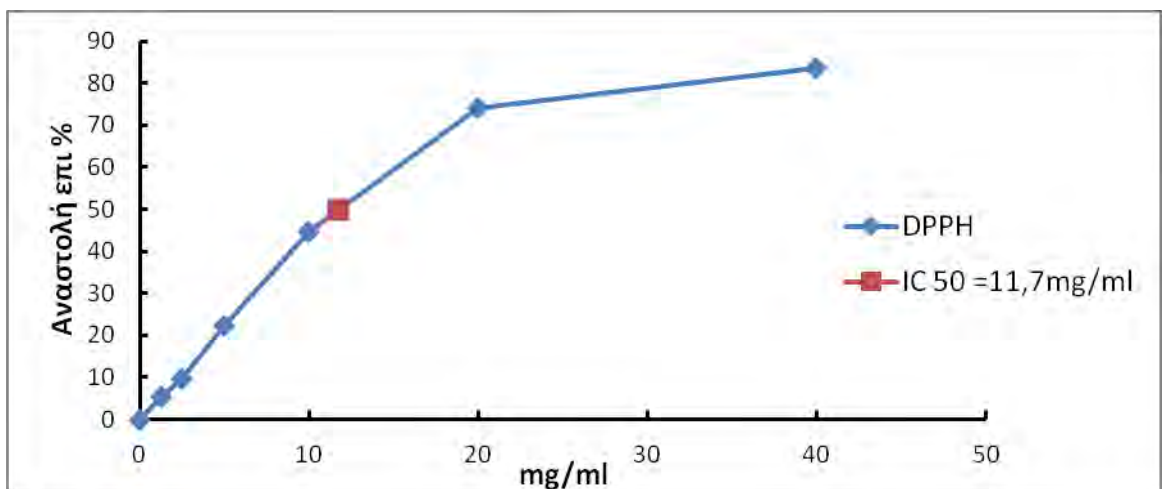
Διάγραμμα 2: DPPH δείγματος 30 λεπτών



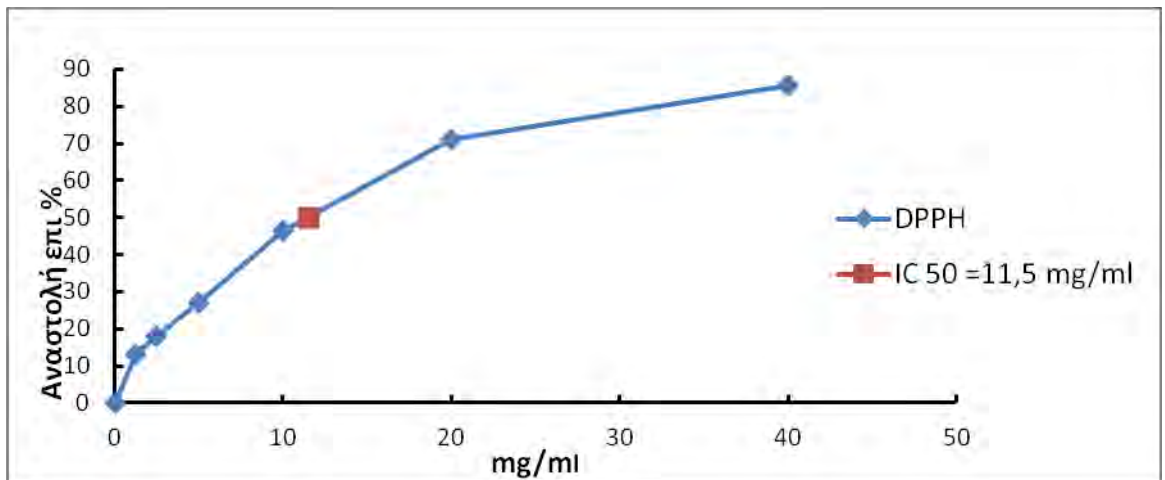
Διάγραμμα 3: DPPH δείγματος 45 λεπτών



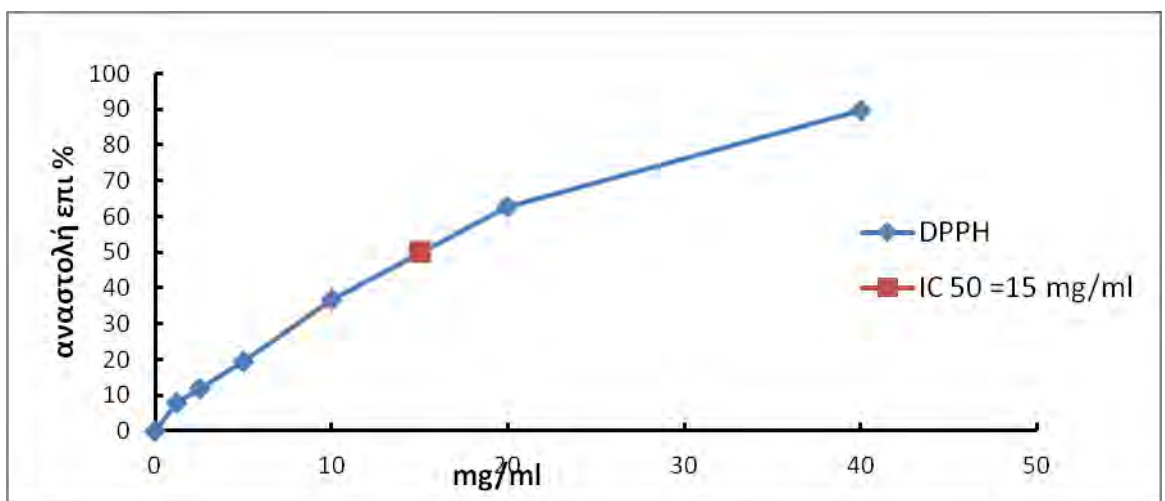
Διάγραμμα 4: DPPH δείγματος 1 ώρας



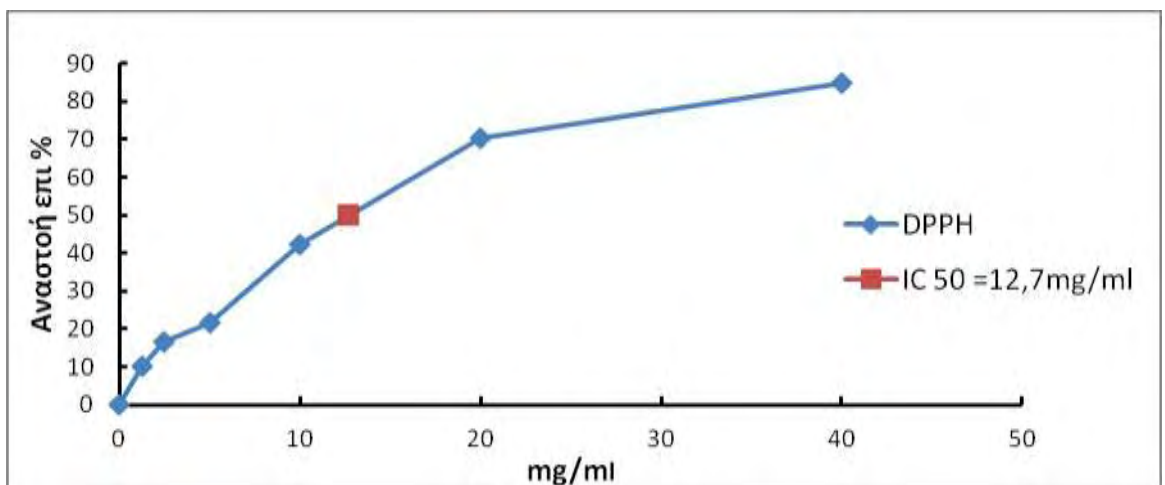
Διάγραμμα 5: DPPH δείγματος 1,5 ώρας



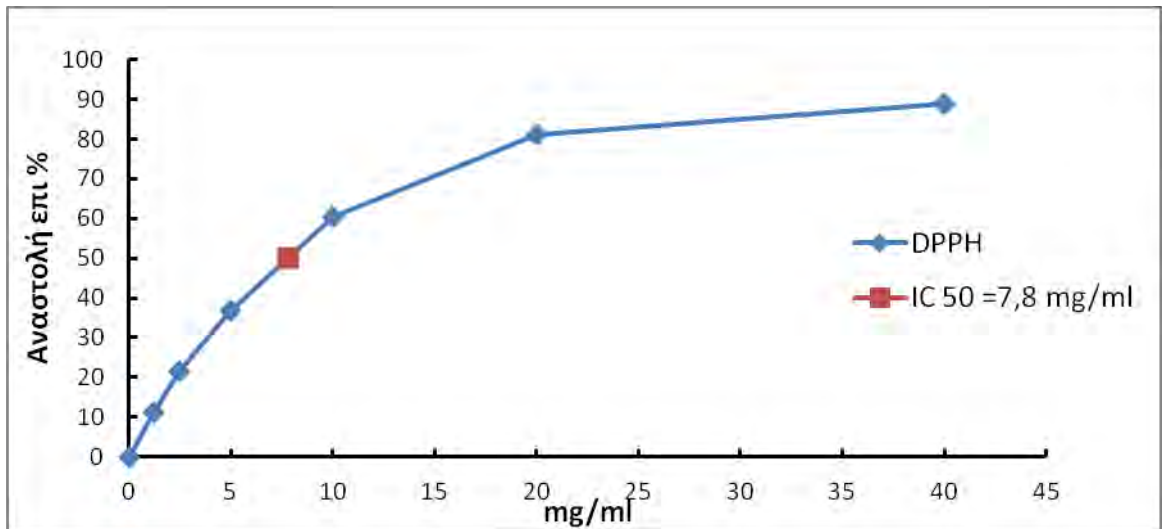
Διάγραμμα 6: DPPH δείγματος 2 ωρών



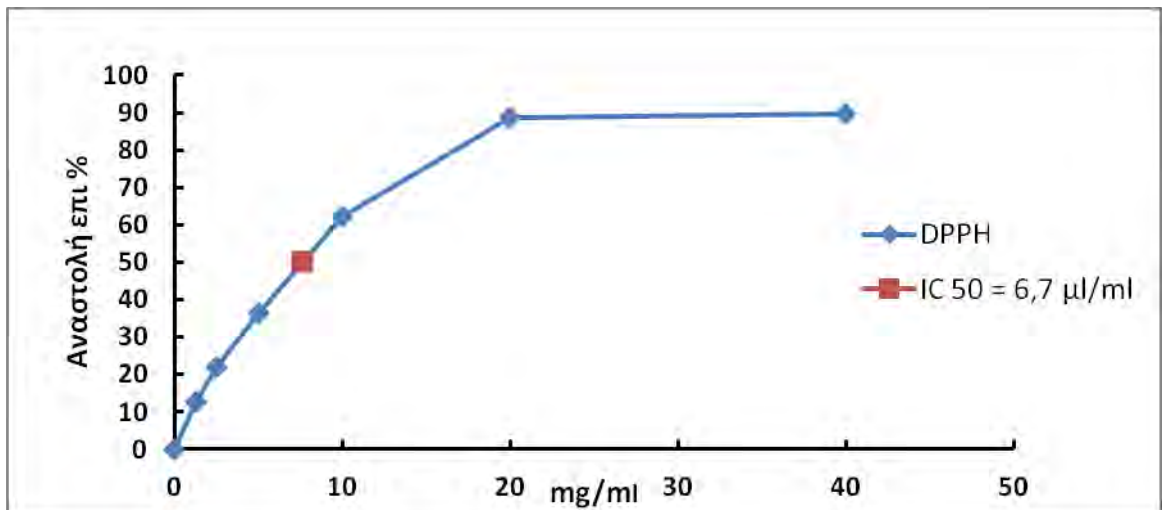
Διάγραμμα 7: DPPH δείγματος 2,5 ωρών



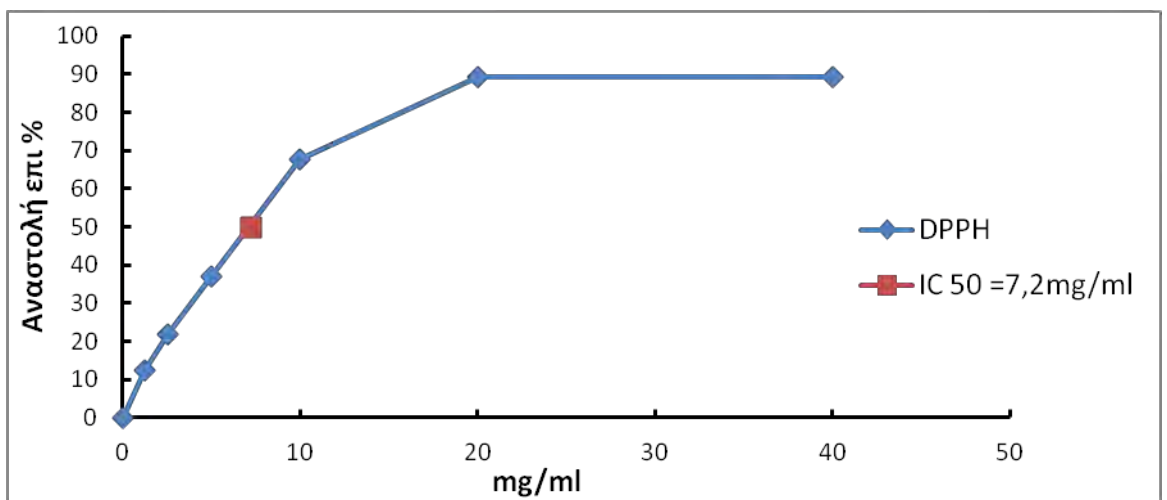
Διάγραμμα 8: DPPH δείγματος 3 ωρών



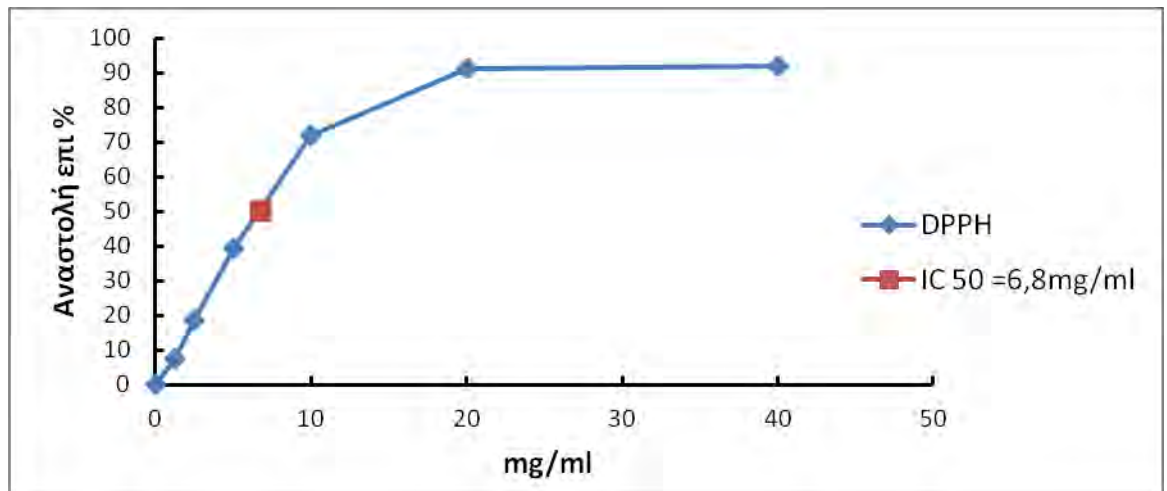
Διάγραμμα 9: DPPH δείγματος 3,5 ωρών



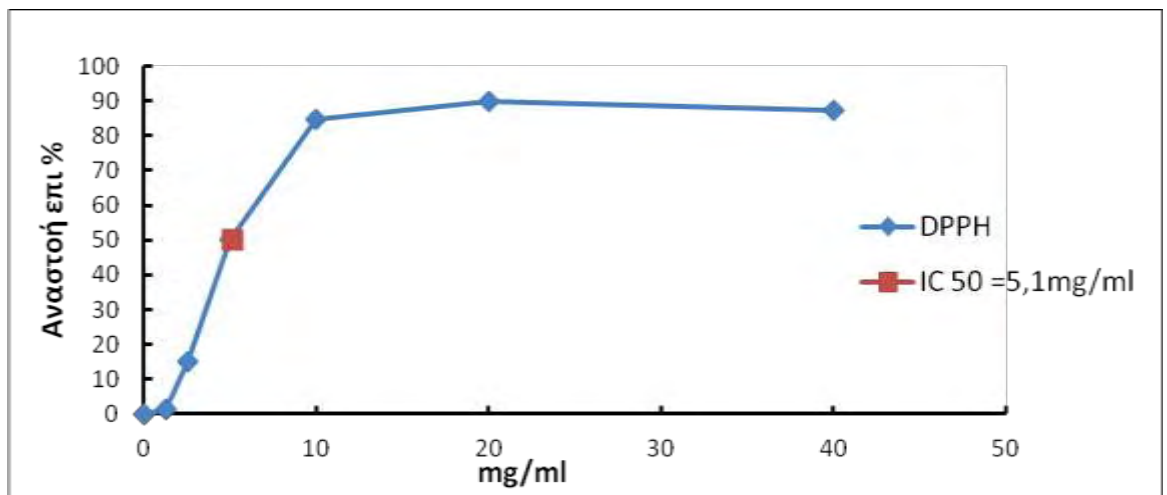
Διάγραμμα 10: DPPH δείγματος 4 ωρών



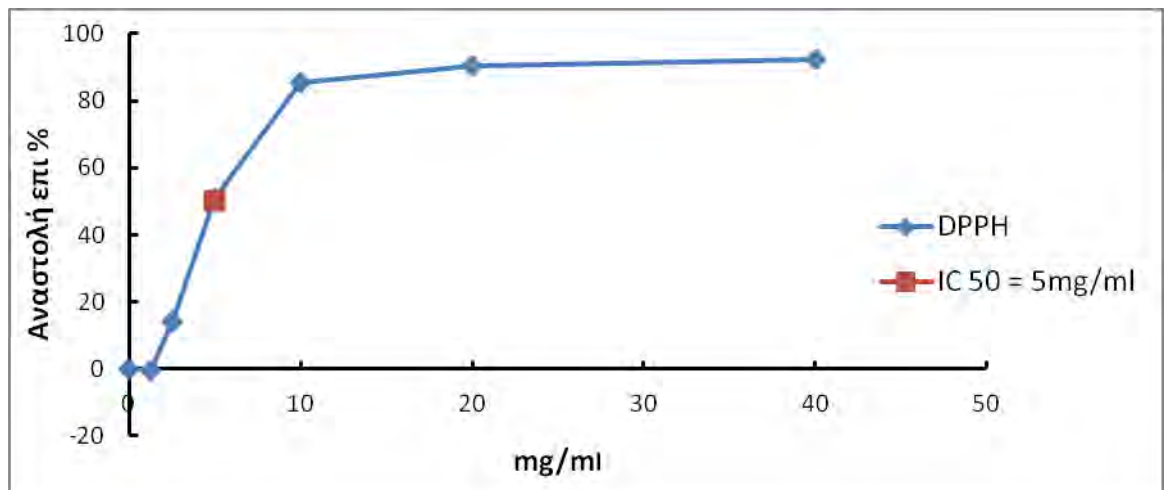
Διάγραμμα 11: DPPH δείγματος 4,5 ωρών



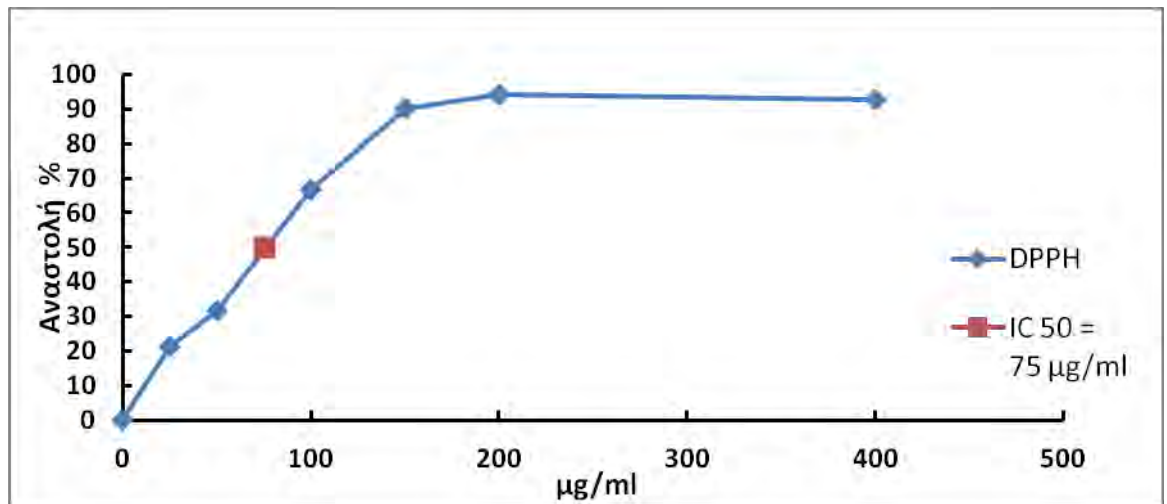
Διάγραμμα 12: DPPH δείγματος 5 ωρών



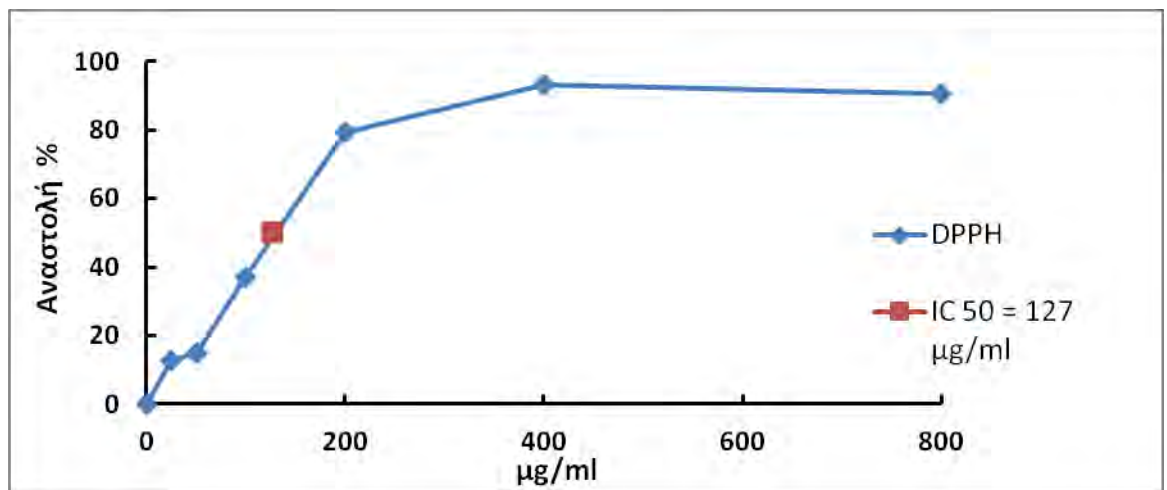
Διάγραμμα 13: DPPH δείγματος 5,5 ωρών



Διάγραμμα 14: DPPH δείγματος 6 ωρών



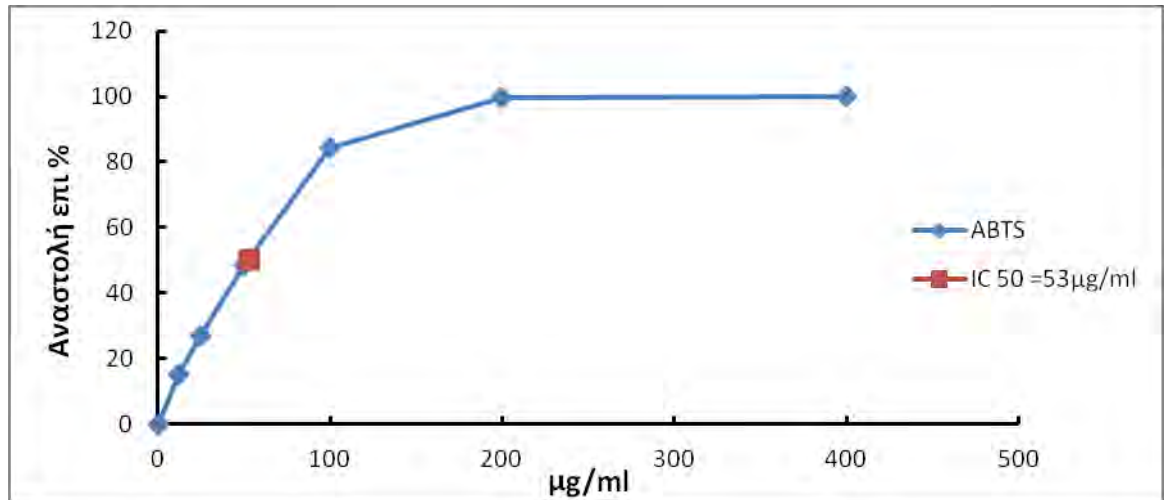
Διάγραμμα 15: DPPH δείγματος σκόνης (1)



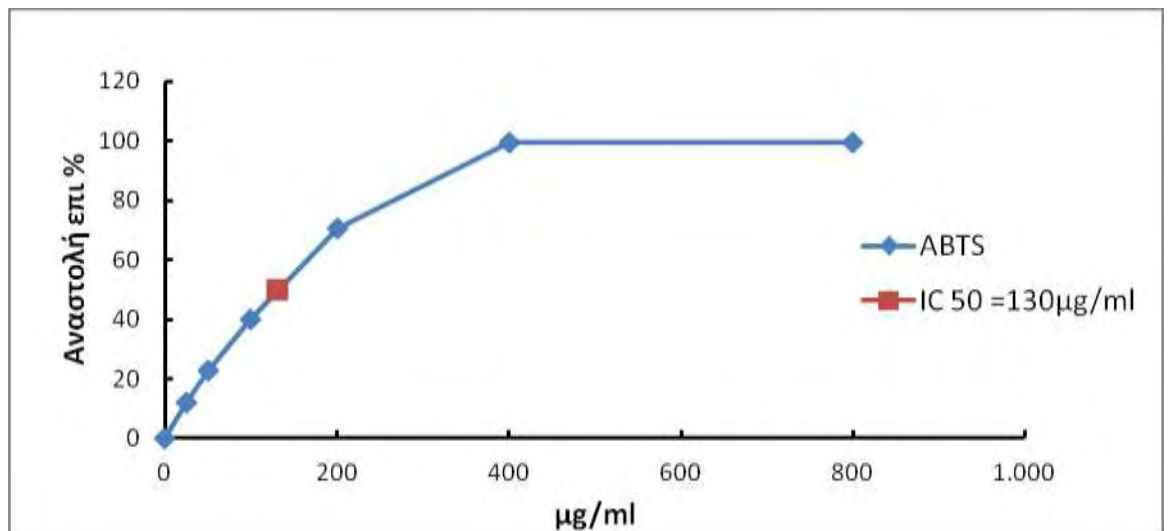
Διάγραμμα 16: DPPH δείγματος σκόνης (2)

3.3 Αποτελέσματα ABTS

Με τη μέθοδο αυτή έγινε εξέταση του ισχυρότερου δείγματος από τα υγρά εκχυλίσματα και των δύο δειγμάτων σκόνης, διότι τα υπόλοιπα υγρά εκχυλίσματα δεν έδειξαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο DPPH. Έδειξε ότι το ισχυρότερο υγρό εκχύλισμα (αυτό των 6 ωρών) είχε τιμή IC₅₀ ίση με 5mg/ml. Ενώ τα 2 εκχυλίσματα του spray dryer έδειξαν αναστολή περίπου 100% στις συγκεντρώσεις 300 μg/ml και άνω. Το δε IC₅₀ ήταν από 75 και 127 μg/ml για τα προϊόντα 1 και 2 αντίστοιχα. Το ABTS έδειξε παρόμοιες τιμές με το DPPH (διαγράμματα 17,18).



Διάγραμμα 17: ABTS δείγματος σκόνης (1)

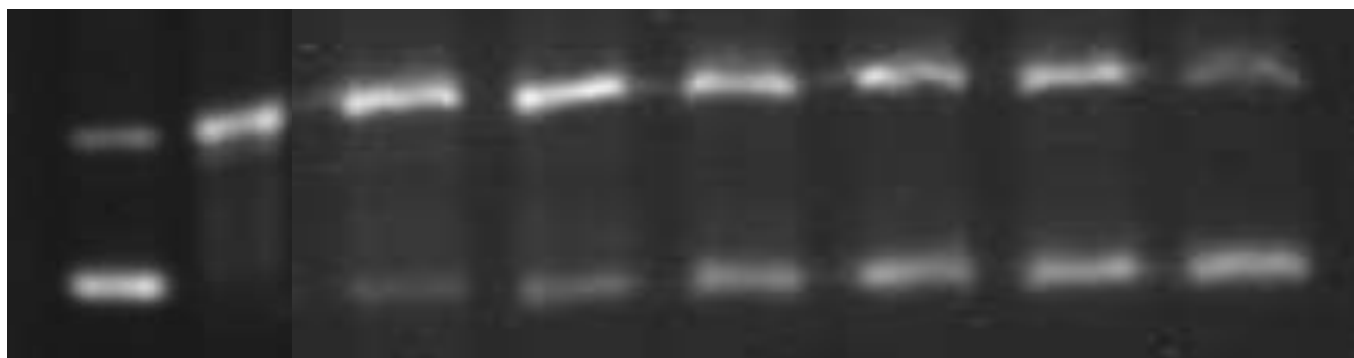


Διάγραμμα 18: ABTS δείγματος σκόνης (2)

3.4 Αποτελέσματα AAPH

Δεν υπάρχει ουσιαστικά αναστολή της ρίζας AAPH και OH από το 2^ο δείγμα σκόνης. Το 1^ο δείγμα έδειξε μικρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση διότι χρησιμοποιήθηκαν πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα στη μέθοδο του AAPH για το πρώτο δείγμα το IC₅₀ βρέθηκε ίσο με 1600 µg/ml. Στις Εικόνες 27, 28 δίνεται μια αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 1 και 2 αντίστοιχα σε πήκτωμα αγαρόζης.

1 2 3 4 5 6 7 8



Εικόνα 27: αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του 1^{ου} δείγματος που προέκυψε από spray dryer σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 200 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

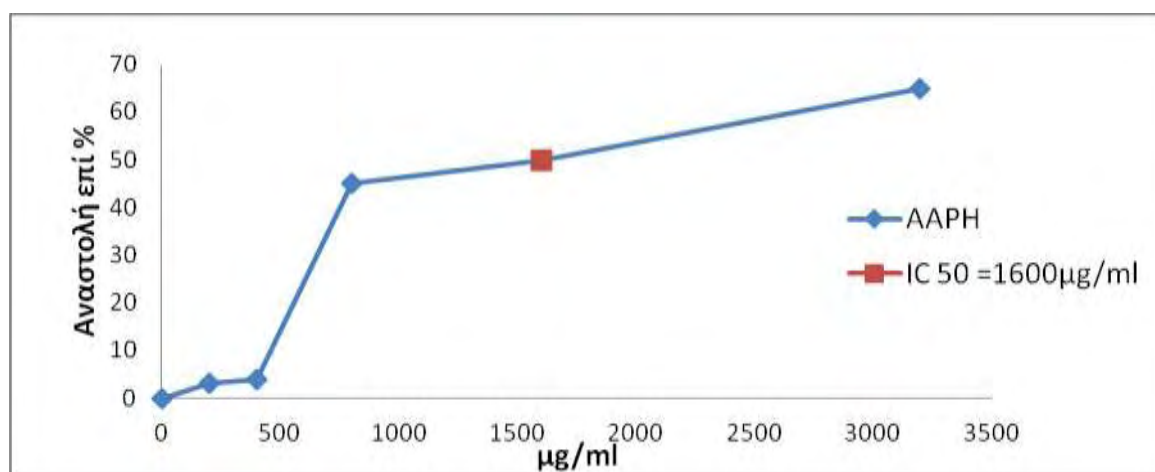
Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 400 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 800 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 1600 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

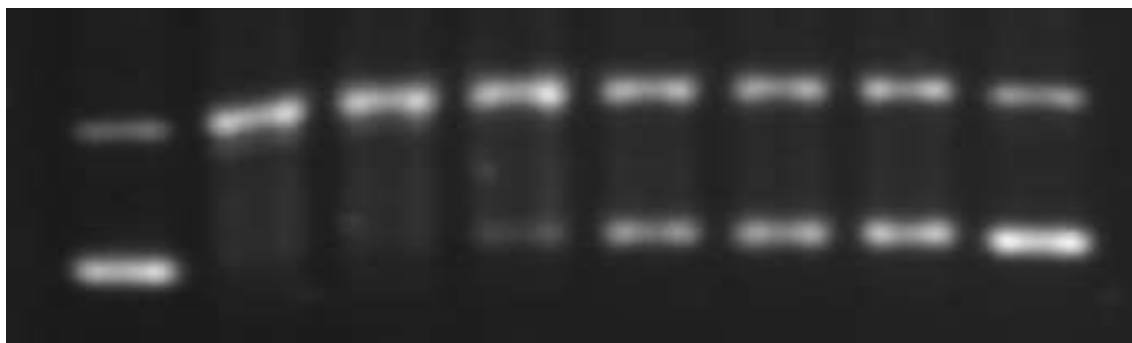
Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 3200 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 8: DNA plasmid + 3200 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης



Διάγραμμα 19: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 1 στις επαγόμενες από ρίζες AAPH ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA

1 2 3 4 5 6 7 8



Εικόνα 28: αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του 2^{ου} δείγματος που προέκυψε από spray dryer σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 200 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

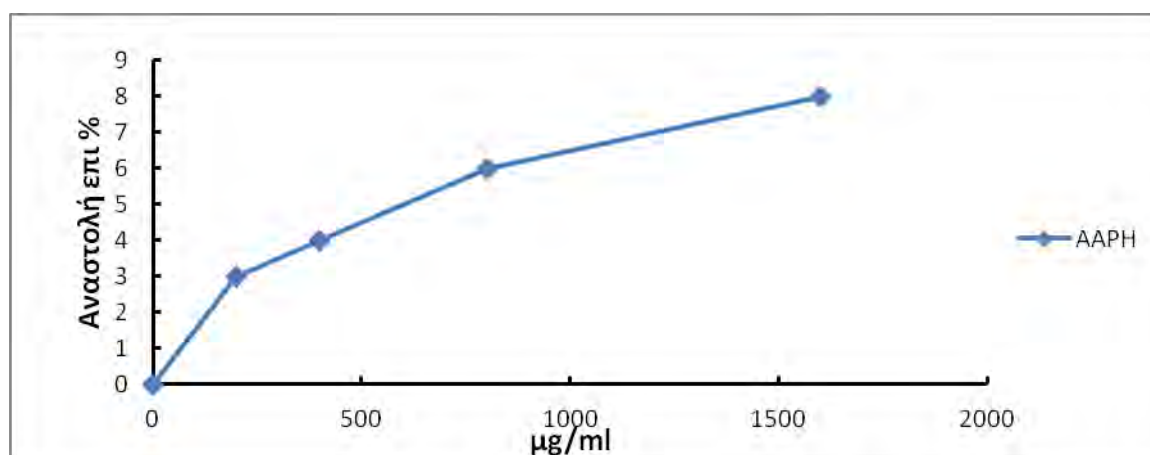
Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 400 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 800 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 1600 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 3200 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 8: DNA plasmid + 3200 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

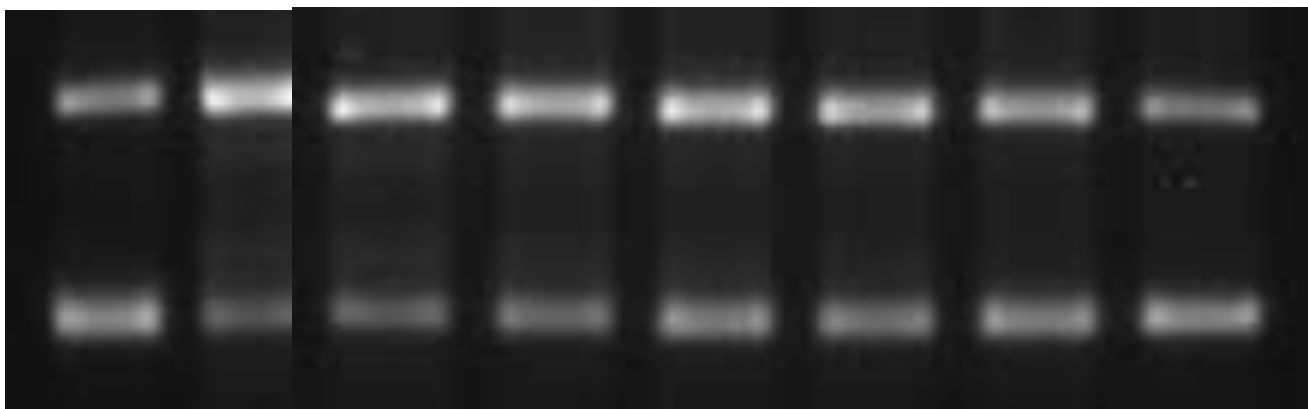


Διάγραμμα 20: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 2 στις επαγόμενες από ρίζες ΑΑΡΗ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA

3.5 Αποτελέσματα OH

Τα 2 εκχυλίσματα έδειξαν πολύ μικρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση όπως φαίνεται στα διαγράμματα 21 και 22. Η αναστολή δεν έφτασε το 50%.

1 2 3 4 5 6 7 8



Εικόνα 29: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του 1^{ου} δείγματος που προέκυψε από spray dryer σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + OH

Σειρά 3: DNA plasmid + OH + 200 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

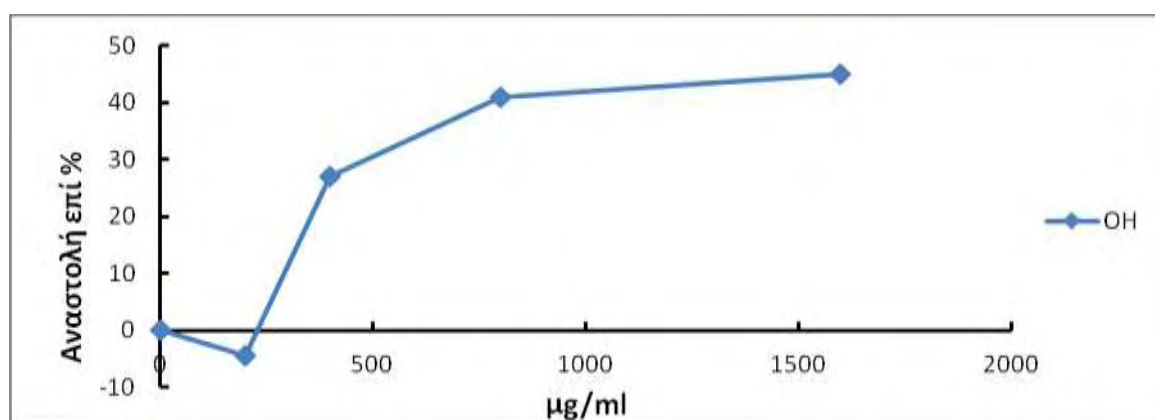
Σειρά 4: DNA plasmid + OH + 400 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 5: DNA plasmid + OH + 800 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 6: DNA plasmid + OH + 1600 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

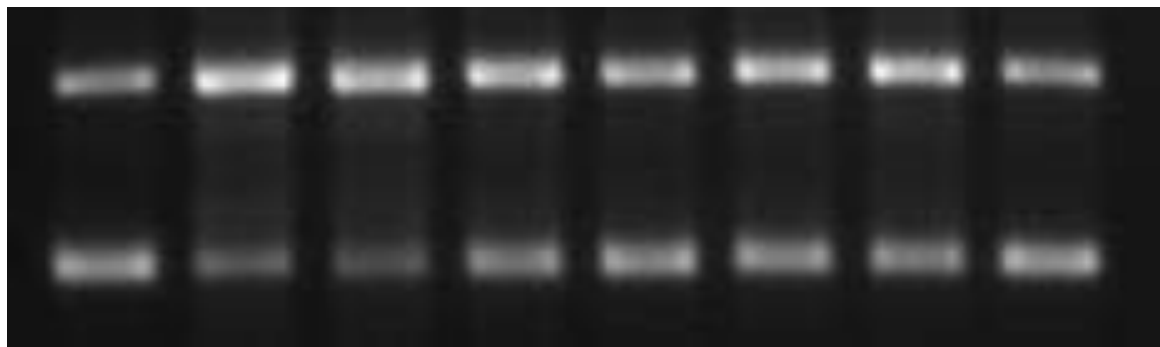
Σειρά 7: DNA plasmid + OH + 3200 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 8: DNA plasmid + 3200 µg/ml εκχυλίσματος σκόνης



Διάγραμμα 21: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 1 στις επαγόμενες από ρίζες OH ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA

1 2 3 4 5 6 7 8



Εικόνα 30: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του 2^{ου} δείγματος που προέκυψε από spray dryer σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + OH

Σειρά 3: DNA plasmid + OH + 200 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος σκόνης

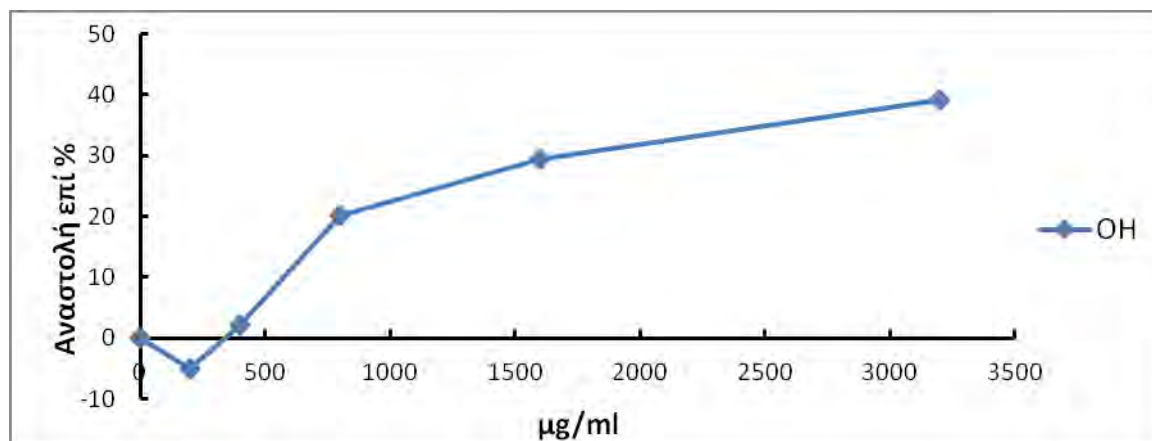
Σειρά 4: DNA plasmid + OH + 400 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 5: DNA plasmid + OH + 800 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 6: DNA plasmid + OH + 1600 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 7: DNA plasmid + OH + 3200 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος σκόνης

Σειρά 8: DNA plasmid + 3200 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος σκόνης



Διάγραμμα 22: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 2 στις επαγόμενες από ρίζες OH ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μεταλλάξεις που προκαλούνται στο DNA από διάφορους παράγοντες, όπως το οξειδωτικό στρες, θεωρούνται ένα σημαντικό στάδιο κατά την καρκινογένεση, καθώς και σε άλλες εκφυλιστικές διαδικασίες όπως είναι οι καρδιοπάθειες, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον) και η πρόωγη γήρανση (Wiseman και συν., 1995). Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες διαφόρων εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών, ιδιότητες οι οποίες αποδίδονται κυρίως στα πολυφαινολικά συστατικά που περιέχουν (Meyer et al, 1997; Torres et al, 2002). Το ενδιαφέρον για τις πολυφαινόλες οφείλεται στις σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους και στον πιθανό ρόλο τους στην πρόληψη ασθενειών, που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Στις μελέτες για την αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση της στέβιας έχουν χρησιμοποιηθεί εκχυλίσματα από αποξηραμένα φύλλα του φυτού σε υγρή και στερεή φάση.

Αρχικά, τα τελευταία δέκα χρόνια το φυτό στέβια έγινε ευρύτερα γνωστό και εκτός της χώρας προέλευσής του, της Παραγουάης. Η φήμη του εξαπλώθηκε ταχύτατα και στην Ελλάδα, κυρίως χάρη στα γλυκά συστατικά των φύλλων του. Περιέχει πλήθος γλυκαντικών ουσιών με σημαντικότερες εξ αυτών και πιο άφθονες τις, στεβιοσίδη και ρεβαουδιοζίτη Α. Απομονωμένες σε καθαρή μορφή είναι περίπου 300 φορές πιο γλυκές από τη ζάχαρη με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ανάγκη χρήσης μεγάλων ποσοτήτων. Αυτός είναι ο λόγος που η στέβια τείνει να αντικαταστήσει τη ζάχαρη σε παγκόσμιο επίπεδο. Ακολούθησαν έρευνες πάνω στο πολυφαινολικό περιεχόμενο των φύλλων της στέβιας και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση του.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πολυφαινόλες είναι χημικά βιοδραστικά μόρια που ενυπάρχουν στα φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, φαρμακευτικά φυτά. Αποτελούνται από φαινολικούς δακτυλίους και παίζουν το ρόλο δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά. Ενδεικτικά αναφέρονται τα φλαβονοειδή, τα πολυφαινολικά οξέα, τα στυλβένια και οι λιγνάνες. Δεν διαθέτουν όμως όλα τα είδη πολυφαινολών αντιοξειδωτική δράση και για αυτό το λόγο, ένα φυτικό εκχύλισμα με μεγαλύτερο πολυφαινολικό φορτίο μπορεί να έχει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από ένα άλλο (Apostolou A et al, 2013), (Veskoukis As et al 2012). Στη στέβια εμπεριέχονται κυρίως οι Quercetin, quercetin-3-O-β-D-arabinoside, kaempferol-3-O-rhamnoside, Apigenin, apigenin-4-O-β-D-glycoside, luteolin.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση (με τη χρήση μοριακών μεθόδων) της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, σε εκχυλίσματα στέβιας. Απομονώθηκαν υγρά εκχυλίσματα με βρασμό αποξηραμένων φύλλων στέβιας και εκχυλίσματα σε μορφή σκόνης μετά από τρία στάδια επεξεργασίας, βρασμό-πέραςμα από μεμβράνες υπερδιήθησης-ξήρανση μέσω ψεκασμού (spray dryer). Για την μελέτη των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν πέντε *in vitro* μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στον προσδιορισμό πολυφαινολικού φορτίου, στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} από αντιοξειδωτικές ενώσεις και στην πιθανή χημειοπροστατευτική δράση των

εκχυλισμάτων στην επαγόμενη οξειδωτική βλάβη του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως είναι οι ρίζες $\text{OH}\cdot$ και $\text{ROO}\cdot$. Προσδιορίστηκε το IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση-εξουδετέρωση των ριζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Όσον αφορά την ποσότητα πολυφαινολών που εμπεριέχονται στα αποξηραμένα φύλλα στέβιας, προσδιορίστηκε με τη μέθοδο folin ciocalteu. Τα υγρά εκχυλίσματα δεν περιείχαν μεγάλες ποσότητες πολυφαινολών (0,049 έως 0,066 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Αυτή η μικρή αύξηση παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα από τις 3 ώρες βρασμού και μετά. Από την άλλη πλευρά, τα στερεά εκχυλίσματα βρέθηκε ότι περιέχουν 49 και 56 μg πολυφαινολών/ mg ξηρού δείγματος. Στα στερεά το εκχύλισμα συλλέχθηκε μετά από 3 ώρες βρασμού, πέρασε από μεμβράνες κατακράτησης χρωστικών και μέρους των γλυκοζιτών και τέλος ξηράνθηκε με ψεκασμό. Φαίνεται λοιπόν ότι η μέθοδος της απομόνωσης των πολυφαινολών στέβιας με τη χρήση μεμβρανών είναι πολύ αποδοτική αφού αυξάνεται κατά πολύ η συγκέντρωσή τους σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα που απομονώθηκαν με βρασμό.

Αυτό άλλωστε μας δείχνουν και τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH. Το IC_{50} των υγρών εκχυλισμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 5 και 13 mg/ml , ενώ των στερεών ήταν 75 και 127 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Τα στερεά εκχυλίσματα παρουσίασαν 100 φορές περισσότερη αντιοξειδωτική δράση. Όπως είδαμε παραπάνω, τα στερεά εκχυλίσματα παρουσίασαν και 100 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινολών περίπου. Το συμπέρασμα είναι ότι η μέθοδος απομόνωσης με βρασμό-πέραςμα από μεμβράνες-ξηράνση είναι πολύ πιο αποδοτική από τον απλό βρασμό. Στη δοκιμή κατακράτησης περισσότερων χρωστικών και γλυκοζιτών με διαφορετική μεμβράνη, παρατηρήθηκε και κατακράτηση πολυφαινολών. Για αυτό το 2^ο δείγμα σκόνης που ήταν πιο ανοιχτόχρωμο έδειξε μικρότερη δράση εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH και μικρότερο περιεχόμενο πολυφαινολών. Το ABTS έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με το DPPH όπως αναμενόταν άλλωστε. Τα δείγματα σκόνης 1 και 2 παρουσίασαν IC_{50} , 50 και 130 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αντίστοιχα (διαγράμματα 17, 18).

Στη μέθοδο της επίδρασης ριζών AAPH επάνω στο πλασμιδιακό DNA τα εκχυλίσματα στέβιας μπορούσαν να αναστείλουν τις προκαλούμενες από ρίζες $\text{ROO}\cdot$ βλάβες στο πλασμιδιακό DNA, με τιμή IC_{50} για το πρώτο, λιγότερο καθαρό από γλυκοζίτες δείγμα, 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ενώ το δεύτερο δείγμα στα 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ έφτασε στο 9% αναστολή (διαγράμματα 19, 20). Η διαφορά είναι αρκετά μεγάλη και δείχνει πόσο πιο ισχυρό είναι το 1^ο δείγμα. Άρα κατακράτηση περισσότερων χρωστικών και άλλων στερεών από τα εκχυλίσματα λιγοστεύει και τις πολυφαινόλες. Όσον αφορά στην εξουδετέρωση της ρίζας $\text{OH}\cdot$, τα δύο εκχυλίσματα δεν παρουσιάστηκαν τόσο ισχυρά. Για τη συγκέντρωση 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ το πρώτο δείγμα έδειξε 45% αναστολή ενώ το δεύτερο 30% αναστολή. Δεν επετεύχθη IC_{50} . Αυτό έχει να κάνει με τη είδος της ρίζας. Δηλαδή, η ρίζα υδροξυλίου είναι πιο δραστική και αντιδρά με μεγαλύτερη ταχύτητα με το DNA σε σύγκριση με τη ρίζα περοξυλίου. Επίσης, έχουν γίνει και άλλες μελέτες, αν και περιορισμένες, από άλλους ερευνητές για τις πολυφαινόλες της

στέβιας. Για παράδειγμα, οι GHANTA και συνεργάτες (2007) ακολούθησαν μια λίγο διαφορετική μέθοδο εξαγωγής πολυφαινολών από φύλα στέβιας. Χρησιμοποίησαν υδατικά, μεθανολικά και αιθυλικής αλκοόλης εκχυλίσματα (crude methanolic extract (CAE) και ethyl acetate extract (EAE)) φύλων στέβιας. Το IC₅₀ του υδατικού εκχυλίσματος ενάντια στη ρίζα του DPPH ήταν 45,32 μg/ml. Συγκριτικά με το IC₅₀ του 1^{ου} και 2^{ου} δείγματός μας (75,127 μg/ml) είναι λίγο πιο δραστικό. Όσον αφορά τη δοκιμή με τη ρίζα OH• το IC₅₀ κυμάνθηκε από 3,08 έως 33,9 στο EAE. Δηλαδή τα εκχυλίσματα ήταν περίπου 50 φορές ισχυρότερα από αυτά της παρούσας έρευνας. Κυριότερη αιτία είναι η μέθοδος και ο τρόπος εκχύλισης αλλά ίσως να παίζει ρόλο και τυχόν διαφορετική ποικιλία στέβιας.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος των μεμβρανών είναι αρκετά αποδοτική όσον αφορά την απομόνωση των πολυφαινολών στέβιας. Βέβαια, μπορεί να βελτιωθεί αυτή η μέθοδος ώστε να αυξηθεί και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Έτσι, αν είναι δυνατή η απομόνωση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων στέβιας με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν μαζί με τους γλυκοζίτες για τη δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων που θα έχουν χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη αλλά και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

5. Βιβλιογραφία

- Afanas'ev, I.B. “Oxygen radicals in biological processes (survey)”. 1985. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 19 (1) , pp. 1-11.
- Alarcon De Lastra C, Martin MJ, Motilva V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacology*. 1994 48:56–62.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM., (1993), Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90:7915–22
- Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM, Kouretas D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem Toxicol*. 2013 Feb 1.
- Blochina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003 Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91: 179-194.
- Brandle, J. E.; Starratt, A. N.; Gijzen, M. *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. *Can. J. Plant Sci.* 1998, 78, 527–536. 9) Ohta, M.; Sasa, S.; et al. Characterization of Novel Steviol Glycosides from Leaves of *Stevia rebaudiana* Morita. *J. Appl. Glycosci.* 2010, 57, 199–209.
- Bravo L, “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance”, *Nutr Rev*, 56, (11): 317-33, 1998.
- Chu SC, Hsieh YS, Lin JY. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod*. 1992 55:179–183.
- Dai Q, Franke AA, Jin F, Shu XO, Hebert JR, Custer LJ, Cheng J, Gao YT, Zheng W. Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 11:815-821.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A., Capasso F, (1999), Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 4:337-353
- Della Loggia R, Tubaro A, Ori P, Zilli C, Del Negro P. Plant Flavonoids in Biology and Medicine. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1986 213:481–489.
- Dew T, Day A, Morgan M, “Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components” Department of Food Science, University of Leeds, 2005.
- Eaton-Evans J. Osteoporosis and the role of diet. *Br J Biomed Sci*. 1994 51:358–370

Ferguson Lynnette R, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*. 1993 341:454-457.

Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000 48:3597-3604.

Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 1999 10:71-75.

Gilbert D.L, “*Fifty years of radical ideas*”, *Ann NY Acad Sci*, 899:1, 2000

Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*

Halliwell B, Gutteridge JMC, “*Free Radicals in Biology and Medicine*”, 11: 416-493, 188-266, 1989.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002), Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships, *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993 342:1007-1011.

<http://books.google.gr/books?id=FYKT8ApFnj0C&pg=PA315&lpg=PA315&dq=Hertog,+M.+G.+L.;+Freskens,+E.+J.+M.;+Hollman,+P.+C.+H.;+Katan,&source=bl&ots=fG7VrPrpqd&sig=7WSYB30>

http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/68/Steviol_glycosides.pdf

http://www.freewebs.com/stevia_egypt/chemistryofstevia.htm

<http://www.lauralee.com/stevia.htm>

http://www.steviola.gr/stevia_plant.html

Kennelly, E. J. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. In: *Stevia, the Genus of Stevia, Medicinal and Aromatic Plants* □ *Industrial Profiles*; Kinghorn, A. D., Ed.; Taylor and Francis: London, 2002; ISBN 0-415-26830-3, pp 68–85.

Kinghorn, A. D. Overview. In: *Stevia, the Genus of Stevia, Medicinal and Aromatic Plants* □ *Industrial Profiles*; Kinghorn, A. D., Ed.; Taylor and Francis: London, 2002; ISBN 0-415-26830-3, pp 1–17.

Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996 312:478-481.

Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002 76: 560-568.

Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res*. 1994 54:1895s-1898s.

Madan Swati¹, Ahmad Sayeed², Singh G N¹, Kohli Kanchan³, Kumar Yatendra⁴, Singh Raman¹, Garg Madhukar² 2010. Stevia rebaudiana (Berr.) Bertoni- A review. *Indian journal of natural products and resources* 1(3): 267-286.

Manach Claudine, Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-47

Nijveldt R.J., van Nood Els, van Hoorn D.E.C., Boelens P. G, van Norren K., van Leeuwen P.A.M, (2001), Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential gynaecologic, *American Society for Clinical Nutrition*, 74:48-25

Prakash, I.; DuBois, G. E.; Clos, J. F.; Wilkens, K. L.; Fosdick, L. E. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food Chem. Toxicol*. 2008, 46, S75–S82.

Prior R, Xianli W, Schaich K, “*Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*”, *J Agric Food Chem*, , 53 (6) : 1841-1856, 2005

Rahman A, Shahabuddin, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis*. 1989 10:1833-1839

Ramesh, K.; Singh, V.; Megeji, N. W. Cultivation of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): A Comprehensive Review. *Adv. Agron*. 2006, 89, 137–177.

Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956

Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 2002 177:67-80.

Scalbert A. and Williamson G., (2000), Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols, *J.Nutrition*, 130:20735-855

Shahidi, F.; Wanasundara, P. K. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1992, 32, 67–103.

Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D, “*The role of oxidative stress in the genesis of heart disease*”, *CardioVasc Res*, 40: 426-432, 1998.

SRIJANI GHANTA, ANINDITA BANERJEE, AVIJIT PODDAR, AND SHARMILA CHATTOPADHYAY, Oxidative DNA Damage Preventive Activity and Antioxidant Potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a Natural Sweetener, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 10962–10967

Stagos D, Karaberis E and Kouretas D, (2005), Assesment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a compination of molecural methods, *In Vivo*: 741-747

Toyokuni S, “*Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation*”, *Biotherapy*, 11: 147-154, 1998.

Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res.* 1991 64:91–100.

Valavanidis A, “*Free radicals in organic chemistry*”, University of Athens, 2006.

Vaněk, T.; Nepovim, A.; Valiček, P. Determination of stevioside in plant material and fruit teas. *J. Food Compos. Anal.* 2001, 14, 383– 388.

Veskoukis Aristeidis, Kyparos Antonios, Michalis Nikolaidis, Stagkos Dimitrios, Chronis Konstantinos, Gkoutzourelas Nikolaos, Kouretas Dimitrios, (2011), The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape seed extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2012, Article ID 185867

Veskoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, Stagos D, Aligiannis N, Halabalaki M, Chronis K, Goutzourelas N, Skaltsounis L, Kouretas D. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;

Wolwer-Rieck, U.; Lankes, C.; Wawrzun, A.; Wüst, M. Improved HPLC method for the evaluation of steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *Eur. Food Res. Technol.* 2010, 231, 581– 588.

www.wikipedia.com

Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 307:230-236.

Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* 1999 68:468-472.

Κουρέτας Δημήτριος Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Λάρισα 2003

Σπανού Χρύσα, «Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών», Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα 2010