

Efecto inhibitorio *in vitro* de la *Stevia rebaudiana* sobre la glicación no enzimática de la Hemoglobina

Johanna E. Peña*, Herminia D. Gil, Yelinda Araujo, Jonathan Zambrano,
Jorge L. Uzcátegui, Alí Sulbarán, Dariana Erazo

Laboratorio de Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, La Hechicera,
Universidad de los Andes, Mérida, 5251, Venezuela.

(*) johannapm35@gmail.com

Recibido: 01/02/2025

Revisado: 05/03/2025

Aceptado: 06/04/2025

Resumen

Las hojas de la *Stevia rebaudiana* se han utilizado tradicionalmente como edulcorante en distintas regiones del mundo, teniendo grandes beneficios para la salud, especialmente en enfermedades con altos índices de mortalidad como la diabetes. El extracto acuoso de las hojas de esta especie demostró un significativo efecto inhibitorio *in vitro* sobre la glicación no enzimática de la hemoglobina, a medida que se aumenta la concentración de *S. rebaudiana* el porcentaje de hemoglobina glicada disminuye. Estos resultados sugieren que la *S. rebaudiana* es un potencial antidiabético que puede ayudar a la prevención de las complicaciones secundarias de la diabetes.

Palabras claves: *Stevia rebaudiana*; glicación; hemoglobina; diabetes; actividad hipoglucemiante

Abstract

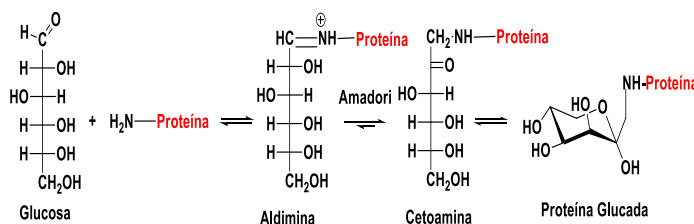
In vitro inhibitory effect of *Stevia rebaudiana* on non-enzymatic glycation of hemoglobin. *Stevia rebaudiana* leaves have traditionally been used as a sweetener in different regions of the world, having great health benefits, especially in diseases with high mortality rates such as diabetes. The aqueous extract of the leaves of this species demonstrated a significant inhibitory effect *in vitro* on the non-enzymatic glycation of hemoglobin; as the concentration of *S. rebaudiana* increases, the percentage of glycated hemoglobin decreases. These results suggest that *S. rebaudiana* is a potential antidiabetic that may help prevent secondary diabetic complications.

Keywords: *Stevia rebaudiana*; Glycation; Hemoglobin, Diabetes, Hypoglycemic activity

Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad que presenta un grupo de alteraciones metabólicas que se caracterizan por elevados niveles de glucosa en la sangre, seguido de una alteración en la secreción de la insulina y su escasa utilización por el organismo. Esta enfermedad afecta a múltiples órganos, puede presentar secuelas en los ojos, riñones, corazón y extremidades, provocando enfermedades cardiovasculares (arteriosclerosis), microangiopatía, retinopatía, neuropatía periférica y cataratas, todas estas desarrolladas muy lentamente¹. El mecanismo propuesto que explica el daño de los tejidos producido por el exceso de glucosa en sangre en la diabetes mellitus es la glicación no enzimática de proteínas o reacción de Maillard².

La glicación no enzimática (esquema 1) comienza con la reacción entre los grupos amino libres de las proteínas y los grupos carbonilo de la cadena abierta de azúcares reductores, para formar una aldimina o base de Schiff, seguido de un re-arreglo de Amadori que conduce a la formación de una cetamina estable o producto de Amadori, el cual es estabilizado por la formación de un hemiacetal cíclico: proteína glicada^{3,4}. El producto de Amadori sufre una serie de reacciones y forma los productos de



Esquema 1. Mecanismo general de glicación de las proteínas⁴

glicación avanzada o (AGE, por sus siglas en inglés *Advanced Glycation End*)³.

En condiciones fisiológicas la formación de AGEs depende, por un lado, de la concentración de azúcares reductores y, por el otro, del tiempo de exposición de la proteína a los mismos (vida media de la proteína). En proteínas de recambio rápido, el proceso de glicación no enzimática no supera en general las etapas iniciales (formación de la base de Schiff y eventualmente la del producto de Amadori), mientras que las de vida media larga llegan a formar los productos de glicación avanzada⁵.

En las últimas décadas se han encontrado evidencias que la gli-

cación puede alterar las funciones y/o estructuras características de las proteínas, cuyos productos finales (AGEs) de reacción son irreversibles y a nivel fisiológico altamente perjudiciales, además de jugar un papel fundamental en el desarrollo de las complicaciones secundarias de la diabetes mellitus, del normal envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer^{3,6,7}.

Las complicaciones de la diabetes inducida por la hiperglucemia se originan en gran medida por cambios químicos y funcionales de las proteínas, alteración en la expresión de los genes y daño del endotelio⁸. La glicación no enzimática de la hemoglobina tiene gran importancia en la diabetes puesto que los estudios muestran que los niveles de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) aumenta en los pacientes con hiperglucemia. La hemoglobina glicada refleja la concentración promedio de glucosa durante el tiempo de vida de los eritrocitos⁹. Las medidas de hemoglobina glicada son rutinariamente utilizadas como el parámetro más simple y confiable para evaluar el control glucémico en pacientes diabéticos.

El estudio de compuestos naturales que puedan inhibir la glicación no enzimática de las proteínas presenta gran interés. Tal es el caso de pruebas realizadas *in vitro* con el extracto de la planta *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae), llamada popularmente “casco de vaca”, que mostraron una disminución en los niveles del porcentaje de hemoglobina glicada (%HbA_{1c}) comparado con el %HbA_{1c} sin muestra vegetal bajo las mismas condiciones de reacción⁹, así como el efecto de los triterpenos aislados de la *Origanum majorana* sobre la glicación de las proteínas¹⁰.

También se han realizado varios estudios *in vivo* demostrando el mismo efecto de diversas especies vegetales tales como: el extracto crudo del fruto *Morinda citrifolia* L. (noni), encontraron una disminución de niveles de glucosa en *Rattus rattus* var. *Norvegicus*¹¹, al igual que la suplementación diaria con extracto de las hojas de *Pisidium guajava* L. (guayaba) en *Rattus rattus* var. *albinus*¹². Similarmente, algunos compuestos activos del extracto etanólico de *Ibervillea sonora* presentaron efecto hipoglucemiante en ratas Wistar¹³.

Las plantas son una rica fuente para explorar como antidiabéticos potencialmente útiles. El efecto anti hiperglucémico de estas plantas es debido a su capacidad para restaurar la función de tejidos pancreáticos mediante el aumento de la producción de insulina o de inhibir la absorción intestinal de la glucosa. Tal es el caso de la especie *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae) conocida también como hoja dulce de Paraguay¹⁴. Las hojas de esta planta, además de tener actividad antihiperglicemiante^{15,16}, también presenta actividad antihipertensiva¹⁷, sus extractos crean defensas impidiendo el crecimiento de organismos patógenos que afectan el sistema inmunológico¹⁸.

Actualmente se ha enfocado mucho interés en el uso de ciertos compuestos para prevenir la glicación y/o la formación de los productos de entrecruzamiento *in vivo* o *in vitro*. La formación del producto de Amadori representa un punto importante para inhibir este proceso ya que, si se bloquean los carbonilos reactivos en dicho producto, la reacción no formaría los AGEs. En

este trabajo se propone evaluar, mediante un ensayo *in vitro*, el efecto inhibitorio del extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana* en la glicación no enzimática de la hemoglobina. Estudios previos han demostrado que la *S. rebaudiana* tiene la capacidad de inhibir la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs)²⁰, aportando información importante para el tratamiento de las complicaciones secundarias de la diabetes.

Parte experimental

Material vegetal

La especie *Stevia rebaudiana* Bertoni fue recolectada en el Laboratorio de Cultivos *in vitro* de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes, en marzo de 2012. El voucher specimen (*S. rebaudiana* Bertoni, 01 J. Peña) fue depositado en el herbario Ruiz Terán de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Preparación del extracto

Las hojas secas y molidas de *S. rebaudiana* aproximadamente 132,47 g, fueron colocadas con 633 mL de agua 18 Ω a 60 °C durante 30 minutos¹⁹. El extracto fue filtrado y liofilizado en un equipo LABCONCO, el sólido obtenido (40,78 g) fue conservado a -4 °C. Las muestras se prepararon con el liofilizado de la planta a concentraciones iniciales de 5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL en buffer fosfato 4,8 mM a pH 7,3 para realizar una evaluación *in vitro* de su efecto inhibitorio sobre la glicación no enzimática de la hemoglobina.

Ensayos con la hemoglobina

Todos los reactivos utilizados fueron de alta pureza: hemoglobina humana cristalizada proporcionada por Sigma Chemical Co, fosfato de sodio dibásico Na₂HPO₄ y fosfato de sodio monobásico NaH₂PO₄ Riedel-de Haën, cloruro de sodio NaCl Fisher Chemical Co y D-glucosa 2-h. C₆H₁₂O₆. H₂O Merck.

Se prepararon soluciones buffer fosfato a pH = 7,3 mediante la mezcla de volúmenes apropiados de fosfato de sodio dibásico (10 mM) y fosfato de sodio monobásico (10 mM) y NaCl (0,15 M).

Las muestras se prepararon con 2 mL de una solución estéril de hemoglobina humana a 9,3 x10⁻² mM en NaCl 0,15 M que fue mezclada con 2 mL de solución estéril de glucosa 40 mM en buffer fosfato 4,8 mM, pH 7,3 en ausencia y en presencia de 1 mL del extracto inicial de la planta a diferentes concentraciones de 1 mg/mL, 2 mg/mL y 4 mg/mL, disueltos en buffer fosfato 4,8 mM a pH 7,3. Las mezclas de reacción fueron colocadas en tubos estériles e incubadas a 37 °C durante 28 días con agitación constante. Todas las soluciones fueron esterilizadas por ultrafiltración a través de Acrodiscos Sartorius 0,20 μm y las muestras de reacción fueron preparadas por triplicado en tubos de ensayo estériles Vacutainer con tapa hermética de goma. Las velocidades de glicación de la hemoglobina, bajo atmósfera de aire, fueron medidas monitorizando la aparición del producto

glicado (HbA_{1C}). Las concentraciones de hemoglobina glicada [HbA_{1C}] y hemoglobina total [HbA_{total}] se determinaron a diferentes tiempos de reacción por cromatografía de intercambio iónico (kit Teco diagnostics) y la absorbancia de HbA_{1C} y HbA_{total} por espectroscopia ultravioleta – visible (UV-visible) con un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo Lambda 2, software PECSS a una longitud de onda de 415 nm.

Se cuantificó la formación de HbA_{1C} una vez obtenida la absorbancia de la HbA_{1C} y HbA_{total} a diferentes intervalos de tiempo de reacción, tomando en cuenta el factor de corrección por la dilución del método empleado, mediante la siguiente relación:

$$\%HbA_{1C} = \frac{AbsHbA_{1C}}{AbsHbA_{total}} \times 100 \quad (1)$$

Las constantes de velocidad de pseudo primer orden fueron determinadas con los valores de la concentración en porcentaje de hemoglobina [HbA_{1C}] en función del tiempo y un procedimiento no lineal de mínimos cuadrados utilizando la ecuación 2, mediante el programa Origin versión 5.0.

$$[HbA_{1C}]_t = [HbA_{1C}]_{\infty} + ([HbA_{1C}]_0 - [HbA_{1C}]_{\infty}) e^{-kt} \quad (2)$$

en donde:

[HbA_{1C}]_t = concentración hemoglobina glicada (%) a tiempo t

[HbA_{1C}]_∞ = concentración de hemoglobina glicada (%) a tiempo infinito

[HbA_{1C}]₀ = concentración inicial de la hemoglobina glicada

k = constante velocidad.

t = tiempo

Resultados y discusión

En la tabla 1 se muestran los valores obtenidos en el ensayo *in vitro* de los porcentajes de formación de hemoglobina glicada (%HbA_{1C}) en función del tiempo, representando un promedio de %HbA_{1C} ± desviación estándar con n = 3. Variando las concentraciones de *Stevia rebaudiana* final entre (1-4) mg/mL. Se mantuvieron fijas las concentraciones de hemoglobina, glucosa y buffer fosfato en 9,3x10⁻², 40 y 4,8 mM, respectivamente, a pH 7,3 y 37 °C. Las constantes de velocidad se determinaron usando un procedimiento no lineal empleando la ecuación 2.

Tabla 1. Porcentaje promedio de hemoglobina glicada a diferentes concentraciones *S. rebaudiana* en función del tiempo a 37 °C y pH 7,3.

Tiempo (horas)	%HbA _{1C} [<i>Stevia rebaudiana</i>]			
	0 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
19,38	35,77 ± 0,12	33,84 ± 0,01	30,18 ± 0,13	22,40 ± 0,12
69,6	42,59 ± 0,11	39,32 ± 0,09	37,49 ± 0,07	28,34 ± 0,15
114,27	48,79 ± 0,16	45,27 ± 0,12	43,21 ± 0,18	34,16 ± 0,22
162,01	52,84 ± 0,17	48,97 ± 0,06	46,91 ± 0,13	41,15 ± 0,12
211,32	62,12 ± 0,23	57,61 ± 0,14	55,55 ± 0,17	45,95 ± 0,16
354,63	77,01 ± 0,11	75,44 ± 0,19	72,49 ± 0,19	63,31 ± 0,17
477,01	83,33 ± 0,12	81,27 ± 0,07	77,23 ± 0,12	71,43 ± 0,13
570,63	83,73 ± 0,02	81,35 ± 0,10	79,36 ± 0,24	76,43 ± 0,13
666,72	83,85 ± 0,12	81,67 ± 0,13	80,24 ± 0,16	77,91 ± 0,08

Se observa en la tabla 1 el porcentaje de formación de HbA_{1C} en función del tiempo. La formación de hemoglobina glicada aumenta con el tiempo para ambos casos, pero la reacción es más lenta a medida que se aumenta la concentración del extracto de *S. rebaudiana* bajo las mismas condiciones. Se encontró que la presencia del extracto vegetal causa una disminución en los niveles de porcentaje de HbA_{1C} comparado con el %HbA_{1C} sin muestra vegetal. El resultado es indicativo del efecto inhibitorio de *S. rebaudiana* sobre la glicación no enzimática de la hemoglobina.

Se compararon los porcentajes de formación de HbA_{1C} en ausencia y con la máxima concentración utilizada del extracto de la planta, determinando su diferencia en función del tiempo, bajo las mismas condiciones de reacción (tabla 2). Esta diferencia nos indica el % de HbA_{1C} inhibido por extracto vegetal, observando que este disminuye con el tiempo de reacción (aproximadamente 28 días) debido a que ya no hay presencia del azúcar o la hemoglobina inicial.

En la figura 1 se muestran los porcentajes de formación de hemoglobina glicada HbA_{1C} en función del tiempo en ausencia y en presencia del extracto de *S. rebaudiana*. Se observa que el porcentaje de hemoglobina glicada HbA_{1C} aumenta con

Tabla 2. Porcentaje de hemoglobina glicada en ausencia y en presencia de 4mg/mL del extracto *S. rebaudiana* y su diferencia en función del tiempo a 37 °C y pH 7,3.

Tiempo (hora)	%HbA _{1C} (sin <i>S. rebaudiana</i>)	%HbA _{1C} (4 mg/mL de <i>S. rebaudiana</i>)	%HbA _{1C} (sin <i>S. rebaudiana</i>) - %HbA _{1C} (4 mg/mL <i>S. rebaudiana</i>)
19,38	35,77	22,4	13,37
69,6	42,59	28,34	14,25
114,27	48,79	34,16	14,63
162,01	52,84	41,15	11,69
211,32	62,12	45,95	16,17
354,63	77,01	63,31	13,70
477,01	83,33	71,43	11,90
570,63	83,73	76,43	7,30
666,72	83,85	77,91	5,94

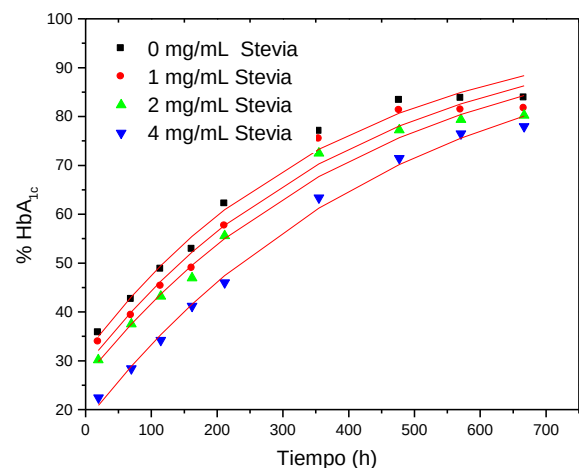


Fig. 1: Efecto de la concentración de *S. rebaudiana* sobre la glicación no enzimática de hemoglobina con glucosa en buffer fosfato 4,8 mM a 37 °C y pH 7,3.

el tiempo de reacción, pero la glicación es menor en presencia de *S. rebaudiana*, indicando un efecto inhibitorio por parte de esta especie vegetal en la reacción de glicación no enzimática de la hemoglobina.

La tabla 3 muestra las constantes de velocidad de pseudo primer orden para la glicación no enzimática de la hemoglobina en función de la concentración del extracto de *S. rebaudiana* bajo las mismas condiciones. La disminución de las constantes de velocidad con el aumento de la concentración del extracto de *S. rebaudiana* nos confirma el poder inhibitorio que tiene la planta.

Tabla 3. Constantes de velocidad de pseudo primer orden para la reacción de glicación no enzimática de hemoglobina a diferentes concentraciones de *S. rebaudiana* a 37 °C y pH 7,3.

[<i>S. rebaudiana</i>] mg/mL	$k_{obs} \times 10^7 \text{ s}^{-1}$	t-student
0	$7,39 \pm 0,50$	
1	$6,86 \pm 0,53^*$	1,2601
2	$6,44 \pm 0,39^*$	2,5949
4	$5,92 \pm 0,19^{**}$	4,7619

* Sin diferencia estadísticamente significativa con la reacción sin extracto ($\alpha = 0,05$)

** Hay diferencia estadísticamente significativa con la reacción sin extracto ($\alpha = 0,05$)
 α : significancia

Conclusiones

Los valores obtenidos en este estudio *in vitro* sugieren que la *Stevia rebaudiana* presenta un efecto inhibitorio sobre la glicación no enzimática de la hemoglobina y, además, podría ser de gran ayuda terapéutica en el tratamiento de la diabetes, ya que las constantes de velocidad para la reacción disminuyen en presencia del extracto de *S. rebaudiana*, y con el aumento de la concentración de éste; el mismo efecto se ha encontrado en estudios *in vivo*¹⁶. Se encontró que para una concentración de extracto de 4 mg/mL la constante de velocidad de la glicación mostró una diferencia estadísticamente significativa con la de la reacción sin extracto (para una significancia con $\alpha = 0,05$).

Se desconoce el mecanismo de acción por el cual la *Stevia rebaudiana* podría prevenir la glicación, ya que existen muchos factores que pueden influir; una posibilidad, debido a la afinidad de algunos compuestos presentes en esta planta para atacar los grupos carbonilos del producto de Amadori, es la inhibición de la reacción entre alguno de estos compuestos y los grupos de proteínas de la sangre, para evitar la formación de los AGEs. Igualmente, alguno de los compuestos presentes en la *Stevia rebaudiana* podría actuar bloqueando los sitios de ataque de la glucosa, compitiendo con los grupos amino libres de la hemoglobina, reduciendo la formación del producto de Amadori y, además, disminuyendo los niveles de producción de los AGEs.

La metodología ensayada con la planta *Stevia rebaudiana* no requiere de sistemas biológicos *in vivo*, proporciona útil información como es, la cuantificación precisa y confiable de la concentración de glucosa y de la cantidad de hemoglobina glicada, y puede ser utilizada como un ensayo preliminar para evaluar el efecto de las plantas medicinales sobre la disminu-

ción de la glucosa, la inhibición en la glicación no enzimática de la hemoglobina y sus posibles actividades biológicas ya que tiene la ventaja de ser un análisis rápido y una técnica sencilla.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al CDCHTA de la Universidad de Los Andes, proyecto C-1947-15-08-B.

Referencias

1. S Dodds. The How-To for Type 2: An Overview of Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes Mellitus. **Nursing Clinics of North America**, **52**, 513-522 (2017).
2. H Vlassara. Intervening in Atherogenesis: Lessons from Diabetes. **Hospital Practice**, **35**, 25-39 (2000).
3. H Vlassara, J Urbina. Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both? **Current Diabetes Reports**, **14**, 1-10 (2014).
4. J Peña, and H Gil. Effect of buffer phosphate in the reaction of hemoglobin with fructose. **Avances en Química**, **9**, 49-53 (2013).
5. E Cohen. La glicosilación no enzimática: una vía común en la diabetes y el envejecimiento. **Medicina Cutánea Ibero-Latino Americana**, **39**, 243-246 (2011).
6. M Brownlee. The Pathobiology of Diabetic Complications. **Diabetes**, **54**, 1615-1625 (2005).
7. M Bracho, M Bozo, A Duran, M Sindas, V Stepenka, Y Riva. Hemoglobina Glicosilada o Hemoglobina Glicada, ¿Cuál de las dos? **Saber**, **27**, 521-527 (2015).
8. D Heredia, D Fernández, J Rodríguez, E Rodríguez, L Santana, E González, et al. La hiperglucemia y el daño oxidativo a lípidos y proteínas. **Acta Bioclinica**, **7**, 65-79 (2017).
9. C de los Ríos, H Gil, D Hidalgo. Efecto de la *Bauhinia variegata* sobre los niveles de glucosa. **Ciencia**, **8**, 100-106 (2000).
10. L García. Efecto de los triterpenos aislados de la *Origanum majorana* sobre la glicación de las proteínas. Proyecto de tesis de Ingeniero Químico Industrial. Instituto Politécnico Nacional. Distrito Federal. México (2015).
11. F Arroyo, S Briones. Efecto protector del extracto crudo del fruto *Morinda citrifolia* L (noni), sobre los niveles séricos de glucosa en *Rattus rattus* var. *Norvegicus*. Proyecto de Tesis. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú (2016).
12. J Avalos. Efecto hipoglucemiante de la suplementación diaria con extracto de "*Pisidium guajava* L." en *Rattus rattus* var albinus. Tesis para obtener el título profesional de Médico Cirujano. Universidad César Vallejos, Trujillo, Perú (2016).
13. M García. Identificación química y farmacológica de compuestos activos de *Ibervillea sonora* como hipoglucemiante. Tesis de Maestría en Ciencias de Bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México (2013).
14. A Kinghorn, D Soejarto. Stevioside. Alternative Sweetener. Eds. O'Brien NL, Gelardi RC. Dekker, New York. 2, 157-171 (1991).

15. S Gregersen, P Jeppesen, J Holst, K Hermansen. Anti-hyperglycemic effects of Stevioside in Type 2 diabetic subjects. **Metabolism**, **53**, 73-76 (2004)
16. A Chowdhury, M Alam, M Raihan, T Rahman, S Islam, O Halima. Effect of stevia leaves (*Stevia rebaudiana* Bertoni) on diabetes: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. **Food Science Nutrition**, **10**, 2868–2878 (2022).
17. P Chan, B Tomlinson, Y Chen, J Liu, M Hsieh, J Cheng. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. **British Journal of Clinical Pharmacology**, **50**, 215-20 (2000).
18. T Tomita, N Sato, T Arai. Bactericidal activity of a fermented hot-water extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. **Microbiol. Immunol.**, **41**, 1005-9 (1997).
19. B Tedesse. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni and *Ajuga remota* Benth grown in Ethiopia on alloxan-induced diabetic mice. Thesis. Master of Science in Medicinal Chemistry. Addis Ababa University. Addis Ababa. Ethiopia (2008).
20. N Escutia, R Cruz, E Cano, V García, Y Rodríguez, E Sánchez, & R Mora. Efecto de la capacidad antioxidante y antiglicación *in vitro* del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Revista Bio Ciencias**, **7**, 16. (2020).