



## Effect of aqueous *Stevia rebaudiana* Bertoni extract in antioxidant and antiglycation capacity *in vitro*

## Efecto de la capacidad antioxidante y antiglicación *in vitro* del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Escutia-López, K. N., González-Montoya, M., Cruz-Ortiz, R., Cano-Sampedro, E., Rodríguez- Rivero, Y., Sánchez-Pardo, M. E., Mora-Escobedo, R\*.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu 699, C.P.07738. Ciudad de México, CDMX, México.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Escutia-López, K. N., González-Montoya, M., Cruz-Ortiz, R., Cano-Sampedro, E., Rodríguez- Rivero, Y., Sánchez-Pardo, M. E., Mora-Escobedo, R. (2020). Effect of aqueous *Stevia rebaudiana* Bertoni extract in antioxidant and antiglycation capacity *in vitro*. *Revista Bio Ciencias* 7, e875. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e875>



### ABSTRACT

Diabetes is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia with alterations in the metabolism of carbohydrates, fat, and proteins. Supplementation with natural antioxidants could have a beneficial effect on diabetic's health, therefore the aim of this study was to determine the effect of an aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni (AES) at different concentrations on the capacity to inhibit the formation of fluorescent Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in a 21 days glycation BSA/glucose/fructose model. The antioxidant capacity of these extracts was evaluated with different techniques as Total phenolic content, Ferric reducing power (FRAP), Hydroxyl radical and DPPH free radical scavenging

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: November 13<sup>th</sup> 2019.

Accepted/Aceptado: April 25<sup>th</sup> 2020.

Available on line/Publicado: May 20<sup>th</sup> 2020.

#### \*Corresponding Author:

Mora-Escobedo, R. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu 699, C.P.07738. Ciudad de México, CDMX; México. E-mail: [rosalmorae@gmail.com](mailto:rosalmorae@gmail.com)

### RESUMEN

La diabetes es un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Se ha sugerido que la suplementación con antioxidantes naturales podría tener un efecto benéfico sobre la salud de los pacientes con esta patología, por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de un extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni (AES) a diferentes concentraciones sobre la capacidad de inhibir la formación de productos finales de glicación avanzada fluorescentes (AGEs) en un modelo de glucosilación de albúmina de suero bovino/glucosa/fructosa de 21 días. La capacidad antioxidante de estos extractos se evaluó con diferentes técnicas como contenido fenólico total, poder reductor férrico (FRAP), radical hidroxilo y actividad de eliminación de radicales libres DPPH. Además, se realizó la cuantificación de esteviósidos presentes en el extracto mediante UHPLC MS/MS. Se encontró que el extracto acuoso exhibió una alta actividad anti-glicación. El contenido

activity. Additionally it was performed UHPLC MS/MS for steviosides quantification. AES exhibit a high anti-glycation activity. The total polyphenol content of extracts of *S. rebaudiana* was  $20.1 \pm 0.4$  mg GAE/g. The percent inhibition on hydroxyl radical scavenging was 13.03 %, 14.36 % and 17.51 %, for each concentration in a dose-dependent manner. For DPPH radical scavenging, the higher concentration (10 mg/mL) showed higher activity, with an inhibition of 60 % to 72.37 %. AES showed an antioxidant capacity which may be due to compounds with antioxidant activity reported in stevia leaves as phenolic compounds which also exhibit a high anti-glycation activity. Antioxidant compounds of AES can suppress the effect on AGEs formation and protein oxidation.

---

## KEY WORDS

---

*Stevia rebaudiana* Bertoni, advanced glycation end products, antiglycation activity, antioxidant activity.

---

## Introduction

Diabetes is defined as a metabolic disorder of multiple etiology characterized by chronic hyperglycemia with alterations in the metabolism of carbohydrates, fat, and proteins resulting from defects in the secretion, action of insulin, or both (Ballali & Lanciai, 2012). The elevation and accumulation of glucose in the bloodstream is progressive and is associated with a high risk of atherosclerosis, kidney damage, neuronal and blindness, which makes it one of the main causes of morbidity and mortality in the world (Neeland & Patel, 2019).

The prevalence of type 2 diabetes mellitus has increased by 30 % globally in the past decade, with the number affected increasing from 333 million in 2005 to 435 million in 2015 (Dunlay *et al.*, 2019). This also implies an increase in the related risk factors, such as overweight or obesity (WHO, 2017).

In type 2 diabetes mellitus there is an increase in oxidative stress and a decrease in antioxidant defense systems, which have been implicated in the etiopathogenesis of the disease and in the appearance

total de polifenoles de los extractos de *S. rebaudiana* Bertoni fue de  $20.1 \pm 0.4$  mg GAE/g. El porcentaje de inhibición sobre la eliminación de radicales hidroxilo fue de 13.03 %, 14.36 % y 17.51 % para cada concentración en un comportamiento dependiente de la dosis. Para la eliminación de radicales DPPH, la concentración más alta (10 mg/mL) mostró la mayor actividad, con una inhibición del 60 % al 72.37 %. La capacidad antioxidante del AES puede deberse a compuestos con actividad antioxidante encontrados en las hojas de *S. rebaudiana* Bertoni tales como compuestos fenólicos que también exhiben una alta actividad anti-glicación. Los compuestos antioxidantes presentes en el extracto pudieron suprimir el efecto sobre la formación de productos finales de glicación avanzada y de la oxidación de proteínas.

---

## PALABRAS CLAVE

---

*Stevia rebaudiana* Bertoni, productos finales de glicación avanzada, actividad antiglicación, actividad antioxidante.

---

## Introducción

La diabetes se define como un trastorno metabólico de etiología múltiple caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas como resultado de defectos en la secreción, acción de la insulina o ambos (Ballali & Lanciai, 2012). La elevación y acumulación de glucosa en el torrente sanguíneo es progresiva y se asocia con un alto riesgo de aterosclerosis, daño renal, neuronal y ceguera, lo que la convierte en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo (Neeland & Patel, 2019).

La prevalencia de diabetes tipo 2 se ha incrementado en un 30 % a nivel mundial en la última década, y el número de afectados aumentó de 333 millones en 2005 a 435 millones en 2015. (Dunlay *et al.*, 2019) Esto también implica un incremento en los factores de riesgo relacionados, como el sobrepeso o la obesidad. (WHO, 2017).

En los pacientes con diabetes tipo 2 existe un aumento en el estrés oxidativo y una disminución en los sistemas de defensa antioxidante, que se han implicado en la etiopatogenia de la enfermedad y en la aparición de complicaciones crónicas. Los mecanismos que pueden contribuir al deterioro del equilibrio en pacientes diabéticos

of chronic complications. The mechanisms that can contribute to the deterioration of the balance in diabetic patients are different, particularly in subjects with inadequate glucose control (hypo and hyperglycemia) and elevated triglycerides (hypertriglyceridemia) (Teodoro *et al.*, 2018).

A high glucose concentration on bloodstream often react binding proteins, and this process is called protein glycation. The products from glycation may accumulate and bind to plasma membrane, circulating and structural proteins. The formation of reduced sugars-amino groups of protein complexes (Amadori products) induces further oxidative modifications to generate Advanced Glycation Endproducts (AGEs) which are associated with the oxidative stress, the increased expression of extracellular matrix proteins, cytokines and inflammation, whose leads to development and acceleration of diabetes complications (Fournet *et al.*, 2018). These mechanisms participate in the formation of free radicals in diabetic patients including the increase of non-enzymatic glycation, auto-oxidative and metabolic stress as a result of changes in metabolism, level of mediators of inflammation and state of the antioxidant defense system (Fuentes *et al.*, 2015).

Antioxidants are compounds or systems that delay oxidation by preventing the formation of free radicals or interrupting their propagation. One of the most common components attributed to antioxidant capacity in plants are phenolic compounds. The phenolic compounds can be divided into several groups such as phenolic acids, phenolic diterpenes, flavonoids, and volatile oils (Najafian & Moradi, 2017).

These compounds constitute a broad group of secondary plant metabolites widely distributed in plants that are fundamental in the signaling and defense mechanism. Its importance lies in the prevention of damage due to stress by pathogenic and predatory organisms; also, it has a function as precursors of compounds of greater complexity, in the intervention in processes of regulation and control of plant growth (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

Phenolic compounds in food play an essential role in the defense against aging and chronic diseases such as diabetes mellitus type 2, cancer and cardiovascular disease among others (Ighodaro & Akinloye, 2018).

son variados, particularmente en sujetos con control de glucosa inadecuado (hipo e hiperglucemia) y triglicéridos elevados (hipertrigliceridemia) (Teodoro *et al.*, 2018).

Una alta concentración de glucosa en el torrente sanguíneo a menudo reacciona enlazándose a proteínas, y este proceso es conocido como glicación de proteínas. Los productos de la glicación pueden acumularse y unirse a la membrana plasmática, a las proteínas circulantes y estructurales. La formación de grupos amino-azúcares reducidos de complejos proteicos (productos de Amadori) induce modificaciones oxidativas adicionales para generar productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés) que están asociados con el estrés oxidativo y con la mayor expresión de proteínas de matriz extracelular, citoquinas e inflamación, lo que conduce al desarrollo y la aceleración de las complicaciones de la diabetes (Fournet *et al.*, 2018). Estos mecanismos participan en la formación de radicales libres en pacientes con diabetes, incluido el aumento de la glicación no enzimática, el estrés autooxidativo y metabólico como resultado de cambios en el metabolismo, en el nivel de mediadores de la inflamación y en el estado del sistema de defensa antioxidante (Fuentes *et al.*, 2015).

Los antioxidantes son compuestos o sistemas que retrasan la oxidación al prevenir la formación de radicales libres o interrumpir su propagación. Uno de los componentes más comunes atribuidos a la capacidad antioxidante en las plantas son los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se pueden dividir en varios grupos, como ácidos fenólicos, diterpenos fenólicos, flavonoides y aceites volátiles (Najafian & Moradi, 2017).

Estos compuestos constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en plantas que son fundamentales en el mecanismo de señalización y defensa. Su importancia radica en la prevención del daño debido al estrés por organismos patógenos y depredadores; además, tienen la función de precursores de compuestos de mayor complejidad, en la intervención en procesos de regulación y control del crecimiento de las plantas (Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Los compuestos fenólicos en los alimentos juegan un papel esencial en la defensa contra el envejecimiento y las enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 2, cáncer y enfermedades cardiovasculares, entre otros (Ighodaro & Akinloye, 2018). Estos compuestos inactivan los radicales libres implicados en el estrés oxidativo y evitan su propagación. Por lo tanto, la suplementación con

These compounds inactivate free radicals involved in oxidative stress and prevent their propagation. Therefore, the supplementation with natural antioxidants could have a beneficial effect on diabetic's health, preventing and delaying development of chronic complications (Lobo *et al.*, 2010).

Besides the multiple phytochemicals with antioxidant capacity (such as flavonoids, alkaloids, hydroxycinnamic acids, vitamins, phytosterols, and essential oils), there is another group of compounds known as steviol glycosides (diterpene glycosides responsible of the sweet taste in *S. rebaudiana* Bertoni) which have been reported to display antioxidant properties (Bender, 2017; Ribeiro *et al.*, 2019).

In addition of the antioxidant capacity of *Stevia rebaudiana* Bertoni, several studies have reported hypoglycemic effects attributed to steviol glycosides. Traditional applications of stevia and its steviosides in Latin America include the regulation of blood glucose levels, among others (Misra *et al.*, 2011).

Therefore, *S. rebaudiana* leaves are a potential source of natural antioxidants (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2017) and several compounds which can be helpful in the treatment of diabetes like glycol steviosides such as stevioside, rebaudioside A, rebaudioside B, and dulcoside A. The aim of the present study was to evaluate the antioxidant effect and the ability to inhibit the formation of Advanced Glycation End Products (AGES) *in vitro* of an aqueous extract of *S. rebaudiana* Bertoni (AES). In the EAS, the antioxidant capacity was determined by FRAP (ferric reducing power test), hydroxyl radical elimination activity (OH $\cdot$ ) and DPPH free radical elimination assay, in addition to inhibition of *in vitro* AGEs and identification of the main steviosides by UHPLC MS/MS.

## Material and methods

Dehydrated *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves were obtained from a greenhouse in Xochimilco, Mexico City. Other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise specified.

### Aqueous Extract of Stevia (AES)

The dried leaves of *S. rebaudiana* Bertoni were ground. 1 g of the dried leaves was weighed in a beaker,

antioxidantes naturales podría tener un efecto benéfico sobre la salud de los pacientes con diabetes, previniendo y retrasando el desarrollo de complicaciones crónicas (Lobo *et al.*, 2010).

Adicionalmente a los múltiples fitoquímicos con capacidad antioxidante (como flavonoides, alcaloides, ácidos hidroxicinámicos, vitaminas, fitoesteroles y aceites esenciales), existe otro grupo de compuestos conocidos como glucósidos de esteviol (diterpenos glucosilados responsables del sabor dulce en *S. rebaudiana* Bertoni) de los que se han informado propiedades antioxidantes (Bender, 2017; Ribeiro *et al.*, 2019).

Además de la capacidad antioxidante de *S. rebaudiana* Bertoni, varios estudios han reportado efectos hipoglucémicos atribuidos a los glucósidos de esteviol. Las aplicaciones tradicionales de stevia y sus esteviósidos en América Latina incluyen la regulación de los niveles de glucosa en sangre, entre otros (Misra *et al.*, 2011).

Por lo anterior, las hojas de *S. rebaudiana* Bertoni son una fuente potencial de antioxidantes naturales (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2017) y de varios compuestos que pueden ser útiles en el tratamiento de la diabetes, como los glucósidos de esteviol entre los que encontramos el esteviósido, el rebaudiósido A, el rebaudiósido B y el dulcósido A. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antioxidante de un extracto acuoso de *S. rebaudiana* Bertoni (AES) y la capacidad de inhibir la formación de productos finales de glicación avanzada (AGES) *in vitro*. En el AES se determinó la capacidad antioxidante por FRAP (ensayo de poder reductor férrico), la actividad de eliminación de radicales hidroxilo (OH $\cdot$ ) y el ensayo de eliminación de radicales libres DPPH, además de la inhibición de AGEs *in vitro* y la identificación de los esteviósidos principales por UHPLC MS/MS.

## Material y Métodos

Las hojas deshidratadas de *S. rebaudiana* Bertoni se obtuvieron de un invernadero en Xochimilco, Ciudad de México. Otros reactivos fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), a menos que se especifique lo contrario.

### Extracto acuoso de stevia (AES)

Las hojas secas de *S. rebaudiana* Bertoni se molieron. Posteriormente, en un vaso de precipitado se pesó 1 g de las hojas secas, se le añadió 10 mL de agua y

10 mL of water was added and it was left in a water bath at 40 °C for 60 minutes with constant agitation. The suspension was filtered under vacuum to obtain EAS and frozen at -20 °C until use (Shukla *et al.*, 2012a).

#### **Total Phenolic Content (TPC)**

TPC was determined by the Folin-Ciocalteu method (Lemus-Mondaca *et al.*, 2018). Gallic acid (GA) calibration curve was used for quantification of 10 a 100 mg de GA. All measurements were performed in triplicate. Results were expressed as mgGAE/100 g dry mass.

#### **In vitro antioxidant assays**

To evaluate the antioxidant capacity of AES, three different methods were used at concentrations of 2.5, 5 and 10 mg/mL.

#### **Ferric reducing power assay (FRAP)**

1 g of sample was weighed in the test tube, adding 2.5 mL of phosphate regulator and 2.5 mL of 1 % potassium ferricyanide solution, and incubated for 20 minutes at 50 °C in an Isotherm® General Purpose Incubator, ESCO. Then, 2.5 mL of 10 % trichloroacetic acid was added to each test tube and centrifuged at 8000 rpm for 10 minutes. 2.5 mL of the supernatant was mixed with 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL of 0.1 % ferric chloride solution. The absorbance was read at 700 nm (Vijayalakshmi & Ruckmani, 2016).

#### **Hydroxyl radical (OH·) scavenging activity**

The assay was performed evaluating the scavenging properties against OH· generated from Fenton's reaction (Brands *et al.*, 2019) by adding 1 mL of 1-10 phenanthroline, 2 mL of phosphate buffer pH 7.4, 1 mL of FeSO<sub>4</sub>, 1mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.12 %, 1 mL of AES (2.5, 5 y 10 mg/mL) each dissolved in distilled water; the mixture was incubated at 37 °C for 90 min and measured at 536 nm.

#### **DPPH free radical scavenging assay**

The ability to eliminate 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH) was determined according to what was reported before (Di Maro *et al.*, 2013). 1.5 mL of the aqueous AES extracts (2.5, 5 and 10 mg/mL) were added with 1.5 mL of 0.1 mM DPPH in 95 % ethanol. The mixture was stirred and kept standing for 30 minutes at room temperature. The effect of DPPH free radical inhibition was measured at 517 nm.

se dejó en baño de agua a 40 °C durante 60 minutos con agitación constante. La suspensión se filtró al vacío para obtener el AES y se congeló a -20 °C hasta su uso (Shukla *et al.*, 2012a)

#### **Contenido de compuestos fenólicos totales (TPC)**

El TPC se determinó por el método Folin-Ciocalteu (Lemus-Mondaca *et al.*, 2018). Para la cuantificación de estos compuestos se utilizó una curva de calibración de ácido gálico (GA) de 10 a 100 mg de GA. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como mg GAE/100 g de materia seca.

#### **Ensayos de capacidad antioxidante in vitro**

Para evaluar la capacidad antioxidante del AES se utilizaron tres métodos diferentes a concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL.

#### **Ensayo de poder reductor férrico (FRAP)**

Se pesó en tubo de ensayo 1 g de muestra, adicionando 2.5 mL de regulador de fosfatos y 2.5 mL de solución de ferricianuro de potasio al 1 % y se incubó durante 20 minutos a 50 °C en una incubadora Isotherm® General Purpose Incubator, ESCO. Luego, se añadieron 2.5 mL de ácido tricloroacético al 10 % a cada tubo de ensayo, y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos. Se mezclaron 2.5 mL del sobrenadante con 2.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de solución de cloruro férrico al 0.1 %. La absorbancia se leyó a 700 nm (Vijayalakshmi & Ruckmani, 2016).

#### **Actividad de eliminación de radicales hidroxilo (OH·)**

El ensayo se realizó evaluando las propiedades de barrido contra OH· generado a partir de la reacción de Fenton (Brands *et al.*, 2019), mediante la adición de 1 mL de 1-10 fenantrolina, 2 mL de regulador de fosfatos pH 7.4, 1 mL de FeSO<sub>4</sub>, 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.12 %, 1 mL de AES (2.5, 5 y 10 mg/mL) cada uno disuelto en agua destilada; la mezcla se incubó a 37 °C durante 90 min y se midió su absorbancia a 536 nm.

#### **Ensayo de inhibición de radical libre DPPH**

La capacidad de eliminación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se determinó de acuerdo a lo reportado anteriormente (Di Maro *et al.*, 2013). Se tomaron 1.5 mL de los extractos acuosos de AES (2.5, 5 y 10 mg/mL) y se les añadió 1.5 mL de DPPH 0.1 mM en etanol al 95 %. La mezcla se agitó y se mantuvo en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. El efecto de inhibición de radicales libres DPPH se midió a 517 nm.

#### **Advanced Glycation End-products (AGEs) Inhibition: Formation of AGEs in the Bovine Serum Albumin (BSA)/Glucose and BSA/ Fructose Systems.**

2 mL of AES (2.5, 5 and 10 mL) were placed in 15 mL conical tubes, adding 0.67 mL of a BSA/ glucose solution (10 mg / mL), plus NaCl and phosphate regulator with azide sodium 0.02 % pH 7.4 (to reach a total volume of 5 mL), this solution is incubated at 37 °C for 21 days. This same procedure was carried out with BSA / fructose (Hori *et al.*, 2012). Metformin (50 mg / mL) was used for this experiment as a positive control, in addition to a blank. The determination was carried out in triplicate. The formation of AGEs was evaluated by excitation wavelength (370 nm) and emission (440 nm) in a fluorescence spectrophotometer (Varioskan Lux microplate reader, Thermo Fisher, 2000) (Aranda-González *et al.*, 2015).

#### **UHPLC MS/MS steviosides identification and quantification**

For the identification of steviol glycosides, 5 µL of AES (2.5, 5 y 10 mg/mL) was injected into a UHPLC RP-C18 column (2.1x100 mm particle size 1.7 microns). The elution was performed by varying the proportion of solvent A (Deionized water) to solvent B (Acetonitrile 100 %) as follows: H<sub>2</sub>O:Acetonitrile 100 % (60:40), at 15 min; H<sub>2</sub>O: Acetonitrile 100 % (60:40), at 22 min; H<sub>2</sub>O: Acetonitrile 100 % (50:50), at 25 min, and finally, H<sub>2</sub>O:Acetonitrile 100 % (0:100), at 28 min. The total running time was 37 min. The column temperature was 30 °C. The flux was 0.7 mL/min.

Each glycoside was identified by registering the mass and MS/MS spectra of each chromatographic peak obtained, applying the FIND BY FORMULA algorithm (Aranda-González *et al.*, 2015). The registration conditions of the mass spectra were the following: a logging interval between 100-1700 m/z; scan speed: 1 m/z; electrospray ionization (ESI) as ionization source. Mode: negative, collision energy: 0, gas temperature 320 °C and variable fragmentation voltages.

To obtain the calibration curves and to quantify the stevioside and rebaudioside A concentrations, both standards were run in triplicate on a RP-C18 column (0.25-3.00 mg/mL, injected 5 µL of both standards). The same separation gradient applied previously was used. The corresponding chromatograms were recorded; the

#### **Inhibición de productos finales de glicación avanzada (AGEs): formación de AGEs en los sistemas de albúmina de suero bovino (BSA)/ glucosa y BSA/fructosa.**

2 mL de los AES (2.5, 5 y 10 mL) se colocaron en tubos cónicos de 15 mL, añadiendo 0.67 mL de una solución de BSA/glucosa (10 mg/mL), más regulador de NaCl y fosfatos con azida de sodio al 0.02 % pH 7.4 (para llegar a un volumen total de 5 mL), incubándose esta solución a 37 °C por 21 días. Este mismo procedimiento se llevó a cabo con BSA/fructosa (Hori *et al.*, 2012) Para este experimento se utilizó metformina (50 mg/mL) como control positivo, además de un blanco. La determinación se llevó a cabo por triplicado. La formación de AGEs se evaluó mediante la longitud de onda de excitación (370 nm) y emisión (440 nm) en un espectrofotómetro de fluorescencia (lector de microplacas Varioskan Lux, Thermo Fisher, 2000) (Aranda-González *et al.*, 2015).

#### **UHPLC MS/MS identificación y cuantificación de esteviósidos**

Para la identificación de los glucósidos de esteviol, se inyectaron 5 µL de AES (2.5, 5 y 10 mg/mL) en una columna UHPLC RP-C18 (tamaño de partícula de 2.1x100 mm, 1.7 µm). La elución se realizó variando la proporción de disolvente A (agua desionizada) a disolvente B (acetonitrilo al 100 %), como sigue: H<sub>2</sub>O: acetonitrilo al 100 % (60:40), a los 15 minutos; H<sub>2</sub>O: acetonitrilo al 100 % (60:40), a los 22 min; H<sub>2</sub>O: acetonitrilo al 100 % (50:50), a los 25 min, y finalmente, H<sub>2</sub>O: acetonitrilo al 100 % (0:100), a los 28 min. El tiempo total de ejecución fue de 37 min. La temperatura de la columna fue de 30 °C. El flujo utilizado fue 0.7 mL/min.

Cada glucósido se identificó registrando los espectros de masa y MS/MS de cada pico cromatográfico obtenido, aplicando el algoritmo FIND BY FORMULA (Aranda-González *et al.*, 2015). Las condiciones de registro de los espectros de masas fueron las siguientes: un intervalo de registro entre 100-1700 m/z; velocidad de escaneo: 1 m/z; ionización por electropulverización (ESI) como fuente de ionización. Modo: negativo, energía de colisión: 0, temperatura del gas 320 °C y voltajes de fragmentación variables.

Para obtener las curvas de calibración y cuantificar las concentraciones de esteviósido y rebaudiósido A, se inyectaron 5 µL de ambos estándares (0.25-3.00 mg/mL), utilizando una columna RP-C18. Se usó el mismo gradiente de separación aplicado previamente. Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes; las curvas de calibración se realizaron con las señales de masa a 803.370 m/z para el esteviósido

calibration curves were performed with the mass signals at 803.370 m/z for the stevioside and 965.422 m/z for the rebaudioside A. The conditions of the mass spectra registration were the same as previously used. The quantification of stevia extracts samples were prepared by taking 200  $\mu$ L of extract and diluting them with distilled water for a final volume of 700  $\mu$ L. Finally, 5  $\mu$ L of each sample in triplicate was injected into the equipment with the same separation and recording conditions as those used for the calibration curve.

## Results and Discussion

### Total phenolic content (TPC)

Most research has been directed towards the identification of plants with antioxidant ability. Available synthetic antioxidants have shown toxicity in contrast to those from natural sources (Shukla *et al.*, 2012a). Figure 1A show that phenolic content was directly proportional to aqueous extract concentration, suggesting that the AES may have high levels of antioxidant activity (Figure 1A). The total polyphenol content of extracts of *S. rebaudiana* varied in average  $20.1 \pm 0.4$  mg GAE/g (Grozeva *et al.*, 2015). The amount of the polyphenols found in water extracts was higher compared to 95 % ethanol extract ( $15.6 \pm 0.4$  vs  $12.75 \pm 0.55$ ) and even higher than the stevia methanolic leaves extract reported by other authors (Jahan *et al.*, 2015).

There are several phenolic compounds reported in extracts of *S. rebaudiana* Bertoni, the most relevant being chlorogenic acid, ellagic acid, coumarin, hesperidin and rosmarinic acid in addition to eugenol, coumarin and vanillin, depending on the culture conditions (Jahan *et al.*, 2015; Grozeva *et al.*, 2015). Dietary consumption of these polyphenolic compounds can prevent the development of some types of dysplasia, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, diabetes and osteoporosis, as evidenced by studies in *in vitro* models and animal models (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

### Ferric reducing power assay (FRAP)

Antioxidant compounds donate electrons to reactive radicals reducing them into more stable species; a higher absorbance indicates a higher ferric reducing power (Bursal & Köksal, 2011). A concentration-dependent absorbance reaches the highest optical density at 10 mg/mL (Figure 1B). These results are

and 965.422 m/z para el rebaudiósido A. Las condiciones del registro del espectro de masas fueron las mismas que se describieron anteriormente. Para la cuantificación de las muestras de extractos de *S. rebaudiana* Bertoni se prepararon éstas tomando 200  $\mu$ L de extracto y diluyéndolo con agua destilada para un volumen final de 700  $\mu$ L. Finalmente, se inyectaron 5  $\mu$ L de cada muestra por triplicado en el equipo con las mismas condiciones de separación y registro que las utilizadas para la curva de calibración.

## Resultados y Discusión

### Contenido de compuestos fenólicos totales (TPC)

La mayoría de las investigaciones se han dirigido a la identificación de plantas con capacidad antioxidante puesto que los antioxidantes sintéticos disponibles han mostrado toxicidad en contraste con aquellos provenientes de fuentes naturales (Shukla *et al.*, 2012a). La Figura 1A muestra que el contenido de compuestos fenólicos fue directamente proporcional a la concentración del extracto acuoso, lo que sugiere que el AES puede tener altos niveles de actividad antioxidante. De acuerdo con la literatura el contenido total de polifenoles del extracto acuoso de *S. rebaudiana* Bertoni varía en promedio  $20.1 \pm 0.4$  mg GAE/g (Grozeva *et al.*, 2015). La cantidad de polifenoles que se encontró en los AES fue mayor que en el extracto etanólico al 95 % ( $15.6 \pm 0.4$  vs  $12.75 \pm 0.55$ ) e incluso mayor que el extracto de hojas de stevia metanólica reportado por otros autores (Jahan *et al.*, 2015).

Existen varios compuestos fenólicos reportados en extractos de *S. rebaudiana* Bertoni, siendo los más relevantes el ácido clorogénico, el ácido elágico, la cumarina, la hesperidina y el ácido rosmarínico además del eugenol, la cumarina y la vainillina, dependiendo de las condiciones de cultivo (Jahan *et al.*, 2015; Grozeva *et al.*, 2015). El consumo en la dieta de estos compuestos polifenólicos puede prevenir el desarrollo de algunos tipos de displasia, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y osteoporosis, como lo demuestran los estudios en modelos *in vitro* y modelos animales (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

### Ensayo de poder reductor férrico (FRAP)

Los compuestos antioxidantes donan electrones a radicales reactivos reduciéndolos a especies más estables; una mayor absorbancia indica un mayor poder reductor férrico (Bursal & Köksal, 2011). En la Figura 1B se observa que la absorbancia del AES fue dependiente de la concentración, alcanzando la densidad óptica más alta a 10 mg/mL. Estos

consistent with those documented before (Rao, 2014), where the highest concentrations showed the higher absorbance in *S. rebaudiana* Bertoni leaves. The ferric reducing capacity is generally associated with the ability to break the free radical chain by donating a hydrogen atom and is widely used to evaluate the antioxidant properties of dietary phytochemicals (Najafian & Moradi, 2017).

#### DPPH free radical-scavenging

The effect of AES on the DPPH radical scavenging as the percentage of inhibition is reported (Figure 1D). The AES antioxidant activity showed a significant difference between concentrations ( $p \leq 0.05$ ) with an inverse concentration-dependent behavior. The higher AES concentration (10 mg/mL) showed higher activity, with 60 % of DPPH inhibition, value below 72 % reported before (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2017). Free radical DPPH can react with antioxidant compounds through a process characterized by the transfer of a hydrogen atom provided by the antioxidant agent and its response depends on the concentration. Low concentrations of this reagent for reliable results it's recommended (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

Other authors (Periche *et al.*, 2015) reported that the drying conditions applied in fresh stevia leaves have a significant impact on steviol glycosides and antioxidants through an increase in antioxidant capacity but a decrease in steviosides; on this research the AES showed an antioxidant capacity, which may be due to other compounds with antioxidant activity reported in stevia leaves as phenolic compounds such as phenolic acids (chlorogenic acid, caffeic acid, and trans-ferulic acid) and flavonoids (rutin) which are present in aqueous extracts of stevia leaves (Lemus-Mondaca *et al.*, 2018).

Finally, it is important to emphasize that DPPH and FRAP are classified as methods based on individual electron transfer. Although these tests are similar in terms of results, they focus on different mechanisms: the DPPH test is carried out in alcoholic media, and FRAP in acidic and non-liquid reaction media. Therefore, both can be used to corroborate the data obtained and evaluate, for example, the possible practical applications of the analyzed samples (Álvarez-Robles *et al.*, 2016).

#### Hydroxyl radical (OH·) scavenging activity

The hydroxyl radical is an extremely reactive free radical formed in biological systems; it can damage

resultados concuerdan con los reportados previamente (Rao, 2014), donde las concentraciones más altas mostraron la mayor absorbancia en las hojas de *S. rebaudiana* Bertoni. La capacidad de reducción férrica se asocia generalmente con la capacidad de romper la cadena de radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno y se usa ampliamente para evaluar las propiedades antioxidantes de los fitoquímicos de la dieta (Najafian & Moradi, 2017).

#### Ensayo de inhibición de radical libre DPPH

En la Figura 1D se presenta el efecto de AES sobre la eliminación de radicales DPPH como porcentaje de inhibición. Se registró una diferencia significativa entre las concentraciones ( $p \leq 0.05$ ) con un comportamiento inverso dependiente de la concentración. La mayor concentración de AES (10 mg/mL) mostró una mayor actividad, con un 60 % de inhibición de DPPH, valor inferior al 72 % publicado con anterioridad (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2017). El radical libre DPPH puede reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la transferencia de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante y su respuesta depende de la concentración. Se recomiendan bajas concentraciones de este reactivo para obtener resultados confiables (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

Otros autores (Periche *et al.*, 2015) informaron que las condiciones de secado aplicadas en las hojas frescas de estevia tienen un impacto significativo en los glucósidos de esteviol y los antioxidantes mediante un aumento en la capacidad antioxidante pero una disminución en la concentración de esteviósidos; en esta investigación, el AES mostró una capacidad antioxidante que puede atribuirse a otros compuestos con actividad antioxidante como compuestos fenólicos tal como, los ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido transferulíco) y flavonoides (rutina), presentes en extractos acuosos de hojas de estevia (Lemus-Mondaca *et al.*, 2018).

Finalmente, es importante enfatizar que DPPH y FRAP se clasifican como métodos basados en la transferencia individual de electrones. Aunque estas pruebas son similares en términos de resultados, se centran en diferentes mecanismos: la prueba DPPH se lleva a cabo en medios alcohólicos y FRAP en medios de reacción ácidos y no líquidos. Por lo tanto, ambos pueden usarse para corroborar los datos obtenidos y evaluar, por ejemplo, las posibles aplicaciones prácticas de las muestras analizadas (Álvarez-Robles *et al.*, 2016).

#### Actividad de eliminación de radicales hidroxilo (OH·)

El radical hidroxilo es un radical libre extremadamente reactivo formado en sistemas biológicos; es capaz de dañar casi todas las moléculas que se encuentran



almost every molecule found in living cells. This radical can join nucleotides in DNA and cause strand breakage leading to carcinogenesis, mutagenesis, and cytotoxicity (Kim *et al.*, 2011). OH<sup>·</sup> radicals generation is particularly dangerous for cellular membranes. In the present research, all extracts had scavenging activity on hydroxyl radicals in a dose-dependent manner; where the high inhibition percentage was found at 10mg/mL (Figure 1C). On prior studies (Stoyanova *et al.*, 2011; Hajjhashemi & Geuns, 2013; Shukla *et al.*, 2012b) it has been documented that *S. rebaudiana* Bertoni possess a high ROS (OH<sup>·</sup>) scavenging activity.

The percent inhibition on hydroxyl radical scavenging was found to be 13.03 %, 14.36 % and 17.51 %, for each concentration in a dose-dependent manner, respectively; therefore the extract is capable of inhibit and reduce free radicals by terminating the radical chain reaction, acting as reducing agent (Kim *et al.*, 2011). All studies published in this regard show that the extracts themselves exert purifying effects of reactive oxygen species (ROS) (Hajjhashemi & Geuns, 2013). Plants contain many phenolic compounds; whose hydroxyl group contained on an aromatic ring can interrupt chain oxidation reactions by donation of a hydrogen atom or chelating metals: they act as reducing agents and antioxidants. High amounts of phenolic compounds indicate high antioxidant capabilities (Jahan *et al.*, 2010). In *S. rebaudiana* the content of phenols and rebaudioside A has been significantly and positively correlated with antioxidant capacity (Tavarini & Angelini, 2013).

#### **Advanced Glycation End-products (AGEs) Inhibition**

The modification of some crucial physiological proteins caused by AGEs formation is an important factor in the development of age-related diseases such as atherosclerosis, diabetes and its complications. Figure 1E shows the effect of AES extract at different concentrations in the formation of fluorescent AGEs in glycation BSA/glucose, BSA/fructose model system for 21 days. AES affect the formation of AGEs in a dose-dependent rate. At 100 mg/mL AES exhibit a better antiglycation activity (96.5 %) in comparison to the metformin control (89 %). Several edible plants or its extracts have shown antiglycation activities in BSA-glucose-fructose models (Kaewnarin *et al.*, 2014).

en las células vivas. Este radical puede unir nucleótidos en el DNA y causar la rotura de la cadena conduciendo a carcinogénesis, mutagénesis y citotoxicidad (Kim *et al.*, 2011); la generación de radicales OH<sup>·</sup> es particularmente peligrosa para las membranas celulares. En la presente investigación, todos los extractos tuvieron actividad de eliminación de radicales hidroxilo de una manera dependiente de la dosis, donde el mayor porcentaje de inhibición se encontró en 10 mg/mL (Figura 1C). En estudios previos (Stoyanova *et al.*, 2011; Hajjhashemi & Geuns, 2013; Shukla *et al.*, 2012b) se ha documentado que *S. rebaudiana* Bertoni posee una alta actividad de captación de especies reactivas de oxígeno (OH<sup>·</sup>).

El porcentaje de inhibición sobre la eliminación de radicales hidroxilo fue 13.03 %, 14.36 % y 17.51 %, para cada concentración con un comportamiento dependiente de la dosis, respectivamente; por lo tanto, el extracto es capaz de inhibir y reducir los radicales libres al terminar la reacción en cadena de los radicales, actuando como agente reductor (Kim *et al.*, 2011). Todos los estudios publicados al respecto muestran que los extractos por sí mismos ejercen efectos depuradores de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hajjhashemi & Geuns, 2013). Las plantas contienen compuestos fenólicos cuyo grupo hidroxilo contenido en un anillo aromático puede interrumpir las reacciones de oxidación en cadena mediante la donación de un átomo de hidrógeno o metales quelantes, mismos que actúan como agentes reductores y antioxidantes. Altas cantidades de compuestos fenólicos indican mayor capacidad antioxidante (Jahan *et al.*, 2010). En *S. rebaudiana* Bertoni, el contenido de fenoles y rebaudiosido A se ha correlacionado de manera significativa y positiva con la capacidad antioxidante (Tavarini & Angelini, 2013).

#### **Inhibición de productos finales de glicación avanzada (AGEs)**

La modificación de algunas proteínas fisiológicas cruciales causadas por la formación de AGEs es un factor importante en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad, como la aterosclerosis, la diabetes y sus complicaciones. La Figura 1E muestra el efecto del AES a diferentes concentraciones en la formación de AGEs fluorescentes en el sistema modelo de glicación BSA/glucosa, BSA/fructosa durante 21 días. AES afecta la formación de AGEs de manera dependiente de la dosis. A 100 mg/mL, AES exhibe una mejor actividad antiglicación (96.5 %) en comparación con el control de metformina (89 %). Varias plantas comestibles o sus extractos han mostrado actividades de antiglicación en modelos BSA/glucosa, BSA/fructosa (Kaewnarin *et al.*, 2014).

The major components of edible plants contain phenolic compounds and flavonoids such as catechin, epicatechin, quercetin, rutin, ellagic acid, cumaric acid, between others who exhibit antioxidant capacity. Aqueous leaf extract of *S. rebaudiana* contains high levels of total phenolic, which results in a high antioxidant capacity that is capable of inhibiting or reduce free radicals to terminate the oxidative estate. Since the EAS exhibits a high antiglycation activity, it can be inferred that the antioxidant compounds it contains could suppress the formation of AGEs and protein oxidation. The high content of phenolic compounds and an important ability to eliminate reactive oxygen species in hydroxyl and DPPH radicals present in the EAS could explain the reduction in protein oxidation measured by the formation of AGEs.

Regarding the role of steviosides in preventing the formation of AGEs, the possible mechanism of antiglycation activity has been reported. It seems to be related to inhibition of the interaction between glucose and amino acids. It has been reported that steviol glycosides compete with glucose to bind to the carrier thus inhibiting the entry of glucose into cells, decreasing glycosylation (Rizzo *et al.*, 2013).

AES may inhibit AGEs formation by its ROS scavenging capacity on hydroxyl and DPPH radicals during the auto-oxidation of sugar and oxidative degradation of Amadori products, leading to reduced protein oxidation. Other mechanisms of antiglycation, particularly for inhibiting the formation of late-stage Amadori products, breaking the cross-linking structures in the intracellular formed AGEs has been proposed (Díaz-Casasola & Luna-Pichardo, 2016). Further comprehensive studies of *Stevia rebaudiana* are required to confirm the antiglycation mechanisms described above.

#### **UHPLC MS/MS steviosides identification and quantification**

The Figure 2 shows the spectra of steviosides from *Stevia rebaudiana* extract obtained from UHPLC identification. The notorious peaks were 9, whose identification are presented in Table 1. During identification, we found two peaks with the same molecular weight despite being different compounds (steviolbioside and rubososide). It is possible to distinguish them by the difference in retention time

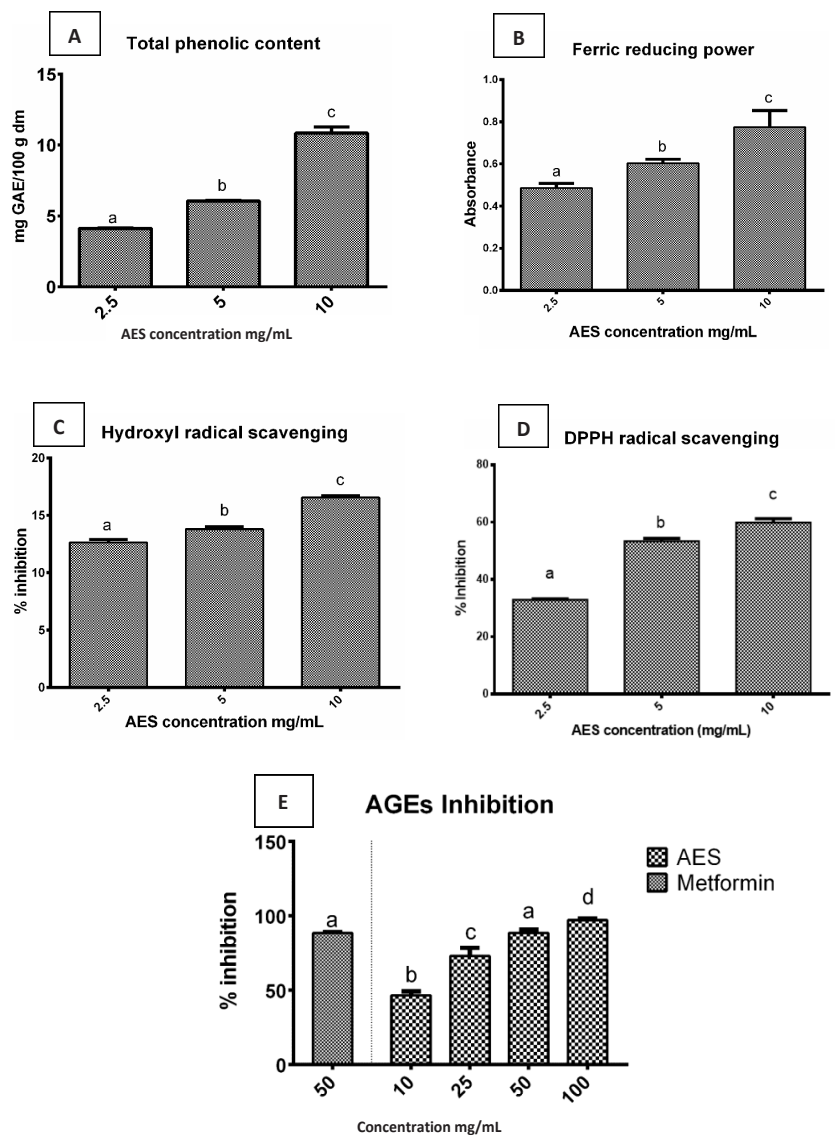
Los componentes principales de las plantas comestibles contienen compuestos fenólicos y flavonoides como catequina, epicatequina, quercetina, rutina, ácido elálgico, ácido cumárico, entre otros, que exhiben capacidad antioxidante. El extracto acuoso de hoja de *S. rebaudiana* Bertoni contiene altos niveles de compuestos fenólicos totales, lo que resulta en una mayor capacidad antioxidante que es capaz de inhibir o reducir los radicales libres para interrumpir el estado oxidativo. Ya que el AES exhibe una alta actividad antiglicación, se puede inferir que los compuestos antioxidantes que contiene pudieran suprimir la formación de AGEs y la oxidación de proteínas. El alto contenido de compuestos fenólicos y una capacidad importante para eliminar especies reactivas de oxígeno en radicales hidroxilo y DPPH presentes en el AES podrían explicar la reducción de la oxidación de proteínas medida por la formación de AGEs.

Con respecto al papel de los esteviósidos en la prevención de la formación de AGEs, se ha informado el posible mecanismo de actividad antiglicación. Éste parece estar relacionado con la inhibición de la interacción entre glucosa y aminoácidos. Se sabe que los glucósidos de esteviol compiten con la glucosa para unirse al portador inhibiendo así la entrada de glucosa en las células, disminuyendo por lo tanto la glicación (Rizzo *et al.*, 2013).

El AES puede inhibir la formación de AGEs debido a su capacidad de eliminación de especies reactivas de oxígeno en los radicales hidroxilos y DPPH durante la autooxidación del azúcar y la degradación oxidativa de los productos Amadori, lo que conduce a una oxidación proteica reducida. Se han propuesto otros mecanismos de antiglicación, particularmente para inhibir la formación de productos Amadori en etapa tardía, rompiendo las estructuras de reticulación en los AGEs formados intracelularmente (Díaz-Casasola & Luna-Pichardo, 2016). Se requieren más estudios exhaustivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni para confirmar los mecanismos de antiglicación descritos anteriormente.

#### **UHPLC MS/MS: identificación y cuantificación de esteviósidos**

La Figura 2 muestra los espectros de los esteviósidos del extracto de *Stevia rebaudiana* Bertoni obtenido de la identificación UHPLC. Los picos notorios fueron 9, cuya identificación se presenta en el Tabla 1. Durante la identificación, se encontraron dos picos con el mismo peso molecular a pesar de ser compuestos diferentes (esteviolbiósido y rubosósido). Es posible distinguirlos por la diferencia en el tiempo de retención (Gardana *et al.*, 2010) Con respecto a los resultados de



**Figure 1. Aqueous leaf extract of *S. rebaudiana*.**

A) Amount of total phenolic content, B) Ferric antioxidant power activity, C) Hydroxyl radical scavenging activity, D) DPPH radical scavenging activity, E) Advanced glycation end products (AGEs) inhibition. Metformin as control. AES: aqueous leaf extract of *S. rebaudiana*. Values are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent determinations. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ), as determined by Tukey's multiple range test.

**Figura 1. Extracto acuoso de hoja de *S. rebaudiana* Bertoni.**

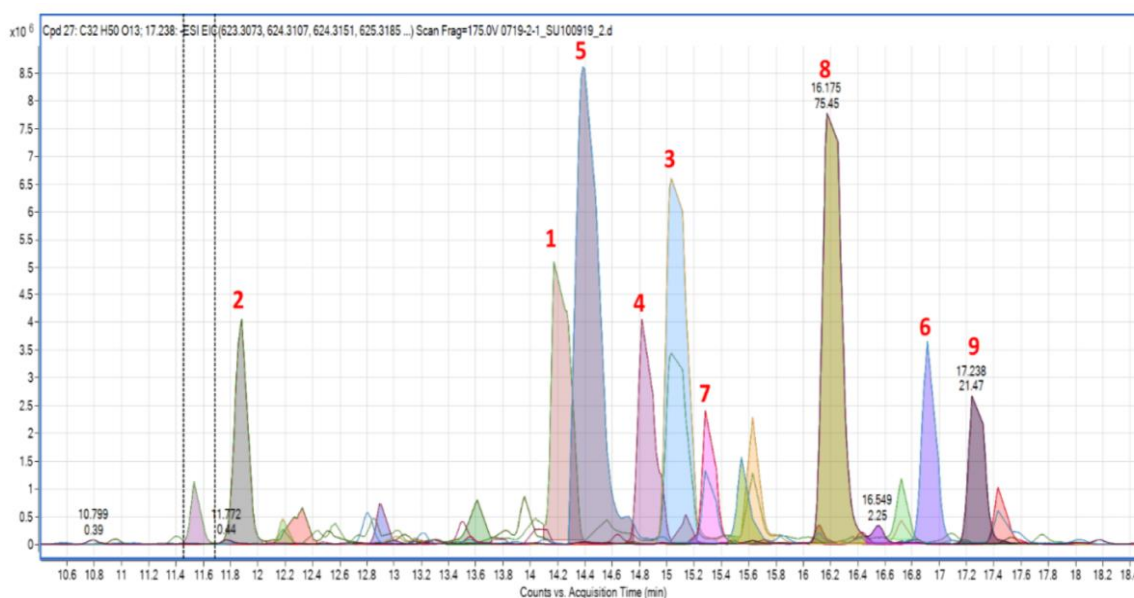
A) Contenido total de compuestos fenólicos, B) Actividad antioxidante férrica, C) Actividad de eliminación de radicales hidroxilo, D) Actividad inhibidora de radicales DPPH. E) Inhibición de productos finales de glicación avanzada (AGEs). Metformina como control. En todos los casos los valores se expresan como media  $\pm$  SD de tres determinaciones independientes. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Tukey.

(Gardana *et al.*, 2010). Regarding the results of the steviosides quantification, our results differ from those previously reported (Aranda-González *et al.*, 2015). The value for stevioside was  $5.018 \pm 0.18$  mg GAE/100 g which is higher than reported before (Gardana *et al.*, 2010), however, the value for rebaudioside A was lower ( $7.79 \pm 2.05$  mg GAE/100 g vs  $15.15 \pm 0.02$  mg GAE/100 g). On the other hand, Aranda-González *et al.*, (2015), reported a content of rebaudioside A of 2 % to 54 % in dried leaves of *S. rebaudiana* Bertoni This variability may be due to variety of *Stevia*, weather conditions and farming, since these factors contribute to the amount and type of glycosides in the plant.

It has been discovered that the same variety may have higher glycoside content if it is exposed to high solar radiation or if it is grown with a specific density from 12.5 to 25 plants per square meter (Jarma-Orozco *et al.*, 2011). Regarding the total content of steviosides it has been published that can vary from 4 % to 22 % depending on the conditions (Aranda-González *et al.*, 2015).

la cuantificación de los esteviósidos, los datos obtenidos en este estudio difieren de los reportados previamente (Aranda-González *et al.*, 2015): el valor de esteviósido fue de  $5.018 \pm 0.18$  mg GAE/100 g, que es más alto que el informado con anterioridad (Gardana *et al.*, 2010), sin embargo, el valor de rebaudiósido A fue menor ( $7.79 \pm 2.05$  mg GAE/100 g vs  $15.15 \pm 0.02$  mg GAE/100 g). Por otro lado, Aranda-González *et al.* (2015) publicaron un contenido de rebaudiósido A que fue desde el 2 % al 54 % en hojas secas de *S. rebaudiana* Bertoni. Esta variabilidad puede deberse a la variedad de estevia, a las condiciones climáticas y la agricultura, ya que estos factores contribuyen a la cantidad y tipo de glucósidos en la planta.

Se ha descubierto que la misma variedad puede tener un mayor contenido de glucósidos si está expuesta a una alta radiación solar o si se cultiva con una densidad específica desde 12.5 a 25 plantas por metro cuadrado (Jarma-Orozco *et al.*, 2011). Respecto al contenido total de esteviósidos se ha publicado que puede variar de un 4 % hasta 22 % dependiendo de las condiciones (Aranda-González *et al.*, 2015).



**Figure 2. Steviosides identified in the aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni by UHPLC MS/MS.**

**Figura 2. Esteviósidos identificados en el extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* Bertoni por UHPLC MS/MS.**

**Table 1.**  
**Characteristics of the steviosides identified in the aqueous extract of**  
***Stevia rebaudiana* Bertoni by UHPLC MS/MS**

**Tabla 1.**  
**Características de los esteviósidos identificados en el extracto acuoso de**  
***Stevia rebaudiana* Bertoni por UHPLC MS/MS**

Peak	Tentative identification	Molecular Formula	M(Da)	RT (min)	$m/z[M-H]^-$	Conc (mg/mL)
1	Rebaudioside A	C44H70O23	966.4309	14.172	965.4218	7.79 ± 2.05
2	Rebaudioside D	C50H88O28	1128.485	11.886	965.4136	ND
3	Rebaudioside C	C44H70O22	950.4359	15.033	949.4289	ND
4	Rebaudioside F	C43H68O22	936.4206	14.87	935.4151	ND
5	Rebaudioside B	C38H60O18	804.3778	14.384	803.3703	ND
6	Stevioside	C38H60O18	803.3704	16.912	803.3703	5.018 ± 0.18
7	Dulcoside A	C38H60O17	78.3838	15.282	787.3751	ND
8	Esteviolbioside	C32H50O13	642.3151	16.175	641.3181	ND
9	Ruboside	C32H50O13	642.3151	17.238	641.3181	ND

## Conclusion

Aqueous leaf extract of *S. rebaudiana* contains high levels of total phenolic, which results in a high antioxidant capacity that is capable of inhibiting or reduce free radicals to terminate the cellular oxidative estate. AES exhibit a high anti-glycation activity since antioxidant compounds can suppress the effect on AGEs formation and protein oxidation. Significant antioxidant activity of AES provides an experimental validation for the traditional use of this plant as a source of natural antioxidants with consequent health benefits. Additional studies are needed to investigate the bioactive compounds responsible for the observed activities.

## Acknowledgments

RME and MESP appreciate the financial support of the National Polytechnic Institute, COFAA, EDI and SNI. KNEL appreciates the CONACYT (599282) scholarship, and YRR the support of the SNI. This research was partially supported by [SIP:20181718](#) and [SIP:20194982](#) projects.

## Conclusión

El extracto acuoso de hoja de *S. rebaudiana* Bertoni posee niveles elevados de fenoles totales, lo que resulta en una alta capacidad antioxidante que es capaz de inhibir o reducir los radicales libres para inhibir el estado oxidativo celular. El AES exhibe una alta actividad anti-glicación ya que los compuestos antioxidantes pueden suprimir el efecto sobre la formación de AGEs y la oxidación de proteínas. La actividad antioxidante significativa de AES proporciona una validación experimental para el uso tradicional de esta planta como fuente de antioxidantes naturales con los consiguientes beneficios para la salud. Se necesitan estudios adicionales para investigar los compuestos bioactivos responsables de las actividades observadas.

## Agradecimientos

RME y MESP aprecian el apoyo financiero del Instituto Politécnico Nacional, COFAA, EDI y SNI. KNEL agradece la beca CONACYT (599282) y YRR el apoyo del SNI. Esta investigación fue parcialmente apoyada por los proyectos [SIP:20181718](#) y [SIP:20194982](#).

## References

- Álvarez-Robles, M. J., López-Orenes, A., Ferrer, M. A. and Calderón, A. A. (2016). Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. *Industrial Crops and Products*, 87: 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.054>
- Aranda-González, I., Moguel-Ordoñez, Y. and Betancur-Ancona, D. (2015). Determination of rebaudioside A and Stevioside in leaves of *S. rebaudiana* Bertoni grown in México by a validated HPLC method. *American Journal of Analytical Chemistry*, 6(11): 878. <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2015.61108>
- Ballali, S. & Lanciai, F. (2012). Functional food and diabetes: a natural way in diabetes prevention?. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(sup1): 51–61. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.637487>
- Bender, C. (2017). *Stevia Rebaudiana's Antioxidant Properties*. *Sweeteners*, 1–27. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26478-3\\_6-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26478-3_6-1)
- Brands, S., Schein, P., Castro-Ochoa, K. F. and Galinski, E. A. (2019). Hydroxyl radical scavenging of the compatible solute ectoine generates two N-acetimides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 108097. 2485–2492. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2008.04.007>
- Bursal, E. & Köksal, E. (2011). Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.). *Food Research International*, 44(7): 2217–2221. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.001>
- Di Maro, A., Pacifico, S., Fiorentino, A., Galasso, S., Gallicchio, M., Guida, V., Severino, V., Monaco, P. and Parente, A. (2013). Raviscanina wild asparagus (*Asparagus acutifolius* L.): A nutritionally valuable crop with antioxidant and antiproliferative properties. *Food Research International*, 53(1): 180–188. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.04.026>
- Díaz-Casasola, L. & Luna-Pichardo, D. (2016). Productos finales de glicación avanzada en la enfermedad cardiovascular como complicación de la diabetes. *Medicina e Investigación*, 4(1): 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.mei.2016.02.002>
- Dunlay, S. M., Givertz, M. M., Aguilar, D., Allen, L. A., Chan, M., Desai, A. S., Deswal, A., Vaughan, V., Kosiborod, M., Lekavich, C., McCoy, R., Mentz, R. and Piña, I. (2019). Type 2 Diabetes Mellitus and Heart Failure: A scientific statement from the american heart association and the heart failure society of America: This statement does not represent an update of the 2017 ACC/AHA/HFSA heart failure guideline update. *Circulation*, 140(7): e294–e324. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000691>
- Fournet, M., Bonté, F. and Desmoulière, A. (2018) Glycation damage: a possible hub for major pathophysiological disorders and aging. *Aging and disease*, 9(5): 880–900. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.1121>
- Fuentes, M., Olmos, P. and Santos, J. L. (2015). Productos finales de glicación avanzada (AGEs) y su importancia en enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición. *Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes*, 8(2): 70-77. [http://www.revistasoched.cl/2\\_2015/5.pdf](http://www.revistasoched.cl/2_2015/5.pdf)
- Gardana, C., Scaglianti, M. and Simonetti, P. (2010). Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1217(9): 1463-1470. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.036>
- Grozeva, N., Pavlov, D., Petkova, N., Ivanov, I., Denev, P., Pavlov, A., Gerdzhikova, M. and Dimanova-Rudolf, M. (2015). Characterisation of extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(6): 1236–1243. ISSN: 0975-4873
- Hajhashemi, S. & Geuns, J. M. C. (2013). Free radical scavenging activity of steviol glycosides, steviol glucuronide, hydroxytyrosol, metformin, aspirin and leaf extract of *Stevia rebaudiana*. *Free Radicals and Antioxidants*, 31–8. <https://doi.org/10.1016/j.fra.2013.10.001>
- Hori, M., Yagi, M., Nomoto, K., Ichijo, R., Shimode, A., Kitano, T. and Yonei, Y. (2012). Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Medicine*, 9(6): 125-134. [http://anti-aging.gr.jp/english/pdf/2012/9\(6\)125134.pdf](http://anti-aging.gr.jp/english/pdf/2012/9(6)125134.pdf)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mei.2016.02.002>  
<https://pdfs.semanticscholar.org/6ff2/80d2c3108a15bd561f6d802ed52683f8c3af.pdf>

- [https://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2016/en/](https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/en/)
- Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. (2018). First line defense antioxidants- superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4): 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Jahan, I, Mostafa, M., Hossain, H., Nimmi, I, Sattar, A., Alim, A. and Moeiz, S. (2010). Antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* Bert. Leaves from Bangladesh. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 13(2): 67–75. ISSN 0301- 4606. <https://www.semanticscholar.org/paper/Antioxidant-activity-of-Stevia-rebaudiana-Bert.-JahanMostafa/6669e57e4e094a591a821a9ee01ef7c611171007>
- Jarma-Orozco, A., Araméndiz-Tatis, H. and Cleves-Leguizamo, A. (2011) Phenotypic Stability and Plant Densities of *Stevia rebaudiana* Bert.) Genotypes in the Caribbean Region of Colombia. *Acta Agronómica*, 60: 165-175. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-28122011000200008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122011000200008)
- Kaewnarin, K., Niamsup, H., Shank, L. and Rakariyatham, N. (2014). Antioxidant and antiglycation activities of some edible and medicinal plants. *Chiang Mai Journal Science*, 41(1): 105-16. <http://www.thaiscience.info/journals/Article/CMJS/10905186.pdf>
- Kim, I. S., Yang, M., Lee, O. H. and Kang, S. N. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5): 1328–1332. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.003>
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Rojas, P., Stucken, K., Delporte, C., Valenzuela-Barra, G., Jagus, R., Agüero, M. and Pasten, A. (2018). Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory potential of *Stevia rebaudiana* leaves: effect of different drying methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 11: 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.10.003>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8): 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Misra, H., Soni, M., Silawat, N., Mehta, D., Mehta, B. K. and Jain, D. C. (2011). Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert.(Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(2): 242. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5276>
- Najafian, S. & Moradi, M. (2017). Polyphenolic compounds (HPLC analysis) and antioxidant activity of *Stevia Rebaudiana* (Asteraceae) by FRAP and DPPH assay in greenhouse and free space condition. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3: 49-55. [https://www.semanticscholar.org/paper/Polyphenolic-compounds-\(HPLC-analysis\)-and-of-\(-\)-Najafian-Moradi/6ff280d2c3108a15bd561f6d802ed52683f8c3af](https://www.semanticscholar.org/paper/Polyphenolic-compounds-(HPLC-analysis)-and-of-(-)-Najafian-Moradi/6ff280d2c3108a15bd561f6d802ed52683f8c3af)
- Neeland, I. & Patel, K. (2019). Diabetes: Key markers of injury and prognosis. In: *Biomarkers in Cardiovascular Disease* (pp. 41-51). Elsevier, Amsterdam, Netherlands. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-54835-9.00004-1>
- Periche, A., Castelló, M.L., Heredia, A. and Escriche, I. (2015). Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, 172: 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.09.029>
- Rao, G.N. (2014). Antioxidant activity of stevia (*Stevia rebaudiana* L.) leaf powder and a commercial stevioside powder. *Journal of Food Pharmacy Science*, 2: 32–38. <https://doi.org/10.14499/jfps>
- Ribeiro, S., Nogueira, M., López-Orenes, A., Moraes, A., Do Amarante, L., Ferrer, M., Asensio A, and Bolacel, E. (2019). Plant growth regulators as potential elicitors to increase the contents of phenolic compounds and antioxidant capacity in stevia plants. *Sugar Technology*, 21(4): 696-702. 2 <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0673-4>
- Rizzo, B., Zambonin, L., Angeloni, C., Leoncini, E., Vieceli Dalla Sega, F., Prata, C., Fiorentini. and Hrelia, S. (2013). Steviol glycosides modulate glucose transport in different cell types. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013: 348169. <https://doi.org/10.1155/2013/348169>
- Ruiz-Ruiz, J. C., Moguel-Ordoñez, Y. B. and Segura-Campos, M. R. (2017). Biological activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and their relationship to health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12): 2680–2690. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1072083>
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. and Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In: *Antioxidants*. IntechOpen. England, UK. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P. and Bajpai, V. K. (2012a). Experimental and toxicologic pathology antioxidant ability and total

- phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7–8): 807– 811. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.02.002>
- Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P. and Bajpai, V. K. (2012b). Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7–8): 807– 811. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.02.002>
- Stoyanova, S., Geuns, J., Hideg, E. and Van Den Ende, W. (2011). The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(3): 207–214. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.523416>
- Tavarini, S. & Angelini, L.G. (2013). *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(9): 2121–2129. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6016>
- Teodoro, J. S., Nunes, S., Rolo, A. P., Reis, F., Palmeira, C. M. and Palmeira, C. M. (2018). Therapeutic options targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation to hinder the progression of vascular complications of diabetes. *Frontiers in physiology*, 9: 1857. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01857>
- Vijayalakshmi, M. & Ruckmani, K. (2016). Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(3): 570-572. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i3.27663>
- WHO (World Health Statistics) (2016). Monitoring health for the SDGs. (2017). WHO. Retrieved from