

Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* harms: contribución de sus flavonoides en esta actividad

Antioxidant potential of leaves and bark of *Bauhinia kalbreyeri* harms: contribution of their flavonoids in this activity

Ortiz Torres, H.;¹ Sánchez, W.; Murillo Perea, E.; Méndez Arteaga, J.¹

Resumen. En el estudio de cuyos resultados da cuenta este artículo se examinó la capacidad antioxidante y antinitrosativa de los extractos y flavonoides aislados de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* Harms ("Casco de vaca. Fabaceae). Los antioxidantes de la planta colectada en Ibagué, mostraron capacidad para estabilizar radicales libres, poder reductor del ion Fe^{+3} , habilidad para quelar el Fe^{+2} , descomponer el peróxido de hidrógeno, y aptitud para capturar especies reactivas de nitrógeno, entre ellas el óxido nítrico (NO). Las pruebas de comparación múltiple mostraron al extracto etanólico de corteza y al acuoso de hojas como los tratamientos de mayor efectividad en las pruebas aplicadas. Se encontraron diferencias significativas entre los extractos, y entre ellos y los flavonoides aislados ($p < 0.05$). La actividad antioxidante de la planta parece fundamentarse en el conjunto de derivados fenólicos.

Los resultados obtenidos indican que el potencial antioxidante de *B. kalbreyeri* es comparable con el del hidroxitolueno butilado y el ácido ascórbico, utilizados como antioxidantes por la industria alimentaria y farmacéutica.

Palabras clave: *Bauhinia kalbreyeri*, Radicales libres, Flavonoides, Potencial antioxidante.

Abstract. In this study the antioxidant and antitrosative capacity of the extracts and isolated flavonoids of leaves and bark of *Bauhinia kalbreyeri* Harms (Cow Hoof. Fabaceae) was examined. The antioxidants of the plant collected in Ibagué has shown the capacity to stabilize free radicals, the reducing power of the ion Fe^{+3} , an ability to chelate the Fe^{+2} , to decompose the hydrogen peroxide, and an aptitude to capture

I. Grupo GIPRONUT. Departamento de Química, Universidad del Tolima.
heidyfaz@hotmail.com, jmendez@ut.edu.co

reactive species of nitrogen, among these nitric oxide (NO). The multiple comparison tests have shown the ethanolic extract of the bark and the aqueous extract of the leaves as the most effective treatments of the probes used. Significant differences were found among the extracts and between these and the isolated flavonoids ($p < 0.05$). The antioxidant activity of the vegetable seems to be based on the set of phenolic derivatives. The obtained results indicate that the antioxidant potential of *B. kalbreyeri* is comparable to that of Butyl-hydroxytoluene and ascorbic acid, used as antioxidants by the food and pharmaceutical industries.

Key words: *Bauhinia kalbreyeri*, Free radicals, Flavonoids, Antioxidant potential.

1. INTRODUCCIÓN

En países que poseen alta biodiversidad, como Colombia, resulta especialmente importante el estudio de las partes de un vegetal, de sus extractos y sustancias puras aisladas, que presentan actividad terapéutica significativa. En esta búsqueda nos hemos centrado al estudiar una especie vegetal del género *Bauhinia Kalbreyeri* (Fabaceae-Caesalpinioideae), que comprende alrededor de 400 especies (Da Silva *et al.*, 2002), distribuidas en un amplio rango de zonas tropicales a nivel mundial como Asia, África, América Central y del Sur (Duarte-Almeida *et al.*, 2004). Estas especies son popularmente conocidas como “pata de vaca”, “casco de vaca”, “pie de buey” o “mororó” (Matos, 1998) y muchas de ellas son utilizadas en la etnofarmacología en casos de disentería, diarrea, inflamaciones, envenenamiento por animales, infecciones de la piel, como laxativas, carminativas, astringentes, tónico, o en afecciones del hígado (Ali *et al.*, 1999; Viana *et al.*, 1999; Raj Kapoor *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2003).

El género *Bauhinia* ha merecido la atención de un número considerable de investigadores que buscan correlacionar la acción antidiabética de estos vegetales con sus constituyentes químicos, especialmente los fitofenoles. No obstante los resultados son algunas veces contradictorios, tal es el caso de Russo *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 1999; Soares, *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 2002; Damasceno *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2005; Murillo *et al.*, 2006, entre otros.

Bauhinia kalbreyeri Harms es quizá una de las especies menos conocida dentro del género que nos ocupa, y sin embargo en Ibagué, Tolima (1170 m.s.n.m., 22.5° C) es abundantemente encontrada en parques, avenidas y jardines. La etnobotánica de la región utiliza las decocciones de hojas y corteza en el tratamiento de la diabetes mellitus, la cual debe entenderse como un conjunto de patologías relacionadas fundamentalmente con fallas en la producción o recepción de insulina. Cuando las célu-

las beta (en los islotes de Langerhans del páncreas) no producen insulina se produce la Diabetes Mellitus Insulinodependiente o tipo I, en tanto que si los receptores de insulina de las células del cuerpo no funcionan, se genera la Diabetes Mellitus No Insulinodependiente, o tipo II. En cualquier caso, la glucosa no puede ingresar a las células para ser usada efectivamente y el aumento del metabolismo de la glucosa remanente genera un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de defensa antioxidante del cuerpo; desbalance conocido como *estrés oxidativo* (Halliwell *et al.*, 1992). Esto ocasiona, a su vez, degeneración de las paredes celulares y de los vasos sanguíneos, daños en la retina, deterioro renal, aterosclerosis, afecciones en el sistema nervioso central e incluso múltiples alteraciones reproductivas, genotoxicidad, diabetes y cáncer (Gülçinet *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2004).

Sobre esta base, en nuestros laboratorios hemos iniciado algunos estudios con extractos de *B. kalbreyeri*, en el intento de evidenciar su actividad antioxidante y establecer la contribución de sus constituyentes fenólicos, como los flavonoides, en la actividad funcional revelada por la planta, buscando dar soporte científico a la aplicación etnofarmacológica que *B. kalbreyeri* tiene en el departamento del Tolima.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos químicos

El 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), el N-[1-Naftil] etilendiamina dihidrocloruro y la Rutina fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. Todos los demás reactivos utilizados en el trabajo, incluidos los solventes, fueron de grado analítico.

2.2 Preparación de la muestra

Hojas y corteza de *B. kalbreyeri* se recolectaron en estado óptimo de desarrollo vegetativo y fitosanitario, en la zona suburbana de Ibagué (1170 m.s.n.m., $22.5 \pm 1^\circ\text{C}$). Una muestra del espécimen se encuentra en la colección de fabáceas del Herbario Nacional de Colombia (referencia N° COL: 509144). Un proceso de maceración con etanol y agua (1:10, vegetal/solvente, por 48 h), con remoción del solvente cada 24h hasta el agotamiento, permitió preparar los extractos crudos, los cuales se filtraron y concentraron a presión reducida, hasta obtener un material viscoso que se almacenó (4°C) hasta su utilización en frascos ámbar debidamente rotulados. En el intento de dar validez científica a las costumbres populares del Tolima, se preparó una decocción con agua a partir del material vegetal (1:10 vegetal/solvente, por 30

minutos), el cual se sometió a los mismos procesos de concentración, envasado y almacenamiento de los anteriores extractos.

2.3 Separación de los flavonoides totales de las hojas y corteza de *baubinia kalbreyeri*

la separación de los flavonoides se realizó mediante cromatografía de capa delgada preparativa, usando como fase estacionaria placas de sílica gel (1mm de espesor) y como eluyente acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (100:11:2:7). El desarrollo del cromatograma se efectuó mediante sistema ascendente. Como revelador se aplicó luz UV (365 nm). Las bandas con fluorescencia azul intensa y amarilla se identificaron como flavonoides, las fracciones separadas se sometieron a las mismas pruebas antioxidantes aplicadas a los extractos.

2.4 Determinación del contenido de fenoles y flavonoides

Una alícuota de una solución etanólica de los extractos (1:50) se mezcló con el reactivo de Folin-Ciocalteu (2.5 mL) y con carbonato de sodio del 7.5% (2 mL). La mezcla se calentó (10 minutos a 50 °C), se le dejó alcanzar la temperatura ambiente y se leyó la absorbancia contra un blanco de reactivos a 760 nm (Singleton y Rossi, 2006). Se usó ácido gálico para preparar la curva de calibración, el contenido fenólico total se calculó a partir de la ecuación de regresión: $y = 173.5X$, $r^2 = 0.9977$, y se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal seco (mgEAG/g. seco).

La cantidad de flavonoides se estimó mezclando una alícuota de los extractos crudos y de los estándares con 4 ml de agua destilada. A cada una de estas alícuotas se le agregó nitrito de sodio del 5% (0.3 mL), se dejó incubar por 5 minutos, se adicionó tricloruro de aluminio del 10% (0.3 mL), y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 6 minutos. Después se agregó hidróxido de sodio (2 mL, 1M), se aforó con agua destilada hasta 10 ml y finalmente se leyó la absorbancia a 510 nm (Kumaran y Karunakaran., 2007). Las lecturas de esta variable se interpolaron en la curva de calibración preparada con rutina, caracterizada mediante la ecuación de regresión: $y = 805.9X$, $r^2 = 0.9979$. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de rutina por gramos de material vegetal seco (mgER/g. seco).

2.5 Actividad antioxidante

2.5.1 Actividad estabilizante del radical DPPH

Se cuantificó la capacidad de los extractos y de los flavonoides aislados para estabilizar el radical (DPPH-H) siguiendo la metodología propuesta (Ohinshiet *et al.*, 2005). Cada uno de los extractos (160 µg/mL) se mezcló con DPPH (0.1mM, relación 1:3), se incubó a temperatura ambiente (30 minutos) y se leyó la absorbancia a 517 nm. El ácido gálico (AG), el ácido ascórbico (AA) y el Butil-hidroxitolueno (BHT), preparados a igual concentración (10 µg/mL), fueron utilizados como estándares de referencia. La actividad estabilizante del radical se cuantificó mediante la ecuación:

$$\% \text{AERL} = \left[\frac{\text{ABS}_{\text{DPPH}} - \text{ABS}_{\text{MUESTRA}}}{\text{ABS}_{\text{DPPH}}} \right] \times 100$$

2.5.2 Medida del poder reductor

El poder reductor del vegetal se determinó siguiendo la metodología descrita (Oyazuet *et al.*, 1986). Una alícuota del extracto crudo se llevó con metanol hasta 1 mL, se mezcló con buffer fosfato (2.5 mL, 0.2M, pH 6.6) y ferricianuro de potasio (2.5 mL, 1%), se incubó a temperatura constante (50 °C, 20 minutos) y se adicionó ácido tricloroacético (2.5 mL, 10%). La mezcla resultante se llevó a la centrifuga (3500 r.p.m. 10 minutos). Del sobrenadante se tomó una alícuota (2.5 mL) que fue disuelta en una cantidad igual de agua destilada e inmediatamente se agregó cloruro férrico (0.5 mL, 0.1%). Finalmente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 700 nm. Se utilizaron como controles positivos AG y AA, a igual concentración (15 µg/mL). El poder reductor de los extractos guarda una relación directa con el valor de la absorbancia.

2.5.3 Actividad quelante del ion Fe^{+2}

La metodología seguida fue la propuesta (Dinis *et al.*, 1994). A los extractos vegetales y a los flavonoides aislados (1%) se les agregó cloruro ferroso (50 µl, 2mM). La reacción se inició por adición de ferrocina (0.8 ml, 5mM), la mezcla se agitó fuertemente, dejándola en reposo a temperatura ambiente (10 minutos), posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. El mismo procedimiento fue aplicado a los patrones utilizados (EDTA, 10,15% y AG, 10%). La densidad óptica es directamente proporcional a la habilidad quelante del extracto.

2.5.4 Habilidad para descomponer el H_2O_2

La potencialidad de los extractos y de las fracciones de flavonoides para descomponer el prooxidante peróxido de hidrógeno fue determinada de acuerdo al método sugerido (Ruch, *et al.*, 1989). A una solución de H_2O_2 preparada en buffer fosfato (pH 7.4) se le determinó la concentración inicial a 230 nm, utilizando una absorptividad molar de $81(\text{mol/l})^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A cada muestra (3 mL, 1 ppm) se le adicionó 1.8 mL de la solución tamponada de peróxido. La absorbancia del H_2O_2 remanente fue determinada después de 10 minutos contra un blanco de reactivos. Patrones ácido gálico, ácido ascórbico, rutina. La habilidad para descomponer el peróxido fue estimada utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{AIP} = \left[\frac{A_M}{A_o} \right] \times 100$$

2.5.5 Actividad antinitrosativa

Para establecer la habilidad de los extractos para capturar el óxido nítrico (NO), se aplicó la metodología seguida (Giraldo *et al.*, 2003) con algunas modificaciones. Se prepararon dos baterías de siete tubos cada una. La batería I contenía diferentes volúmenes de los extractos (0.2, 1.2 y 2 mL) a igual concentración (5%), al séptimo tubo se le añadió 1 mL de AG al 5% (patrón). A cada tubo se le agregó suficiente agua destilada para completar 2 mL, e inmediatamente se adicionó nitroprusiato de sodio (NPS, 0.4 mL, 113 μM), se agitó y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 150 minutos, tiempo después del cual se agregó el reactivo de Griess: primero 0.8 mL del reactivo A (ácido sulfanílico al 1% en ácido fosfórico al 5%) y 30 minutos después se adicionó 0.8 mL del reactivo B (N-1 naftiletilediamina al 0.1% en agua destilada). Los tubos se dejaron en reposo durante 45 minutos, y se leyó la absorbancia a 546 nm. Las lecturas de absorbancia decrecen con el aumento de la actividad antinitrosativa. La batería II fue utilizada como blanco de la anterior; para prepararla se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, reemplazando el volumen de NPS por agua destilada.

2.6 Análisis estadístico

Todos los datos son expresados como la media de tres determinaciones ($n=3 \pm \text{DS}$). El análisis de regresión lineal se efectuó para calcular la relación dosis-respuesta de las soluciones estándar y muestras analizadas. El grado de correlación entre las variables se expresó a través del coeficiente de correlación r_{xy} . Con el ánimo de medir el nivel

de significancia entre los extractos se aplicó un ANOVA de un factor y ANOVA de dos factores. Además se realizaron tests de comparación múltiple: LSD (diferencia mínima significativa), utilizando el programa de apoyo para estadística general con algunas aplicaciones matemáticas (ESM), versión 8.4.5. Adicionalmente, se aplicó el test de TUKEY (prueba de comparación múltiple) a través del programa G-STAT (Glaxo-Smithkline, versión 1.2).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del extracto etanólico de hojas y corteza de *B. kalbreyeri*, se aislaron mediante cromatografía de capa delgada preparativa las bandas fluorescentes azules y amarillas con Rf entre 0.3 y 0.8, las cuales respondieron de manera positiva a las pruebas de Shinoda, Pew y cloruro férrico. Un tratamiento posterior con reactivos de desplazamiento (metanol, acetato de sodio, ácido bórico, tricloruro de aluminio y tricloruro de aluminio más ácido clorhídrico) dejó ver una mezcla heterogénea de flavonoides, dentro de los cuales priman las flavonas y los flavonoles, con los OH ubicados en las posiciones 3 y 5 posiblemente glicosiladas.

La naturaleza química de los flavonoides es predictiva de su actividad estabilizante de radicales libres, debido a que los potenciales reductores de sus radicales son más bajos que aquellos de los radicales peroxilos y superóxido, lo que significa que estos metabolitos secundarios pueden inactivar esas especies prooxidantes y prevenir así sus efectos dañinos (Rice *et al.*, 1996). Adicionalmente, se realizó un tamizaje fitoquímico del extracto etanólico crudo de hoja y corteza de la planta, encontrándose en ambos una alta presencia de carbohidratos reductores, fenoles, flavonoides, taninos condensados, fenilpropanoides, quinonas, terpenos y/o esteroides e iridoides. En menor proporción se observaron saponinas y cumarinas. No se detectaron, bajo las condiciones del ensayo, alcaloides, cardiotónicos y lactonas terpénicas. Lo anterior permite inferir que en el material bajo estudio, los constituyentes de naturaleza fenólica son abundantes y diversos.

Los fitofenoles, entre ellos los flavonoides, fenilpropanoides y taninos, han sido reportados como precursores de múltiples actividades biológicas entre las que se cuenta su acción antioxidante (Rice *et al.*, 1996; Pietta, 2000; Gorinstein *et al.*, 2004; Soobrattee *et al.*, 2005; Dasgupta y De, 2007). De igual manera se tiene en cuenta, además, que esta funcionalidad ha sido correlacionada con procesos fisiopatológicos como la diabetes (Gülçin *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2004), por lo tanto fue de gran interés cuantificar los contenidos de fenoles y de flavonoides totales presentes en *B. kalbreyeri*.

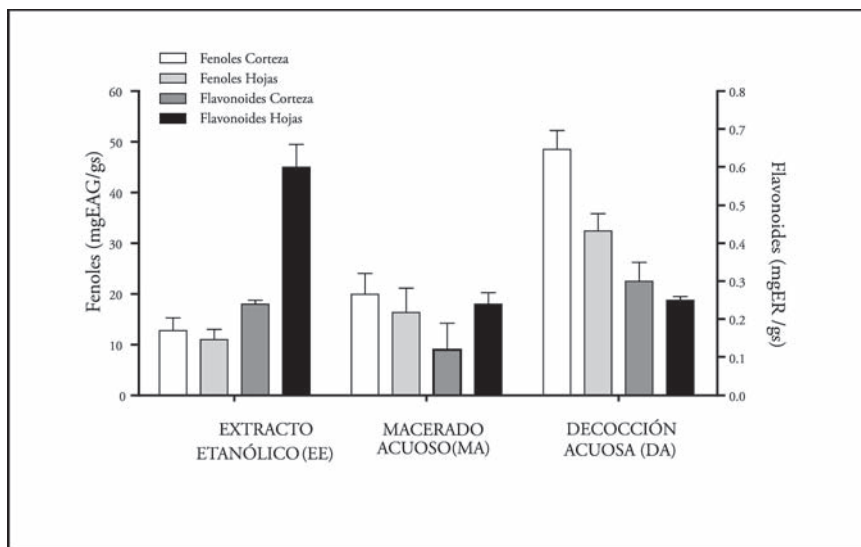


Figura 1. Contenido total de fenoles y de flavonoides en *Baubinia kalbreyeri*.

De acuerdo con los resultados que ilustra la figura 1, se puede deducir que al someter la corteza de *B. kalbreyeri* a decocción se obtiene buena cantidad de constituyentes fenólicos, mientras que los macerados etanólicos de hojas hacen lo propio en relación con los flavonoides. Al realizar un análisis comparativo se infiere que la utilización de agua caliente favorece la extracción de los compuestos de naturaleza fenólica en mayor medida que cuando se hace uso del mismo solvente en frío, lo que permite pensar que un producto fitoterapéutico preparado a partir de la planta podría conservar las cualidades manifestadas en el vegetal crudo. Las funciones antioxidantes de los constituyentes fenólicos son eliminar radicales libres convirtiéndolos en especies estables, en algunos casos reaccionar con ellos, o bien quelar metales que actúan como cofactores de enzimas que intervienen en procesos oxidativos (Shahidi, 1992; Sánchez, *et al.*, 1999).

Mediante un ensayo preliminar se estableció la actividad de los extractos para estabilizar radicales libres. Para tal efecto se realizó un screening rápido de decoloración del radical DPPH comparado con la acción de los patrones (AA y BHT). En distintos pozos de una microplaca se depositaron diferentes volúmenes del extracto (2-12 μ l), y en cada uno de ellos se agregó DPPH (100 μ l, 0.1mM).

El método permite estimar semicuantitativamente la acción del material ensayado.

A través de esta prueba se encontró que los extractos AHD y EEC fueron los más activos, lo que se corroboró con las pruebas colorimétricas aplicadas.

Los valores estimados al determinar la actividad estabilizadora del radical libre DPPH (AERL), la capacidad para descomponer el peróxido de hidrógeno (CDP) y el poder reductor (PR) de los extractos y de la fracción de flavonoides aislados aparecen consignados en la tabla 1.

Tabla 1. Actividad estabilizante de radicales libres (AERL), capacidad de descomposición del H₂O₂ (CDP) y poder reductor (PR) de los extractos y flavonoides de *B. kalbreyeri* comparados con los patrones.

Muestra	AERL (%)	CDP (%)	PR(abs)
EEH	88,61 ± 0.5	63,95 ± 0.07	0,620 ± 0.08
EEC	95,84 ± 0.12	69,43 ± 0.04	0,620 ± 0.081
MAH	94,43 ± 0.23	100 ± 0	0,119 ± 0.005
MAC	79,09 ± 0.36	98,79 ± 0.43	0,087 ± 0.013
AHD	95,49 ± 2.36	100 ± 0	0,306 ± 0.002
ACD	83,47 ± 0.55	100 ± 0	0,331 ± 0.024
FH(flavonoides hoja)	31,82 ± 1.28	36,31 ± 4.26	0,005 ± 0.033
FC(flavonoides corteza)	18,53 ± 1.00	56,28 ± 1.04	0,019 ± 0.005
BHT	98.32 ± 0.47	ND	ND
AA	99.37 ± 0.47	48,05 ± 0.8	0,053 ± 0.002
AG	ND	62,1 ± 1.09	0,213 ± 0.006
RUTINA	ND	37,3 ± 0.34	ND

ND: No detectado. Los resultados corresponden a la media de tres determinaciones ± DS (n = 3).

En todos los casos se nota a los extractos igualando o superando la acción de los controles positivos, en especial al BHT y al AA. Caso contrario se observa con las fracciones de flavonoides, cuya habilidad para estabilizar radicales libres y su poder reductor resultaron ser los más bajos entre los tratamientos,. Sin embargo la capacidad de los mismos para desestabilizar el H₂O₂ se muestra equiparable a la de las sustancias de referencia.

Importa mencionar que la tabla en cuestión nos muestra a alguno de los tratamientos con un comportamiento particularmente sobresaliente a través de los tres ensayos aplicados. Por el contrario, se observan variaciones que podrían ser parcialmente

sustentables en los diversos mecanismos de acción de los antioxidantes, los cuales son dependientes de factores intrínsecos como estructura, características de solubilidad, número y posición de los sustituyentes, entre otros (Mathew y Abraham, 2006), así como también de propiedades derivadas de la naturaleza del prooxidante, su potencial reductor o del tipo de prueba a la que es sometido.

No obstante, el análisis de varianza de un factor mostró diferencias significativas de los extractos entre sí, y las fracciones de flavonoides ($p < 0.05$). Complementariamente permitió corroborar que la acción de los flavonoides aislados de hojas y corteza es inferior a la de los extractos. Las pruebas de comparación múltiple dejaron ver a EEC, MAH y AHD como los tratamientos de mayor efectividad en las pruebas aplicadas, dando a entender que el potencial antioxidante del vegetal no deriva directamente de los flavonoides contenidos en ellos, sino más bien de la actividad conjunta de sus metabolitos secundarios detectados a través del análisis fitoquímico: flavonoides, taninos condensados, fenilpropanoides, quinonas y terpenos, entre otros.

Entre todos los usos etnofarmacológicos atribuidos a las especies de *Bauhinia*, quizá la hipoglicemiante y diurética son las que mayor interés han despertado, convirtiendo a estos vegetales en blanco de un sinnúmero de estudios principalmente de corte clínico, a pesar de lo cual los resultados han sido algunas veces contradictorios. Da Silva *et al.* (2002) observaron un efecto hipoglicemiante del extracto hidroalcohólico de *B. variegata* en ratones normales, pero no resultó así cuando la diabetes fue inducida por acción de la estreptozotocina. Sin embargo Wazlawilk *et al.* (1994) determinaron que los flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de las semillas del mismo vegetal tienen actividad hipoglicemiante en ratas tratadas con el mismo diabetógeno.

Los resultados hasta ahora obtenidos fueron motivantes para continuar indagando sobre la funcionalidad antioxidante de los extractos y las fracciones de flavonoides de hoja y corteza de *B. kalbreyeri*. En tal sentido, se probó la habilidad de los materiales vegetales para quelar el ion Fe^{+2} . No debe perderse de vista que en sistemas biológicos, las sales de hierro enlazan proteínas, membranas, ácidos nucleicos o actúan como agentes quelantes de especies de bajo peso molecular, y que la enzima superóxido dismutasa convierte el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en H_2O_2 mediante la reacción de Fenton. Esto último en presencia de Fe^{+2} produce el radical hidroxilo ($OH^{\cdot-}$), reacción que es activada por Fe^{+2} y Cu^+ , a su vez este radical ataca la doble unión de los ácidos grasos insaturados que contienen los fosfolípidos de las membranas celulares, daño que puede ocurrir en la membrana plasmática, la mitocondrial y la del retículo

endoplasmático (Bencheroun *et al.*, 1993; Goeth *et al.*, 1990), modificando además la activación de los canales iónicos y la liberación de los neurotransmisores.

La figura 2 ilustra el comportamiento de extractos y flavonoides aislados en su acción quelante del ion Fe^{+2} (AQH). Con claridad se evidencia la importante participación de los flavonoides en esta actividad, la cual resulta superior a la de los extractos y comparable a la de los patrones (EDTA y AG). No obstante todos los tratamientos alcanzaron valores cercanos al 80%, o superiores. Se entendería entonces que la acción antioxidante de la planta está fundamentalmente apoyada en la habilidad de sus constituyentes químicos para estabilizar radicales libres o bien para quelar metales.

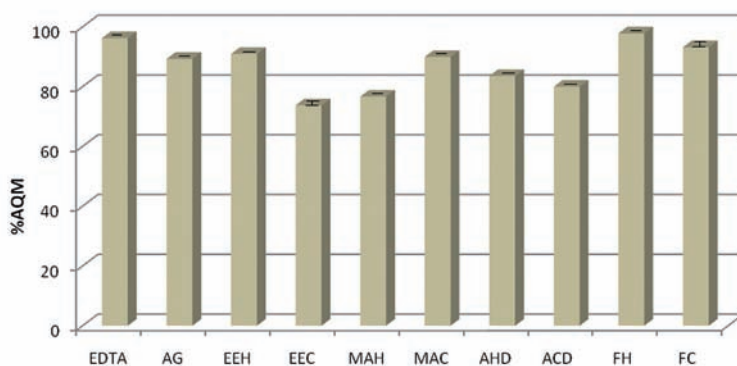


Figura 2. Actividad quelante de hierro de extractos y flavonoides de *B. kalbreyeri*, comparada con los patrones.

De acuerdo con Halliwell y Gutteridge (1992), los flavonoides ejercen su acción antioxidante mediante diferentes mecanismos: suprimiendo la formación de especies reactivas del oxígeno por inhibición de enzimas o quelando elementos trazas involucrados en la producción de radicales libres, capturando especies reactivas del oxígeno o bien protegiendo las defensas antioxidantes. En el interés de probar esta actividad algunos investigadores han realizado estudios que muestran la participación de los flavonoides en la actividad antioxidante de vegetales (Giraldo *et al.*, 2003; Murillo *et al.*, 2006; Kumaran y Karunakaran, 2007).

Estos fitocompuestos intervienen en los sistemas redox biológicos, ligándose a un

número de proteínas antioxidantes, tales como la transferrina, la ceruloplasmina y la proteína quinasa (Dumoulin *et al.*, 1996; Grutteridge, 1985), también se les ha registrado como inhibidores de la ciclooxigenasa, lipoxigenasa, monooxigenasa microsomal, glutatión S-transferasa, succinoxidasa mitocondrial y la NADH oxidasa, todas ellas involucradas en la generación de especies reactivas del oxígeno (Pietta, 2000).

Por otra parte, se sabe que tanto el estrés oxidativo como el nitrosativo, por diversas circunstancias, tanto de carácter intrínseco como extrínseco, inducen a que los mecanismos biológicos pierdan el control sobre los radicales libres con el desbalance consecuente entre las condiciones oxidantes y las defensas antioxidantes celulares. En concordancia, resulta de particular interés evaluar no sólo el potencial antioxidante de un material vegetal sino además su capacidad antinitrosativa.

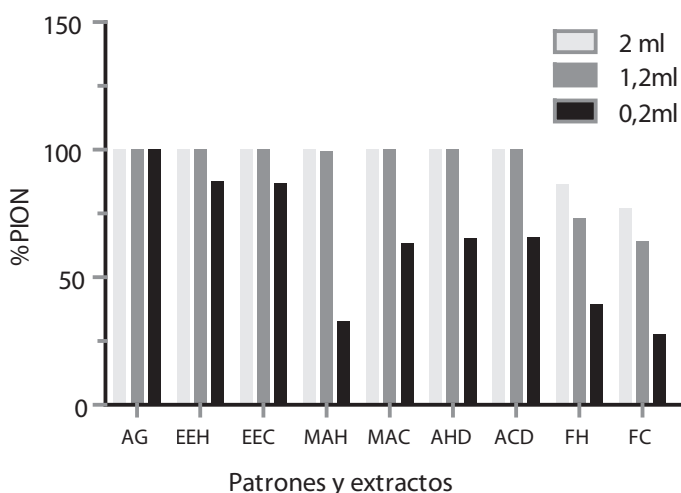


Figura 3. Potencial inhibitorio del óxido nítrico de extractos y flavonoides de *B. kalbreyeri*, comparado con el ácido gálico.

Las fracciones de flavonoides aislados presentaron actividad antinitrosativa no despreciable, sin embargo ésta fue menor que la de los extractos, en todas las cantidades probadas; se infiere entonces que durante el procesamiento de obtención de los extractos se separan también otros componentes que sinergizan a los flavonoides en su actividad. Los resultados ilustrados en la figura 3 y los arrojados por la prueba de comparación múltiple de dos vías aplicada, permiten observar que el potencial antinitrosativo de los extractos no difiere en forma significativa entre ellos. La figura también deja ver una relación directa dosis-respuesta.

Adicional a la participación en la actividad enzimática mencionada en párrafos anteriores, a los flavonoides se les ha reconocido que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (Lindahl & Taggeson, 1997), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa y la superóxido dismutasa (Sudheesh, *et ál.*, 1999).

Nuestros resultados demuestran que los flavonoides de las hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* colectada en Ibagué presentan actividad antioxidante manifestada a través de diferentes mecanismos. La literatura pertinente a este trabajo no muestra otros comparables, dado que los investigadores de las especies de *Bauhinia* se han interesado en probar el efecto hipoglicemiante de extractos crudos de diferente polaridad o bien a aislar metabolitos a partir de ellas; este parece ser uno de los pocos que evidencia la participación directa de los flavonoides en la funcionalidad antioxidante de una especie de *Bauhinia*.

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS


Los antioxidantes de *Bauhinia kalbreyeri* Harms, colectada en Ibagué, muestran capacidad para estabilizar radicales libres, poder reductor del ion Fe^{+3} , habilidad para quelar el Fe^{+2} y descomponer el peróxido de hidrógeno, así como también aptitud para capturar especies reactivas de nitrógeno, entre ellas el óxido nítrico (NO). Se observó que el etanol es mejor solvente que el agua para extraer los constituyentes activos de la planta, al proceso de decocción con agua como más favorable que el de maceración, a la corteza como la mayor aportante de compuestos bioactivos y una correlación dosis-respuesta antinitrosativa. Complementariamente, la capacidad de la especie vegetal para quelar el ion Fe^{+2} es fundamentalmente soportada por los flavonoides que posee en las hojas y la corteza. Es importante tener en cuenta que la actividad antioxidante evidenciada en *B. kalbreyeri* está basada en los derivados fenólicos, los cuales sustentan, al menos en parte, las pruebas *in vitro* a que fue sometida.

Actualmente se está ampliando el estudio de los mecanismos de acción de los antioxidantes de *B. kalbreyeri* tales como transducción de la señal celular, proliferación y diferenciación de células, apoptosis o la inflamación; sólo así pueden tenerse ideas importantes de sus usos profilácticos, para lo cual se está probando su eficacia a través de sistemas celulares *in vivo* y modelos animales.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M. S., Azhar, I. & Amtul, Z. (1999). Antimicrobial screening of Caesalpiniaceae. *Fito-terapia* 70: pp. 299–304.
- Bencheroun, M. N., Pourquier, P., Schott., B. & Robert, J. (1993). Dexorubicin-induced lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in tumor cell lines selected for resistance to dexorubicin. *Eur. J. Biochem.* 211: pp.141-146.
- Da Silva, M. L & Filho, V. C. (2002). Plantas do gênero *Bauhinia*. Composição química e potencial farmacológico. *Química nova.* 25 (3): pp. 449-454.
- Damasceno, D. C., Volpato, G. T., Mattos, I., Calderon, P., Aguilar, R. & Cunha Rudge, M. V. (2004). Effect of *Bauhinia forficata* extracts in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. *Phytomedicine.* 11: pp.196–201.
- Dasgupta, N. & De, B. (2007). Antioxidants Activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry.* 101: pp. 471-474.
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. & Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of biochemistry and biophysics.* 315: pp. 161-169.
- Duarte-Almeida, J. M., Negri, G. & Salatin, A. (2004). Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). *Biochemical Systematics and Ecology.* 32 (8): pp. 747-753.
- Dumoulin, M. J., Chaine, R., Atanasiv, R., Nadeau, R. & Mateescu, M. (1996). Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin. *Arzneimittel-fors-chung-drug-research.* 46: pp. 588-861.
- Giraldo, B., Hernández, M. M., Angulo, P. & Fuertes, C. (2003). Actividad antinitrosativa y antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de *Uncaria tomentosa* Willd. D.C. (Uña de gato). *Rev. Soc. Quím. Perú.* 69 (4): pp. 229-242.
- Goeth, M. E., Freyberger, A. & Rieder, P. (1990). Oxidate stress: A role in the pathogenesis of parkinson's disease. *J Neural Transm.* 29: pp. 241-249.
- Gorinstein, S., Cvikrová, M., Machackova, I., Haruenkit, R., Park, Y.-S., Jung, S.-T.; Yamamoto, K., Martinez, A. L., Katrich, E. & Trakhtenberg, S. (2004). *Food Chemistry.* 84: pp. 503-510.
- Grutteridge, J. M. (1985). Inhibition of the fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assess ment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chenico-Biological Interactions.* 56: pp.113-120.
- Gülçin, I., Büyükkuroğlu, M. E., Oktay, M. & Küfrevioğlu, Ö. I.. (2003). Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. Subs. *Pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *Journal of Ethnopharmacology.* 86: pp. 51-58.

- Gupta, M., Mazumder, U. K., Sambath Kumar, Gomathi, P., Rajeshwar, Y., Kakoti, B. B., Tamil Selven, V. (2005). Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *B. racemosa* stem bark in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*. 98 (3): pp. 267-273.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* pp.119- 598.
- Kumaran, A. & Karunakaran, R. J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of .ve *Phyllanthus* species from India. Swiss Society of Food Science and Technology. *Published by Elsevier*. p. v.
- Lindahl, M., & Tagesson C. (1997). Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation* Vol 21: pp. 347-56.
- Mathew, S. & Abraham, E. (2006). In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by diferent methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. 44:pp. 198–206.
- Matos, F. J. A. (1998). *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 2°.ed :Fotaleza: EUFC. Brazil.
- Murillo, E., Tique, M .M., Ospina, L.F. & Lombo Ó. (2006). Evaluación preliminar de la actividad hipoglicemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante in vitro de extractos de *Bauhinia kalbreyeri* Harms. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 35 (1): pp. 64-80.
- Ohinishi, M. (2005). Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis, citado por Miceli, N. *et al.* Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham.. *Journal of Ethnopharmacology*. 97 (2): pp. 261-266.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese journal of nutrition*. 44: pp. 307-315.
- Pietta, P-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Reviews; J.Nat. Prod.* 63: pp. 1035-1042.
- Rajkapoor, B., Jayakar, B. & Muruges, N. (2003). Antitumour activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascitic lymphoma.. *Journal of Ethnopharmacology*. 89: 107–109. Reddy, M. V. B., Reddy, M. K., Gunasekar, D., Caux, C. & Bodo, B. (2003). A flavanone and dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. *Phytochemistry* 64: pp. 879–882.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., & Pagang, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical & medicine*. 20 (7): pp.933-956.
- Ruch, R. J., Cheng, S. J. & Klauning, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. 10:pp. 1003-1008.

- Russo, E. M. K., Reichelt, A. A. J., De-Sa, J. R., Furlanetto, R. P., Moises R. C. S., Kasamatsu, T. S. & Chacra A. R. (1990). Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 23: pp.11–20.
- Saha, K., Lajis N. H., Israf D. A., Hamzah A. S., Khozirah, S., Khamis, S., & Syahida, A. (2004). Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 92: pp. 263-267.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity an inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*. 32: pp. 407-412.
- Shahidi, F., & Wanasundara, P. K. J. P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critica Reviews in Food Science and Nutrition*. 32: pp.67-103.
- Silva, K. L. (1999). Monografia de Conclusão de Curso, Universidade do Vale do Itajaí, Brasil.
- Singleton & Rossi, J.A. (2006). Colorimetry of total phenols with phospho molybdic phosphotungstic acid reagents, citado por Mathew, Sindhu & Abraham, E. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by diferent methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. 44: pp.198–206.
- Soares, J., Costa, S. & Cecim, M. (2000). Níveis glicêmicos de colesterol em ratos com diabetes mellitus aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. *Ciência Rural, Brasil*. 30 (1): pp.113-118.
- Soobrattee, N. A., Neergheen, V. S., Luximan-Ramma, A. O., Auroma, C. & Bahorum, T. (2005). Phenolics as potencial antioxidants therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*. 579: pp. 200-213.
- Sudheesh, S., Sandhya, C., Sarah, K. A., & Vijayalakshmi, N. R. (1999). Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother Res*. 13: pp. 393-396.
- Viana, E. *et al.*, (1999) Constituents of the stem bark of *B. guianensis*. En: *Fitoterapia*. Vol. 70; pp. 111-112.
- Wazlawilk, E, Silva, M. A., Peters, R. R., Simões, C. M. O. & Ribeiro-Do-Vale, R. M. (1994). IX Reunião Anual da FSBE, Caxambú, Brasil. 

Referencia	Recepción	Aprobación
Ortiz, H.; Sanchez, W.; Murillo, E.; Mendez, J. Potencial antioxidante de hojas y corteza de <i>Bauhinia kalbreyeri</i> harms: contribución de sus flavonoides en esta actividad. Revista <i>Tumbaga</i> (2009).	Día/mes/año 10/02/2009	Día/mes/año 13/03/2009