

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE HOJAS Y CORTEZA DE *BAUHINIA KALBREYERI* HARMS: CONTRIBUCIÓN DE SUS FLAVONOIDES EN ESTA ACTIVIDAD

Por

Heidy F. Ortiz¹, Wilmer F. Sánchez¹, John Méndez A.² & Elizabeth Murillo P.^{2*}

Resumen

Ortiz H. F., W. F. Sánchez, J. Méndez A. & E. Murillo P.: Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* Harms: Contribución de sus flavonoides en esta actividad. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **33**(127): 183-191, 2009. ISSN 0370-3908.

En este estudio se examinó la capacidad antioxidante y antinitrosativa de los extractos y flavonoides aislados a partir de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (Casco de Vaca. Fabaceae). Los extractos mostraron alta funcionalidad antioxidante y antinitrosativa, en tanto que los flavonoides aislados dejaron ver habilidad para quelar metales e inhibir el NO. Se encontraron diferencias significativas entre los extractos entre sí, y entre ellos y las fracciones de flavonoides ($p < 0.05$). 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 from the leaves and bark of *Bauhinia kalbreyeri* Harms (Cow Hoof. Fabaceae) was examined. The extracts showed high antioxidant and antinitrosative functionality, while the flavonoids ability to capture metals and inhibit the NO. Significant differences were found among the extracts, and into those and the flavonoids fractions ($p < 0.05$). The antioxidant activity of the plant seems to be based in the whole phenolic derivatives. The results obtained indicate that the antioxidant potential of *B. kalbreyeri* is comparable with the Butylated Hydroxytoluene and the ascorbic acid used as antioxidants by the food and pharmaceutical industry.

Key words. *Bauhinia kalbreyeri*, free radicals, flavonoids, antioxidant potential.

¹ Licenciatura en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias de la Educación. Universidad del Tolima.

² Departamento de Química. Universidad del Tolima.

* Grupo GIPRONUT. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. Ibagué. Tolima. Correo electrónico: emurillo8@hotmail.com/ elizam60@yahoo.com

1. Introducción

En países como Colombia, poseedores de una alta biodiversidad, resulta especialmente importante el estudio de partes de un vegetal, de extractos o de sustancias puras aisladas que presentan significativa actividad terapéutica. En esta búsqueda nos hemos centrado en el estudio de algunas especies vegetales del género *Bauhinia* (Fabaceae-Caesalpinioideae), el cual comprende alrededor de 400 especies (da Silva & Cechinel Filho, 2002), distribuidas en un amplio rango de zonas tropicales a nivel mundial como Asia, África, América central y del sur (Duarte-Almeida, 2004); popularmente son conocidas como pata de vaca, casco de vaca, pie de buey o mororó (Matos, 1998); 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 y colaboradores (1990), Silva, (1999), Soares, et al. (2000), da Silva, et al. (2002), Damasceno y colaboradores (2004), Gupta (2005), Murillo y colaboradores (2006), entre otros.

Bauhinia kalbreyeri Harms, es quizá una de las especies menos conocida dentro del género que nos ocupa; sin embargo, en Ibagué-Tolima (1170 m.s.n.m., 22.5°C) es 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 originadas fundamentalmente cuando las células beta (en los islotes de Langerhans del páncreas) no producen insulina (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; el aumento del metabolismo de la glucosa remanente genera entonces 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 (Gülçin, et al., 2003; Saha, et al., 2004).

En nuestros laboratorios estamos realizando estudios con extractos de algunas especies de *Bauhinia*, entre ellas *B. kalbreyeri*, con el propósito de establecer el potencial antioxidante y la contribución de los constituyentes fenólicos, entre otros los flavonoides, en la actividad funcional revelada por la planta; en el intento por correlacionar la aplicación etnofarmacológica que el vegetal tiene en el departamento del Tolima y los resultados obtenidos en esta investigación.

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 alto grado de pureza de Merck.

2.2 Obtención de los extractos y preparación de la muestra

Se recolectaron hojas y corteza de *B. kalbreyeri*, en óptimo estado de desarrollo vegetativo y fitosanitario, en la zona suburbana de Ibagué (1170 m.s.n.m., 22.5 ± 1°C). Una muestra del espécimen se encuentra en la colección de fabaceas del Herbario Nacional de Colombia de la Universidad Nacional de Colombia con número de referencia (N° COL: 509144). Un proceso de maceración con etanol y agua (1:10, vegetal/solvente, 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 en un rotavapor BÜCHI R114, hasta obtener un material viscoso que se almacenó (4°C) en frascos ámbar debidamente rotulados hasta su utilización. 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, 30 min), 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 *Bauhinia kalbreyeri*

La separación de los flavonoides se realizó mediante cromatografía de capa delgada preparativa utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel (1 mm 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 inten-

sa y amarilla se identificaron como flavonoides, las fracciones separadas se sometieron a las mismas pruebas de actividad antioxidante aplicadas a los extractos.

2.4 Determinación del Contenido de Fenoles y Flavonoides

Una alícuota de 0.5 mL de una solución de los extractos (1:50) se mezcló con el reactivo de Folin-Ciocalteu (2.5 mL) y con carbonato de sodio (2 mL, 7.5%); la mezcla se calentó (10 min, 50°C), se le dejó alcanzar la temperatura ambiente y se leyó la absorbancia contra un blanco de reactivos a 760 nm (Singleton & Rossi, 2006). El ácido gálico se utilizó 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).

La cantidad de flavonoides se estimó mezclando una alícuota (0.5 mL) de los extractos crudos y de los estándares con 4 mL de agua destilada, a la solución obtenida se le agregó nitrito de sodio (0.3 mL, 5%), se dejó incubar 5 min, se adicionó tricloruro de aluminio (0.3 mL, 10%) y se dejó en reposo a temperatura ambiente (6 min), después de lo cual se agregó hidróxido de sodio (2 mL, 1M), se aforó con agua destilada a 10 mL, y se leyó la absorbancia a 510 nm (Kumaran, *et al.*, 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).

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), siguiendo la metodología propuesta por Ohinishi, *et al.* (2005). A 1 mL de cada uno de los extractos (160 µg/mL) se adicionó 3 mL de DPPH (0.1 mM), se incubó a temperatura ambiente (30 min) y se midió la absorbancia a 517 nm. Se utilizaron como patrones el ácido gálico (AG), ácido ascórbico (AA) e hidroxitolueno butilado (BHT), a igual concentración (10 mg/mL).

El porcentaje de Actividad Estabilizante de Radicales Libres (%AERL) se obtuvo mediante la ecuación:

$$\%ASRL = \left[\frac{ABS_{DPPH} - ABS_{MUESTRA}}{ABS_{DPPH}} \right] \times 100$$

2.5.2 Medida del Poder reductor

El poder reductor del vegetal se determinó siguiendo la metodología descrita por Oyaizu (1986), una alícuota de 0.1 mL 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 min), se adicionó ácido tricloroacético (2.5 mL, 10%), la mezcla resultante se centrifugó (548 x g, 10 min); se tomó una alícuota del sobrenadante (2.5 mL) la cual fue disuelta en una cantidad igual de agua destilada, inmediatamente se agregó cloruro férrico (0.5 mL, 0.1%); finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 700 nm. Se utilizaron como controles positivos AG, 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}

A los extractos vegetales y a los flavonoides aislados (1%), se les agregó sulfato ferroso (50 µl, 2 mM). La reacción se inició por adición de ferrocina (0.8 mL, 5 mM), la mezcla se agitó fuertemente, dejándola en reposo a temperatura ambiente (10 min), 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%, AG 10%). La densidad óptica es directamente proporcional a la habilidad quelante del extracto. La metodología seguida fue la propuesta por Dinis, *et al.* (1994).

El porcentaje de inhibición de la formación del complejo Ferrocina- Fe^{+2} fue estimada mediante la ecuación:

$$\%AQH = \left[\frac{(A_0 - A_M)}{A_0} \right] \times 100$$

Donde.

%AQH: actividad quelante de Fe^{+2}

A_0 : absorbancia del control

A_M : absorbancia de la mezcla reaccionante

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 por Ruch, *et al.* (1989). Una solución de H_2O_2 preparada en buffer fosfato (pH 7.4) se le determinó la concentración inicial a 230 nm, utilizando una absortividad molar de 81 $cm^{-1} \cdot mol^{-1} L$. A las muestras (3 mL, 1 ppm) se les adicionó

1.8 mL de la solución tamponada de peróxido. La absorbancia del H₂O₂ remanente se determinó después de 10 min contra un blanco de reactivos.

La actividad inhibitoria del peróxido fue estimada utilizando la siguiente ecuación:

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

Donde:

%CDP: actividad inhibitoria de H₂O₂

A₀: Absorbancia del control

A_M: Absorbancia de la mezcla reaccionante

2.5.5 Actividad antinitrosativa

Para establecer la habilidad de los extractos para capturar el óxido nítrico (NO), se aplicó la metodología seguida por **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, inmediatamente se adicionó nitroprusiato de sodio (NPS, 0.4 mL, 113 mM), se agitó y se dejó incubar a temperatura ambiente (150 min), 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 min después se adicionó 0.8 mL del reactivo B (N-1 naftiletilediamina al 0.1% en agua destilada); los tubos se dejaron en reposo 45 min, y se midió 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.

La actividad antinitrosativa se estimó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% PION = \left[\frac{A_0 - A_M}{A_0} \right] \times 100$$

Donde:

% PION: corresponde al potencial inhibitorio del óxido nítrico

A₀: es la absorbancia del control

A_M: es la absorbancia de la mezcla reaccionante

2.5.6 Análisis estadístico

Todos los datos son expresados como la media de tres determinaciones (n = 3) ± DS. El análisis de regresión lineal se efectuó para calcular la relación dosis-respuesta de las soluciones estándares 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. Adicionalmente se realizaron test 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

Del extracto etanólico de hojas y corteza pulverizadas de *Bauhinia 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 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-Evans et al.**, 1996).

Adicionalmente se realizó un tamizaje fitoquímico al extracto etanólico crudo de hoja y corteza de la *B. kalbreyeri*, encontrándose en ambos abundante contenido 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 *B. kalbreyeri* los constituyentes de naturaleza fenólica son abundantes y diversos.

Los fitofenoles, entre ellos los flavonoides, fenilpropanoides y taninos, han sido reportados como poseedores

de múltiples actividades biológicas entre las que se cuenta su acción antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996; Pietta 2000; Gorinstein *et al.*, 2004; Soobrattee *et al.*, 2005; Dasgupta & De, 2007), teniendo en cuenta además que esta funcionalidad ha sido correlacionada con procesos fisiopatológicos como la diabetes (Gülçin *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2004), en este trabajo se cuantificaron los contenidos de fenoles y de flavonoides totales (figuras 1 y 2 respectivamente).

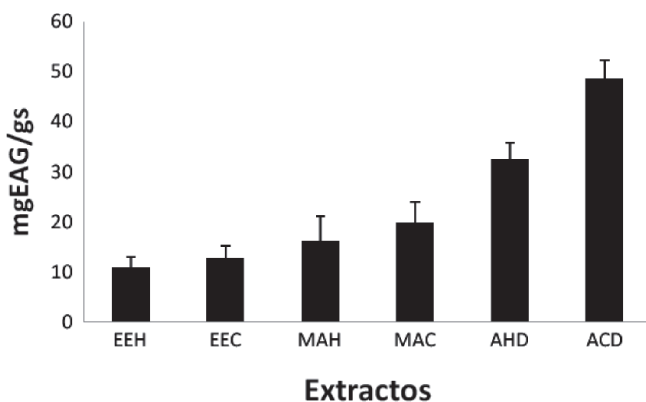


Figura 1. Contenido total de fenoles en *Bauhinia kalbreyeri*

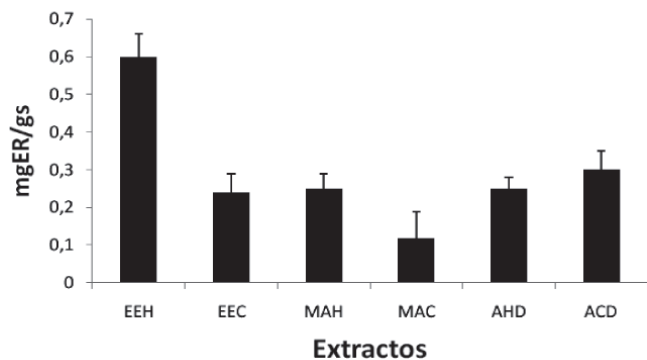


Figura 2. Contenido total de flavonoides en *Bauhinia kalbreyeri*

A través de los resultados que ilustran las figuras 1 y 2 se puede deducir que al someter la corteza de *B. kalbreyeri* a decocción se obtiene una considerable cantidad de constituyentes fenólicos, en tanto 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 más que hacer 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. Uno de los mecanismos de acción antioxidante de los constituyentes fenólicos es 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 & Wanasundara, 1992; Sánchez-Moreno *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 comparados con la acción de los patrones (AA y BHT). En distintos pozos de una microplaca se depositaron diferentes volúmenes del extracto (2-12 µl) y en cada uno de ellos se agregó DPPH (100 µl, 0.1 mM).

Este test es un método rápido y sencillo para evaluar moléculas antioxidantes pequeñas, debido a que la reacción puede observarse visualmente utilizando un equipo de laboratorio clásico, como lo es la microplaca; adicionalmente 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 confirmó el método espectrofotométrico.

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.

En todos los casos se nota que la actividad de los extractos es comparable a la del BHT y al AA, sustancias utilizadas como antioxidantes en alimentos. Caso contrario se observa con las fracciones de flavonoides, cuya habilidad para estabilizar radicales libres y su poder reductor resultó ser la más baja entre los tratamientos; sin embargo, la capacidad de los mismos para desestabilizar el H₂O₂ se muestra equiparable a la de las sustancias de referencia.

Cabe mencionar que la tabla en cuestión no 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 & Abraham, 2006), así como también en propiedades derivadas de la naturaleza del prooxidante, su potencial reductor o del tipo de prueba a la que es sometido.

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* comparado 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	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)

No obstante, el análisis de varianza de un factor mostró diferencias significativas de los extractos entre sí, y entre ellos 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, no obstante los resultados han sido algunas veces contradictorios. **da Silva** y colaboradores (2002) observaron 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** y colaboradores (2002) 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 (O₂^{•-}) en H₂O₂ mediante la reacción de Fenton; este último en presencia de Fe⁺² produce el radical hidroxilo (OH[•]), 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 (**Benchroun et al**, 1993; **Goeth et al**. 1990), modificando además la activación de los canales iónicos y la liberación de los neurotransmisores.

La figura 3 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.

De acuerdo a **Halliwell y Gutteridge** (1992), los flavonoides ejercen su acción antioxidante mediante dife-

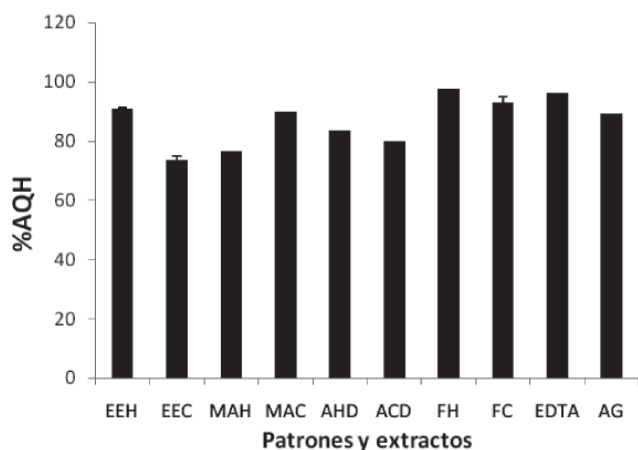


Figura 3. Actividad quelante de hierro de extractos y flavonoides de *B. kalbreyeri*, comparado con los patrones.

rentes 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 & 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; Gutteridge, 1985), también se les ha registrado como inhibidores de la ciclooxigenasa, lipoxigenasa, monooxigenasa microsomal, glutation S-transferasa, succinoxidasa mitocondrial y la NADH oxidasa, todas ellas involucradas en la generación de especies reactivas del oxígeno (Pietta, 2000).

De 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.

Las fracciones de flavonoides aislados presentaron actividad antinitrosativa considerable, 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 com-

ponentes que sinergizan a los flavonoides en su actividad. Los resultados ilustrados en la figura 4 y los arrojados por la prueba de comparación múltiple de dos vías aplicada, permiten deducir que el potencial antinitrosativo de los extractos no difiere en forma significativa entre ellos. La figura también deja ver una relación directa dosis-respuesta.

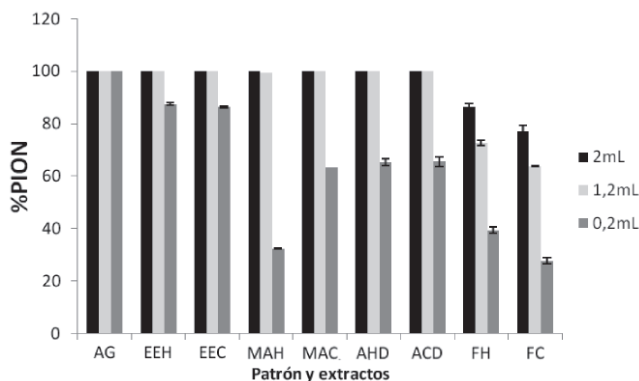


Figura 4. Potencial inhibitorio del óxido nítrico de extractos y flavonoides de *B. kalbreyeri*, comparados con el ácido gálico.

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 al.*, 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.

5. Bibliografía

- Ali, M. S., Azhar, i. & Amtul, Z. 1999. Antimicrobial screening of Caesalpinaceae. *Fitoterapia* **70**: 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**: 141-146.
- Da Silva, M. L & Filho, V. C. 2002. Plantas do gênero *Bauhinia*. Composição química e potencial farmacológico. *Química nova.* **25**(3): 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**: 196-201.
- Dasgupta, N. & De, B. 2007. Antioxidants Activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry.* **101**: 471-474.
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. & Almeida, L. M. 1994. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as perodyl radical scavengers. *Archives of biochemistry and biophysics.* **315**: 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): 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**: 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): 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**: 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**: 503-510.
- Gülçin, I., Büyükkurođlu, M. E., OKTAY, M. & Küfreviođlu, Ö. I. 2003. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. Subs. *Pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *Journal of Ethnopharmacology.* **86**: 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): 267-273.
- Gutteridge, J. M. 1985. Inhibition of the fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chenico-Biological Interactions.* **56**: 113-120.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Cross, C. E. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **119**: 598-620.
- 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**: 347-56.
- Matos, F. J. A. 1998. *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades.* 2ªed: Fozaleza: EUFC. Brazil.
- 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**: 198-206.
- 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): 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): 261-266.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese journal of nutrition.* **44**: 307-315.
- Pietta, P-G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Reviews; J.Nat. Prod.* **63**: 1035-1042.

- Raj Kapoor, 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**: 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): 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**: 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**: 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**: 263-267.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F.** 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*. **32**: 407-412.
- Shahidi, F., & Wanasundara, P. K .J. P. D.** 1992. Phenolic antioxidants. *Critica Reviews in Food Science and Nutrition*. **32**: 67-103.
- Silva, K. L.** Monografia de Conclusão de Curso, Universidade do Vale do Itajaí, Brasil, 1999.
- 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 different methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. **44**: 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): 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**: 200-213.
- Sudheesh, S., Sandhya, C., Sarah, K. A., & Vijayalakshmi, N. R.** 1999. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother Res*. **13**: 393-396.
- Viana, E. P., Santa-Rosa, R. S., Almeida, S. S. M. S., y Santos, L. S.** Constituents of the stem bark of *B. guianensis*. *Fitoterapia*. **70**: 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.

Recibido: enero 14 de 2008.

Aceptado para su publicación: abril 30 de 2009.

