

## Evaluación preliminar de la actividad hipoglicemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante in vitro de extractos de *Bauhinia kalbreyeri* Harms

Elizabeth Murillo<sup>1</sup>, Margarita María Tique<sup>2</sup>, Luis Fernando Ospina<sup>3</sup>, Óscar Lombo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química. Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima. Ibagué. Correo electrónico: emurillo8@hotmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima.

<sup>3</sup> Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Recibido para evaluación: mayo 10 de 2006

Aceptado para publicación: junio 15 de 2006

### RESUMEN

*Bauhinia kalbreyeri* (casco de vaca) es una planta tropical de la familia Caesalpiniaceae. Sus hojas sirvieron de base para obtener un extracto etanólico con el cual se realizaron dos bioensayos con el fin de determinar la actividad hipoglicemiante de la planta. El estudio se complementó evaluando la actividad antioxidante por el método del radical libre DPPH y realizando un análisis fitoquímico preliminar. La diabetes se indujo en ratones normoglicémicos mediante la administración de aloxano en dosis de 75 mg/Kg. Los animales que resultaron diabéticos fueron asignados a diferentes grupos para ser sometidos a tratamiento con el extracto (1.000 mg/Kg), el disolvente de los tratamientos (control), la tolbutamida (patrón, vía oral) y la insulina (vía subcutánea). En los bioensayos se realizaron comparaciones mediante un análisis de varianza (ANOVA). La dosis única de 1.000 mg/Kg no disminuyó los niveles de glucosa sanguínea en ratones con diabetes tipo I (insulino dependiente). No obstante, los extractos etanólicos y acuosos de hoja y corteza de la planta mostraron capacidad atrapadora de radicales libres comparable al ácido ascórbico, utilizado como patrón. La actividad antioxidante de los extractos podría estar relacionada con el uso de la planta como antidiabético dado en la etnobotánica y ser consecuencia de la abundante cantidad de metabolitos tipo fenólico encontrados.

**Palabras clave:** *Bauhinia kalbreyeri*, diabetes, actividad hipoglicemiante, actividad antioxidante, radical libre DPPH.

### SUMMARY

#### PRELIMINARY EVALUATION OF HYPOGLYCEMIC ACTIVITY IN DIABETIC MICE AND IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Bauhinia kalbreyeri* HARMS EXTRACTS

*Bauhinia kalbreyeri* ("cow hof"), is a tropical plant included in the family Caesalpiniaceae. In this work, an ethanolic was obtained. From this extract two bioassays were

carried out in order to determine the hypoglycemic action of plant. The study was complemented evaluating the antioxidant activity by the DPPH free radical method and carrying out a preliminary phytochemical analysis. The diabetes was induced in normoglycemic mice by means of aloxane administration in dose of 75 mg/Kg. The diabetic animals were assigned to different groups to be subjected to treatment with the extract (1.000 mg/Kg), the vehicle (control), the tolbutamide (pattern, *per os*) and the insulin (via subcutaneous). In those bioassays was carried out comparisons by means of a variance analysis (ANOVA). The unique dose of 1.000 mg/Kg did not present antidiabetic activity in mice with diabetes type I (insulin dependent). Nevertheless, the ethanolic and aqueous extracts of leaf and bark showed free radical scavenging capacity comparable to ascorbic acid, which was used as pattern. The antioxidant activity of extracts could be related with the ethnopharmacology use of *Bauhinia kalbreyeri* as antidiabetic, and being consequence of the abundant presence of phenolic-like compounds detected.

**Key words:** *Bauhinia kalbreyeri*, diabetes, hypoglycemic activity, antioxidant activity, free radical DPPH.

## INTRODUCCIÓN

Cuando las células beta (en los islotes de Langerhans del páncreas) no producen insulina, se origina la Diabetes Mellitus Insulinodependiente (DMID) 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 (DMNID) o tipo II. En cualquier caso, la glucosa no puede penetrar en las células del cuerpo y utilizarse eficazmente; se produce entonces un desbalance entre la elaboración de especies reactivas de oxígeno (EROS) y la capacidad de defensa antioxidante del cuerpo; desbalance conocido como estrés oxidativo (1). 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 (2).

Las plantas medicinales pueden convertirse en alternativa válida con el fin de mejorar la calidad de vida de quienes padecen la más importante enfermedad relacionada con el páncreas endocrino; resultando de particular interés aquellas que manifiesten tanto propiedades hipoglicemiantes como antioxidantes. Ciertas especies empleadas popularmente para el tratamiento de la diabetes han sido probadas científicamente con el fin de corroborar esta bioactividad (3-5), entre ellas se encuentran las pertenecientes al género *Bauhinia* utilizadas tradicionalmente con diferentes propósitos en varias regiones del mundo: Asia, África, América Central y del Sur (6-8). Algunas investigaciones han confirmado que una buena parte de ellas tienen actividad hipoglicemiante tanto en animales normales como en aquellos con diabetes inducida por aloxano (9-11).

La decisión de estudiar la actividad hipoglicemiante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (Caesalpinaceae), se fundamentó en la observación de su empleo en la etnobotánica colombiana, particularmente en el Departamento del Tolima, en el tratamiento de la diabetes, y porque se encuentran pocos estudios relacionadas con su actividad farmacológica.

En este trabajo se investigó la actividad hipoglicemiante de la planta en ratones normoglicémicos y con diabetes inducida por aloxano. El efecto inmediato del aloxano como diabetógeno experimental se caracteriza por una variación en el nivel de glucosa, observándose diferencias según la especie tratada y de acuerdo a la dosis administrada (12).

Este estudio se emprendió con el propósito de evaluar la posible actividad hipoglicemiante del extracto etanólico de las hojas de *Bauhinia kalbreyeri*, probada a diferentes dosis sobre grupos de 10 ratones cada uno, comparando la eficacia del extracto frente a la tolbutamida y a la insulina. Complementariamente, se determinó la actividad antioxidante mediante la evaluación de la capacidad de la planta para atrapar radicales libres y se realizó un estudio fitoquímico, buscando con ello asociar la bioactividad observada con los constituyentes químicos detectados.

## METODOLOGÍA

### Recolección y preparación del material vegetal

Las hojas de *B. kalbreyeri* (casco de vaca), se recolectaron (octubre/2004) en zona suburbana de Ibagué (Tolima) (bosque seco tropical, 1.100 m.s.n.m., 24 °C). Un ejemplar de la planta fue depositado en el Herbario Nacional y referenciado con el número COL 509144. El material se secó (45 °C), se redujo a polvo y se maceró exhaustivamente con etanol del 96% (1:30, planta:solvente). Después de filtrar, el extracto se concentró (65 °C) a través de un rotavapor. El producto concentrado fue la base para la realización de los bioensayos. Una muestra del extracto concentrado se sometió a análisis fitoquímico siguiendo recomendaciones sugeridas en la literatura (13-15).

### Reactivos químicos

El 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH), el aloxano y la tolbutamida, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. La insulina lispro de acción rápida (medicamento de referencia), fue disuelta en suero fisiológico para el suministro por vía subcutánea (SC). Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

## ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE

### Animales

Se utilizaron ratones machos de una colonia ICR, con 30 g de peso promedio y de 7-10 semanas de edad. Los animales fueron suministrados por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, los cuales se mantuvieron a  $21 \pm 1$  °C, humedad relativa de  $70 \pm 5\%$ , fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, con libre disponibilidad de alimento (Rodentina®) y agua.

### Test de Irwin

A través de este ensayo se evaluó el comportamiento y estado fisiológico de los ratones en dos fases de experimentación: 1) observación sin administración de la droga (medición basal), colocando 10 ratones en cajas de experimentación y aplicándoles el test de Irwin (16); 2) observación después de administrar las diferentes dosis del extracto. En cada fase, se valoraron los efectos de los tratamientos de acuerdo a un sistema de "puntuaciones estándar" según el efecto observado: nulo (cero), leve (uno), apreciable (dos), notable (tres), intenso (cuatro).

Una vez establecido el comportamiento y estado fisiológico de los 10 animales se procedió a la administración de las diferentes dosis del extracto. Los ratones se distribuyeron en cinco grupos, de dos cada uno, a los cuales se les aplicó la misma dosis por vía oral (VO) e intraperitoneal (IP), así: grupo I (1000 mg/Kg), grupo II (500 mg/Kg), grupo III (250 mg/Kg), grupo IV (125 mg/Kg), grupo V (vehículo: propilenglicol, glicerina y suero fisiológico 1:1:8, control). Las observaciones se hicieron a los 5, 15, 30, 60 minutos y 24 horas después de la administración de los tratamientos; al finalizar se aplicó de nuevo el test de Irwin.

Doce horas antes del bioensayo para evaluar la actividad hipoglicemiante se retiró el alimento dejando solamente la disponibilidad de agua, se tomaron las primeras muestras de sangre y se determinaron los niveles de glicemia basal ( $T_{-1}$ ) en animales normoglicémicos, aceptando como glicemia normal entre 70 y 200 mg/dL. Inmediatamente se suministraron los diferentes tratamientos VO así: grupo I (extracto 1.000 mg/Kg), grupo II (extracto 500 mg/Kg), grupo III (extracto 250 mg/Kg), grupo IV control (vehículo: propilenglicol, glicerina y suero fisiológico 1:1:8), grupo V patrón (tolbutamida 100 mg/Kg). Una hora después se tomaron las segundas muestras de sangre ( $T_0$ ) y se administró la sobrecarga oral de glucosa (2.000 mg/Kg). De nuevo se midió el nivel de glicemia a la 1 hora ( $T_1$ ), 2 horas ( $T_2$ ) y 4 horas ( $T_4$ ).

## DETERMINACIÓN DE NIVELES DE GLUCOSA EN ANIMALES EXPERIMENTALMENTE DIABÉTICOS

Se utilizó el modelo de diabetes aloxánica para producir diabetes tipo I, posteriormente se administraron los diferentes tratamientos teniendo en cuenta que la dosis de 1.000 mg/Kg del extracto fue la que presentó una mejor respuesta hipoglicemiante en el bioensayo previo.

Cincuenta animales se mantuvieron a temperatura controlada y con libre acceso a agua y alimento. Antes del experimento (120 horas) los animales se trataron con aloxano (75 mg/Kg IV, vena marginal de la cola). Pasado este tiempo, se tomaron las muestras de sangre y se determinaron los niveles de glicemia en los animales. Respuestas superiores a 200 mg/dL se consideraron como diabetes positiva. Cuarenta ratones hiperglicémicos se distribuyeron en cuatro grupos al azar de 10 individuos cada uno y se administraron los diferentes tratamientos: extracto grupo I (tolbutamida 100 mg/Kg), grupo II (insulina 22 x 10<sup>3</sup> UI/Kg), grupo III (1.000 mg/Kg), grupo IV control (vehículo: propilenglicol, glicerina y suero fisiológico 1:1:8, 10 mL/Kg). Los niveles de glicemia en sangre se determinaron a la 1/2 (T<sub>1/2</sub>), 1 (T<sub>1</sub>) y 2 (T<sub>2</sub>) horas después suministrar los tratamientos.

## DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA EN PLASMA

La toma de las muestras de sangre se hizo mediante la técnica de punción del seno retroorbital con capilares de hematocrito heparinizados. Las muestras colectadas fueron enfriadas a 0 °C y centrifugadas a 3.000 rpm durante 5 minutos. Los niveles de glucosa se determinaron por el método GOD-PAD (17). Del plasma se tomaron 20 µL y se adicionaron 200 µL de solución reactivo GOD-PAD (Boehringer). Luego de agitación, la solución fue incubada a 37 °C durante 10 minutos. Se leyó la absorbancia en un equipo BIO-RAD Model 550 Microplato READED, ( $\lambda = 500$  nm) y se calculó la concentración de glucosa en sangre por medio de la fórmula:

$$(A_m/A_p) \times 100 = C_g$$

En donde:                    A<sub>m</sub> = absorbancia de la muestra.  
                                  A<sub>p</sub> = absorbancia del patrón.  
                                  C<sub>g</sub> = concentración de glucosa.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

## CAPACIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES. MÉTODO DEL DPPH

La habilidad para donar átomos de hidrógeno o electrones de los extractos de *B. kalbreyeri*, se determinó a partir de la decoloración de la solución de DPPH (18). Cuando una sustancia capaz de ceder protones se mezcla con una solución de DPPH, el color violeta original del radical (forma oxidada) cambia a amarillo pálido (forma reducida), esto puede monitorearse mediante lecturas de absorbancia a ~518 nm. Se preparó una solución 0,1 mM de DPPH en metanol, 1 mL de esta solución se adicionó a 3 mL del extracto vegetal resuspendido en metanol y preparado a diferentes concentraciones (5-120 µg/mL). Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se leyó la absorbancia de la mezcla contra un blanco a 517 nm. Valores muy bajos de absorbancia de la mezcla reaccionante son indicativo de una alta capacidad atrapadora de radicales libre (CARL), la cual se expresó numéricamente mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CARL} = [\text{Abs DPPH} - \text{Abs muestra} / \text{Abs DPPH}] \times 100$$

Aplicando regresión lineal se determinó la  $CI_{50}$  (concentración a la cual el extracto puede inhibir el 50% de las especies radicales presentes), a partir de gráficas donde la abcisa fue representada por las concentraciones probadas y la ordenada por la media del porcentaje de actividad antioxidante obtenido de tres réplicas realizadas para cada nivel de concentración aplicado.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados en medias y desviación estándar (DE). Además se realizaron comparaciones de los diferentes tratamientos utilizando diseños completamente aleatorizados y mediante el análisis de varianza, en las dos primeras etapas: pretest y experimento propiamente dicho se verificó la igualdad de los grupos al inicio del experimento. El ANOVA aplicado es de una sola vía sin interacciones en cada tiempo propuesto.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A través del análisis fitoquímico preliminar aplicado al extracto etanólico crudo de la planta se pudo determinar cantidad relativamente abundante de flavonoides, lactonas terpénicas, alcaloides y compuestos de naturaleza terpénica/esteroidal. Los constituyentes tipo quinónico, los taninos y las cumarinas se detectaron en mediana proporción, pero no se encontraron saponinas. Estos resultados se ase-

mejor cualitativa y cuantitativamente, con algunas diferencias, con los de Silva y Cechinel (19).

## ACTIVIDAD MULTIDIMENSIONAL

Para medir esta actividad se aplicó el test de Irwin, cuyo propósito es determinar si la droga administrada en diferentes dosis tiene una actividad farmacológica evidente macroscópicamente, provocando en los ratones de experimentación efectos neurofarmacológicos como en la actividad motora, coordinación, reflejos, etc.

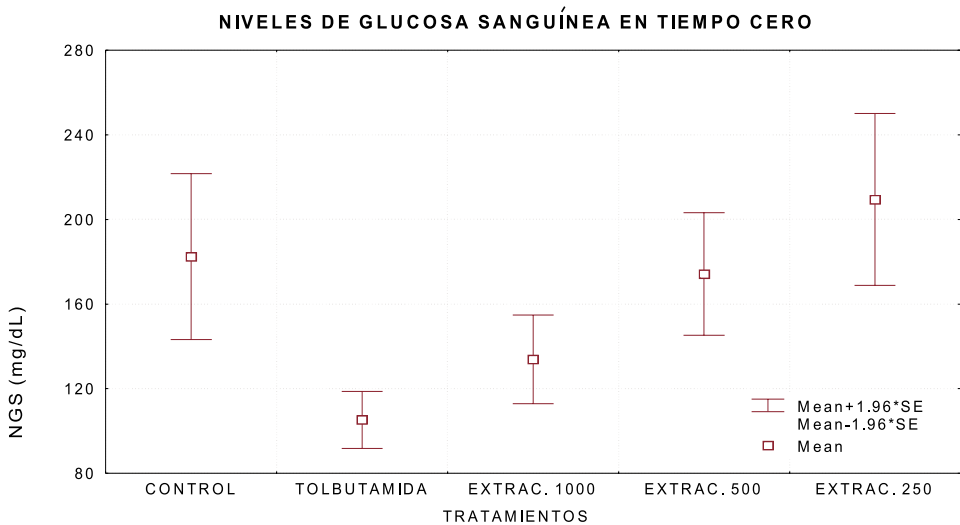
Mediante la administración del extracto (IV y VO) se observaron diferencias fundamentales, así: todas las concentraciones aplicadas por IV afectaron el estado de ánimo de los animales, los cuales presentaron contorsiones y disminución del tono abdominal. Las concentraciones del extracto más altas (1.000 y 500 mg/Kg) provocaron pasividad, elevación de la cola y marcha vacilante. La dosis de 1.000 mg/Kg en particular evidenció una leve pérdida del reflejo pinna después de 30 minutos de administración. Contrariamente, el suministro del extracto VO no mostró cambios marcados en el estado de ánimo de los ratones, tampoco se presentó mortalidad ni toxicidad aparente al proporcionar las diferentes dosis; todo ello sirvió de base para continuar los bioensayos utilizando las dosis de 1.000, 500 y 250 mg/Kg administradas por VO, pese a que por esta vía aparecen factores que pueden influir en la absorción de los metabolitos. No obstante es la forma más conveniente, no sólo por ser fácil y segura sino además porque las personas utilizan generalmente esta vía para ingerir las infusiones que realizan con las hojas de *B. kalbreyeri*.

A partir del conocimiento de los niveles de glucosa sanguínea, se realizó un pre-test en tiempo basal ( $T_{-1}$ ) a fin de verificar la homogeneidad de los ratones, el ANOVA mostró que entre los 50 individuos los niveles de glucosa basales son homogéneos para todos los tratamientos.

## EFFECTO DEL EXTRACTO SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOSA SANGUÍNEA DE LOS RATONES NORMOGLICÉMICOS CON SOBRECARGA ORAL DE GLUCOSA

Para el experimento propiamente dicho, se realizó en cada tiempo ( $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_4$ ) un análisis de varianza similar al pretest con el fin de identificar diferencias entre los tratamientos (extractos, patrón y control), después de una hora ( $T_0$ ) de ser administrados se observaron diferencias significativas entre ellos ( $P = 0,0002$ ); sin embargo, para saber entre cuáles se encontraban las desigualdades, se decidió hacer comparaciones múltiples utilizando la prueba de "Diferencias mínimas

significativas" (LSD). Los resultados evidenciaron disparidad entre la tolbutamida (patrón), el control y los extractos de 500 y 250 mg/Kg, pero no entre la tolbutamida y el extracto de 1.000 mg/Kg (figura 1).



**Figura 1.** Niveles de glucosa sanguínea en animales normoglicémicos con sobrecarga de glucosa después de una hora de administración de los tratamientos ( $T_0$ ).

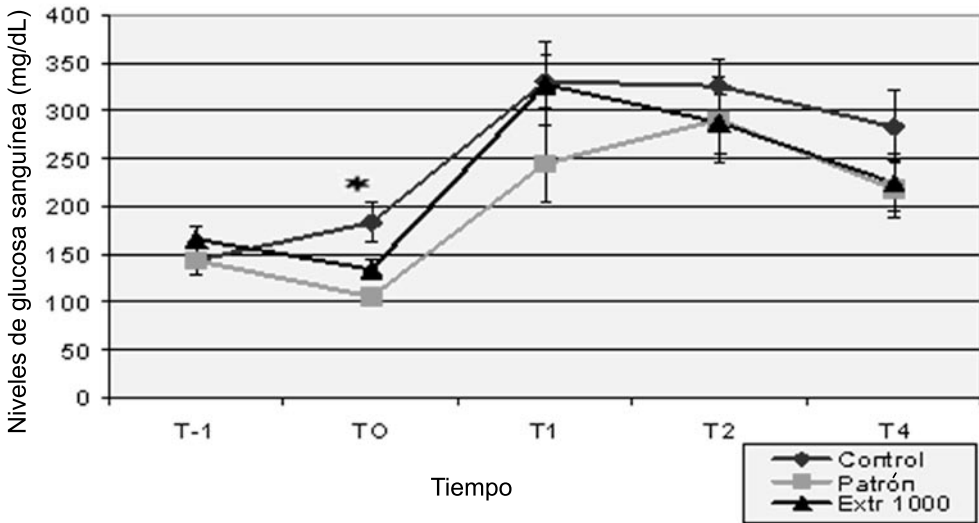
En los tiempos  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_4$  (1, 2 y 4 h), después de suministrar la sobrecarga de glucosa a los grupos, los efectos presentados no permitieron ver diferencias significativas ( $P = 0,321$ ,  $0,8046$  y  $0,6319$ , respectivamente).

Importa mencionar que al proporcionar la sobrecarga oral de glucosa, la tolbutamida incrementó los niveles bajos de glucosa de  $105 \text{ mg/dL}$  en  $T_0$  a  $244 \text{ mg/dL}$  en  $T_1$ , dando a entender que esta sustancia no actúa inhibiendo la absorción de glucosa en el intestino. De otra parte, las tres concentraciones del extracto no estabilizaron los niveles de glucosa sanguínea en  $T_1$ , sino que por el contrario aumentaron los valores entre  $327 \text{ mg/dL}$  y  $342 \text{ mg/dL}$ . Sólo 5 horas después de la administración de los tratamientos las concentraciones de glucosa comenzaron a disminuir gradualmente. El extracto en dosis de  $1.000 \text{ mg/Kg}$  actuó de forma similar a la tolbutamida durante el tiempo de experimentación.

En la figura 2 se puede observar, mediante comparaciones, los efectos producidos en el transcurso del tiempo, se destaca el tiempo  $T_0$  con los niveles de glucosa más bajos provocados por la tolbutamida y la dosis de  $1.000 \text{ mg/Kg}$  del extracto. Los resultados se consideraron significativos a partir de  $p < 0.05$ .



La prueba LSD dejó ver que la tolbutamida (patrón) actúa de manera diferente al control, pero no entre ella y la dosis de 1.000 mg/Kg, de lo que se deduce que el extracto, suministrado a este nivel de concentración, y la tolbutamida tienen actividad hipoglicemiante.



\*Diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ )

**Figura 2.** Efecto de los extractos de *B. kalbreyeri* sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglicémicos con sobrecarga de glucosa ( $n = 10$ ).

### EFFECTOS DEL EXTRACTO EN LOS NIVELES DE GLUCOSA SANGUÍNEA EN RATONES DIABÉTICOS POR ALOXANO

La insulina se utilizó como nuevo patrón en animales experimentalmente diabéticos, con el objetivo de realizar comparaciones de los efectos entre este medicamento alopático, la tolbutamida (hipoglicemiante oral) y el extracto de *B. kalbreyeri* (1.000 mg/Kg).

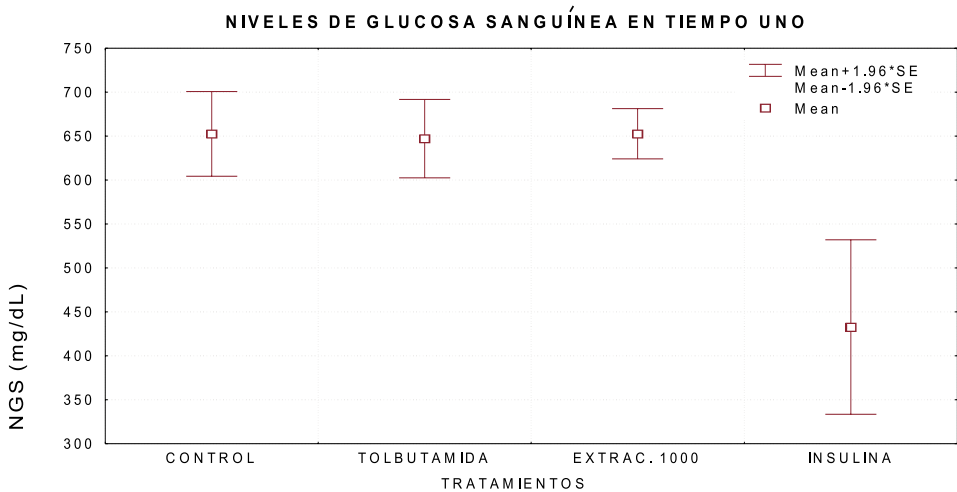
A los animales se les aplicó una dosis de 75 mg/Kg de aloxano, consecuentemente se notaron síntomas de hiperglicemia: aumento de la micción y de los niveles de glucosa sanguínea, en comparación con los ratones normales. Teniendo un número significativo de 40 individuos hiperglicémicos, se realizó un análisis estadístico descriptivo para todos los tratamientos. De nuevo se efectuó un pre-test en tiempo basal ( $T_0$ ) para verificar en los animales de experimentación las mismas condiciones de hiperglicemia. El análisis de varianza mostró que entre los

40 ratones no existían diferencias significativas ( $P = 0,5886$ ), permitiendo así las comparaciones a lo largo del tiempo.

Sobre la base de los efectos principales observados en los siguientes tiempos ( $T_{1/2}$ ,  $T_1$  y  $T_2$ ) se aplicó un análisis de varianza similar al pretest, éste dejó ver diferencias significativas entre los tratamientos en  $T_{1/2}$  ( $P = 0,0036$ ). De nuevo, la prueba LSD reveló que la insulina se diferencia de todos los tratamientos; por su parte el control, la tolbutamida y el extracto resultaron homogéneos.

En  $T_1$ , después de una hora de administrar los diferentes tratamientos, el ANOVA mostró diferencias significativas ( $P = 0,000$ ), y la prueba de comparaciones múltiples (LSD) identificó de nuevo a la insulina con los niveles de glucosa más bajos.

La figura 3 ilustra lo sucedido en  $T_1$  y en  $T_2$  puesto que la situación no varió después de dos horas de suministrar los tratamientos.



**Figura 3.** Niveles de glucosa sanguínea después de una hora ( $T_1$ ) de administrar los diferentes tratamientos en animales diabéticos.

Los efectos experimentales fueron nuevamente confirmados a través del ANOVA aplicado ( $p = 0,000$ ) y ratificados por la prueba LSD, la cual identificó a la insulina como la única que disminuyó los niveles de glucosa. La figura deja ver claramente que la dosis de 1.000 mg/Kg no logra mantener bajos los niveles de glucosa sanguínea en el transcurso del tiempo, sugiriendo que el extracto de la planta no actúa sobre la diabetes tipo I. Si se tienen en cuenta las diferencias entre los tipos de diabetes, podría pensarse que los metabolitos secundarios de la planta funcionarían mejor en la diabetes tipo II que en la tipo I, algunos trabajos así lo confirman (20, 21).

Varios estudios del género *Bauhinia* (22, 23), experimentando en pacientes diabéticos y normales con infusión y extracto etanólico de hojas de *B. forficata*, igualmente no pudieron evidenciar actividad hipoglicemiante. No obstante, la actividad hipoglicemiante mostrada por el extracto en animales normoglicémicos antes del suministro de la sobrecarga oral de glucosa, sería un punto de apoyo para pensar en la posibilidad de que el extracto de la planta posee efecto sobre la diabetes tipo II. El mecanismo de acción podría ser estimulando la secreción de insulina por el aporte de minerales esenciales, con inhibición de la absorción de glucosa en el intestino y la captación de glucosa por vesículas de membrana apical del enterocito o quizás tal vez actuando como inhibidor de la gluconeogénesis y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (24).

### CAPACIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES

La actividad antioxidante de los constituyentes químicos presentes en los extractos orgánicos (etéreo, acetato de etilo, etanólico) y acuoso de hoja y corteza de *B. kalbreyeri*, se determinó evaluando la habilidad de éstos para reducir el radical DPPH\* hasta su forma estable DPPH-H. El proceso puede secuenciarse midiendo la absorbancia del DPPH\* que no pudo ser reducido. La absorbancia decrece en relación directa a la habilidad de los antioxidantes de la planta para atrapar el DPPH\*. Es un método que permite valorar en forma fácil y rápida la capacidad antioxidante de extractos vegetales.

En este trabajo se hizo un ensayo preliminar con los extractos orgánicos y acuosos de la planta relacionados anteriormente, probándolos a un mismo nivel de concentración (40 µg/mL). Todos los extractos manifestaron una "capacidad atrapadora de radicales libres" (CARL) superior al 70 %, evidenciando un alto potencial antioxidante de la planta. Sin embargo, fueron los extractos etanólicos y acuosos de hoja y corteza (EC, EH, AC, AH) los de mayor potencial inhibitorio. La tabla 1 deja ver los resultados de la valoración de la CARL, determinada a varias concentraciones, así como también la  $CI_{50}$  respectiva.

**Tabla 1.** Capacidad atrapadora (%) de extractos de *Bauhinia kalbreyeri* frente al radical DPPH y concentración inhibitoria ( $CI_{50}$ )

Extractos	5	10	20	40	60	80	100	120	$CI_{50}$ (ppm)
EC	95,42 ± 0,5	95,57 ± 0,3	96,01 ± 0,3	97,70 ± 0,2	93,61 ± 0,2	93,28 ± 0,6	93,79 ± 0,1	93,84 ± 0,2	18,75

<b>EH</b>	77,05 ± 1,2	89,06 ± 0,8	91,00 ± 1,1	91,40 ± 0,9	90,88 ± 0,6	88,54 ± 0,6	89,32 ± 0,4	96,06 ± 1,8	18,42
<b>AC</b>	79,42 ± 0,2	83,38 ± 0,6	89,80 ± 0,1	96,25 ± 0,5	96,52 ± 0,2	95,61 ± 0,4	95,98 ± 0,3	95,96 ± 0,6	27,00
<b>AH</b>	80,61 ± 0,6	84,63 ± 0,1	92,38 ± 1,2	96,07 ± 1,1	96,15 ± 0,8	95,07 ± 0,4	95,50 ± 0,8	94,85 ± 0,1	28,30
<b>Ac. ascórbico</b>	78,56 ± 0,4	79,67 ± 0,2	95,33 ± 0,1	96,29 ± 0,2					

Los datos mostrados son medias  $\pm$  D S (desviación estándar) de determinaciones por triplicado.  $P \leq 0,05$  para concentraciones diferentes en el mismo extracto.

EC, EH = extracto etanólico de corteza y hora, respectivamente. AC, AH = extracto acuoso de corteza y hoja, respectivamente.

La tabla revela que la máxima actividad de los extractos etanólicos se alcanza a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en tanto que el mismo nivel de actividad se logra a 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con el extracto acuoso. Se nota además mayor variabilidad de actividad en los extractos de hojas que en los de corteza, y que en el acuoso resulta indiferente utilizar las hojas o la corteza, puesto que en ambos casos se logra la misma actividad a igual concentración (40-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Un comportamiento diferente es revelado por el extracto etanólico, en cuyo caso es más activo el extracto de corteza que el de hojas. Importa mencionar que en cualquier caso la planta evidencia un alto potencial antioxidante, puesto que los extractos alcanzan y superan el 90% de capacidad de inhibición de radicales libres a concentraciones relativamente pequeñas, efecto que resulta comparable al del ácido ascórbico, utilizado como patrón. Los valores de la  $\text{Cl}_{50}$  que muestra la tabla son confirmatorios de la alta actividad antioxidante de *B. kalbreyeri*, dado que se obtienen resultados pequeños si se comparan con los obtenidos en otras investigaciones (25, 26).

Basados en mecanismos de reducción del DPPH y en conocimientos previos de la química de algunas plantas, muchos autores sostienen que la actividad antioxidante de algunos extractos polares es debida, al menos en parte, a la presencia de sustancias de naturaleza fenólica (flavonoides, quinonas, taninos, cumarinas, etc.); esta actividad ha sido también observada en alcaloides y en algunos compuestos de naturaleza terpénica (27-29); esta gama de constituyentes químicos se detectaron en la planta en estudio, aunque en diferentes proporciones.

La interacción de un compuesto antioxidante con el DPPH depende de su conformación estructural; así mismo, el número de radicales que logran reducirse puede estar correlacionado con la cantidad de grupos hidroxilos disponibles en la molécula con potencialidad antioxidante; una de las formas como estos compuestos ejercen su actividad es por donación de protones (30, 31).

La diabetes y estrés oxidativo parecen relacionarse, dado que los niveles elevados de glucosa en la sangre conducen a la autooxidación de esta misma con lo que las especies reactivas del oxígeno (EROS) se incrementan, contribuyendo así a la resistencia a la insulina debido a que interfieren con las vías de señalización inducida por esta hormona, evitando de esta forma la traslocación del transportador de glucosa GLUT 4 a la membrana plasmática, lo que a su vez provoca alteraciones en los tejidos afectados tales como ruptura de la barrera de permeabilidad vascular, migración de leucocitos e inflamación (32).

Basados en el mecanismo de reducción de la molécula de DPPH ampliamente descrita en la literatura (30, 33, 34) que lo correlacionan con la presencia de grupos hidroxilos sobre la molécula del antioxidante, podemos inferir que los extractos de *Bauhinia kalbreyeri* intervienen en el metabolismo de la glucosa a través de sustancias fenólicas (sin despreciar los otros constituyentes), los cuales le confieren actividad antioxidante a través de su capacidad atrapadora de radicales libres, y por ende, posibilidades de disminuir las EROS, más que actuar como hipoglicemiantes. Varios estudios han demostrado que el estrés oxidativo, el cual es alto en la diabetes mellitus, contribuye significativamente a la patogénesis de la enfermedad y sus complicaciones (35). Es posible también pensar que los efectos de la planta podrían ser acumulativos en el tiempo, lo que coadyuvaría a explicar los usos etnofarmacológicos.

Las especies de *Bauhinia* han merecido la atención de los investigadores para probar científicamente una gran variabilidad de bioactividades (36, 37); no obstante el potencial antioxidante ha sido escasamente evaluado, y dentro de esta misma actividad son menos frecuentes los estudios comparativos entre extractos procedentes de diferentes partes de un mismo vegetal. Cabe aclarar que en la mayoría de los casos los estudios son realizados con las partes aéreas de las plantas de este género, podría decirse que es este uno de los pocos trabajos realizados con una especie de *Bauhinia* en el que se determina su actividad antioxidante aplicando extractos de diferente polaridad y utilizando distintas partes de la planta.

## CONCLUSIONES

El presente estudio muestra que el extracto etanólico de *B. kalbreyeri*, en la dosis de 1.000 mg/Kg, reduce significativamente los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglicémicos después de una hora de administración, existiendo la posibilidad de actuar sobre la diabetes tipo 2 (DMNID). Preparaciones extractivas de hoja o corteza de la planta, obtenidas a partir de etanol o agua, tienen alta capacidad atrapadora de radicales libres derivada de compuestos antioxidantes de diferente grado de polaridad, su habilidad para reducir el estrés oxidativo puede

ayudar a prevenir las complicaciones asociadas a la diabetes. Trabajos posteriores podrían orientarse a identificar los compuestos de *Bauhinia kalbreyeri* relacionados con la diabetes y el estrés oxidativo.

### AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Química, Facultad de Ciencias, de la Universidad del Tolima. A la profesora Liliana Francis, de la Universidad del Tolima.

### REFERENCIAS

1. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge y C.E. Cross, Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?, *J. Lab. Clin. Med.*, **119**, 598 (1992).
2. I. Gülçin, M.E. Büyükkuroğlu, M. Oktay y Ö.I. Küfrevioğlu, On the in vitro antioxidant properties of melatonin, *J. Pineal Res.*, **33**, 167 (2002).
3. M.C. Sabu y R. Kuttan, Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property, *J. Ethnopharmacology*, **81** (2), 155 (2002).
4. N.H. Ugochukwu y N.E. Babady, Antioxidant effects of *Gongronema latifolium* in hepatocytes of rat models of non-insulin dependent diabetes mellitus, *Fitoterapia*, **73** (7-8), 612 (2002).
5. L. M. McCune y T. Johns, Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest, *J. Ethnopharmacology*, **82** (2-3), 197 (2002).
6. B. Raj Kapoor, B. Jayakar y N. Muruges, Antitumour activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascitic lymphoma, *J. Ethnopharmacology*, **89** (6), 107 (2003).
7. P. Kittakoop, K. Kirtikara, M. Tanticharoen y Y. Thebtaranonth, Antimalarial pre-racemosols A and B, possible biogenetic precursors of racemosol from *Bauhinia malabarica* Roxb, *Phytochemistry*, **55**(2), 349 (2000).
8. S. Sosaa, A. Bracab, G. Altiniera, R. Della Loggia, I. Morellib y A. Tubazo, Topical anti-inflammatory activity of *Bauhinia tarapotensis* leaves, *Phytomedicine*, **9** (7), 646 (2002).

9. D.C. Damasceno, G.T. Volpato, I. de Mattos Paranhos Calderon, R. Aguilar y M.V. Cunha Rudge, Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions, *Phytomedicine*, **11**, 196 (2004).
10. O. Fuentes, P. Arancibia-avila y J. Alarcón, Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits, *Fitoterapia*, **75** (4), 527 (2004).
11. L.K.N Okine, A. K. Nyarko, N. Osei-Kwabena, I.V. Oppong, F. Barnes y M. Ofo-suhene, The antidiabetic activity of the herbal preparation ADD-199 in mice: a comparative study with two oral hypoglycaemic drugs, *J. Ethnopharmacology*, **97** (1), 31 (2005).
12. S. Mohanam y M. Bose, Influence of streptozotocin and alloxan induces diabetes in the rat on collagenase a certain lysosomal enzymes en relation to the degradation of connective tissue proteins, *Diabetologia*, **25** (66), 86 (1983).
13. E. Murillo, "Guía metodológica para la investigación fitoquímica preliminar en plantas medicinales", Universidad del Tolima, Ibagué. 2003, p. 22.
14. G.A. Sanabria, "Análisis fitoquímico preliminar: Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae", Santa Fe de Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. 1983, p. 77.
15. X.A. Domínguez, "Métodos de investigación fitoquímica". Centro regional de ayuda técnica. México/Buenos Aires. 1988, p. 93.
16. S. Irwin, Comprehensive observational assessment: a systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse, *Psychopharmacologia (berl.) s. l. s.n.*, **222** (1968).
17. P. Trinder, Quantitative determination of glucose using the GOD-PAD method, *Clin. Biochem.*, **6**, 27 (1969).
18. M. Ohnishi, H. Morishita, H. Iwahashi, S. Toda, Y. Shirataki, M. Kimura y R. Kido, Inhibitory Effects of Chlorogenic Acids on Linoleic Acid Peroxidation and Haemolysis, *Phytochemistry*, **36** (3), 579 (1994).
19. K. L. da Silva y V. Cechinel, Plantas do gênero Bauhinia: Composição química e potencial farmacológico, *Quim. Nova*, **25** (3), 449 (2002).
20. S. Chakrabarti, T.K. Biswas, B. Rokeya, L. Alí, M. Mosihuzzaman, N. Nahar y A.K. Khan, B. Mukherjee, Advanced studies on the hypoglycemic effect of *Caesalpinia bonducella* in type 1 and 2 diabetes in Long Evans rats, *J. Ethnopharmacology*, **84** (1), 41 (2003).

21. B. Kameswararo, M. Kesavulu y C. Apparao, Evaluation of antidiabetic effect of *Momordica cymbalaria* fruit in alloxan-diabetic rats, *Fitoterapia*, **74** (1-2), 7 (2003).
22. E.M.K Russo, A.A.J Reichelt, J.R.De-Sá, R.P. Furlanetto, R.C Moisés, T.S. Kasamatsu y A.R.Chacra, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **23**, 11 (1990), citado por K. Silva, y F. Cechinel, Plantas do género *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico, *Quim. Nova.* **25** (3), 449 (2002).
23. F. González-Mujica, N. Motta, A.H. Márquez y J. Capote-Zulueta, Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose adsorption and uptake by enterocyte brush border membrane, *Fitoterapia*, **74** (1-2), 84 (2003).
24. J.K. Grover, S. Yadav y V. Vats, Medicinal plants of India with anti-diabetic potential, *J. Ethnopharmacology*, **81** (1), 81 (2002).
25. L. Mensor, F. Menezes, G. Leitão, A. Reis, T. dos Santos, C. Coube y S. Leitão, Screening of Brazilian plants extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.*, **15**, 127 (2001).
26. A. Argolo, A. Sant'Ana, M. Pletsch y L. Coelho, Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*, *Bioresource Technology*, **95**, 229 (2004).
27. J. K. Grover, S. Yadav y V. Vats, Medicinal plants of India with anti-diabetic potential, *J. Ethnopharmacology*, **81** (1), 81(2002).
28. T.B. Ngi, F. Liu y Z.T. Wang, Antioxidative activity of natural products from plants, *Life sciences*, **66** (8),709(2000).
29. S. Son y B.A. Lewis, Free radical scavenging and antioxidant activity of caffeic acid amide and ester analogues:structure-activity relationship, *J. Agricult. Food Chem.*, **50** (3), 468 (2002).
30. W. Brand-Williams, M. Cuvelier y C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **28**, 25 (1995).
31. S. Parameshwar, K.Srinivasan y C. Mallikarjuna Rao, Oral Antidiabetic Activities of Different Extracts of *Caesalpinia bonducella* Seed Kernels, *Pharm. Biol. (Formerly Int. J. Pharmacog.)*, **40** (8), 590 (2002).
32. F. Vasconcelos, S. Sampaio, A. Garofalo, L. Guimaraes, J. Giglio y C. Arantes, Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming, *J. Ethnopharmacology*, **95** (2), 385 (2004).



33. P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *J. Sci. Technol.*, **26** (2), 211 (2004).
34. C. Silva, R. Herdeiro, C. Mathias, A. Panek, C. Silveira, V. Rodrigues, M. Rennó, D. Falcão, D. Cerqueira, A. Minto, F. Nogueira, C. Quaresma, J. Silva, F. Menezes y E. Eleutherio, Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants, *Pharmacol. Res.*, **52**, 229 (2005).
35. L.K. Okine, A.K. Nyarko, N. Osei-Kwabena, IV. Oppong, F. Barnes y M. Ofosuhen, The antidiabetic activity of the herbal preparation ADD-199 in mice: a comparative study with two oral hypoglycaemic drugs, *J. Ethnopharmacology*, **97** (1), 31 (2005).
36. C. Cagliari, F. De Caroli, A. Nakahata, M. Araujo, C. Nakaie, M. Sampaio, C. Sampaio y M. Oliva, Action of *Bauhinia bauhinioides* synthetic peptides on serine proteinases, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **311** (1), 241 (2003).
37. C. Oliveira, V. Maiorano, S. Marcussi, C. Sant'Ana, A. Januario, M. Lourenco, S. Sampaio, S. Franca, P. Pereira y A. Soares, Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *B. forficata* against snake venoms, *J. Ethnopharmacology*, **98** (1-2), 213 (2005).