

## Control de calidad de hojas y correlación entre actividad antioxidante y citotóxica de *Bauhinia pauletia* Pers

### Quality control of leaves and correlation between antioxidant and cytotoxic activity of *Bauhinia pauletia* pers

Adriana Sierra Hernández<sup>1\*</sup>, Nicxy Duarte De Moya<sup>1,2</sup>, Andrés Gamero Charris<sup>1,2</sup>, Catalino De la Rosa Torres<sup>2</sup>

- <sup>1</sup>. Grupo Investigación Proteómica y Genómica. Universidad Metropolitana. Programa de Medicina. Barranquilla. Colombia.  
<sup>2</sup>. Grupo de Investigación Fitoquímica (GIF). Facultad de Química y Farmacia. Universidad del Atlántico. Barranquilla. Colombia.

Recibido: Octubre 2 del 2018

Aceptado: Diciembre 11 de 2018

\*Correspondencia del autor: Adriana Sierra Hernández, E-mail: asierra@unimetro.edu.co



#### Resumen

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, en el 2015 se le atribuyeron 8,8 millones de defunciones. Es por ello que se busca generar alternativas de solución a este problema mediante la utilización de plantas, que sean fuente de obtención de nuevos metabolitos secundarios con actividad biológica. El extracto etanolicos de hojas secas de *Bauhinia pauletia* Pers., y la subfracción de éter mostraron actividad citotóxica frente a la línea celular de cáncer de mama MCF7. En la composición fitoquímica de los extractos obtenidos de las hojas se identificaron alcaloides, fenoles y flavonoides citotóxicos. Se identificaron metabolitos como el ácido p-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido p-coumarico y ácido ferulico, captadores de radicales libres y por lo tanto antioxidantes.

**Palabras clave:** línea celular MCF7, *Bauhinia pauletia* Pers., p-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido p-coumarico, ácido ferulico, cáncer de mama.

#### Abstract

Cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide, and was responsible for 8.8 million deaths in 2015. One of the alternative solutions is for the use of plants which are a source of new secondary metabolites with biological activity. The ethanol extract of dried leaves of *Bauhinia pauletia* Pers, and the subfraccion of ether showed cytotoxic activity against the MCF7 breast cancer cell line. In the phytochemical composition of the extracts obtained from the leaves, alkaloids, phenols and cytotoxic flavonoids were identified. Metabolites were identified such as p-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, p-coumaric acid and ferulic acid.

**Keywords:** Cell line MCF 7, *Bauhinia pauletia* Pers., caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, breast cancer.

## Introducción

Las plantas medicinales desde la antigüedad han constituido una fuente alternativa para curar y aliviar las enfermedades. En la actualidad siguen siendo consideradas como una de las mejores alternativas en el momento de identificar compuestos químicos con importancia clínica.

El empleo de las plantas medicinales como herramientas terapéuticas se ha basado en su accesibilidad y lo económico que resulta su uso, esto ha permitido la explotación de este recurso y ha obligado a la creación de parámetros de calidad para su comercialización y exportación (1)

El material vegetal a ser utilizado debe ser sometido a evaluaciones de control de calidad a fin de garantizar la clasificación taxonómica, eficacia, inocuidad y futuro uso. El control de calidad de las plantas medicinales tiene un impacto directo en su eficiencia y seguridad. Existen muchas medidas de control para la medicina natural, y el primer paso importante es controlar la calidad de la droga vegetal (2)

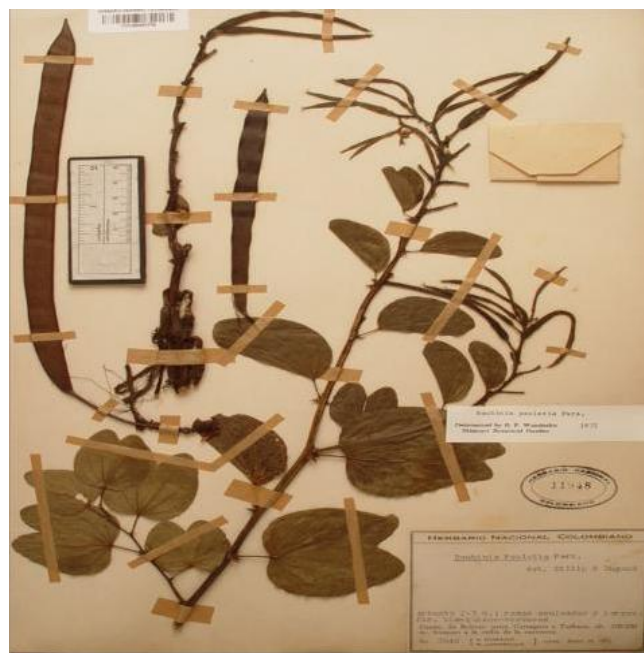
Los compuestos de origen natural y sus derivados desempeñan un papel cada vez más importante en medicina y farmacología. Aproximadamente el 60% de los fármacos terapéuticos utilizados en el tratamiento del cáncer son composiciones que comprenden compuestos naturales y / o sus derivados. (3)

Durante décadas, ha habido debates científicos sobre el uso de antioxidantes para el tratamiento de cánceres humanos. Por un lado, se sostiene que algunos tratamientos contra el cáncer generan especies reactivas de oxígeno, también conocidas como *radicales libres*, que dañan las células cancerosas, desencadenando la muerte celular y los antioxidantes pueden neutralizar estas especies reactivas, lo que resulta en efectos anticancerígenos disminuidos. (4). Por otro lado, se dice los antioxidantes son fundamentales para mantener la homeostasis del sistema inmune del huésped, un equilibrio entre los niveles de pro-oxidantes y antioxidantes definen la integridad genómica, el destino celular, por el mantenimiento del estado redox, responsables de la inmunomodulación y la radiosensibilización. (5)

Dentro de estas especies vegetales con fines medicinales anticancerosos se ubica el género *Bauhinia* (Pata de Vaca). Este género comprende aproximadamente 250

especies que crecen mayoritariamente en las zonas tropicales y subtropicales de América, África, Asia y Oceanía. (6) Dentro de estas se ubica la *Bauhinia pauletia* pers, (figura 1) que en Colombia según el herbario de la Universidad Nacional, se reporta en el departamento del Atlántico específicamente en Barranquilla, Tubará y entre Baranoa y Galapa.

Este tipo de plantas se caracteriza por crecer en forma de elegantes arbustos, pertenecientes a la familia de la Leguminosea y Fabacea, de hojas bilobuladas o indivisas, flores dispuestas en racimos terminales y frutos en forma de legumbre con semillas planas, negras y semi-circulares. (7)



**Figura 1.** *Bauhinia pauletia* subsp. Pers.

Fuente: (8) <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/8453/>

Existen diversas investigaciones farmacognósicas, realizadas a este género el cual se ha caracterizado tradicionalmente por poseer principalmente actividad hipoglucemiante, ayuda a disminuir la concentración de azúcar en la sangre. Con el fin de ampliar el conocimiento y la utilidad de las diferentes especies del género *Bauhinia*, en los últimos diez años se han realizado estudios, dirigidos a la obtención de nuevas alternativas terapéuticas contra enfermedades neoplásicas, se han evaluado actividades biológicas tales como la antitumoral y antioxidante. En este contexto, se entiende por antioxidante, a una molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, que tienen

un importante potencial al reducir el desarrollo de aquellas enfermedades que actualmente más afectan a la población mundial como las enfermedades cardiovasculares, tumorales y/o neurodegenerativas.

Como indicio de actividad citotóxica, antitumoral y antioxidante del género *Bauhinia* se resaltan diversas investigaciones, entre las cuales tenemos:

En el año 2011, Martínez M y su equipo de trabajo evidenciaron el potencial citotóxico de alcaloides aislados de extractos de *Bauhinia variegata*, los resultados permitieron concluir que en las hojas se encuentra este tipo de metabolitos de tipo alcaloides. (9)

En 2014, Silva, M. y colaboradores describieron la inhibición del crecimiento de células MCF7, cáncer de mama humano, por efecto de lectinas extraídas y purificadas de semillas de la *Bauhinia forficata*. Esta investigación concluyó que la BFL muestra un efecto citotóxico además que inhibe la adhesión de las células cancerosas. (10)

En otro estudio dirigido por Haeyoung y colaboradores, se reportó la especie química denominada como HY52, presente en las hojas de la Pata de Vaca (*Bauhinia forficata*), la cual inhibe la proliferación de células HeLa, cáncer cérvico-uterino. (11)

Por otra parte, se evidencian investigaciones que muestran el efecto antioxidante de extractos de especies de este género, tal es el caso de la *Bauhinia kalbreyeri* Harms, según la medicina tradicional colombiana, se reportó como antidiabética y con una alta actividad antioxidante, que podría contrarrestar el exceso de radicales libres, una planta con un alto potencial. (12)

De igual forma, Ortiz y colaboradores, examinaron la capacidad antioxidante de los extractos y la presencia de flavonoides aislados de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri*, los antioxidantes mostraron capacidad para estabilizar radicales libres in vitro. Según los resultados obtenidos, el potencial antioxidante de esta planta es comparable con el del hidroxitolueno butilado y el ácido ascórbico, utilizados como antioxidantes por la industria alimentaria y farmacéutica. (13)

Las anteriores investigaciones, van dirigidas a obtener nuevas alternativas terapéuticas de origen natural que ayuden a controlar el estrés oxidativo producido por el exceso de radicales libres los cuales pueden ocasionar

daños a las células especialmente daño al ADN, siendo este una de las posibles causas de aparición o progresión del cáncer.

Las enfermedades neoplásicas son una de las principales causas de muerte en el mundo, según la Organización mundial de la salud el cáncer es responsable de 17,5 millones de muertes/año, con altos índices de repercusiones sociales, económicas y emocionales.

Basados en este problema de salud y en los estudios previos científicos realizados al género *Bauhinia*, nos planteamos si la pata de vaca, más allá de su uso para el diabético, ¿tendrá efecto antitumoral y antioxidante? Actualmente el Grupo de Investigación de Fitoquímica (GIF) de la Universidad del Atlántico en asociación con el grupo de investigación de Proteómica y Genómica de la Universidad Metropolitana, se adelanta una investigación en la especie vegetal *Bauhinia pauletia Pers*, especie sin estudios farmacognósticos y fitoquímicos actuales. El objetivo de este proyecto es reportar resultados preliminares de evaluaciones de control de calidad e identidad de las hojas y a la vez determinar si extractos de *Bauhinia pauletia Pers*, poseen actividad antitumoral sobre la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) y actividad antioxidante in vitro, con la expectativa que sea igual o mayor a la de otras especies del género *Bahunia* ya publicadas.

## Materiales y métodos

Tipo de estudio: analítico Descriptivo

**Población y muestra:** La población la constituye las hojas secas de la especie *Bauhinia pauletia Pers* de procedencia la población de Tubará – Atlántico. Para la identificación taxonómica se colectaron ramas hojas, flores y frutos y se envió al Herbario DUNGAN de la Universidad del Atlántico. Luego de la recolección, se verificó que la planta se encontraba en condiciones óptimas, libre de insectos y material extraño

Control de calidad del material vegetal: Se hizo la identificación macroscópica, organoléptica y microscópica: Según lo establecido en el documento “Quality control methods for medicinal plant materials” establecido por la OMS. Se realizaron, mediciones de las dimensiones (largo, ancho y áreas de las hojas) con el programa IMAGE J, así como las características organolépticas (color y olor) (14)

Para la determinación de las características microscó-

picas se realizaron finos cortes longitudinales y transversales a las hojas, para observar posteriormente en el lente de aumento de 10x y 40x utilizando agua destilada. Se determinó contenido de humedad, cenizas totales y cenizas sulfatadas.

### Obtención del extracto etanólico

Las hojas se secaron al aire libre, se sometieron a molienda, hasta obtener un tamaño de partícula moderadamente fino según los lineamientos de la WHO. La extracción se llevó a cabo mediante maceración con etanol al 96% a temperatura ambiente, durante 7 días con agitación ocasional. Se filtró con papel Whatman N°1 y concentró a presión reducida a 50° C en un rotaevaporador.

Se hizo control de calidad al extracto etanólico. Se determinaron características organolépticas como color, olor; características fisicoquímicas como pH, densidad, sólidos totales.

### Marcha fitoquímica preliminar

Se realizó la marcha fitoquímica preliminar para identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Bauhinia pauletia* pers., utilizando las pruebas químicas coloreadas y de precipitación para la identificación de metabolitos secundarios (tabla 1).

**Tabla 1.** Pruebas de color y precipitación para identificar metabolitos secundarios.

N°	METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN
1	Alcaloides	Meyer,Hager ,Dragendorff y Warner
2	Flavonoides	Shinoda
3	Fenoles	Tricloruro férrico
4	Taninos	Gelatina-sal
5	Saponinas	Espuma
6	Triterpenoides y/o Esteroles	Liebermanm-Burchard
7	Cumarinas	Baljet
8	Cardiotónicos y lactonas	Kedde
9	Antocianinas	Virage de color con cambio de pH
10	Quinonas	Coloración en el anillo alcalino

Fuente: Pérez- González L., 2006 (15)

### Obtención de las fracciones

El extracto etanólico total de las hojas de la especie *pauletia* Pers, fue sometido a fraccionamiento por cromatografía flash en fase normal.

Evaluación Fenoles totales: Curva de calibración de ácido gálico a las siguientes concentraciones: 0, 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL. El extracto y las fracciones se midieron a una concentración de 50 µg/mL, longitud de onda de 760 nm. Los resultados fueron expresados en µg equivalente a ácido gálico. Esta prueba se realizó por triplicado.

Evaluación de flavonoides totales: Para analizar el contenido de flavonoides totales se realizó una curva de calibración con concentraciones de 5, 10, 20,40 µg/mL de quercetina. Se preparó previo al ensayo una solución

de extracto y las fracciones a 50 µg/mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados en µg equivalente de quercetina.

### Estudios de la actividad antioxidante

Actividad inhibidora del radical libre 1,1-difenil-2-picril hidracilo (DPPH):

Para determinar la capacidad atrapadora del radical DPPH del extracto total y sus fracciones se siguió la metodología usada por Piña (2011) a 517 nm. La solución etanólica del extracto y las fracciones se prepararon a las concentraciones de 500, 250 y 125 µg/mL. El patrón fue ácido ascórbico en concentraciones de 200, 100 y 50 µg/mL.

Ensayo ABTS (ácido 2,2'azinobis-(3-  
etilbenzotiazolina)-6-sulfónico):

Para determinar la capacidad atrapadora del radical ABTS del extracto total y sus fracciones se siguió la metodología usada por Tovar (2013) concentración de 7 mM en solución acuosa de ABTS, absorbancia inicial de  $0.7 \pm (0.1)$  a 732nm. Seguidamente se leyó en el espectrofotómetro contra un blanco (agua destilada) a 732 nm. La solución etanólica del extracto y las fracciones se prepararon a las concentraciones de 500, 250 y 125  $\mu\text{g/mL}$ . El patrón fue ácido ascórbico en concentraciones de 200, 100 y 50  $\mu\text{g/mL}$ . (16).

### Actividad Citotóxica

Se realizó esta prueba específica para medir la actividad citotóxica del extracto etanólico y subfracciones de hojas secas de *Bauhinia pauletia Pers* sobre la línea celular MCF7, adenocarcinoma de mama, mediante el ensayo enzimático basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), medio de cultivo DMEM/HIGH Glucose, suplementado con 5% de suero fetal bobino y 1% de penicilina-estreptomicina. La cantidad de células a utilizar 300.000/pozo se calculó mediante conteo en cámara de Neubauer. Incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>

Para la preparación de las concentraciones utilizadas se pesaron 10 mg de extracto seco, los cuales se disolvieron en 125  $\mu\text{L}$  de DMSO y 875  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. se filtro y se realizaron diluciones de 100, 200, 350, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$  (concentraciones establecidas en base a el ensayo de *Artemia Salina* previamente realizado al extracto etanólico total, no mostrado). El control negativo fue el medio de cultivo sin extracto. Se dejó en contacto con las células a 24 y 48 horas.

La citotoxicidad fue expresada como la concentración tóxica del extracto y fracciones para el 50% de las células (IC50) calculado por regresión lineal.

### Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD):

La preparación de la muestra, se llevó a cabo mediante

extracción sólido-líquido, usando una solución de ácido acético 0,3% acuoso: metanol (50:50), acompañada de la sonicación (15 min), centrifugación y vórtice (10 min). Finalmente, los extractos se filtraron y se realizó el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD). Como materiales de referencia se utilizaron las xantinas cafeína, teobromina, las catequinas epicatequina galato); Los flavonoides ácido caféico, Ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico (quercetina Naringenina, luteolina Kaempferol ácido ursólico pinocembrina ácido carnósico.

El análisis se realizó en un cromatógrafo líquido (LC) *Agilent Technologies* 1200 series (Palo Alto, California, EE.UU.) con detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD), a  $\lambda = 245\text{nm}$ . La columna empleada en el análisis fue KINETEX (C18) (Phenomenex), 100 mm x 4,6 mm (d.i) x 2,6  $\mu\text{m}$  (tamaño de partícula). La inyección se realizó en modo automático ( $V_{\text{iny}} = 10\mu\text{L}$  con gradientes de elución del 95 a 75% ACN/ H<sub>2</sub>O

### Análisis Estadístico

En los ensayos de la actividad citotóxica, antioxidante, fenoles y flavonoides se utilizó el análisis de varianza simple y multifactorial (ANOVA) con el programa STATGRAPHICS Centurion versión 16.1.2.0 para ver si existen diferencias estadísticamente significativas en los parámetros estudiados de las distintas muestras analizadas, con una significancia en la muestra de  $p < 0.05$ .

### Resultados

La planta fue identificada por el herbario Armando Dugand Gnecco como: Nombre de la especie: *Bauhinia pauletia pers*. Familia Botánica: FABACEAE, N° del Ejemplar 3122 e Identificado por H. Cuadros-V.

### Descripción macroscópica de las hojas

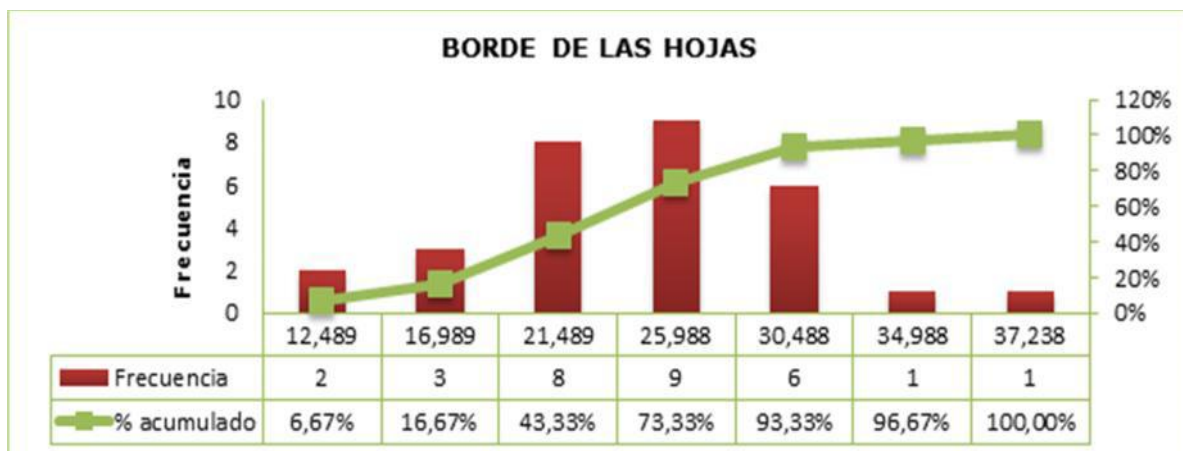
En relación con las medidas de largo, ancho y borde de las hojas (área foliar) se arrojaron los siguientes valores  $5.02 \pm 0.78$ ,  $5.37 \pm 0.78$  y  $22.48 \pm 6.30$ , respectivamente (figura 2, 3 y 4).



**Figura 2.** Descripción macroscópica del largo de las hojas de *Bauhinia pauletia* Pers. Fuente: Propia



**Figura 3.** Descripción macroscópica del ancho de las hojas de *Bauhinia pauletia* Pers. Fuente: Propia



**Figura 4.** Descripción macroscópica del borde las hojas de *Bauhinia pauletia* Pers. Fuente: Propia

Características fenotípicas de las hojas: se observaron y establecieron según la guía dada por Becerra de Lozano & Chaparro de Valencia (1999), las hojas presentaron forma redondeada, de ápice bilobulado (dos lóbulos), de base sub-cordada (forma casi de corazón), de margen entero, textura nervada, glabra (sin pelos) en el haz y pubescente (con pelos o tricomas) en el envés principalmente en las nervaduras

Descripción de las características organolépticas

Color: Hoja fresca código en carta pantone: 371PC, color verde musgo. Hojas secas: código en carta pantone: 448 PC, color marrón oscuro.

### Descripción Microscópica

Corte longitudinal (haz)

A través de este corte se observó que el haz o cara adaxial de las hojas presentan células epidérmicas de forma irregular con paredes gruesas y contornos sinuosos sin espacios entre sí. La presencia de estomas en esta cara se encuentra generalmente cerca de las nervaduras, observándose en esta tres diferentes tipos de estomas, clasificándose como anisocíticos pues están rodeados por tres células subsidiarias de las cuales una es visiblemente mayor que las otras dos, paracíticos ya que tiene dos células subsidiarias cuyos eje longitudinales son paralelos al eje del estoma y anomocíticos pues están rodeados por cuatro a cinco células epidermales acompañantes semejante a la de las células epidermales.

Cortes longitudinales (envés)

A través de este corte se observó que el envés o cara abaxial de las hojas presenta al igual que el haz células epidérmicas de forma irregular con paredes gruesas y contornos sinuosos sin espacios entre sí, pero con ausencia de estomas, dándose por entendido que el intercambio gaseoso y la transpiración solo se da por medio del haz y que de acuerdo con esta distribución podríamos categorizarla como hojas epistómicas. Sin embargo, en esta cara a diferencia del haz se observó la presencia de tricomas epidermales de diversos tamaños distribuidos sobre todo el envés y con mayor frecuencia sobre las nervaduras. Los tricomas epidermales de

acuerdo a las características observadas se han clasificado como no glandulares de tipo uniseriados

Corte transversal de la lámina foliar

La sección transversal de la hoja en la región de la nervadura central, presentó epidermis más gruesa en el haz que en el envés. En el interior de la epidermis el mesófilo dorsiventral muestra una hilera de parénquima empalizada de células columnares que están dispuestas libremente y otra de parénquima esponjoso, observándose en medio de estas el haz vascular de una nervadura secundaria.

Material seco y molido

Mediante la observación microscópica realizada al material seco y molido fue posible evidenciar fragmentos de tricomas no glandulares uniseriados de distintos tamaños, vaso de fibras lignificadas, además de células de la epidermis.

Contenido de humedad

Una forma de conservación de la droga cruda es eliminar el exceso de humedad para evitar reacciones de hidrólisis de sus componentes y el crecimiento bacteriano, mediante secado se alcanzo una disminución del contenido de humedad del 64.8% a 11.9%.

Cenizas totales Hojas Secas y molidas  $6,66 \pm 0,01\%$

Cenizas sulfatadas: Secas y molidas  $3,22 \pm 0,01$ ,

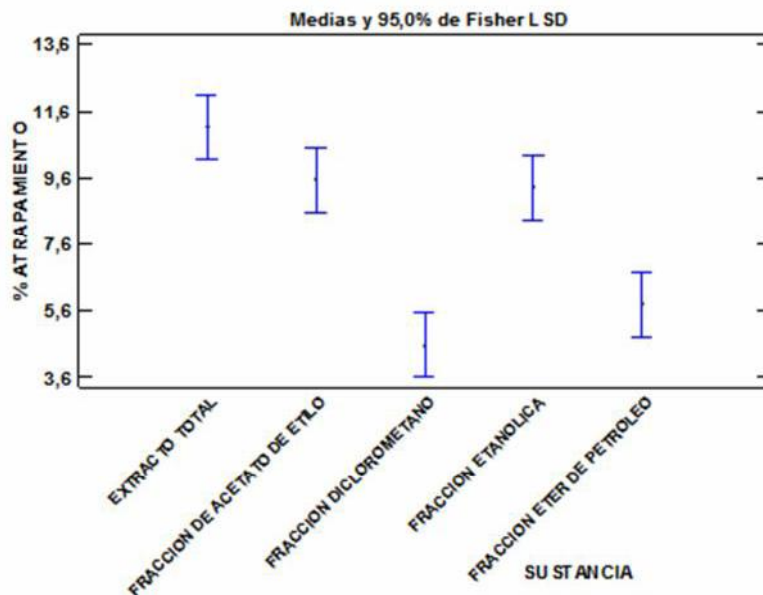
Control de calidad al extracto etanólico

Color Pantone 448 Pc Marrón Oscuro, Olor: no se halló olor dentro de las diferentes categorías ya establecidas, dato equivalente a lo obtenido en el control de calidad del material vegetal fresco y seco, pH:  $5,93 \pm 0,01$ , Densidad  $0,90 \pm 0,001$ . Sólidos totales  $11,45 \pm 0,01$ .

### Marcha Fitoquímica preliminar del extracto etanólico de la *Bauhinia pauletia* Pers

Se identificaron metabolitos del tipo alcaloides, fenoles, flavonoides, terpenosn cumarinas y saponinas.

### Actividad antioxidante por DPPH y ABTS.



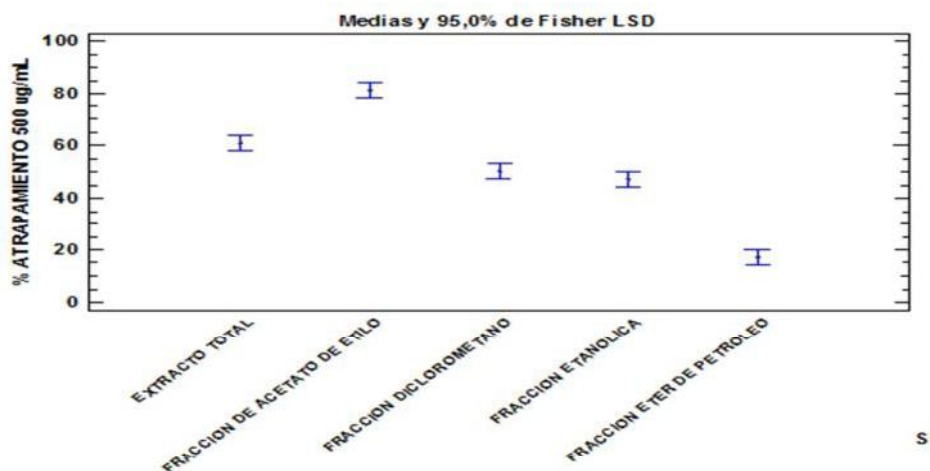
**Figura 5.** % Atrapamiento 250 ug/ml por sustancia. DPPH intra grupos. Fuente: propia

La capacidad neutralizante de las muestras depende de la polaridad de cada una de ellas, por tanto, las más polares poseen mayor capacidad antioxidante que las no polares. Se evidencia que esta especie vegetal mostró efecto antioxidante con un porcentaje de atrapamiento de DPPH máximo del 12,899% a concentraciones pequeñas (16,12 ug/mL) (figura 5).

**Tabla 2.** Anova para % Atrapamiento 500 ug/ml por Sustancia. ABTS intra grupos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6512,05	4	1628,01	160,49	0,0000
Intra grupos	101,441	10	10,1441		
Total (Corr.)	6613,49	14			

Fuente: Propia



**Figura 6.** % Atrapamiento 500 ug/ml por Sustancia. ABTS intra grupos. Fuente: propia



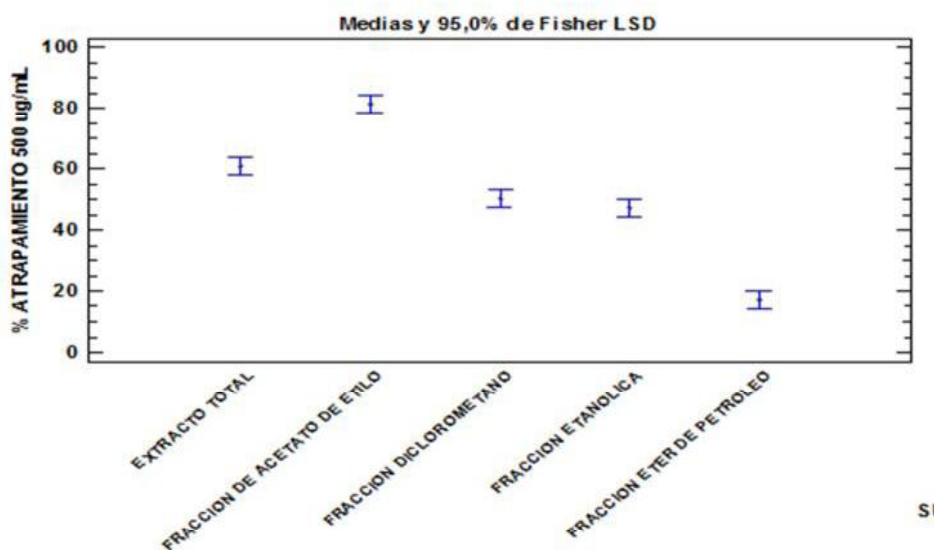
Se observa que el mayor %ABTS atrapado fue de 81,388% que corresponde a la fracción de acetato de etilo y el menor %ABTS atrapado fue de 7,705% que corresponde la fracción de éter de petróleo. De igual forma como sucedió en el ensayo de DPPH, la capacidad neutralizante de las muestras depende de la polaridad de cada una de ellas, por tanto, las más polares poseen mayor capacidad antioxidante que las no polares (tabla 2, figura 6).

### Fenoles y Flavonoides Totales:

**Tabla 3.** ANOVA para Absorbancia por Sustancia

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0221923	4	0,00554807	108,64	0,0000
Intra grupos	0,000510667	10	0,0000510667		
Total (Corr.)	0,0227029	14			

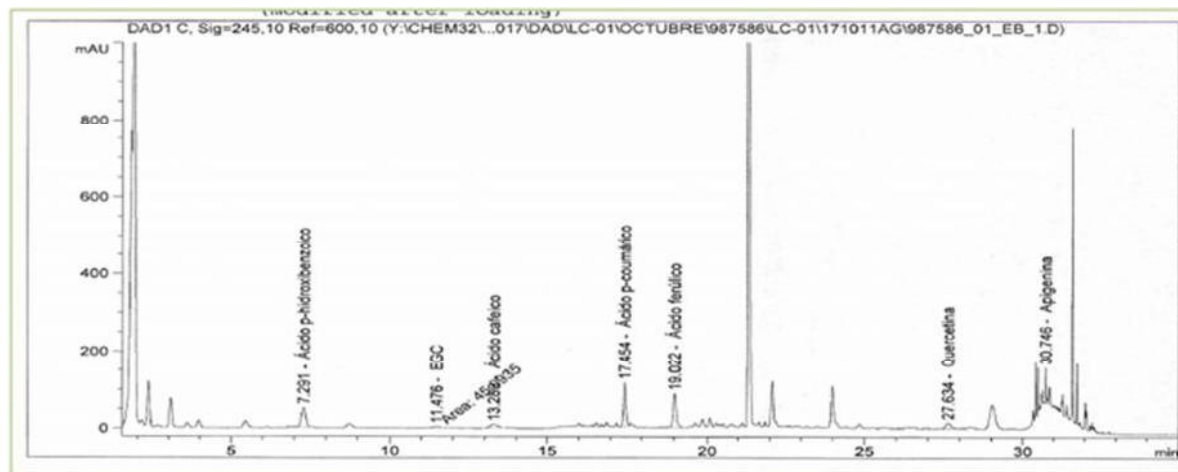
Fuente: Propia



**Figura 7.** Actividad Antioxidante: Fenoles. Fuente: propia

Las muestras con mayor contenido de flavonoides y fenoles totales corresponden al extracto total (tabla3, figura 7) que corresponde a 58,7 mgEQ/gES (equivalente de ácido gálico por gramo de extracto seco) y la fracción de acetato de etilo con 46,03 mgEQ/gES, al hacer los correspondientes cálculos. En otro estudio realizado a la especie vegetal *Bauhinia kalbreyeri*, se determinó el contenido de flavonoides al extracto etanólico de corteza y hojas obteniéndose como resultado 0,25 y 0,6 mgER/g (miligramos equivalentes de rutina por gramos de material vegetal seco) respectivamente (13). Estos resultados, ratifican que ambas plantas y que el género *Bauhinia*, constituyen una fuente de compuestos químicos antioxidantes.

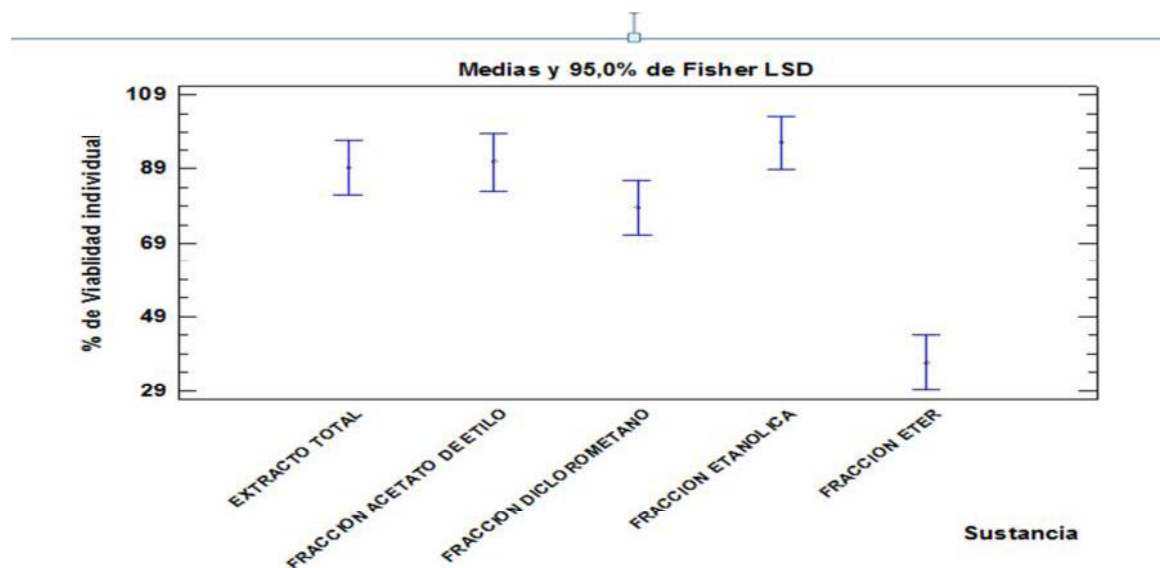
### Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD).



**Figura 8.** Determinación cualitativa de metabolitos por (HPLC/DAD): Cromatograma respecto a patrones de ácidos fenólicos y flavonoides. Fuente: propia

Se identificaron metabolitos como el ácido p-hidroxibenzoico, espigalocatequina, ácido vanílico, catequina, ácido cafeico, ácido p-cumarico, ácido ferulico, quercetina y apigenina (figura 8).

### Actividad Citotóxica



**Figura 9.** Determinación Actividad Citotóxica fracciones, método MTT. Fuente: propia

El extracto etéreo, el menos polar, muestra mayor actividad citotóxica contrario a los ensayos in vitro de actividad antioxidante (figura 9). Posiblemente por efecto de la misma solubilidad o a que las hojas de *Bauhinia pauletia* Pers contienen otro metabolito responsable de dicho efecto, se detectó la presencia de lectinas que posiblemente sean responsables de este, resultados no mostrados.

### Discusión

De acuerdo con los datos reportados por (17) y (18) las hojas de la especie *Bauhinia pauletia* Pers poseen entre 2,5-5,5 cm de largo, ancho entre 3,77 y 7.2 cm, rango que nos confirma que los resultados obtenidos hacen parte de este mismo valor promedio reportado. Las características Macroscópicas (fenotípicas) son similares a las reportadas por (17) y (18) en el cual describen las hojas de la especie como hojas alternas, bilobuladas, pecioladas, con lámina foliar anchamente elíptica, glabra o con pelos en los nervios principales del envés; cordada en la base,

escotada en el ápice que forma 2 lóbulos sub-obtusos o redondeados. De acuerdo a lo percibido sensorialmente se determinó que las hojas tanto frescas como secas de la especie en mención presentaron olor característico a la planta,

Según lo reportado en la bibliografía existen otras especies del mismo género con aberturas microscópicas semejantes a las observadas en la *Bauhinia pauletia pers*, tal es el caso de la *Bauhinia forficata* y la *Bauhinia rufescens* de las cuales se reporta la presencia de estomas de forma esporádica de tipo anomocítico en el haz de la hoja, distribuyéndose cerca de las nervaduras. En las inclusiones celulares no protoplasmáticas son reportadas en las nervaduras al igual que en otras especies del mismo género como es el caso de la *Bauhinia rufescens* y la *Bauhinia variegata* La *B. variegata* Linn al igual que la *B. pauletia pers* presentan forma de primas, mientras que la *B. rufescens* en forma de cristales de racimo o roseta. El almacenamiento de cristales de oxalato de calcio encontrado, posiblemente actúa como regulador de las funciones osmóticas, como mecanismos de defensa cuando hay déficit de este elemento y la detoxificación de metales pesados.

Los tricomas unicelulares de tejidos alargados, (de diversos tamaños, distribuidos sobre todo el limbo y con mayor frecuencia sobre las nervaduras) son semejantes a los reportados con las especies *Bauhinia forficata* y *Bauhinia variegata*, de igual forma se reporta una cubierta más densa en la epidermis superior con cutícula que en la epidermis inferior, formada por células rectangulares de paredes finas tangencialmente alargadas, observándose en el mesófilo la presencia de capas de parénquima empalizada debajo de la epidermis superior y el parénquima esponjoso sobre la epidermis inferior. Se reporta en las tres especies un haz vascular bien desarrollado en forma de "U" rodeado en el centro de esclerénquima con la presencia del xilema, floema y colénquima, además de tricomas en epidermis inferior.

Material seco y molido: observaciones microscópicas, no se encontraron muchas similitudes con lo reportado en otras especies del mismo género, se encontró la presencia de células del parénquima con cristales de oxalato de calcio, vasos de espesores helicoidales a espirales, abundantes cristales solitarios y con forma de prisma, células epidérmicas con estomas anomocíticos

Humedad: material vegetal con el que se trabajó para realizar el extracto etanólico total se encontraba dentro

de límites establecidos por la mayoría de las monografías encontradas en las farmacopeas, los cuales reportan que los niveles aceptados oscilan entre un 8 y 14% de humedad, indicando en este acaso que el proceso de secado aplicado fue adecuado para su correcta conservación y posterior utilización

Cenizas totales: residuos que permanece después de la ignición de la materia extraña como polvo, tierra, arena; que se encuentran adheridas a la superficie de la droga. Teniendo en cuenta que la farmacopea brasilera establece que una planta medicinal debe tener un 12% máximo de cenizas totales para ser considerada apta para el consumo humano, se establece que esta especie cumple con las especificaciones generales en cuanto a la cantidad de residuo no volátil después de la calcinación de la droga, indicando en cierta medida, que hubo el debido cuidado en la preparación de la droga o material vegetal

Cenizas sulfatadas: De acuerdo con el valor obtenido representa el contenido de impurezas inorgánicas presentes en la droga o material vegetal, dato que según lo reportado por (19) se encuentra dentro de las especificaciones, ya este establece que el valor máximo permitido por la norma es del 17%.

Control de calidad al extracto etanólico: corresponde a un pH de carácter ácido débil, este valor de pH está dado por la presencia de ciertos metabolitos como son flavonoides y fenoles el cual aportan el carácter ácido al medio y ausencia de especies químicas de carácter básico como alcaloide En comparación con otros extractos de especies vegetales pertenecientes al mismo género podemos citar a la *Bauhinia tarapotensis benth* quien a pesar de no reportar un valor semejante si reporto el mismo carácter ácido débil con un pH de 6.68. La densidad relativa es semejante a la reportada por otras especies del mismo género tal como la *Bauhinia tarapotensis benth* quien arrojó un valor de 0.82 g/mL, la *Bauhinia tarapotensis benth* que reporto 2,95% de solidos totales.

Según la Marcha Fitoquímica preliminar del extracto etanólico de la *Bauhinia pauletia pers*, se identificaron metabolitos del tipo alcaloides, fenoles, flavonoides, terpenos cumarinas y saponinas. Coincidentes con lo que reporta la literatura que plantas como la *Bauhinia purpurea*, *forficata*, *variegata*, *candicans* poseen los mismos metabolitos secundarios. Lo que hace que la planta tenga un gran potencial antioxidante ya que estas especies son capaces de atrapar radicales libres respon-

sables del estrés oxidativo

La literatura reporta que plantas como la *Bauhinia purpurea*, *forficata*, *variegata*, *candicans*, poseen metabolitos secundarios como alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, terpenos, saponinas, estos coinciden con los confirmados en la *Bauhinia pauletia* a través de la marcha fitoquímica. Sin embargo, solo una de las cuatro pruebas para la identificación de alcaloides dio positivo, por tanto, se evidencia la baja presencia de alcaloides, lo cual no coincide con el género *Bauhinia purpurea* (21), la cual muestra presencia de alcaloides en las pruebas cualitativas tales como Wagner, Dragendorf, Meyer y Hager.

Estos resultados permiten afirmar que esta planta presenta abundancia de compuestos fenólicos, lo que hace probable que tengan un gran potencial antioxidante debido a que estas especies químicas con capaces de neutralizar o atrapar radicales libres que son los responsables del inicio estrés oxidativo en los seres vivos, se han identificado especies químicas tales como esteroides (B-sitosterol y estigmasterol) además de, flavanonas y flavonoides de variada estructura en la especie vegetal *Bauhinia candicans* y *Bauhinia forficata*. (22).

La actividad antioxidante de la *Bauhinia pauletia* fue evaluada a través de los métodos espectrofotométricos DPPH• y ABTS•+. La fracción de acetato de etilo mostró mejor efecto antioxidante con respecto a las demás fracciones, lo que demuestra que este solvente es el mejor extractor para obtener compuestos activos con actividad antioxidante. La *Bauhinia pauletia pers* mostró menos actividad antioxidante (44,57 µg/mL) que la *B. kalbreyeri* (18,75 µg/mL) (23)

A pesar de la diferencia, se puede afirmar que la *B. pauletia* es una especie vegetal con gran potencial antioxidante. Se observa que el mayor % ABTS•+ atrapado (81,39% ±2,6) corresponde a la fracción de acetato de etilo y el menor % ABTS•+ atrapado (7,70% ±1,4) corresponde la fracción de éter de petróleo. El extracto total y la fracción de acetato de etilo demostraron tener mayor efecto antioxidante que las demás fracciones,

En el extracto etanólico de la *Bauhinia pauletia* se obtuvo mayor cantidad de fenoles y la fracción etérea de la misma planta, mostró el resultado más bajo en el contenido de fenoles. En otro estudio realizado al extracto etanólico de la corteza de la *Bauhinia kalbreyeri* (23), se cuantificaron compuestos fenólicos con un valor de

26,02 mgEAG/g de material seco.

Se consideraron citotóxicos los extractos y fracciones que presentaron porcentajes de viabilidad celular igual o inferior a un 50%. Además se puede observar que las células MCF7 tratadas con el extracto total y sus fracciones (fracción de etanol, acetato de etilo, éter y diclorometano) presentaron una disminución de la viabilidad celular con respecto al DMSO como control negativo. De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que a las 24 horas de exposición las fracciones que presentaron menor % de viabilidad fueron: la fracción de éter de petróleo con un % de viabilidad celular de 2,60 % y 2,93 % a concentraciones de 500 µg/mL y 1000 µg/mL. De acuerdo con la bibliografía la fracción de éter de petróleo podría contener triterpenos y saponinas triterpénicas siendo estos posiblemente los que estén actuando favorablemente en la actividad citotóxica de esta fracción. Los triterpenos y saponinas triterpénicas se les ha comprobado propiedades farmacológicas, entre ellas una buena actividad citotóxica en varias líneas celulares derivadas de tumores humanos, como lo referencia (24) para varias familias botánicas.

En la fracción de acetato de etilo a través del análisis de HPLC/DAD se encontraron compuestos fenólicos y flavonoides. Estos grupos de compuestos actúan en forma preventiva en el desarrollo del cáncer, poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres. Estos metabolitos representan un gran interés científico debido a que se pueden considerar responsables del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades como el cáncer.

Esta familia de compuestos fenólicos se caracterizan principalmente por su alta actividad antioxidante, que se debe a su estructura química, que contiene un núcleo fenólico y una cadena lateral insaturada esto permite formar un radical fenoxilo estabilizado por resonancia, el cual tiene actividad como agente secuestrador de radicales libres, por lo que los ácidos fenólicos están relacionados con la protección del ADN y los lípidos de la membrana celular contra las especies reactivas de oxígeno, sugiriéndose su uso como agentes preventivos de enfermedades ligadas al estrés oxidativo .

## Conclusiones

El extracto etanolicos de hojas secas de *Bauhinia pauletia Pers.*, y la subfraccion de eter mostraron actividad citotóxica frente a la línea celular de cáncer de mama

MCF7. En la composición fitoquímica de los extractos obtenidos de las hojas se identificaron alcaloides, fenoles y flavonoides antioxidantes. Se identificaron metabolitos como el ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido *p*-coumarico y ácido ferulico.

## Agradecimientos

A la Universidad de Sucre, a su Grupo de Investigación de Productos Naturales, dirigido por la doctora Rita Márquez Vizcaíno y a todos sus colaboradores. Al cuerpo de docentes de la Universidad del Atlántico y de la Universidad Metropolitana. Y a todas las instituciones y personas que contribuyeron para la financiación de este proyecto. A los Msc. Alex Parodi y Fredys Sánchez por su asesoría.

---

## Referencias

1. Soria I, N., Ramos, P., Uso de plantas medicinales en la atención primaria de salud en Paraguay: algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2015;13(2):8-17.
2. World Health Organization. (1998). Quality control methods for medicinal plant materials World Health Organization Geneva. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41986/9241545100.pdf?sequence=1>.
3. Calaf, GM., Aguayo F., Sergi CM., Juarranz A., Roy D. Antioxidants and Cancer: Theories, Techniques, and Trials in Preventing Cancer. Oxid Med Cell Longev. 2018; 20; doi: 10.1155/2018/5363064.
4. Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddlestun SE, Zhao Z, Leitch AM, Johnson TM, DeBerardinis RJ, Morrison SJ. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. Nature. 2015; 527(7577):186-91.
5. Thyagarajan A, Sahu RP. Potential Contributions of Antioxidants to Cancer Therapy: Immunomodulation and Radiosensitization. Integr Cancer Ther. 2018; 17(2):210-216..
6. OMS | Enfermedades no transmisibles [Internet]. Who.int. 2015 [citado 25 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>
7. Enfermedades No Transmisibles [Internet]. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. 2016 [citado 25 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.minsal.cl/enfermedades-no-transmisibles/>
8. COL000091759 -*Bauhinia pauletia* Pers. –Caesalpiniaceae. <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/8453/>
9. Martínez Maby M, Ocampo Diana M, Galvis Jhon H, Valencia Andrea. Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). Rev Cub Plant Med 2011; 16(4): 313-323.
10. Silva MC, de Paula CA, Ferreira JG, Paredes-Gamero EJ, Vaz AM, Sampaio MU, et al. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. Biochim Biophys Acta 2014;1840(7):2262-2271.
11. Lim Hae-Young; Lim Yoong-Ho; Cho Youl-Hee; Lee Chul-Hoon. Induction of Apoptosis in the HepG2 Cells by HY53, a Novel Natural Compound Isolated from *Bauhinia forficata*. J Microbiol Biotechnol. 2006; 6(8): 1262-1268.
12. Murillo E, Lombo O, Tique M, Méndez JJ. Potencial antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (FABACEAE). Información tecnológica 2007;18(6):65-74.
13. Ortiz H, Sánchez W, Murillo E, Méndez JJ. Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* harms: contribución de sus flavonoides en esta actividad. Tumbaga 2009; 4:43-58.
14. Quality control methods for medicinal plant material [Internet]. apps.who.int. [citado 25 Agosto 2018]. Disponible en <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41986/9241545100.pdf?sequence=1>
15. Pérez- González L., Estudio fitoquímico biondirigido de las plantas con potencial actividad insecticida *Ttrichilia havanensis* y *Croton ciliatoglanduliferus*. Universidad de las Américas Puebla, 2006. Disponible en [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lcf/perez\\_g\\_le/](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/perez_g_le/)

16. Tovar Del Rio J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera [pregrado]. Universidad tecnológica de Pereira; 2013. disponible en <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/3636>
17. Toro J., Briones J. Manejo de plantas-plagas en pastizales. Pb INIAP Archivo Histórico. Disponible en <https://books.google.com.co/books?id=fI0zQAAMAAJ>
18. Catálogo de la Biodiversidad de Colombia. Disponible en <http://www.catalogo.biodiversidad.co>. Consultado en 2014-01-15
19. Méndez Gladys, Fuentes Fiallo Víctor R, Soler Benito A, Villanueva Gloria, Lemes Hernández Ciro M, Rodríguez Ferrada Carlos A. Variación de índices farmacognósticos en *Passiflora incarnata* L. con la época y hora de cosecha de la droga. *Rev Cub Plant Med.* 2001; 6(3): 98-104.
20. da Silva LK., Valdir CF. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. *Quím. Nova* 2002; 25(3): 449-454.
21. Martínez N, Cayama E, González L, Labrador S, Espino C, Pérez L. Efecto Hipoglicemiante de la planta *Bauhinia purpurea* L. en ratones euglémicos. *Comunidad y Salud* 2009; 7(2): 45-51.
22. Muñoz O. Plantas medicinales de uso en Chile: Química y farmacología. Disponible en: [https://books.google.com.co/books?id=cuviT1SKao8C&pg=PA57&dq=bauhinia&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwihjY-1\\_bjVAhXKfCYKHSAtCUYQ6AEIMjAC#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.co/books?id=cuviT1SKao8C&pg=PA57&dq=bauhinia&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwihjY-1_bjVAhXKfCYKHSAtCUYQ6AEIMjAC#v=onepage&q&f=false)
23. Ortiz H, Sánchez W, Murillo E, Méndez J. Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kal-*