

MIZAJE FITOQUÍMICO Y POTENCIAL ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE PARTES AÉREAS DE BAUHINIA VARIEGATA

Resumen

Los objetivos de este estudio son tamizar los fitoquímicos, cromatografía en capa fina, estimar el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides y determinar la capacidad antioxidante de la (*Bauhinia variegata*). El análisis cualitativo de varios constituyentes fitoquímicos y el análisis cuantitativo de fenol total y flavonoides se determinaron mediante el conocido protocolo de prueba disponible en la literatura. El extracto hidroalcohólico de partes aéreas de (*Bauhinia variegata*) se estudió para el análisis cualitativo y cuantitativo y la actividad antioxidante en un modelo in vitro, a saber, el ensayo de 1,1-difenil, 2-picrilhidrazilo (DPPH). El análisis fitoquímicos reveló la presencia de fenoles y flavonoides. El contenido total de fenoles y flavonoides del extracto hidroalcohólico de (*Bauhinia variegata*) fue de 1.454 y 1.112mg/100mg respectivamente. El ácido ascórbico utilizado como estándar también se evaluó para comparar. El extracto mostró una propiedad de eliminación de radicales libres dependiente de la dosis en los modelos probados. Las partes aéreas del extracto hidroalcohólico de (*Bauhinia variegata*) mostraron un valor de IC50 de 60,22 µg/ml para el método DPPH, que fue comparable al del ácido ascórbico (IC50 = 17,68 µg/ml). Para el método de peróxido de hidrógeno, se encontró que el valor IC50 era de 76,97 µg/ml, que se compara favorablemente con el ácido ascórbico (IC50 = 18,69 µg/ml). El presente estudio describe el perfil fitoquímico y la actividad antioxidante y la TLC de (*Bauhinia variegata*), que se utilizará posteriormente para aplicaciones medicinales.

Palabras clave: Bauhinia variegata, Cualitativo, Fitoquímico cuantitativo, TLC, Actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres o especies de oxígeno altamente reactivas se forman por sustancias químicas exógenas o procesos metabólicos endógenos en el cuerpo humano. Estos son capaces de oxidar biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y ADN, y pueden iniciar diferentes enfermedades degenerativas como trastornos neurológicos, cáncer, enfisema, cirrosis, aterosclerosis, artritis, etc. [1, 2]. Los antioxidantes son los compuestos que ponen fin al ataque de los radicales libres y, por lo tanto, reducen el riesgo de estos trastornos [3]. Casi todos los organismos están protegidos hasta cierto punto por el daño de los radicales libres con la ayuda de enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y los compuestos antioxidantes, a saber. Ácido ascórbico, tocoferol, ácidos fenólicos, polifenoles, flavonoides y glutatión. Prior y Cao [4] informaron que los suplementos antioxidantes o los antioxidantes dietéticos protegen contra los efectos dañinos de los radicales libres. En la actualidad, se ha centrado mucha atención en el uso de antioxidantes naturales para proteger el cuerpo humano, especialmente los tejidos cerebrales, del daño oxidativo causado por los radicales libres. En las últimas dos décadas,

Comment [U1]: Mejor (para estimar)

Comment [U2]: Mejor (en la determinación de la)

Comment [U3]: Todos los nombres científicos de animales o plantas van en letra negrita y en cursiva.

Comment [U4]: Mejor (de)

Comment [U5]: Mejor (en)

Comment [U6]: Mejor (reactivos)

Comment [U7]: Mejor (internos)

Comment [U8]: Mejor (arteriosclerosis)

Comment [U9]: Mejor (el)

varias plantas medicinales han demostrado tal eficacia a través de los métodos tradicionales de la psiconeurofarmacología [5]. (*Bauhinia variegata*) Linn. (Leguminosae) la corteza se usa tradicionalmente como tónico y en el tratamiento de úlceras. También es útil en enfermedades de la piel. Las raíces se utilizan como antídoto contra el veneno de serpiente [6]. En la medicina popular, esta planta también se usa para controlar varias enfermedades, incluidas las inflamatorias [7]. Teniendo esto en cuenta, el presente estudio se ha realizado para evaluar la actividad antioxidante, el estudio cuantitativo del contenido total de fenoles y flavonoides de (*Bauhinia variegata*), que son tradicionalmente bien conocidos por sus diversas actividades.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Las partes aéreas de (*Bauhinia variegata*) se recolectaron de Vindhya Herbals (MFP-PARC) Bhopal (M.P.) en el mes de febrero de 2020. Todos los productos químicos utilizados en este estudio se obtuvieron de Hi Media Laboratories Pvt. Ltd. (Mumbai, India), Sigma-Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, EE. UU.), SD Fine-Chem. Ltd. (Mumbai, India) y SRL Pvt. Ltd. (Mumbai, India). Todos los productos químicos y disolventes utilizados en este estudio eran de grado analítico.

Métodos

Procedimiento de extracción

Se adoptó el siguiente procedimiento para la preparación del extracto de las partes aéreas secadas a la sombra y en polvo [8-9]

Extracción por método de maceración [10]

El material secado a la sombra se pulverizó en forma de polvo grueso y se sometió a extracción con éter de petróleo mediante maceración. Se continuó la extracción hasta que tuvo lugar el desengrasado del material. Se extrajeron exhaustivamente 77 g de partes aéreas secas de *Bauhinia variegata* con solvente hidroalcohólico (metanol: agua: 70:30) por el método de maceración. Los extractos se evaporaron por encima de sus puntos de ebullición y se almacenaron en un recipiente hermético libre de cualquier contaminación hasta su uso. Finalmente se calcularon los rendimientos porcentuales de los extractos secos.

Determinación del porcentaje de rendimiento

El porcentaje de rendimiento de cada extracto se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso de la droga en polvo tomada}} \times 100$$

Comment [U10]: Eliminar estas palabras

Cribado fitoquímico

Los exámenes fitoquímicos se llevaron a **cabo** extractos según los siguientes métodos estándar.

Comment [U11]: Mejor (cabo mediante)

1. Detección de alcaloides: Extractos disueltos individualmente en ácido clorhídrico diluido y filtrados.

a) Prueba de Hager: Los filtrados se trataron con el reactivo de Hager (solución saturada de ácido pícrico). Alcaloides confirmados por la formación de un precipitado de color amarillo.

2. Detección de carbohidratos: Los extractos se disolvieron individualmente en 5 ml de agua destilada y se filtraron. Los filtrados se usaron para probar la presencia de carbohidratos.

a) Prueba de Fehling: Los filtrados se hidrolizaron con dil. HCl, neutralizado con álcali y calentado con soluciones A y B de Fehling. La formación de un precipitado rojo indica la presencia de azúcares reductores.

3. Detección de glucósidos: Los extractos se hidrolizaron con dil. HCl, y luego se sometió a la prueba de glucósidos.

a) Prueba de Legal: Los extractos fueron tratados con nitroprusiato de sodio en piridina e hidróxido de sodio. El hallazgo de color rosa a rojo sangre indica la presencia de glucósidos cardíacos.

4. Detección de saponinas

a) Prueba de espuma: los extractos se diluyeron con agua destilada a 20 ml y se agitó en un cilindro graduado durante 15 minutos. La formación de una capa de espuma de 1 cm indica la incidencia de saponinas.

5. Detección de fenoles

a) Prueba de Cloruro Férrico: Los extractos se trataron con 3-4 gotas de solución de cloruro férrico. La formación de color negro azulado indica la presencia de fenoles.

6. Detección de flavonoides

a) Prueba de acetato de plomo: los extractos se trataron con unas gotas de solución de acetato de plomo. Las formaciones de precipitado de color amarillo indican la presencia de flavonoides.

7. Detección de proteínas

a) Prueba Xantoproteica: Los extractos fueron tratados con unas gotas de concentrado. Ácido nítrico. La formación de color amarillo indica la presencia de proteínas.

8. Taninos

a) Prueba de gelatina: A 1 ml del extracto vegetal se le añadieron unas gotas de solución de gelatina al 1% que contenía cloruro de sodio al 10% (NaCl). La formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos.

9. Detección de diterpenos

a) Prueba de acetato de cobre: los extractos se disolvieron en agua y se trataron con 3-4 gotas de solución de acetato de cobre. La formación de color verde esmeralda indica la presencia de diterpenos [11-13].

Cromatografía de capa fina

La cromatografía en capa fina se basa en el fenómeno de **adsorción**. En este tipo de cromatografía, la fase móvil que contiene los solutos disueltos pasa sobre la superficie de la fase estacionaria. Cada extracto de disolvente se sometió a cromatografía en capa fina (TLC) según el método ascendente unidimensional convencional usando gel de sílice 60F254, se cortaron 7X6 cm (Merck) con tijeras domésticas ordinarias. Las marcas de las placas se hicieron con lápiz blando. Se usaron capilares de vidrio para detectar la muestra para el volumen de muestra aplicado por TLC de 1 microlitro usando el capilar a una distancia de 1 cm en 5 pistas. En la cámara de doble cubeta con diferente sistema de disolvente tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (5:4:1) para quercetina y tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (7:5:1) para el sistema de disolvente de ácido gálico utilizado. Después de la presaturación con la fase móvil durante 20 minutos, se utilizaron para el desarrollo. Después de secar y rociar las placas de ensayo, se usaron reactivos de yodo recién preparados para detectar las bandas en las placas de TLC. El movimiento del compuesto activo se expresó por su factor de retención (Rf), los valores se calcularon para diferentes muestras.

Comment [U12]: Mejor (absorción)

Detección y Cálculo de Rf. Valor

Una vez desarrollado el cromatograma, se calculó el Valor Rf del spot utilizando la fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distance traveled by solute}}{\text{Distance traveled by solvent}}$$

Estudios cuantitativos de fitoconstituyentes

Estimación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales del extracto se determinó por el método de Folin-Ciocalteu modificado. Se disolvieron 10 mg de ácido gálico en 10 ml de metanol, se prepararon varias alícuotas de 10-50 µg/ml en metanol. Se disolvieron 10 mg de extracto seco en 10 ml de metanol y se filtraron. Dos ml (1 mg/ml) de este extracto fueron para la estimación de fenol. Se mezclaron 2 ml de extracto y cada patrón con 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (previamente diluido con agua destilada 1:10 v/v) y 1 ml (7,5 g/l) de carbonato de sodio. La

mezcla se agitó durante 15 s y se dejó reposar durante 10 min para el desarrollo del color. La absorbancia se midió a 765 nm utilizando un espectrofotómetro.

Estimación del contenido total de flavonoides

La determinación del contenido total de flavonoides se basó en el método del cloruro de aluminio. Se disolvieron 10 mg de quercetina en 10 ml de metanol y se prepararon varias alícuotas de 5-25 µg/ml en metanol. Se disolvieron 10 mg de extracto seco en 10 ml de metanol y se filtraron. Tres ml (1 mg/ml) de este extracto fueron para la estimación de flavonoides. A 3 ml de extracto o de cada patrón se le añadió 1 ml de solución de AlCl₃ al 2% y se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente; la absorbancia se midió a 420 nm.

Actividad antioxidante in vitro del extracto de *Bauhinia variegata* utilizando el método DPPH

La actividad de captación de DPPH se midió con el espectrofotómetro [14]. La solución madre (6 mg en 100 ml de metanol) se preparó de manera que 1,5 ml de ella en 1,5 ml de metanol dieron una absorbancia inicial. Se observó una disminución en la absorbancia en presencia de extracto de muestra a diferente concentración (10-100 µg/ml) después de 15 minutos. Se tomó 1.5 ml de solución de DPPH y se aforó a 3 ml con metanol, se tomó inmediatamente la absorbancia a 517 nm para lectura de control. Se tomaron tres muestras de prueba y cada una se procesó de manera similar. Finalmente se tomó la media. Se notó una disminución final en la absorbancia de DPPH con la muestra a diferente concentración después de 15 minutos a 517 nm.

Cálculo del % de reducción (Absorbancia de control - Absorbancia de prueba) / (Absorbancia de control) X 100

Resultados y discusión

Rendimiento porcentual del extracto hidroalcohólico obtenido Partes aéreas de (*Bauhinia variegata*) representadas en la Tabla 1. Los estudios fitoquímicos preliminares del extracto se realizaron de acuerdo con los métodos estándar publicados. El análisis fitoquímico reveló la presencia de flavonoides, diterpenos, fenol, proteínas y saponinas Tabla 2. Se realizó una cromatografía en capa fina para confirmar la presencia de ácido gálico y quercetina en el extracto de hierbas de las tablas 3 y 4. Los compuestos fenólicos totales (TPC) se expresaron en mg /100mg de ácido gálico equivalente de muestra de extracto seco utilizando la ecuación obtenida de la curva de calibración: $Y = 0.011X + 0.011$, $R^2 = 0.998$, donde X es el ácido gálico equivalente (GAE) e Y es la absorbancia. El contenido de flavonoides totales se calculó como equivalente de quercetina (mg/100mg) utilizando la ecuación basada en la curva de calibración: $Y = 0.032X + 0.018$, $R^2 = 0.998$, donde X es el equivalente de quercetina (QE) e Y es la absorbancia Tabla 5. El ensayo de captación de radicales DPPH midió la naturaleza donadora de hidrógeno de los extractos. Bajo la

actividad de eliminación de radicales DPPH, se encontró que el valor de la concentración inhibitoria al 50% (IC50) del extracto hidroalcohólico de (*Bauhinia variegata*) era de 76,97 µg/ml en comparación con el del ácido ascórbico (18,69 µg/ml). Se observó una actividad dependiente de la dosis con respecto a la concentración Tabla 6.

Cuadro No. 1: % Rendimiento de extracto hidroalcohólico de *Bauhinia variegata*

| S. No. | Hydroalcoholic extract | % Yield (W/W) |
|--------|---|---------------|
| 1. | Aerial parts of <i>Bauhinia variegata</i> | 3.91 |

Cuadro No. 2: Resultado del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Bauhinia variegata*

| S. No. | Constituents | Aerial parts extract |
|--------|---|----------------------|
| 1. | Alkaloids Wagner's Test: | -ve |
| 2. | Glycosides Legal's Test: | -ve |
| 3. | Flavonoids Alkaline Reagent Test: Lead acetate Test: | +ve + ve |
| 4. | Diterpenes Copper acetate Test: | +ve |
| 5. | Phenol Ferric Chloride Test: | + ve |
| 6. | Proteins Xanthoproteic Test: | +ve |
| 7. | Carbohydrate Fehling's Test: | -ve |
| 8. | Saponins Froth Test: | +ve |
| 9. | Tannins Gelatin test: | -ve |

Tabla No. 3: Cálculo de Rf. Valor del extracto hidroalcohólico de variegata de Bauhinia para la quercetina

| <i>Bauhinia variegata</i> extract | | |
|--|--|--|
| S. No. | Mobile phase | Rf value |
| | Toluene: Ethyl acetate Formic acid (5:4:1) | |
| 1. | (Quercetin) Dis. travel by mobile phase= 5cm No. of spot at long UV= 1 No. of spot at short UV = 1 No. of spot at normal light= 1 | Long- 0.58 Short- 0.58 Normal- 0.58 |
| 2. | (Hydroalcoholic extract) Dis. travel by mobile phase= 5cm No. of spot at long UV = 6 No. of spot at short UV = 4 No. of spot at normal light= 4 | Long- 0.58, 0.68,0.72,0.8, 0.92,0.96 Short- 0.58, 0.64,0.72,0.8 Normal- 0.58, 0.64,0.72,0.8 |

Tabla No. 4: Cálculo de Rf. Valor del extracto hidroalcohólico de variegata de Bauhinia para el ácido gálico

| <i>Bauhinia variegata</i> extract |
|--|
|--|

| S. No. | Mobile phase Toluene: Ethyl acetate Formic acid (7:5:1) | Rf value |
|--------|--|---|
| 1. | (Gallic acid) Dis. travel by mobile phase= 5cm No. of spot at long UV = 1 No. of spot at short UV = 1 No. of spot at normal light= 0 | Long- 0.34 Short- 0.34 Normal- 0.34 |
| 2. | (Hydroalcoholic extract) Dis. travel by mobile phase= 5cm No. of spot at long UV = 6 No. of spot at short UV = 4 No. of spot at normal light= 4 | Long- 0.58, 0.64, 0.74, 0.86, 0.9, 0.98 Short- 0.58, 0.64, 0.74, 0.86 Normal- 0.58, 0.64, 0.74, 0.86 |

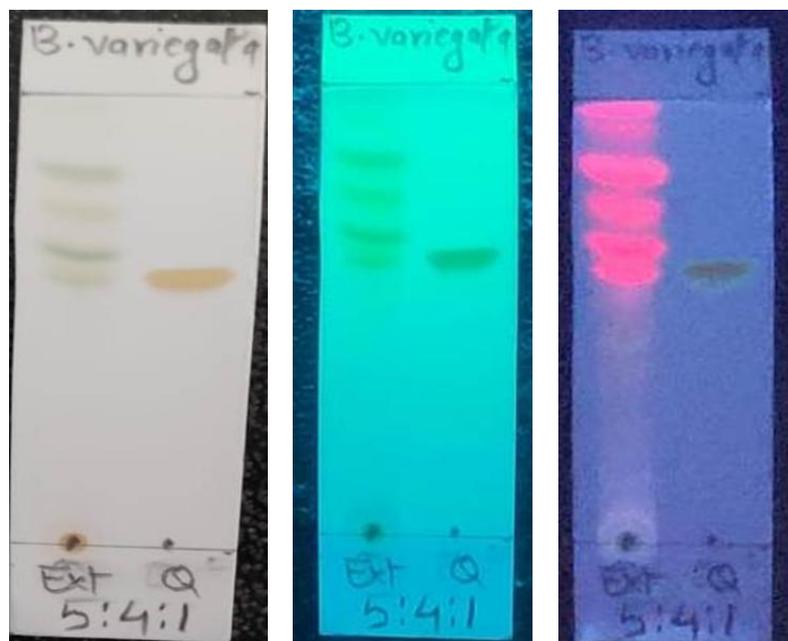


Figura 1: Luz normal

U.V corta

U.V larga

Spot-1= Quercetina, Spot-2= Extracto de partes aéreas de (*Bauhinia variegata*)

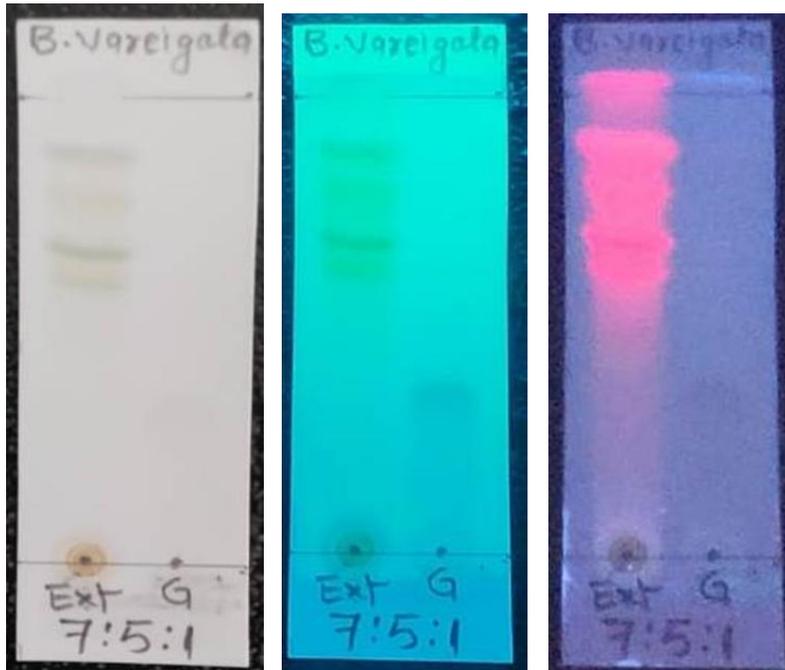


Figura 2: Luz normal U.V corta U.V larga

Spot-1= Ácido gálico, Spot-2= Extracto de partes aéreas de (*Bauhinia variegata*)

Cuadro No. 5: Estimación del contenido de fenoles y flavonoides totales de partes aéreas del extracto (*Bauhinia variegata*)

| S. No. | Extract | Total phenolic content (mg/100mg of dried extract) | Total flavonoids content (mg/ 100 mg of dried extract) |
|--------|---------------------------|--|---|
| 1. | <i>Bauhinia variegata</i> | 1.454 | 1.112 |

Tabla 6: % Inhibición de ácido ascórbico y extracto hidroalcohólico de (*Bauhinia variegata*) por método DPPH

| S. No. | Concentration (µg/ml) | % Inhibition | |
|------------------------|--------------------------|---------------|--------------------------------------|
| | | Ascorbic acid | <i>Bauhinia variegata</i> extract |
| 1 | 10 | 30.42 | 18.26 |
| 2 | 20 | 59.11 | 19.13 |
| 3 | 40 | 67.48 | 32.17 |
| 4 | 60 | 75.25 | 46.95 |
| 5 | 80 | 77.58 | 52.17 |
| 6 | 100 | 79.63 | 58.26 |
| IC₅₀ | | 18.69 | 76.97 |

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran claramente que el extracto, que puede eliminar eficazmente varias especies reactivas de oxígeno/radicales libres en condiciones in vitro. Esto puede deberse a la cantidad de productos oxidados estables que puede formar después de la oxidación o la eliminación de radicales. El amplio rango de actividad de los extractos sugiere que múltiples mecanismos son responsables de la actividad antioxidante. La actividad antioxidante múltiple del extracto demostrada en este estudio indica claramente el valor de aplicación potencial de ambas plantas. Sin embargo, la seguridad in vivo de ambas plantas debe investigarse a fondo en modelos experimentales de roedores antes de su posible aplicación como ingrediente antioxidante, ya sea en alimentos para animales o en alimentos para la salud humana. Los resultados anteriores mostraron que las partes aéreas del extracto de (*Bauhinia variegata*) podrían exhibir propiedades antioxidantes. Estudios adicionales sobre el uso de las plantas anteriores por su papel antioxidante en varios sistemas pueden proporcionar antioxidantes naturales potenciales.

Comment [U13]: Mejor (demostrado)

DESCARGO DE RESPONSABILIDAD DE INTERESES EN COMPETENCIA:

Los autores han declarado que no existen intereses contrapuestos. Los productos utilizados para esta investigación son productos de uso común y predominante en nuestra área de investigación y país. No existe absolutamente ningún conflicto de intereses entre los

autores y los productores de los productos porque no tenemos la intención de utilizar estos productos como una vía para ningún litigio, sino para el avance del conocimiento. Además, la investigación no fue financiada por la empresa productora, sino que fue financiada por el esfuerzo personal de los autores.

REFERENCIAS

1. Halliwell B, Gutteridge JM. Toxicidad del oxígeno, radicales de oxígeno, metales de transición y enfermedades. *Biochem J* 1984; 219:1-4.
2. Maxwell SR. Perspectiva para el uso de terapias antioxidantes. *Drogas* 1995; 49:45-361.
3. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Relaciones de actividad antioxidante estructural de flavonoides y ácidos fenólicos. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:933-56.
4. RL anterior, Cao G. Variabilidad en suplementos dietéticos de productos naturales relacionados con antioxidantes: la necesidad de métodos de estandarización. *Asociación Nutracéutica J Am* 1999; 2:46-56.
5. Dhawan BN. Agentes de acción central de plantas indias. En: Koslow SH, Murthy RS, Coelho GV, editores. *Década del Cerebro: India/EE.UU. Investigación en Salud Mental y Neurociencias*. Rockville: Instituto Nacional de Salud Mental; 1995. pág. 197-202.
6. S. Jan, M. A. Khan, Sirajuddin, W. Murad, M. Hussain y A. Ghani, "Remedios herbales utilizados para trastornos gastrointestinales en el valle de Kaghan, NWFP, Pakistán", *Pakistan Journal of Weed Science Research*, vol. 14, págs. 169 a 200, 2008.
7. Y. K. Rao, S.-H. Fang y Y.-M. Tzeng, "Actividades antiinflamatorias de los flavonoides y un café triterpénico aislado de *Bauhinia variegata*", *Phytotherapy Research*, vol. 22, núm. 7, págs. 957-962, 2008.
8. Khandelwal KR. ed. *Técnica y experimentos prácticos de farmacognosia*, 23ª edición: 2005; 15.
9. Kokate CK. ed. *Farmacognosia práctica*, 4.ª edición, Vallabh Prakashan: 1994; 112:120.
10. Mukherjee PK. Control de calidad de medicamentos a base de hierbas, 2.ª edición, *Business Horizons*, 2007; 2-14.
11. Roopashree TS, Dang R, Rani SRH, Narendra C. Actividad antibacteriana de hierbas antipsoriásicas: *Cassia tora*, *Momordica charantia* y *Calendula officinalis*. *Revista Internacional de Investigación Aplicada en Productos Naturales* 2008; 1(3): 20-28.
12. Obasi NL, Egbunu ACC, Ukoha PO, Ejikeme PM. Detección fitoquímica y antimicrobiana comparativa de algunos extractos solventes de las vainas de *Samanea saman*. *Revista africana de química pura y aplicada* 2010; 4(9): 206-212.
13. Audu SA, Mohamed I, Kaita HA. Cribado fitoquímico de las hojas de *Lophira lanceolata* (Ochanaceae). *Revista de Ciencias de la Vida* 2007; 4(4): 7579.

Comment [U14]: Todos los autores van ordenados en orden alfabético

14. Olufunmiso, Olajuyigbe, O. y Afolayan, Anthony, J. (2011). Contenido fenólico y propiedad antioxidante del extracto de corteza de *Ziziphus mucronata* silvestre. subsp. *Mucronata* salvaje, *BMC, Medicina complementaria y alternativa*. 11: 130.