



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Carrera de Biología

Laboratorio de Química Vegetal y Biotransformaciones

Concentración letal media (CL50), dosis letal media (DL50) y fitoquímica de los extractos de las hojas de *Bauhinia variegata* L.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

GARDUÑO ESCOBEDO ADAN

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. F. LEONORA SÁNCHEZ Y GARCIA-FIGUEROA

Ciudad de México, a 30 de abril del 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **GARDUÑO ESCOBEDO ADAN**, con número de cuenta **307147998**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **30 de abril de 2019** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

VOCAL Dra. FRANCISCA LEONORA SÁNCHEZ Y GARCÍA FIGUEROA

SECRETARIO Biól. JUAN ROMERO ARREDONDO

SUPLENTE M. en C. FLORENCIA CRUZ BECERRIL

SUPLENTE Dra. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ

El título de la tesis que presenta es: **Concentración letal media (CL50), dosis letal media (DL50) y fitoquímica de los extractos de las hojas de *Bauhinia variegata* L.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 29 de marzo de 2019

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la **Dra. F. Leonora Sánchez y García Figueroa**, en el **Laboratorio de Química Vegetal y Biotransformaciones** de la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM**.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la **Universidad Nacional Autónoma de México** la cual me abrió sus puertas para pertenecer a ella.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** y a la carrera de **Biología** por forjarme como profesionalista.

A la **Dra. F. Leonora Sánchez y García Figueroa** por aceptarme en su laboratorio, gracias por todo el apoyo, orientación y paciencia.

Al municipio de Olinalá, Guerrero por compartir sus conocimientos, la hospitalidad brindada y además del material para hacer posible este trabajo.

A mis sinodales por contribuir para que este trabajo mejorara.

A mi amigo Osvan Rojo por el apoyo y compañía en este camino.

A mis amigos de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza gracias por estar conmigo en este camino; en especial a Carlos, Adriana y Nacho.

A mis compañeros del “laboratorio de química vegetal y biotransformaciones”
Antonio, Luis, Paty, Karla, Frank, Viky, Ely

DEDICATORIAS

Este trabajo de tesis está dedicado a:

A mi padre **Alberto A. Garduño Nájera** y a mi madre **Andrea Guadalupe Escobedo Delgadillo** por sacarnos adelante con su amor, trabajo y esfuerzo, por alentarnos a ser mejores cada día, por los sacrificios que hicieron y hacen por nosotros, por su apoyo, aliciente e insistencia para que continuara estudiando, por hacerme una mejor persona y un profesionalista. Por todo esto y más los amo.

A mis hermanos **Rosario Garduño Escobedo** y **Ernesto Garduño Escobedo** por ser los mejores hermanos, por escucharme, apoyarme, estar para mí en su debido momento, por tantos años de felicidad los adoro.

A **Karen Daniela Hernández Gutiérrez** por estar conmigo este camino, por ser mi cómplice, por amarme como soy, por ser incondicional, por alentarme a seguir, por tener fe en mí, por aguantarme, por estar a mi lado.

A mi hijo **Elián Santiago Garduño Hernández** por ser mi motor, cambie mi vida, mi tiempo y mi forma de pensar por ti; le pido a la vida que me permita vivir muchos años para acompañarte.

A **Natalia Quetzaly** por darme su cariño y amor incondicional.

Natalia y Santiago quiero darles grandes alas para que puedan volar más alto que yo, no quiero que sean como yo, **quiero que sean mejores.**

A mis abuelitas **Guadalupe Nájera Castillo**† por todo tu amor y cariño, te extraño.

Josefina Delgadillo López por su amor y cariño, gracias por su apoyo.

A mi tía **Teresa Escobedo** por estar al pendiente y apoyarme ese tiempo.

A mi padrino **Everardo Gómez** Castro por todo el apoyo brindado.

A **Manuel Mendoza Coyac** por todos estos años de apoyo y consejos.

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1 Toxicidad.....	3
3.1.1 toxicología (OMS).....	3
3.1.2 Toxicidad aguda.....	4
3.1.3 Toxicidad subcrónica.....	5
3.1.4 Toxicidad crónica.....	6
3.2 CL ⁵⁰ (Concentración Letal Media).....	6
3.2.1 <i>Artemia salina</i>	6
3.2.2 Modelo probit.....	8
3.3 DL ⁵⁰ (Dosis Letal Media).....	9
3.3.1 Ratón CD-1.....	9
3.4 Genero <i>Bauhinia</i>	10
3.4.1 Fitoquímica del género <i>Bauhinia</i>	13
3.5 <i>Bauhinia variegata L.</i>	16
3.6 Método de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a masas.....	18
4. JUSTIFICACIÓN.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
5.1 Objetivos específicos.....	21
6. HIPÓTESIS.....	22
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
7.1 Etapa de gabinete.....	23
7.2 Etapa de campo.....	23
7.3 Etapa de laboratorio.....	23
8. RESULTADOS.....	35
9. DISCUSIÓN.....	56
10. CONCLUSIONES.....	60
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Artemia salina</i>	8
Figura 2. Ratón CD 1.....	9
Figura 3. Clave pictográfica para la identificación de especies del género <i>Bauhinia</i>	11
Figura 4. Hojas y flor de <i>Bauhinia variegata</i> de Olinalá.....	18
Figura 5. Espectrómetro de masas.....	19
Figura 6. Mapa de localización del municipio de Olinalá, Guerrero.....	23
Figura 7. Obtención del extracto metanólico.....	25
Figura 8. Método de extracción de proteínas.....	27
Figura 9. Obtención del extracto acuoso.....	28
Figura 10. Extractos obtenidos y su utilización.....	29
Figura 11. Obtención de las fracciones del extracto metanólico.....	30
Figura 12. Etapas de la evaluación de la CL ⁵⁰	32
Figura 13. Etapas de la evaluación de DL ⁵⁰	34
Figura 14. Reactivo Dragendorff.....	37
Figura 15. Reactivo Molisch.....	37
Figura 16. Reactivo Lieberman-Buchard.....	38
Figura 17. Reactivo Shinoda.....	38
Figura 18. Cromatograma del extracto hexánico de las hojas de <i>Bauhinia Variegata L</i>	44
Figura 19. Cromatograma del extracto metanólico de las hojas de <i>Bauhinia variegata L</i>	45
Figura 20. Cromatograma del extracto de acetato de etilo de las hojas de <i>Bauhinia variegata L</i>	45
Figura 21. Cromatograma del extracto butanólico de las hojas de <i>Bauhinia variegata L</i>	46
Figura 22. Estructura de la rutina.....	46
Figura 23. Espectro de masas de la rutina del extracto hexanico.....	47
Figura 24. Espectro de masas de la rutina del extracto de acetato de etilo.....	47

Figura 25. Espectro de masas de la rutina del extracto metanólico.....	47
Figura 26. Espectro de masas de la rutina del extracto butanólico.....	48
Figura 27. Estructura de la apigenina.....	48
Figura 28. Espectro de masas de la apigenina del extracto hexánico.....	49
Figura 29. Espectro de masas de la apigenina del extracto de acetato de etilo.....	49
Figura 30. Estructura del kaempferol.....	50
Figura 31. Espectro de masas del derivado de kaempferol en el extracto de hexano.....	50
Figura 32. Espectro de masas del derivado de kaempferol del extracto de Acetato de etilo.....	50
Figura 33. Espectro de masas del derivado de kaempferol del extracto de hexano.....	51
Figura 34. Espectro de masas del derivado de kaempferol del extracto de Acetato de etilo.....	51
Figura 35. Espectro de masas del derivado de kaempferol del extracto de metanol.....	51
Figura 36. Espectro de masas del derivado de kaempferol del extracto de butanol.....	52
Figura 37. Estructura de la quercetina.....	52
Figura 38. Espectro de masas del derivado de quercetina del extracto de Acetato de etilo.....	53
Figura 39. Espectro de masas del derivado de quercetina del extracto de butanol.....	53
Figura 40. Estructura del bauhinol.....	54
Figura 41. Espectro de masas del bauhinol del extracto de hexano.....	54
Figura 42. Espectro de masas del bauhinol del extracto de acetato de etilo.....	54
Figura 43. Espectro de masas del bauhinol del extracto de metanol.....	55

Índice de cuadros

Cuadro 1. Datos etnobotánicos del género <i>Bauhinia</i> (modificado de Cechinel, 2009).....	12
Cuadro 2. Metabolitos secundarios encontrados en el género <i>Bauhinia</i> . (Modificado de Rojo, 2016).....	14
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de <i>Bauhinia variegata</i>	17
Cuadro 4. Categorización para la determinación del grado de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	33
Cuadro 5. Extractos preparados con diferentes disolventes a partir del extracto metanólico inicial.....	35
Cuadro 6. Peso de las hojas utilizadas en la preparación de los extractos acuosos.....	36
Cuadro 7. Test utilizado para la determinación preliminar de fitoquímicos.....	36
Cuadro 8. Mortalidad de <i>Artemia salina</i> en diferentes concentraciones de los extractos.....	39
Cuadro 9. Valores obtenidos con el método probit y su categorización.....	40
Cuadro 10. Cantidad de muertes de CD1 para DL ⁵⁰ en machos.....	41
Cuadro 11. Cantidad de muertes de CD1 para DL ⁵⁰ en hembras.....	42
Cuadro 12. Compuestos identificados en cada extracto por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a masas.....	42

1. RESUMEN

En nuestro país *Bauhinia variegata* se utiliza como remedio para la enfermedad de la diabetes y se desconoce si tiene algún efecto adverso para el organismo.

El estudio de *Bauhinia variegata* L. se debe a que en el municipio de Olinalá, Guerrero, se usa de manera tradicional como remedio para esta enfermedad y no han hecho estudios sobre su toxicidad.

En este trabajo se realizó la evaluación de la toxicidad de los extractos de *Bauhinia variegata* L. por medio de la determinación de la concentración letal media (CL^{50}) en *Artemia salina* y la Dosis Letal media (DL^{50}) con ratones de la cepa CD1.

Obteniendo como resultados para la concentración letal media (CL^{50}) *Artemia salina* el extracto butanólico es extremadamente tóxico, mientras que los extractos hexánico, de hoja y acuoso son muy tóxicos y los extractos de proteínas, metanólico y acetato de etilo son moderadamente tóxicos.

Los extractos metanólico, butanólico, de acetato de etilo y la infusión de *Bauhinia variegata* para la prueba de DL^{50} no resultaron tóxicos.

Bauhinia variegata tiene actividad biológica de acuerdo a los resultados de CL^{50} sobre *Artemia salina*, pero no presenta toxicidad (DL^{50}) en ratones.

El flavonoide más abundante que se encuentra en las hojas de *B variegata* es la rutina.

2. INTRODUCCIÓN

En México, de acuerdo con cifras de la Secretaría de Salud, al menos el 90% de la población usa las plantas medicinales, de ese 90%, la mitad usa exclusivamente a las "yerbas" para atender sus problemas de salud el otro 50%, además de las hierbas medicinales usa la medicina alópata (Pérez, 2009).

En el mercado Sonora de la Ciudad de México se venden día con día aproximadamente unas 10 toneladas de plantas curativas. Se estima que la industria herbolaria de la ciudad procesa y comercializa unas 2000 toneladas mensuales. Si consideramos los demás mercados de todas las capitales estatales, los mercados regionales y las empresas naturistas de provincia se calcula que al menos se comercializan 3500 toneladas de plantas medicinales al mes en todo el país (Pérez, 2009).

La primer visita al municipio de Olinalá en el estado de Guerrero los habitantes mencionaron que las hojas de *Bauhinia variegata* son útiles para combatir la diabetes, el "dolor de estómago" y el "cansancio". Empíricamente las personas del lugar recomiendan tomarla en infusión durante 15 días y descansar un mes antes de volverla a tomar, ya que podría ser perjudicial para la salud.

En el laboratorio de química vegetal y biotransformaciones de la FES ZARAGOZA se encontró que *Bauhinia variegata* tiene actividad hipoglucemiante y disminuye los síntomas de la diabetes en ratones de la cepa CD-1.

Para este trabajo se evaluó la toxicidad de los extractos de las hojas de *Bauhinia variegata* a través de la determinación de la concentración letal media (CL^{50}) y la dosis letal media (DL^{50}). Se identificaron algunos de los compuestos presentes en el extracto metanólico y sus fracciones de hexano, acetato de etilo y butanol por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a masas (CLAP-Masas).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Toxicidad

La toxicidad es la capacidad de una sustancia de causar algún efecto nocivo sobre los organismos vivos. El que una sustancia sea tóxica depende de: la cantidad administrada o absorbida por el organismo, la vía de ingreso, la distribución a lo largo del tiempo después de su administración, la naturaleza y severidad del daño producido y el tiempo necesario para producir el efecto.

Un tóxico se define como el agente que puede producir un efecto adverso a través de un daño referido a la estructura y función del sistema orgánico. La cantidad del tóxico liberada debe superar un nivel umbral para que se manifieste el efecto, estableciéndose así la relación concentración/respuesta (Gámez & Ramírez 2008).

Para conocer la toxicidad de una sustancia, existen diferentes pruebas, dos de ellas son la concentración letal media (CL⁵⁰) y la dosis letal media (DL⁵⁰), la primera se emplea para conocer el daño a nivel celular en un organismo zoológico simple y la segunda se utiliza para conocer la cantidad de una sustancia en un organismo pequeño similar a un humano.

3.1.1 Organización Mundial de la Salud - toxicología

Desde Paracelsus (1493 - 1541) se conoce que la toxicidad es la dosis lo que diferencia un veneno de un remedio. Hoy sabemos que otros factores, como etapa da vida, edad, nutrición, enfermedades y exposiciones a los químicos, entre otros factores, también deben ser considerados.

La toxicología puede ser definida como la ciencia que se ocupa de los efectos adversos a la salud causados por agentes químicos, físicos o biológicos en los organismos vivientes. Los efectos adversos pueden variar desde muerte, cáncer e enfermedades hasta daños sutiles en el sistema nervoso que pueden resultar en la disminución de la inteligencia (Steven, 2012).

El cambio de paradigma en la toxicología implica en una transición de una ciencia 'in vivo' para estudiar parámetros como dosis letal para mitad de la población de animales en condiciones experimentales de laboratorio, para una ciencia 'in vitro' en la cual se estudia

los eventos y procesos clave de la molécula diana, respuestas celulares, hasta los efectos a la salud humana y del medio ambiente. Trabajamos para integrar esos diferentes tipos de conocimiento (Meek et al, 2014).

La Agencia Europea de Químicos, en su programa de registro, evaluación, autorización y restricción de químicos, estima circa de 100,000 sustancias químicas en uso, con discusiones sobre los métodos para evaluar toxicidad de 30% de esas.

Las capacitaciones de personal de salud y diálogos multisectoriales y con diferentes actores de interés son necesarias para desarrollar metodologías de evaluaciones y mitigaciones de riesgos químicos, basadas en guías disponibles por diferentes agencias.

Los efectos según la cantidad de sustancia que entra en el organismo, grafica lo que decía Paracelsus. (OMS)

3.1.2 Toxicidad aguda

La toxicidad aguda se investiga frecuentemente en ratas, donde el efecto tóxico cuantificable o parámetro, es la muerte. Una prueba de toxicidad aguda consiste en la exposición, en una sola ocasión, de varios grupos de animales a diferentes dosis de la sustancia a probar. Los animales se examinan diariamente, se registran los signos clínicos y los síntomas de toxicidad.

Los signos y síntomas pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de estos organismos, tales como muerte, cambios morfológicos, fisiológicos, entre otros. Estos efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras sub-celulares hasta organismos completos.

Los animales deberán ser observados para identificar los signos y síntomas, que incluyen, cambios en peso corporal, alimento consumido, cambios en color o textura del pelaje, dificultad respiratoria o cardiovascular, anormalidades conductuales o motoras, masas palpables, parálisis anterior, parálisis posterior, convulsión, cianosis, hipotermia irritabilidad y letargia (Guerrero, 2016).

Después de un intervalo de 14 días, se cuenta el número de animales muertos en cada grupo de dosis y en el grupo control, los resultados son analizados estadísticamente con respecto a la frecuencia de animales expuestos muertos como función de la dosis.

Los animales se examinan diariamente, se registran los síntomas y conductas observados. Después de un intervalo de 14 días, se cuenta el número de animales muertos en cada grupo de dosis y en el grupo control, los resultados son analizados estadísticamente con respecto a la frecuencia de animales expuestos muertos como función de la dosis (Roldan, 2016).

3.1.3 Toxicidad subcrónica

A diferencia del tiempo de exposición en las pruebas de toxicidad aguda, las de toxicidad subcrónica implican dosis repetidas del compuesto químico a probar, normalmente se administra por un periodo de aproximadamente 90 días. El objetivo de este tipo de pruebas es investigar la toxicidad en órganos, obtenida de los datos de dosis - efecto con los cuales se diseñan las pruebas de toxicidad crónica. Se prueban al menos tres dosis: la dosis alta seleccionada que causa mortalidad en un 10% o menos; la dosis baja seleccionada no produce efectos tóxicos; una o más dosis intermedias; y un grupo control que no se expone al químico a probar. Se deben utilizar dos especies, por ejemplo, ratas y perros (grupos pequeños de 10 a 20 ratas y de 2 a 4 perros). Además, generalmente se aplican pruebas por separado en machos y hembras, porque el género puede afectar la vía de respuesta del cuerpo al químico tóxico.

Se observa cuidadosamente a los animales expuestos y se registran los signos y síntomas de toxicidad. Se colectan muestras de sangre y se analizan durante intervalos regulares. Al final de los 90 días, todos los animales sobrevivientes se sacrifican y observan para estudios *post mortem*, que incluye exámenes al microscopio de órganos y tejidos para caracterizar las patologías asociadas con la exposición al químico de prueba.

3.1.4 Toxicidad crónica

La toxicidad "crónica" implica la exposición al tóxico durante más de 3 meses, pudiendo llegar a varios años, en los cuales ordinariamente no se aprecian signos de enfermedad durante un período prolongado.

3.2 Concentración Letal media (CL⁵⁰)

La toxicidad *in vivo* de un organismo animal puede usarse como método para el seguimiento y fraccionamiento de extractos en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos. Uno de los modelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad en *Artemia salina*, desarrollada en 1982 por Meyer y colaboradores. El procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a los nauplios de *Artemia salina* (figura 1), para determinar valores de concentración letal media (CL⁵⁰) expresada en µg/ mL (Martínez, Ocampo, Galvis, & Valencia, 2011). Los valores obtenidos de CL⁵⁰, no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas.

Artemia salina es un organismo fácil de cultivar y manipular en laboratorio, es sensible a una gran variedad de tóxicos y genera resultados confiables es una alternativa poco costosa, sencilla y rápida. Puede ser usada de manera rutinaria en la investigación fitoquímica y permite crear una base para adelantar posteriores estudios, que brinden aplicaciones (Betancurt, Barrer y palacios 2016).

3.2.1 *Artemia salina*

Artemia spp es un camarón de cuerpo blando, de color anaranjado y transparente a la luz; pertenece al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda (figura 1). Se conocen comúnmente por el nombre de Artemia, también llamados "monos de mar" o "brine shrimp" en inglés. El género *Artemia* está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cinco bisexuales y varias poblaciones partenogénicas, entre ellas *Artemia salina* Leach, *Artemia persimilis* Piccinelli y Prosdocimi, *Artemia franciscana* Kellogg (bisexuales) y *Artemia partenogénica*. Estas especies se encuentran

distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y son fuente de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados. Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. La *Artemia* se convierte en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7 mm. La disponibilidad permanente de huevos (quistes) a partir de los cuales pueden ser obtenidas las larvas ofrece las siguientes ventajas:

- no hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente,
- las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario,
- se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica.

El ensayo de *Artemia salina* tiene las ventajas de ser rápido (24 horas), barato y sencillo (no se requieren técnicas asépticas). Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras (2-20mg). Además, no se requiere suero animal, que si es necesario para las citotoxicidades. Este sistema de bioensayo puede ser utilizado fácilmente por farmacólogos y químicos de productos naturales; cada técnico de laboratorio conduce sus propias pruebas biológicas, y obtiene de una manera rápida y reproducible los resultados estadísticos confiables del bioensayo. De esta manera, los compuestos bioactivos novedosos se pueden detectar y aislar rápidamente mediante un fraccionamiento biodirigido de los extractos de las plantas. Por último, los defensores de los derechos de los animales no han objetado el uso de estos invertebrados para el trabajo experimental (Pino Pérez y Jorge Lazo, 2010).

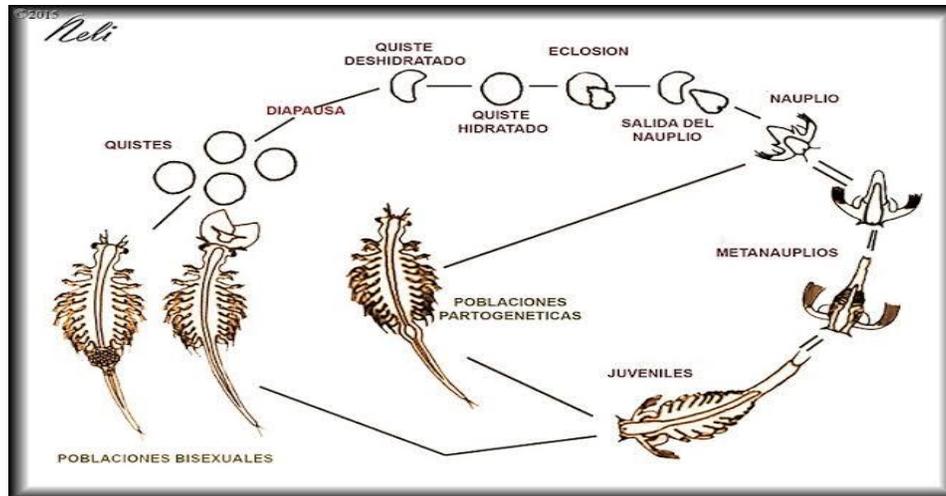


Figura 1. Ciclo de vida de *Artemia salina*

La CL^{50} es la concentración de tóxico en el medio, necesaria para causar la muerte del 50% de la población de estudio en un tiempo determinado, generalmente se utiliza un organismo zoológico simple, como larvas de *Artemia salina*.

La CL^{50} se ha utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos, para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales y para descubrir compuestos con actividad biológica.

La concentración letal media es un parámetro que se suele utilizar para exposiciones cortas y por tanto suele emplear concentraciones relativamente altas de tóxico. El cálculo de la concentración de extracto que provoca la muerte de 50 % de los organismos (CL^{50}) y su intervalo de confianza de 95 % se efectúa por medio del método estadístico probit.

3.2.2 Modelo probit

El método probit es un tipo particular de regresión lineal que se construye para conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración de tóxico) y una variable dependiente (respuesta=mortalidad) para una especie y un tiempo de exposición al tóxico (normalmente 48 o 96 horas). Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transforma a unidades probit (eje Y) y la concentración de tóxico se transforma logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual

podemos interpolar el 50% de la respuesta y conocer que concentración de tóxico causa esa respuesta (CL^{50}) (Alonso, 2013).

3.3 Dosis Letal media (DL^{50})

La dosis letal media, o DL^{50} , se utiliza con frecuencia como una medida de la toxicidad aguda de un compuesto en una especie dada de animal de laboratorio (Finney, 1978).

La dosis letal media hace referencia a aquella dosis de una sustancia dada que causa la muerte del 50 % de los animales de prueba. La DL^{50} es un valor virtual obtenido estadísticamente. Se trata de un valor calculado que representa la mejor estimación de la dosis requerida para producir la muerte en el 50% de los animales y por lo tanto, siempre va acompañada de algunos tipos de estimación del error del valor hallado, tal como su intervalo de confianza, los límites del intervalo de confianza se escogen arbitrariamente para indicar que se obtendrán resultados similares en el 90 o 95 por ciento de los ensayos llevados a cabo en este trabajo se utilizó el método logarítmico de probit (Roldan, 2016).

Los animales utilizados para este trabajo fueron ratones CD-1 (Figura 2), ya que es el modelo utilizado en estudio previo en el laboratorio.

3.3.1 ratón CD-1

REINO: Animal

PHYLUM: Chordata

SUBPHYLUM: Vertebrata

CLASE: Mammalia

ORDEN: Rodentia

FAMILIA: Muridae

GÉNERO: *Mus Rattus*

ESPECIE: *Mus musculus* (Linneo, 1758)



Figura 2. Ratón CD 1

Más del 90% de los mamíferos utilizados en investigación científica pertenecen al orden Rodentia. La cría de ratones ha conducido a una gran diversidad de variedades genéticas

en los últimos años cada una con una utilidad en la investigación. La variedad CD-1 de estos ratones tiene características particulares que hacen de este ratón apto para el manejo de laboratorio ya que tamaño y su comportamiento dócil es una ventaja para el manejo del mismo. En cuanto a su capacidad reproductiva es muy buena con una gestación de 21 días y con un número de crías en promedio de 15 (Instituto Vital Brasil). La finalidad de estos ratones en el ámbito investigativo se hace en áreas como oncología, vacunación, teratología, embriología, nutrición, toxicidad, reproducción y otros. Los cuidados necesarios para estos ratones son básicos para cualquier especie. El cambio de agua, comida, cama, caja de alojamiento diariamente es una de las labores que debe cumplir el operario encargado del bioterio, así mismo el lavado de todo este material es necesario para tener la certeza de que los ratones no se van a contagiar con una enfermedad de tipo infecciosa (Rivera, 2015)

En el laboratorio de química vegetal de la FES ZARAGOZA se encontró que las hojas *Bauhinia variegata* de México tiene actividad hipoglucemiante, mencionando que en las proteínas aisladas de *Bauhinia variegata* L. existen proteínas vegetales llamadas glucoquininas y tienen una secuencia genética inicial parecida a la insulina bovina (Cechinel Filho, Massignani, Lemos, Maistro, Schaphauser, & Mohan 2009). Por consiguiente se extrajeron las proteínas y se utilizaron para conocer su toxicidad mediante la CL⁵⁰.

3.4 Género Bauhinia

El género Bauhinia es pantropical con cerca de 50 especies en México y Centroamérica, varias de ellas endémicas, sus especies se reconocen con facilidad de los otros géneros de la familia Caesalpinioide por sus hojas enteras bilobadas o bifoliadas, generalmente las flores tiene el cáliz espataceo y los pétalos unguiculados de color blanco sus hojas enteras bilobadas o bifoliadas, generalmente las flores tiene el cáliz espataceo y los pétalos unguiculados de color blanco, rojo, violeta, verde, amarillo y rosado (figura 3).

Este género consiste aproximadamente de 300 especies que son comúnmente conocidas como árbol orquídea, pata de vaca o casco de vaca debido a que la forma de sus hojas semeja la pisada de una vaca. Se distribuye ampliamente en los países tropicales y sus hojas y corteza son usados frecuentemente en la medicina tradicional como remedio para diferentes tipos de patologías, particularmente diabetes, infecciones, dolor y procesos inflamatorios (Cechinel Filho, 2000).

El género *Bauhinia* tiene un importante potencial ornamental por lo atractivo de sus flores y también se les atribuyen propiedades medicinales (Torres-Colín, Duno de Stefano & Lorena Can, 2009).

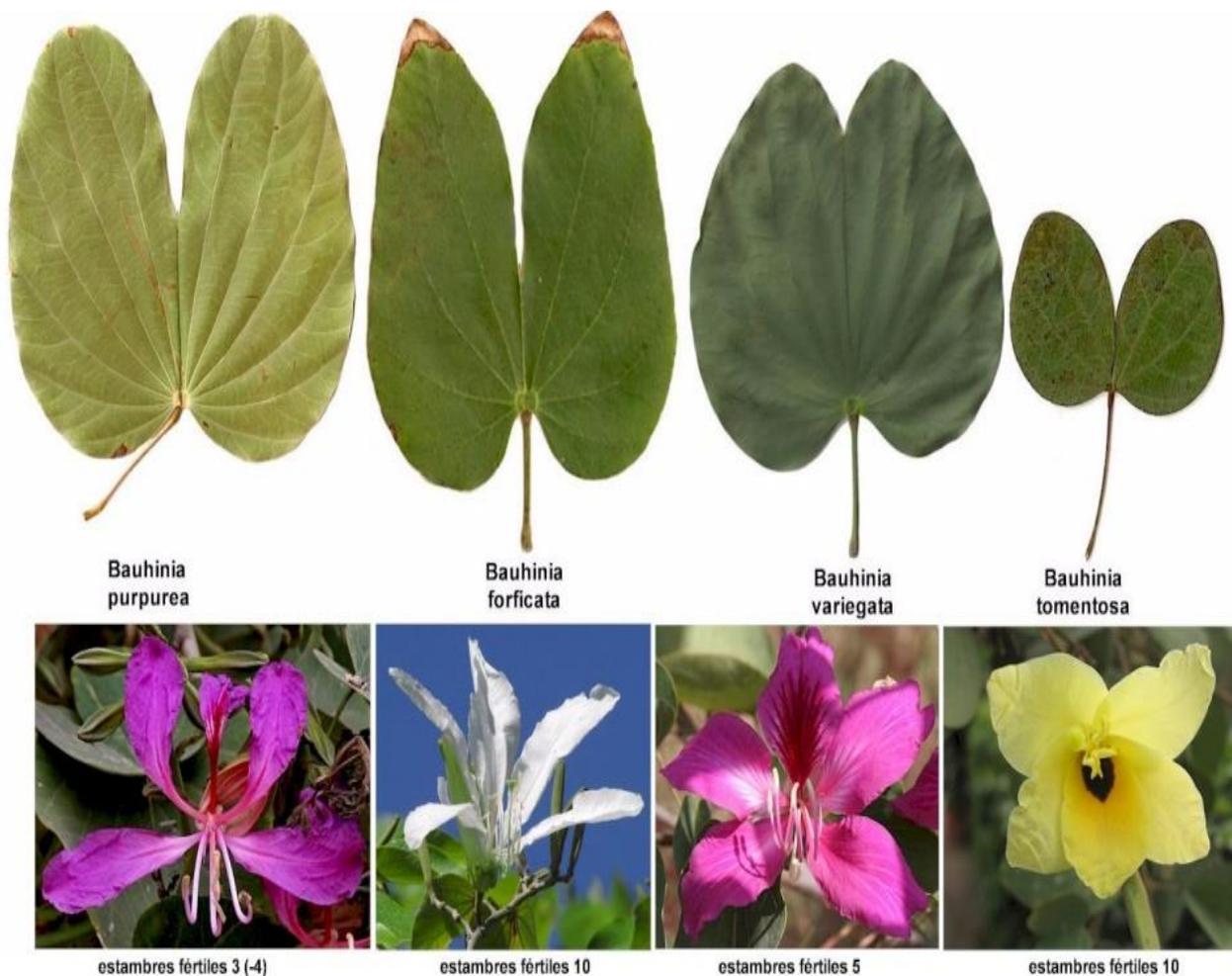


Figura 3. Clave pictográfica para la identificación de especies del género *Bauhinia*

En el cuadro 1 se reportan propiedades terapéuticas de Bauhinia, indicando la presencia de flavonoides (Da Silva & Cechinel, 2002).

Cuadro 1. Datos etnobotánicos del género Bauhinia (modificado de Cechinel et al, 2009)

Bauhinia	Propiedad biológica	Principio activo	Parte de la planta	País	Referencias
Variegata	Anti-protozoario	nd	Desconocido	India	Aswal et al., 1984
Variegata	Anti-tumoral	Flavonoides	Tallos	India	Raj Kapoor, Jayakar, Muruges, & Sakthisekaran, 2006
Variegata	Anti -úlceras	nd	Tallos	India	Raj Kapoor et al., 2006
Variegata	Hepatoprotector	nd	Raíz	Brasil	Macedo et al., 2007
Variegata	Citotóxico	nd	Tallos	India	Raj Kapoor et al., 2006
Variegata	Quimioprotectivo	nd	Tallos	India	Bodakhe & Ram, 2007
Variegata	ni	Alcaloide	Aéreas	China	Zhao, Cui, Cai, Han & Sun, 2005.
Forficata	Anticoagulante	nd	Aéreas	Brasil	Oliveira et al., 2005
Forficata	Antioxidante	Flavonoides	Hojas	Brasil	De Sousa et al., 2004
Forficata	Colesterol	Flavonoides	Hojas	ni	Lino et al., 2004
Forficata	Anti leucémico	Amina	Hojas	China	Lim et al., 2006
Ungulata	ni	Alcaloide	nd	ni	Iribarren and Pomilio, 1983
Ungulata	ni	Alcaloide	nd	ni	Maia, 2007
Purpurea	Citotóxico	Dibenzoxepina	Hojas	India	Pettit, Numata, Iwamoto, Usami, Yamada, Ohishi, & Cragg, 2006
Malabárica	Antimalarial	Componentes tetraciclados	Raíz	India	Kittakoop et al., 2000

Scandens	Antitumoral	Glicerol	Hojas	ni	Hazra and Chatterjee, 2008
----------	-------------	----------	-------	----	----------------------------

nd: no determinado; ni: no informado

La especie más estudiada del género es la *Bauhinia forficata* de la cual se reportó que el extracto etanólico de hojas no logró disminuir los niveles de glucosa en ratas diabéticas inducidos con estreptozocina (Pepato, Baviera, Vendramini & Brunetti, 2004) pero después de un mes de administración de una decocción acuosa de hojas frescas en ratas diabéticas, estas mostraron una disminución de glucosa en la orina en comparación al grupo control (Román, Alarcón, Lara & Flores, 1992).



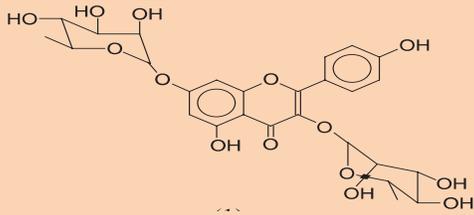
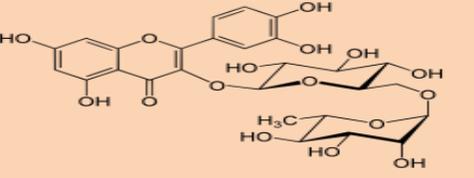
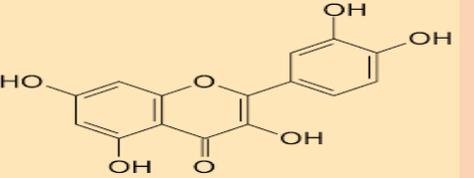
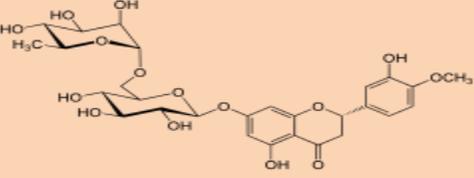
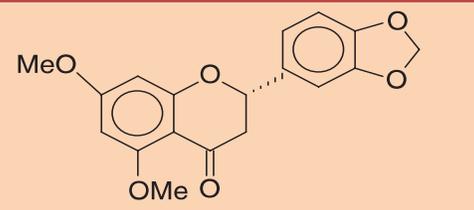
Figura. 4 Obtención de las hojas de árbol de Olinalá, Guerrero.

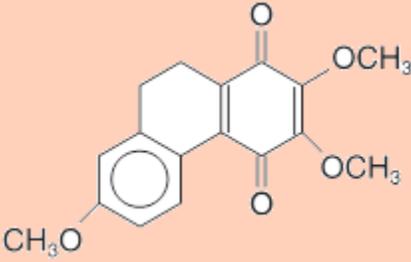
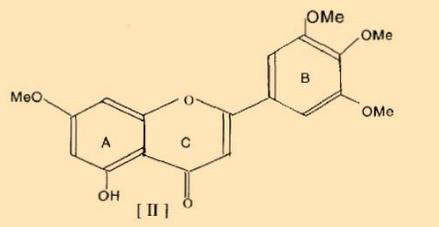
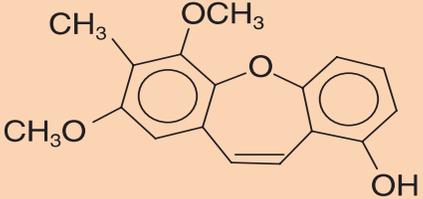
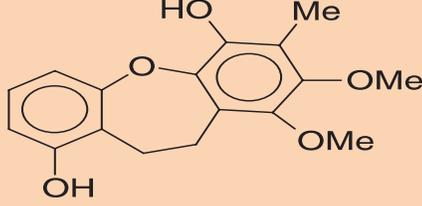
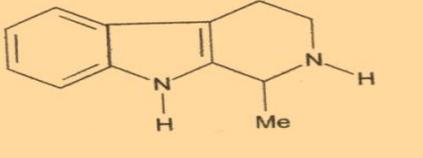
3.4.1 FITOQUÍMICA DEL GÉNERO *Bauhinia*

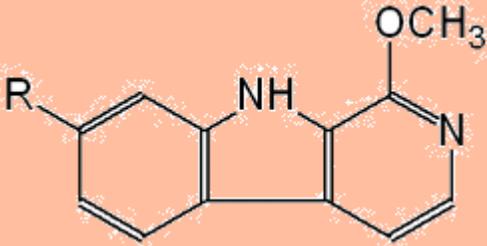
Los estudios fitoquímicos realizados en *Bauhinia* muestran una predominancia de terpenoides, taninos, saponinas, azúcares reductores, glucósidos cardíacos, esteroides, alcaloides y flavonoides (Da Silva & Cechinel, 2002) y Al-Snafi & Ali Esmail (2013) comprobó su actividad biológica en diferentes modelos experimentales con *B. variegata* y *B. forficata*, que son las especies más estudiadas.

Pizzolatti, Cunha Jr., Szpoganicz, Sousa, Braz-Filho & Schripsema, (2003) aislaron varios flavonoides de extractos de hojas de *B. forficata* incluyendo kaempferol y otros cuatro flavonoides glucósidos identificados como kaempferinas (cuadro 2).

Cuadro 2. Metabolitos secundarios encontrados en el género *Bauhinia*. (Modificado de Rojo, 2016)

Nombre del compuesto y peso molecular	Estructura química	Especie	Órgano de la planta	Referencia
Kaempferitrina 286.2 g/mol		<i>B. forficata</i>	Hojas	Pizzolatti et al. (2003)
Rutina 610.5 g/mol		<i>B. splendens</i>	Hojas o tallo	Cechinel (2000)
Quercetina 302.2 g/mol		<i>B. splendens</i>	Hojas o tallo	Cechinel (2000)
Hesperidina 610.6 g/mol		<i>B. variegata</i>	Partes aéreas	Rao, Fang & Tzen (2008)
(2S)-5,7dimetoxi-3',4'metilenflavanona 328 g/mol		<i>B. variegata</i>	Corteza de raíz	Reddy, Reddy, Gunasekar, caux & Bodo (2003)

2,7-dimetoxi-3-metil-9,10-dihidrofenantren-1,4- diona		<i>B. variegata</i>	Tallo	Zhao et al. (2005)
5-hydroxi 7,3',4',5'-tetrametoxiflavona		<i>B. variegata</i>	Semillas	Yadava & Reddy (2001)
Bauhiniastatina 4-hidroxi-8,10-dimetoxi-9-metildibenzoxepina 286 g/mol		<i>B. purpurea</i>	Tallo	Pettit et al. (2006)
5,6-dihidro-1,7-dihidroxi-3,4-dimetoxi-2-metildibenzoxepina 302 g/mol		<i>B. variegata</i>	Corteza de raíz	Reddy et al. (2003)
Eleagnina		<i>B. unguolata</i>	Hojas	Maia et al. (2008)

Harmano 182.2 g/mol		<i>B.</i> <i>ungulata</i>	Hojas	Maia et al. (2008)
------------------------	---	------------------------------	-------	-----------------------

Martínez et al., (2011) en Cuba encontró actividad citotóxica y antibacteriana en los extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. En Colombia encontraron actividad antibacterial, que el extracto probado en *Artemia salina* no es tóxico e indican el potencial de compuestos fenólicos de la planta y su posible uso como agente antibacteriano (Betancurt, et al 2016), en la India (Raj Kapoor et al., 2006) muestra un importante efecto quimiopreventivo y citotóxico de *Bauhinia variegata* contra tumores hepáticos y líneas celulares de cáncer.

En México no se han realizado estudios que documenten la toxicidad de *Bauhinia variegata* como la CL^{50} y la DL^{50} y es importante conocer el grado de toxicidad de esta planta de uso terapéutico, ya que al ser utilizada como remedio para la diabetes y otros malestares, se debe saber que cantidad puede ser suministrada sin provocar algún daño.

3.5 *Bauhinia variegata* L

Bauhinia variegata L, (figura 4) conocida como pata de vaca o árbol de orquídeas, es un árbol caducifolio que crece en lugares soleados y cálidos. El fruto es una vaina de 20 a 30 cm de longitud que contiene varias semillas (Rzedowski, 2001) la clasificación se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *Bauhinia variegata*

REINO	Plantae
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Fabales
FAMILIA	Caesalpiaceae
GÉNERO	Bauhinia
ESPECIE	<i>Bauhinia variegata</i>

Los estudios farmacológicos mostraron que *Bauhinia variegata* tiene efectos anticancerígenos, antioxidantes, hipolipidémicos, antimicrobianos, antiinflamatorios, nefroprotectores, hepatoprotectores, antiúlcerosos, inmunomoduladores, molusquicidas y cicatrizantes. (Ali Esmail Al-Snafi, 2013).

En Brasil, las hojas se usan como tratamiento tradicional para la diabetes (Azevedo et al., 2006); En la India su corteza se emplea para la gota, diabetes, disentería, diarrea, dolor, procesos inflamatorios y presenta actividad antitumoral (Parekh, & Chanda, 2007). En China la decocción de la raíz se usa como antídoto para mordeduras de serpientes (Gupta, Vidyapati & Chauhan 1980) y se ha encontrado actividad antibacterial de los extractos metanólicos en *Bacillus cereus*, *Staphilococcus*, *Epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* (Parekh & Chanda, 2007).



Figura 4. Hojas y flor de *Bauhinia variegata* de Olinalá

3.6 Cromatografía de Líquidos de alta resolución acoplado a masas (CLAP-MASAS)

La cromatografía de líquidos de alta eficacia es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones son la sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, es ideal para la separación de especies químicas no volátiles o termolábiles y por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria. Algunos ejemplos son: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y gran variedad de sustancias inorgánicas. La fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es una columna que puede ser de acero inoxidable.

Para distinguir estos procedimientos más nuevos de los métodos básicos, que todavía se utilizan con fines preparativos, se emplea la denominación de cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) o high pressure liquid chromatography (HPLC).

Cuando se realiza una cromatografía de líquidos acoplada al espectrómetro de masas (CLAP-MS) se aumenta la precisión de los resultados. Porque al unir las dos técnicas se combina el poder de separación de los materiales de alto peso molecular de la cromatografía de líquidos y la capacidad de detección de cada uno de los compuestos con

la confirmación de la identidad molecular que realiza el espectrómetro de masas (Figura 5).

La LC-MS utiliza un sistema HPLC pero en el punto en el que las fases móviles de líquidos abandonan la columna, la muestra líquida es rociada para producir microgotas. Estas se evaporan rápidamente, liberando moléculas de analito ionizadas que a continuación, pueden separarse en el espectrómetro de gases.

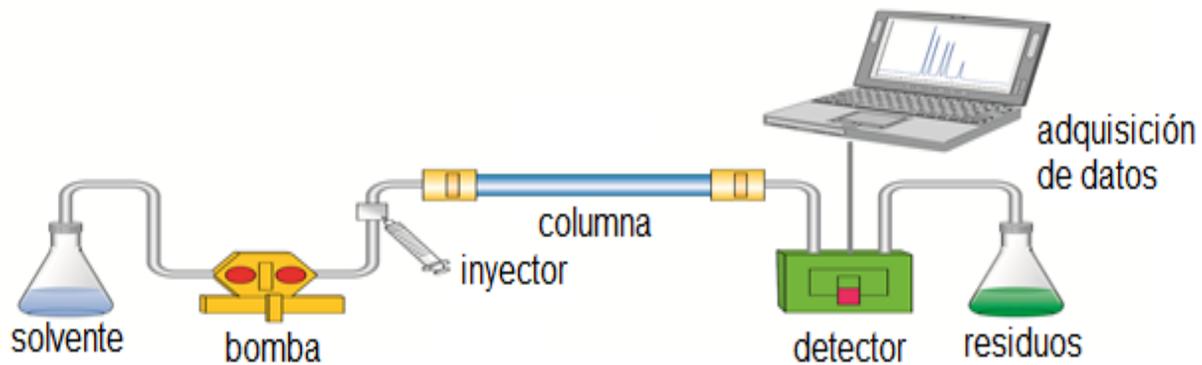


Figura 5. Espectrómetro de masas

4. JUSTIFICACIÓN

La actividad antidiabética reportada para *Bauhinia variegata* en México indica una disminución de síntomas y glucemia de los ratones machos y hembras de la cepa CD-1 (Rojo, 2016). Además, en el municipio de Olinalá Guerrero, los habitantes utilizan las hojas empíricamente para controlar “cansancio, diabetes y dolor estomacal”. Al ser utilizada como remedio para esta enfermedad y otros malestares, se debe conocer que cantidad puede ser suministrada sin tener algún daño para la salud.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad de las hojas de *Bauhinia variegata* por medio de la determinación de parámetros como la concentración letal media (CL^{50}) y la dosis letal media (DL^{50}).

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la concentración letal media (CL^{50}) de las fracciones metanólica, hexánica, acetato de etilo, butanol, proteínas, y acuoso de hojas de *Bauhinia variegata* utilizando como organismo de ensayo *Artemia salina*.

Evaluar la dosis letal media (DL^{50}) de la infusión y los extractos butanólico y metanólico de las hojas de *Bauhinia variegata* en ratones hembras y machos de la cepa CD-1.

Realizar un estudio fitoquímico del extracto metanólico y sus fracciones por el método CLAP-masas.

6. HIPÓTESIS

Bauhinia variegata tiene una cierta toxicidad cuando se ingiere sin interrupción. Al realizar los ensayos de CL^{50} y DL^{50} se conocerá el nivel de toxicidad.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Etapa de gabinete.

Revisión bibliográfica utilizando bases de datos y revistas científicas.

7.2 Etapa de campo.

Recolecta de hojas de *Bauhinia variegata* en la localidad de Zacango municipio de Olinalá en el estado de Guerrero (figura 6) ubicada a 1540 msnm, en las coordenadas 17° 47' 45'' W y 98° 46' 43'' N. y se determinó usando claves taxonómicas y pictográficas.

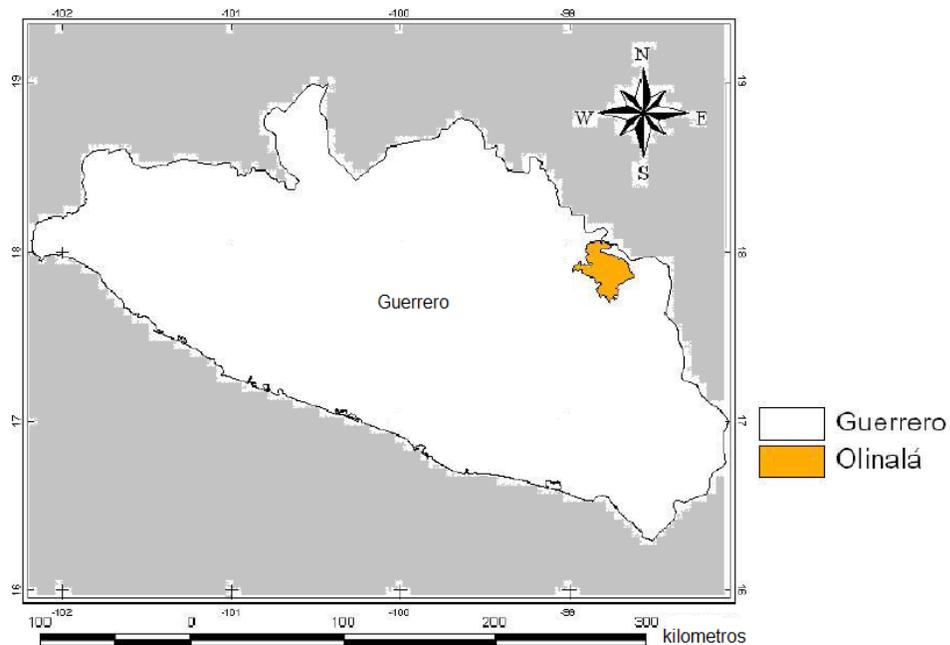


Figura 6. Mapa de localización del municipio de Olinalá, Guerrero.

Obtenido de Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009).

7.3 Etapa de laboratorio.

Obtención del extracto metanólico y fracciones de las hojas *Bauhinia variegata*: las hojas se limpiaron y se secaron en una estufa para después molerlas en un molino de aspas. Se maceraron con metanol por espacio de 1 semana con cambio de disolvente cada 2 días hasta que se extrajera la totalidad de la clorofila para una extracción exhaustiva. Se

fraccionó el extracto metanólico para obtener las fracción hexánica, de acetato de etilo y la butanólica. Los extractos se concentraron a presión reducida usando un rotavapor marca Büchi R11 y se calculó el rendimiento de cada uno de los extractos usando la siguiente formula:

$$R = (\text{masa del extracto} / \text{masa de las hojas secas}) \times 100$$

Dónde:

R: Rendimiento porcentual

Masa del extracto: cantidad de extracto obtenido en gramos

Masa de las hojas secas: cantidad de hojas maceradas en gramos.

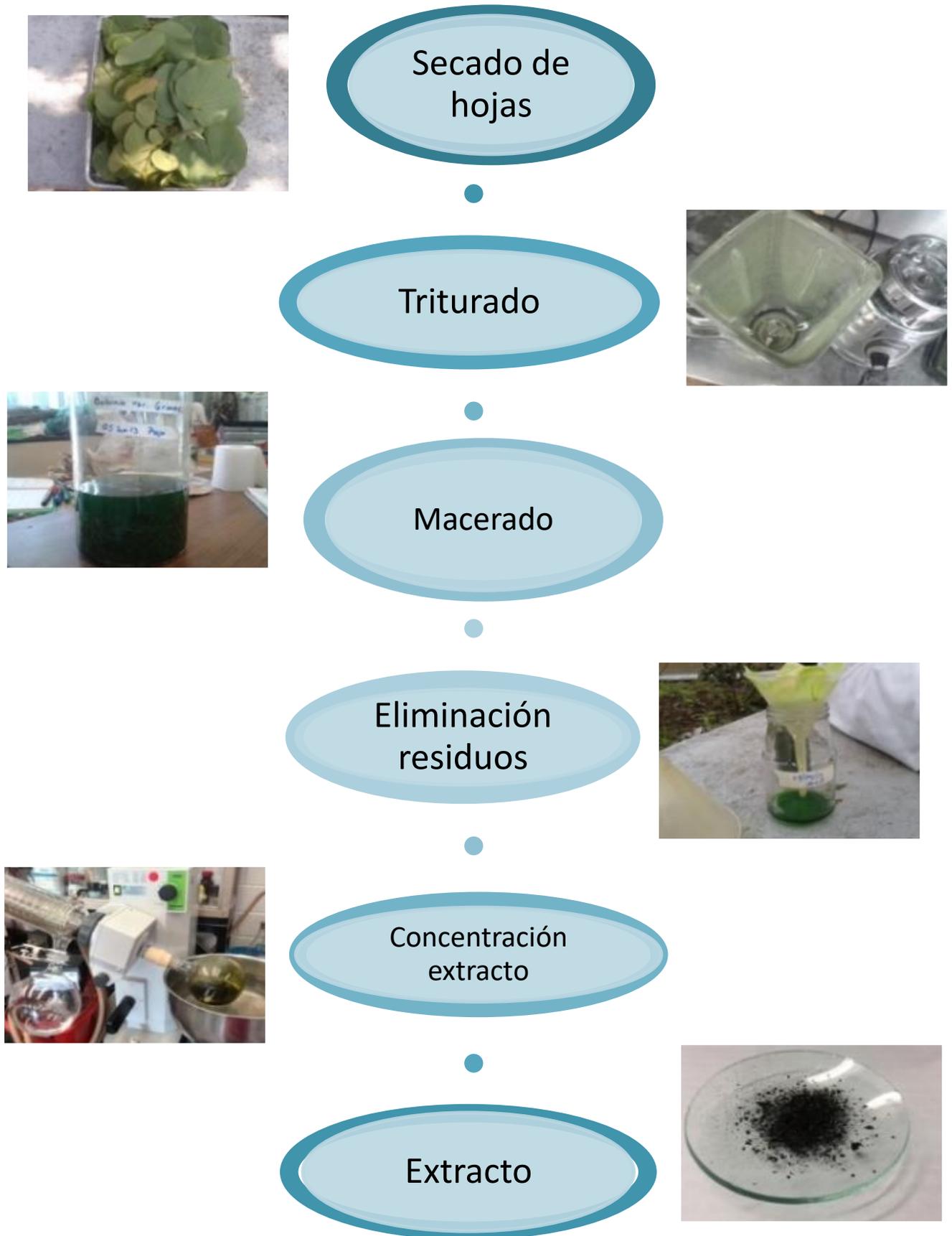


Figura 7. Proceso de obtención del extracto metanólico

Obtención extracto metanólico

Las hojas de *Bauhinia variegata* se secan en una estufa a 60°C, se molieron en un molino de aspas; 180 g de las hojas se extrajeron con dos litros de metanol, como disolvente a temperatura ambiente durante una semana, cambiando el disolvente cada dos días, el extracto obtenido se filtró para separar el material vegetal del macerado y se eliminó el disolvente a presión reducida en rotavapor (figura 7).

Obtención de proteínas de *Bauhinia variegata* por el método de Khanna

A 100 gramos de hojas se les agregó 10 mL de agua, 45 mL de etanol y 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado, con agitación por 20 minutos. Añadiendo 60 mL de agua y 250 mL etanol con agitación. Ajustando el pH a 1.7 y se filtró. El filtrado se ajustó a pH 3 con un potenciómetro y se añadió 1.5 litros de etanol más 2 litros de éter. Refrigerando por 24 horas, después de este lapso se recuperó el precipitado y se lavó con 27 mL de acetona y 9 mL de éter y manteniéndolo en refrigeración hasta su uso (Khanna et al, 1976). Se calculó el rendimiento del extracto usando la fórmula antes mencionada (figura 8).

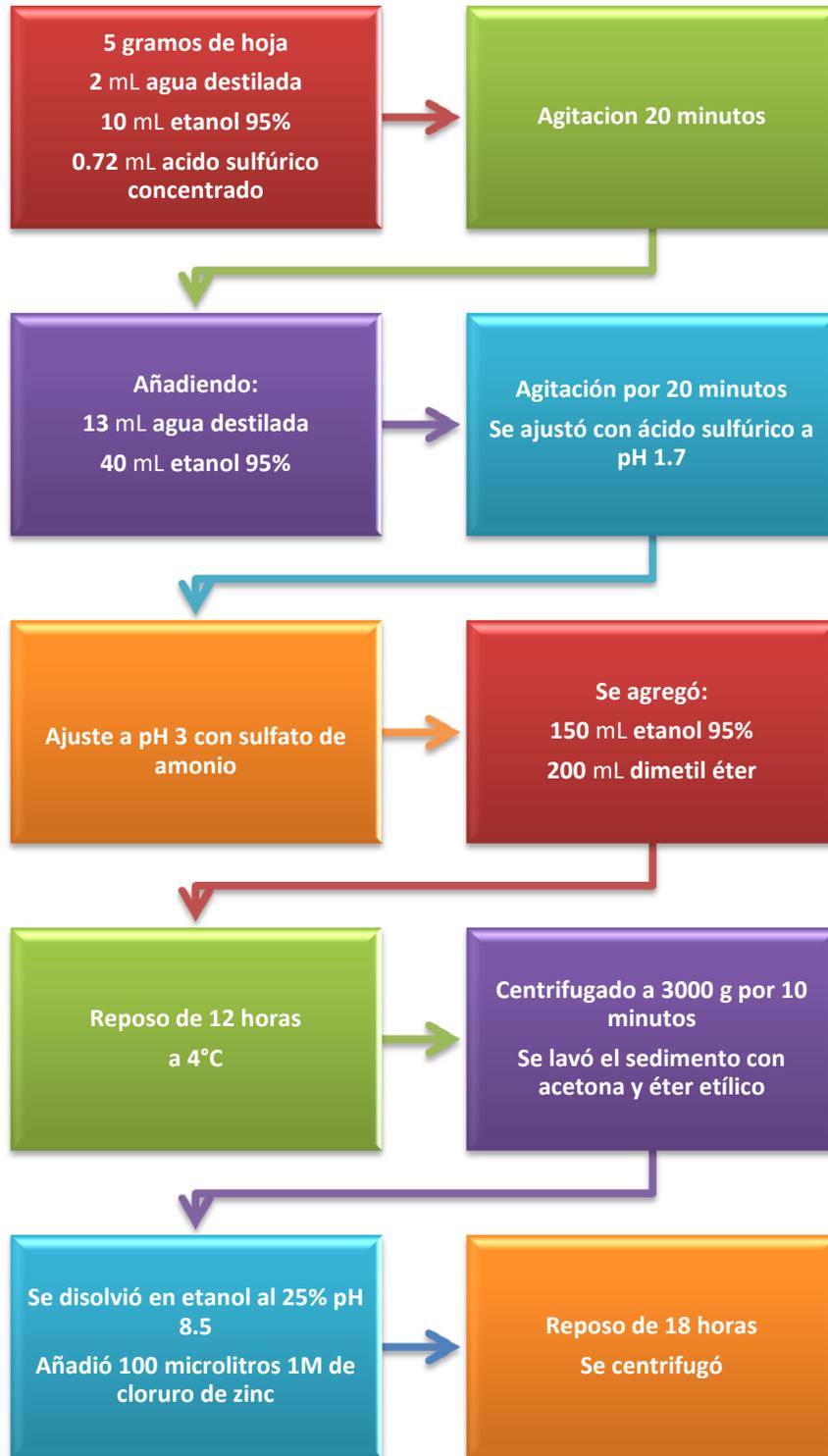


Figura 8. Método de extracción de proteínas

Obtención del extracto acuoso de *Bauhinia variegata*.

Se secaron las hojas en una estufa a 60°C, moliendo en un molino de aspas marca Osterizer. Calentando a ebullición y se agregó 10g de hojas molidas, después de 15 minutos, se filtró y eliminó los restos sólidos (figura 9).



Figura 9. Obtención del extracto acuoso

El extracto acuoso se utilizó para realizar las pruebas de toxicidad en *Artemia salina* (CL⁵⁰) y en la detección de la dosis letal media (DL⁵⁰).

Se fraccionó el extracto metanólico (figura 11) con hexano, acetato de etilo y butanol. Cada uno de estos extractos se utilizó para las pruebas de toxicidad y de cromatografía de líquidos-masas, como se observa en la figura 10.

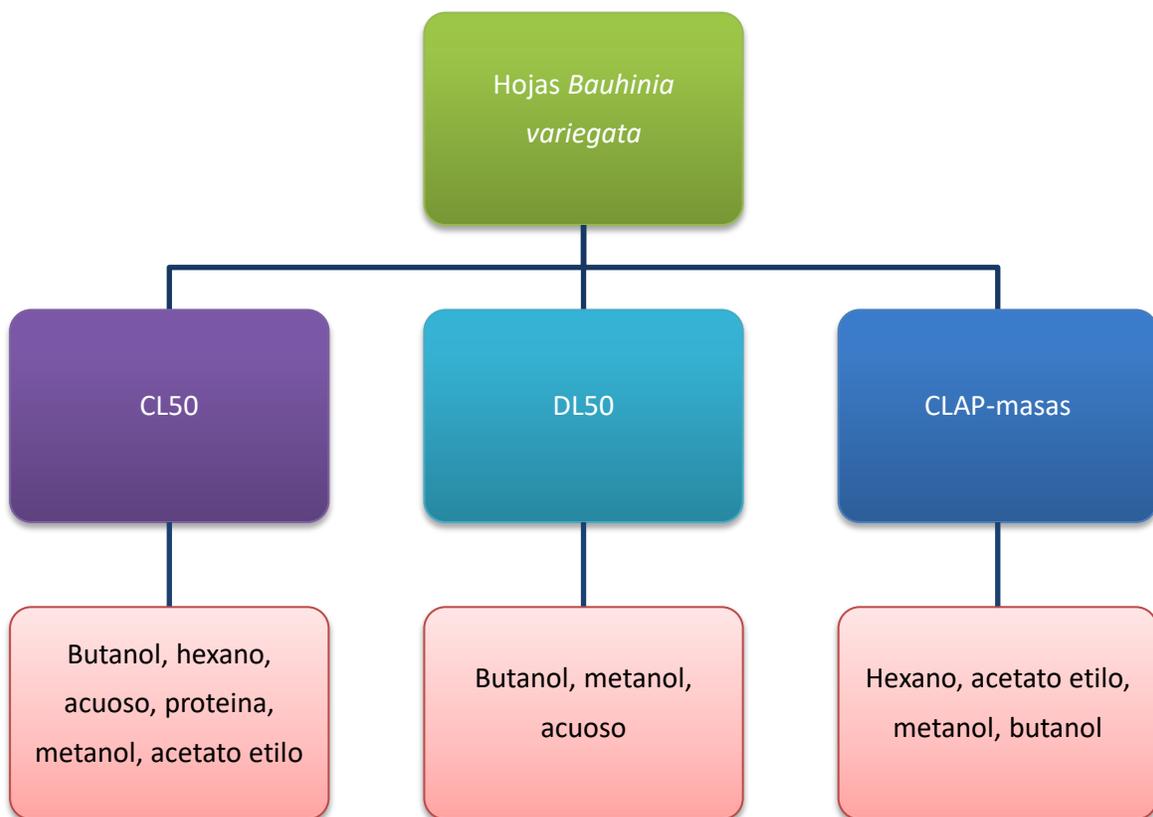


Figura 10. Extractos obtenidos y su utilización.



Figura 11. Obtención de las fracciones del extracto metanólico

Tamizaje fitoquímico

Reconocimiento de alcaloides

Se preparó el reactivo de Dragendorff modificado por Munier y Machelbuf que consiste en dos soluciones:

SOLUCIÓN A: nitrato de bismuto, en una mezcla de ácido acético glacial y agua; SOLUCIÓN B: Disolver yoduro de potasio en agua, considerando positivo si presentan precipitados color marrón.

Reconocimiento de flavonoides

Reactivo Shinoda preparado con limadura de magnesio añadido al extracto y ácido clorhídrico (HCL) concentrado, este último añadido en pequeñas cantidades por las paredes del recipiente que contiene el extracto con la limadura; una coloración roja o rosa se considera positiva a flavonoides. Carmesí o purpura indica flavonas.

Reconocimiento de terpenos

El reactivo de Lieberman-Buchard para la detección de terpenos y esteroides se preparó con una mezcla de Cloroformo, anhídrido acético, ácido sulfúrico HSO₄, al agregar esta mezcla si la coloración es rojiza-anaranjada indica terpenos; pero si la coloración es azulada-verdosa indica la presencia de esteroides.

Reconocimiento de glucósidos

El reactivo de Molish se preparó para el reconocimiento de carbohidratos al extracto se colocó el naftol y cuidadosamente por las paredes del recipiente se agregó el ácido sulfúrico concentrado. La reacción debe dar una coloración rojiza violeta para positivo. (Domínguez, 1973)

Concentración letal media (CL⁵⁰)

Se utilizaron nauplios de *Artemia salina*. Formando grupos al azar de 10 nauplios por vial, con concentraciones de 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 µg/ mL (por triplicado), para cada uno de los extractos (figura 12).

Se determinó la mortalidad de las larvas de *Artemia salina*, mediante un conteo de organismos vivos y muertos. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Versión 20 para la prueba probit.



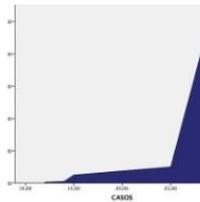
Incubación de
Artemia salina

Nauplios en
viales



Dosis única

Cuantificación



Análisis probit

Figura 12. Etapas de la evaluación de la CL^{50}

Se definió el grado de toxicidad de acuerdo a las categorías reportadas por (Valdés-Iglesias et al, 2003).

Cuadro 4. Categorización para la determinación del grado de toxicidad en *Artemia salina*.

CL ⁵⁰	CATEGORIA
CL ⁵⁰ <10 µg/ mL	Extremadamente tóxico
10<CL ⁵⁰ <100 µg/ mL	Muy tóxico
100<CL ⁵⁰ <1000 µg/ mL	Moderadamente tóxico
CL ⁵⁰ > 1000 µg/ mL	No tóxico

Dosis letal media (DL⁵⁰)

Se utilizaron 30 ratones hembras y 30 machos de la cepa CD-1 de 12 semanas de edad para el diseño experimental, empleando la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-200-199) para el cuidado y manejo de animales de laboratorio.

Se formaron 5 grupos de 6 ratones al azar, los grupos formados fueron: control (solución salina, intragástrica) y cuatro dosis 2571mg/kg, 1828mg/kg, 1285mg/kg y 914mg/kg se utilizaron 60 ratones, 30 hembras y 30 machos de la cepa CD-1, administrando una sola dosis a cada grupo y se observó su conducta durante 14 días, al término del bioensayo se sacrificaron los animales en cámara de CO₂. Extrayendo y pesando los siguientes órganos: bazo, hígado, riñones y páncreas de todos los individuos de cada grupo para compararlos entre sí y observar si hay diferencias significativas entre los pesos (figura 13). El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Versión 20 para prueba probit.



Figura 13. Etapas de la evaluación de DL^{50}

Método cromatografía de líquidos acoplada a masas.

Se colocaron en viales 0.5 g. del extracto y sus fracciones para los analizarlos por medio de un cromatógrafo de líquidos modelo series 1200, marca Agilent equipado con una columna Zorbax Extend-C18 analítica 4.6x150 mm y con un tamaño de partícula de 5 µm. en el laboratorio de química vegetal y biotransformaciones de la FES ZARAGOZA se analizaron los datos obtenidos.

8. RESULTADOS

Rendimiento de los extractos de *Bauhinia variegata*

Se utilizaron 180 g de hojas para obtener el extracto metanólico, el rendimiento fue de 6.39%, este porcentaje permite conocer la cantidad de material vegetal necesario para preparar la cantidad de extracto deseado en peso seco. En el cuadro 5 se muestra el rendimiento de los extractos preparados a partir del metanólico.

Cuadro 5. Extractos preparados con diferentes disolventes a partir del extracto metanólico inicial.

Extracto	Peso extracto (g)	Rendimiento (%) con base en el extracto metanólico	Rendimiento con respecto a la planta (%)
HEXANO	4.1	35.65	0.023
ACETATO DE ETILO	3.6	31.30	0.02
BUTANOL	1.2	10.43	0.007
METANOLICO	2.3	20	0.013

Para la extracción de proteínas se utilizaron 100 g de hojas y para el acuoso 389 g. Los rendimientos se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Peso de las hojas utilizadas en la preparación de los extractos acuosos.

EXTRACTO	Peso extracto (g)	Peso hojas	Rendimiento %
ACUOSO	10.5	389	nd
PROTEÍNA	3.30	100	3.3

nd= no se determinó

Tamizaje fitoquímico

Pruebas preliminares para la detección de compuestos en la caracterización de los extractos (cuadro 7).

Cuadro 7. Pruebas utilizadas para la determinación preliminar de fitoquímicos.

Reactivo	EXTRACTO HEXÁNICO	EXTRACTO ACETATO DE ETILO	EXTRACTO METANÓLICO
Dragendorff (Alcaloides)	++	+	+++
Molisch (carbohidratos)	+	++	+++
Lieberman-Buchard (esteroides)	-	++	+
Shinoda (flavonoides-flavonas)	-	++	+

Presencia: (+++) alta, media (++) , baja (+) o sin presencia (-).

Reactivo Dragendorff para detección de alcaloides

Se observó la formación de un precipitado anaranjado-rojo que indica presencia de alcaloides, el control tiene todos los reactivos menos alcaloides.

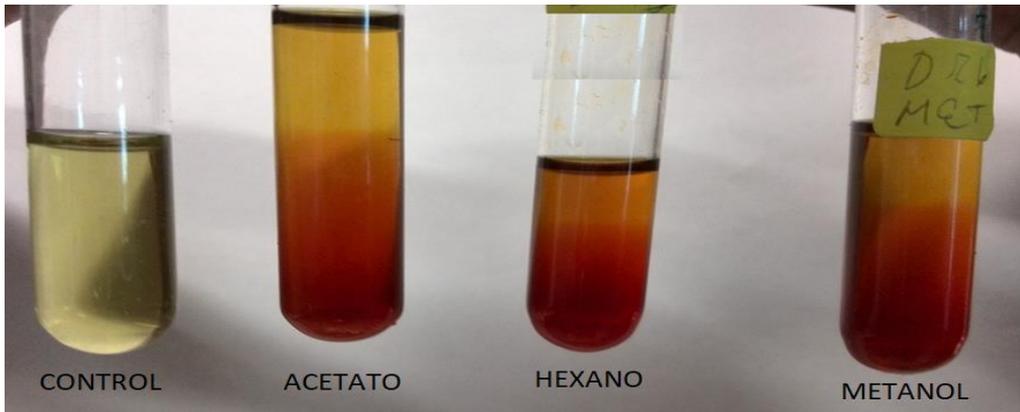


Figura 14. Reactivo Dragendorff el precipitado rojizo indica la presencia de alcaloides.

Reactivo de Molisch para detección de glucósidos (carbohidratos)

Indica la presencia de glucósidos, observando la formación de un anillo rojizo.

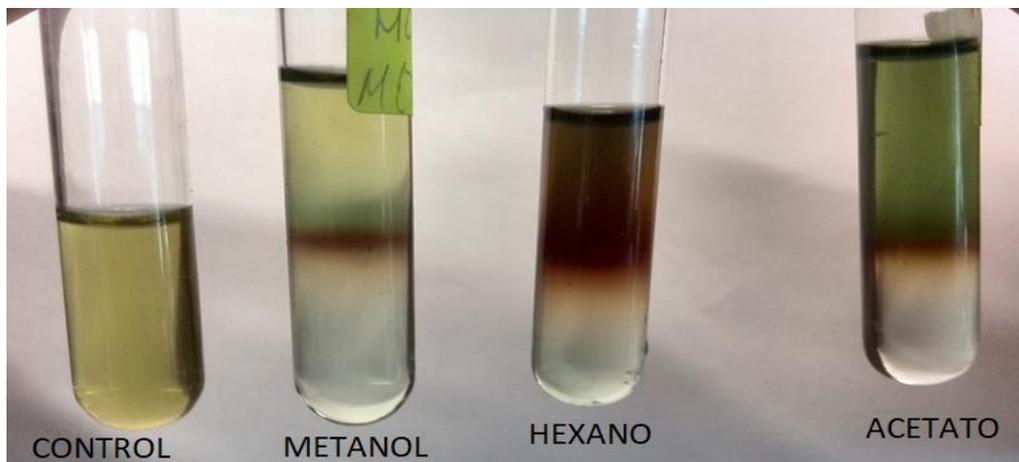


Figura 15. Reactivo de Molisch

Prueba de Lieberman-Buchard

La coloración azulada de todos los extractos indica la presencia de esteroides como el lupeol, β -sitosterol reportados por Jash, Roy, & Gorai, 2014.

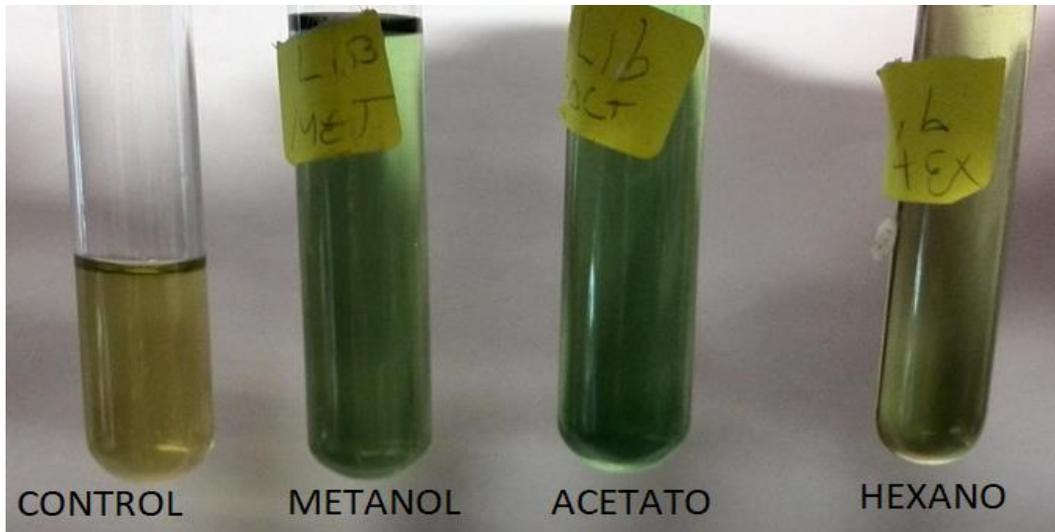


Figura 16. Reactivo Lieberman-Buchard con coloración azul indicando presencia de esteroides.

Reactivo Shinoda

El extracto metanólico indica la presencia de flavonoides por su coloración rosa-rojo como el kaempferol, quercetina, (2S)-5,7dimetoxi-3',4'metilen-flavanona, 5-hidroxi 7,3',4',5'-tetra-metoxiflavona 5-O-β-D-xilopiranosil-(1 → 2)-α-L-ramnopiranosido reportado por (Reddy et al, 2003) y (Yadava & Reddy, 2001) para el género Bauhinia.

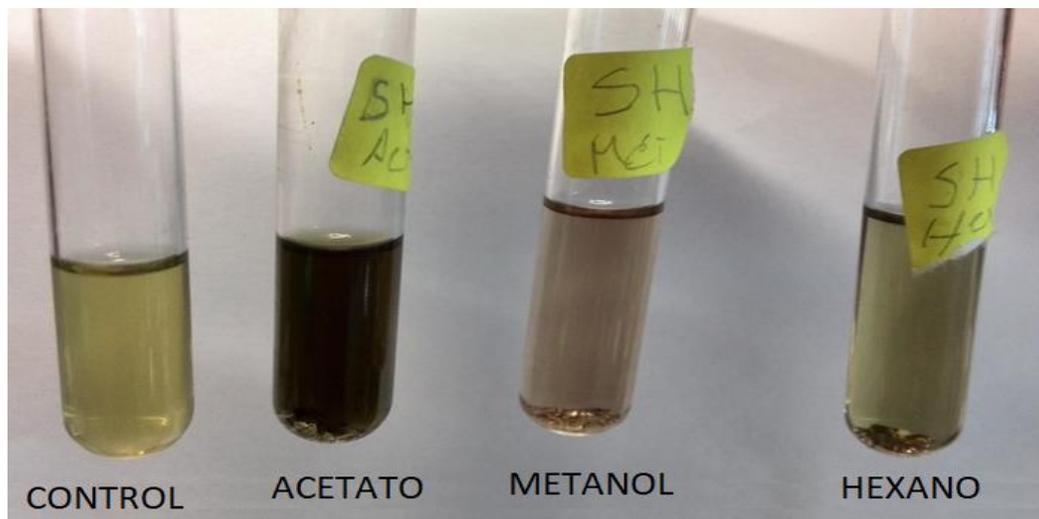


Figura 17. Reactivo Shinoda que indica presencia de flavonoides y flavonas, según la coloración rosa-rojo o carmesí-púrpura respectivamente.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con varias investigaciones donde han encontrado la presencia de flavonoides en varias especies del género *Bauhinia* en otros países como Egipto, Brasil y la India (Reddy et al, 2003), (Yadava & Reddy, 2001) reportan kaempferol y quercetina; (Rao et al, 2008) reporta rutina, kaempferol y derivados de kampferol, hesperidina, triterpenos en partes aéreas de *Bauhinia variegata* (Farang, Sakna, El-fiky, Shabana, & Wessjohann, 2015).

CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL⁵⁰

El ensayo se realizó por triplicado, haciendo una determinación de la actividad de los extractos a las 24 horas, En todas las concentraciones los extractos de *Bauhinia variegata* revelaron actividad contra *Artemia salina*. El análisis probit de Finney, 1978 establece la mortalidad promedio para cada extracto CL⁵⁰ usando el programa IBM SPSS STATISTICS 20 con un intervalo de confianza del 95% y con un p-valor mayor que 0.05, categorizando la toxicidad como lo sugiere en el cuadro 4 (Valdés-Iglesias et al, 2003), mostrando los resultados en el cuadro 8.

Cuadro 8. Mortalidad de *Artemia salina* en diferentes concentraciones de los extractos.

Concentración	Total de muertes a las 24 horas (muertos/total de organismos)							CL ⁵⁰ µg/ mL calculada método probit
	0µg/ mL	5µg/ mL	10µg/ mL	50µg/ mL	100µg/ mL	5000µg/ mL	1000µg/ mL	
Butanol	30/30	26/30	28/30	29/30	30/30	30/30	30/30	7.82
Hexano	30/30	13/30	12/30	23/30	28/30	30/30	30/30	48.19
Hoja	30/30	1/30	5/30	13/30	22/30	28/30	30/30	49.62
Acuoso	30/30	12/30	14/30	15/30	25/30	30/30	29/30	78.49
Proteína	30/30	28/30	21/30	17/30	23/30	30/30	30/30	142.45
MeOH	30/30	9/30	6/30	5/30	9/30	29/30	30/30	182.51
Acetato	30/30	4/30	8/30	9/30	10/30	27/30	30/30	236.84

Con base a la categorización de (Valdés-Iglesias et al, 2003), los extractos de *Bauhinia variegata* se clasifican de la siguiente manera (Cuadro 9):

Cuadro 9. Valores obtenidos con el método probit y su categorización.

EXTRACTO	CL ⁵⁰	CATEGORIA
Butanol	7.823	Extremadamente tóxico
Hexano	48.192	Muy tóxico
Hoja	49.621	Muy tóxico
Acuoso	78.486	Muy tóxico
Proteína	142.448	Moderadamente tóxico
Metanol fraccionado	182.513	Moderadamente tóxico
Acetato de etilo	236.838	Moderadamente tóxico

La CL⁵⁰ del extracto butanólico fue de 7.823 µg/mL, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las dosis utilizadas, por lo que el extracto en las concentraciones a estas concentraciones es extremadamente tóxico, es el extracto más tóxico de los utilizados en este trabajo.

En el análisis probit de la CL⁵⁰, el valor de toxicidad del extracto hexánico fue de 48.192 µg/ mL, no se encontró una diferencia significativa entre las diferentes dosis de extractos hexánicos, por lo que el extracto es muy tóxico en todas las concentraciones utilizadas.

El valor del extracto de la hoja fue de 49.62 µg/ mL, no hay diferencia estadísticamente significativa, el número indica que el extracto es muy tóxico.

El valor del extracto acuoso fue de 78.486 µg/ mL para la DL⁵⁰, indicando que no hay diferencia estadísticamente significativa, por lo que el extracto es muy tóxico.

El valor de las proteínas fue de 142.45 µg/ mL, indicando que hay diferencia estadísticamente significativa, por lo que el extracto muestra que es moderadamente tóxico, pero sin ser tan confiable porque la chi cuadrada es muy grande.

El valor del extracto metanólico para la CL^{50} fue de 182.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicando que no hay diferencia estadísticamente significativa, mostrando que el extracto es moderadamente tóxico.

El valor de toxicidad CL^{50} del extracto de acetato de etilo fue de 236.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicando que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las dosis, por lo que el extracto de acetato de etilo en las concentraciones utilizadas es moderadamente tóxico, siendo el extracto menos tóxico de todos los utilizados.

El efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios se le puede atribuir la alta toxicidad mostrada (Martínez et al, 2011).

En este estudio la toxicidad en *Artemia salina* se usó como una prueba preliminar y antes de realizar la prueba de DL^{50} con ratones. Este trabajo condujo a mostrar la actividad biológica de los extractos. Se seleccionó el extracto acuoso para los ensayos de DL^{50} porque es el tipo de extracto que utilizan los pobladores. El extracto butanólico se seleccionó por ser el más tóxico y el extracto metanólico fraccionado por la posible presencia de terpenoides, alcaloides y flavonoides (Mishra, Sharma, Kumar, Saxena & Pandey, 2013) (Neto, 2006) (Neto, Braz Filho, Lima & Silveira, 2008) (Martínez et al, 2011).

DOSIS LETAL MEDIA DL^{50}

Para la dosis letal media no se consideró viable el análisis ya que aunque se usó la cantidad de ratones sugerida por la OCDE y el número de muertes totales fue 3 de 60 ratones (1.8%). Tres de las muertes debidas al extracto, este es un valor muy bajo y no es posible obtener la DL^{50} . Se muestran los datos en el cuadro 10 y 11.

Cuadro 10. Cantidad de muertes de CD1 para DL^{50} en machos

Extracto	Machos				DL^{50} mg/kg
	Total de muertes a los 15 días				
	2571mg/kg	1828mg/kg	1285mg/kg	914mg/kg	
Butanol	0	0	0	0	0

MeOH	0	0	0	0	0
Acuoso	1	0	0	0	0
Solución salina	0	0	0	0	0

Cuadro 11. Cantidad de muertes de CD1 para DL⁵⁰ en hembras

Extracto	Hembras				DL ⁵⁰ mg/kg
	Total de muertes a los 15 días				
	2571mg/kg	1828mg/kg	1285mg/kg	914mg/kg	
Butanol	0	0	0	0	0
MeOH	1	0	0	0	0
Acuoso	1	0	0	0	0
Solución salina	0	0	0	0	0

Bodakhe & Ram (2007) indica que la toxicidad del extracto alcohólico de la corteza de *Bauhinia variegata* realizado con ratas wistar no se observó mortalidad.

Identificación de compuestos de los extractos de las hojas de *Bauhinia Variegata* con el sistema CLAP- MASAS

La rutina se identificó con ayuda de: el patrón de fragmentación; la comparación con espectros de la bibliografía y con el espectro de masas del estándar. En el cuadro 12 se muestra a la rutina y a los compuestos identificados tentativamente en cada extracto por medio de la separación por cromatografía de líquidos de alta resolución y su espectro de masas.

Cuadro 12. Compuestos identificados en cada extracto por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a masas.

Extracto	Identificación	Pico	TR	[M-H] m/z	Fragmentos	Área %	Área
Hexano	rutina	4	10.8	609	677, 113	42.16%	129951
	bauhinol	8	15.2	325	327, 255, 113	7.48%	23049
	derivado de	11	17.8	285	285, 113	>7%	>20000

	kaempferol						
	derivado de quercetina	15	19.6	301	299, 269, 113	35.40%	109133
	apigenina	16	19.8	269	269, 225, 113	19.12%	58941
	derivado de kaempferol	19	22.3	285	284, 113	63.31%	195157
Acetato de Etilo							
	rutina	9	10.8	609	---	65.10%	453801
	derivado de quercetina	---	---	447	447, 273, 249, 113	>10%	>100000
	derivado de quercetina	---	---	447	447, 415, 300, 249, 113	>10%	>100000
	derivado de quercetina	---	---	447	447, 249, 163, 119	>10%	>100000
	derivado de kaempferol	---	---	285	---	>10%	>100000
	bauhinol	24	15.2	327	---	16.78%	116952
	derivado de kaempferol	32	17.8	285	---	43%	299726
	apigenina	38	19.8	269	269, 210, 113	41.71%	290712
Metanol							
	rutina	6	10.8	609	---	100%	637752
	bauhinol	9	15.2	325	---	>2.5%	>15000
	naringenina	10	19.6	269	269, 210, 113	>2.5%	>15000
	derivado de kaempferol	12	22.3	285	---	6.46%	41205
Butanol							
	rutina	4	10.8	609	---	100%	1003876
	derivado de	6	11.9	447	447, 273, 249,	3.60%	36112

	quercetina				155, 113		
	derivado de kaempferol	---	---	285	---	>3%	>30000
	derivado de kaempferol	---	---	285	285, 249, 155, 113	>3%	>30000
	derivado de quercetina	---	---	301	301, 255, 175, 113	>3%	>30000
	bauhinol	---	---	325	327, 249, 155, 113	>3%	>30000
	derivado de kaempferol	18	22.3	285	284, 225, 113	20.25%	203322

---: no determinado.

Los picos de los compuestos identificados por cromatografía de líquidos asociada a masas para el extracto hexánico se muestran en el cromatograma de la figura 18.

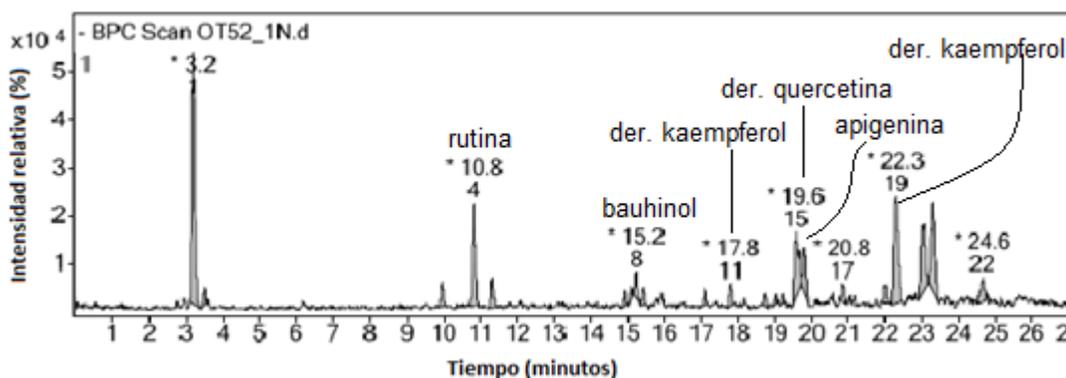


Figura 18. Cromatograma del extracto hexánico de las hojas de *Bauhinia variegata L.*

Los picos de los compuestos identificados por cromatografía de líquidos asociada a masas y su abundancia relativa para el extracto metanólico se muestran en el cromatograma de la figura 19.

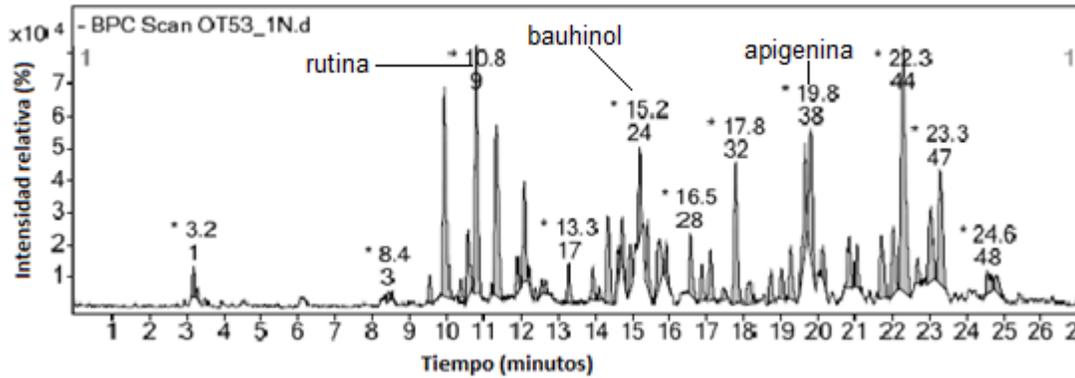


Figura 19. Cromatograma del extracto metanólico de las hojas de *Bauhinia variegata* L.

Los picos de los compuestos identificados por cromatografía de líquidos asociada a masas y su abundancia relativa para el extracto de acetato de etilo se muestran en el cromatograma de la figura 20.

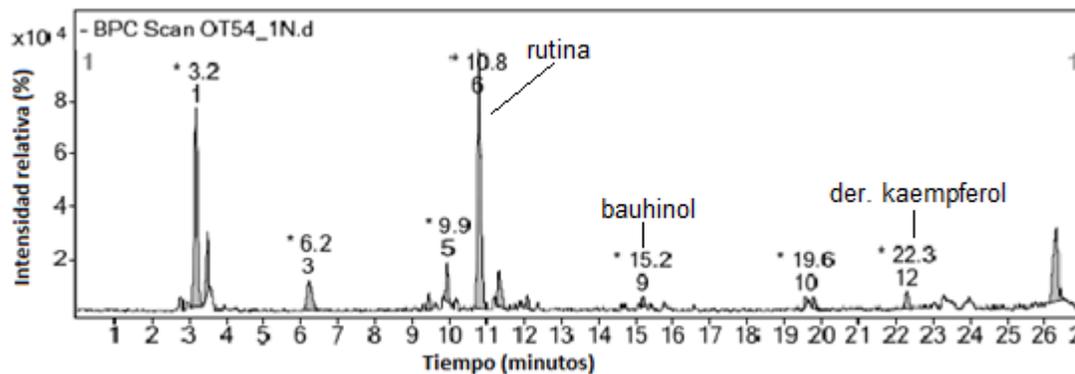


Figura 20. Cromatograma del extracto de acetato de etilo de las hojas de *Bauhinia variegata* L.

En el cromatograma del extracto butanólico (figura 21) se muestra la rutina y los compuestos identificados tentativamente por CLAP-Masas y su abundancia relativa.

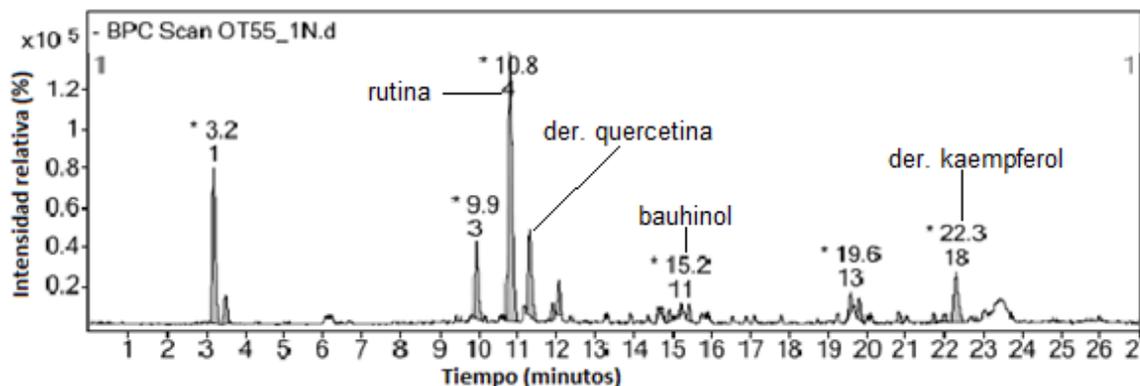


Figura 21. Cromatograma del extracto butanólico de las hojas de *Bauhinia variegata* L.

Con un tiempo de retención de 10.8 aparece en todos los extractos con un ion molecular en m/z de 609 identificado como rutina (figura 22), con un porcentaje de área de 42.16% en el extracto hexánico (figura 23), en el extracto de acetato de etilo de 65.1% (figura 24), en metanol el área es del 100% (figura 25) y en el extracto de butanol representa 100% del porcentaje de área (figura 26).

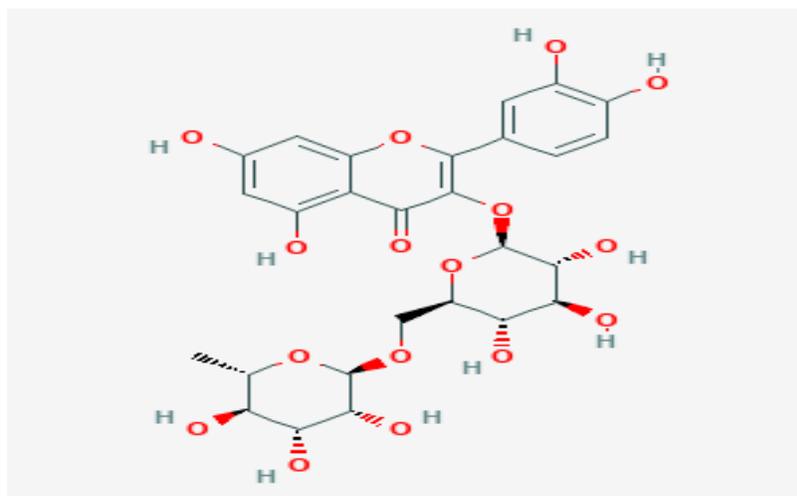


Figura 22. Estructura de la rutina.

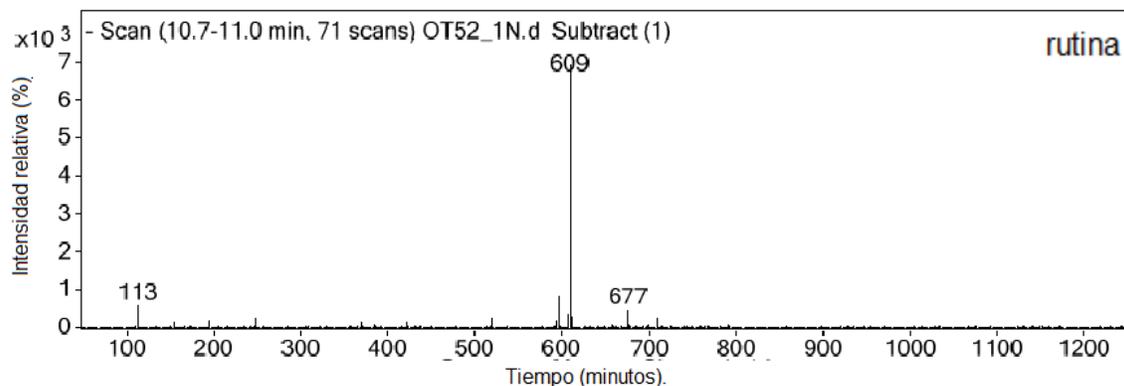


Figura 23. Espectro de masas de la rutina del extracto hexánico

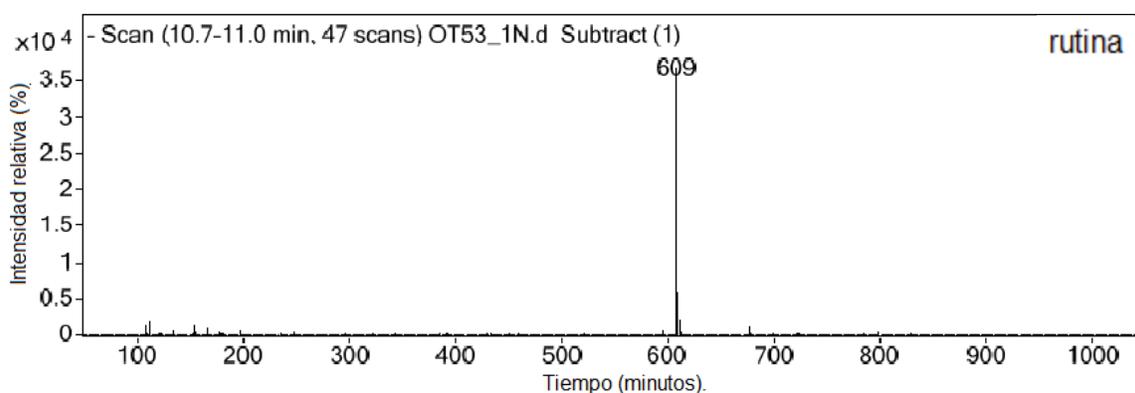


Figura 24. Espectro de masas de la rutina del extracto de acetato de etilo

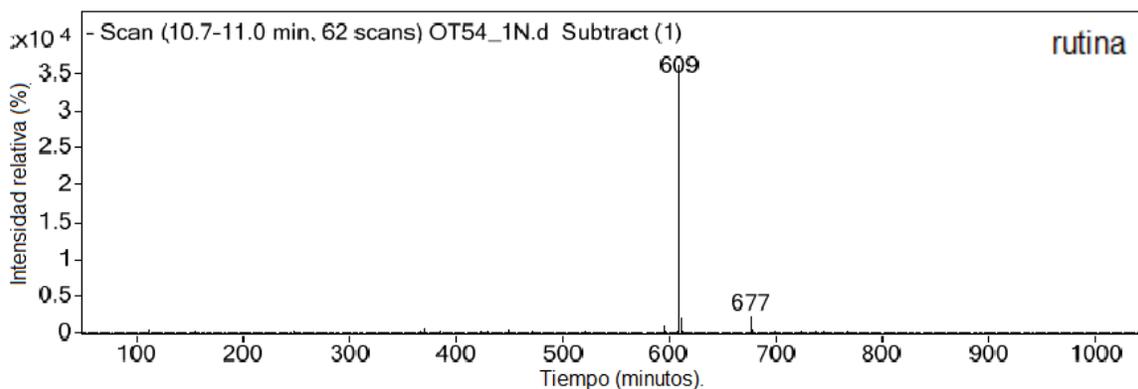


Figura 25. Espectro de masas de la rutina del extracto metanólico

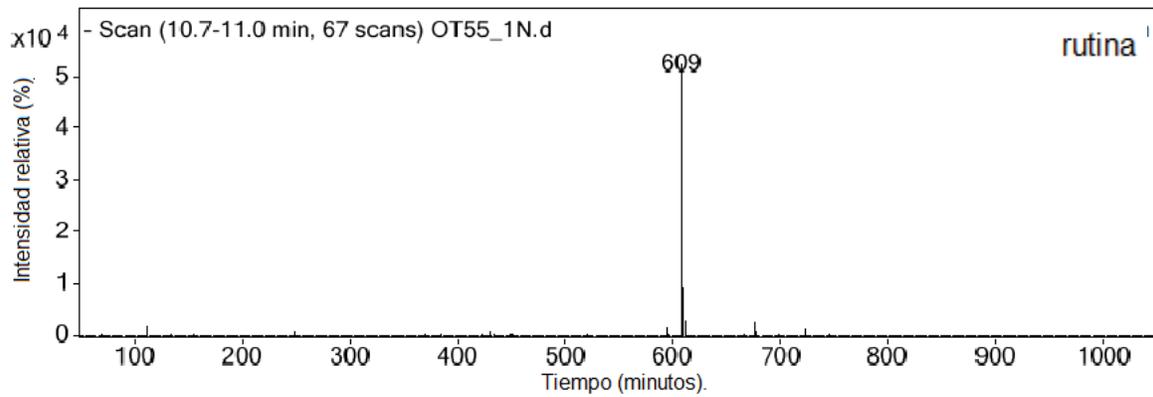


Figura 26. Espectro de masas de la rutina del extracto butanólico.

Con un tiempo de retención de 19.8 en los extractos hexánico y de acetato de etilo con un ion m/z en 269 se identificó tentativamente a la apigenina (figura 27) con un porcentaje de área de 19.12% en el extracto hexánico (figura 28) y un área de 41.71% en el extracto de acetato de etilo (figura 29).

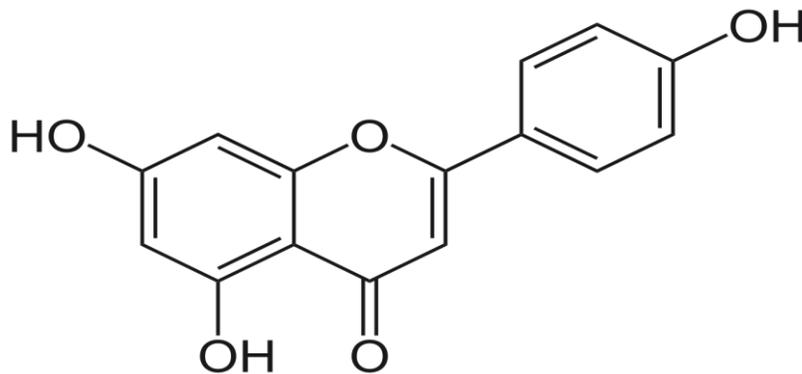


Figura 27. Estructura de la apigenina

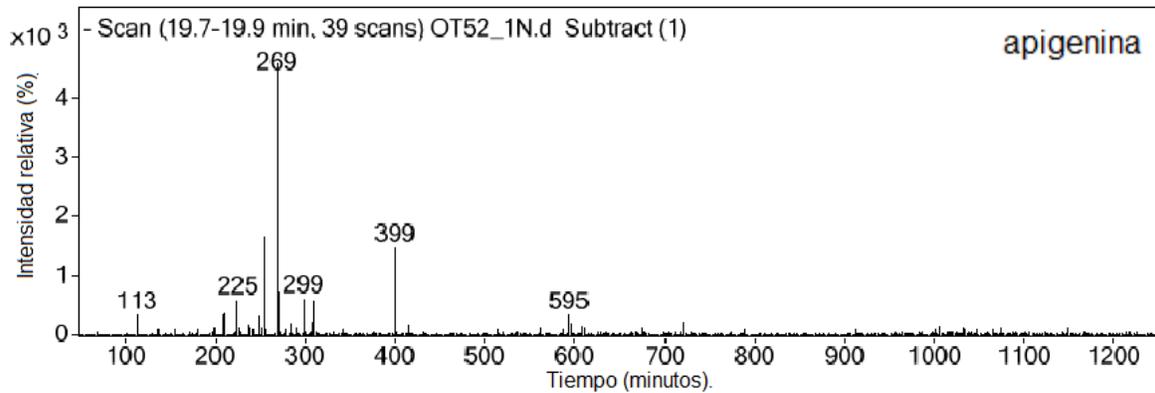


Figura 28. Espectro de masas de la apigenina del extracto hexánico.

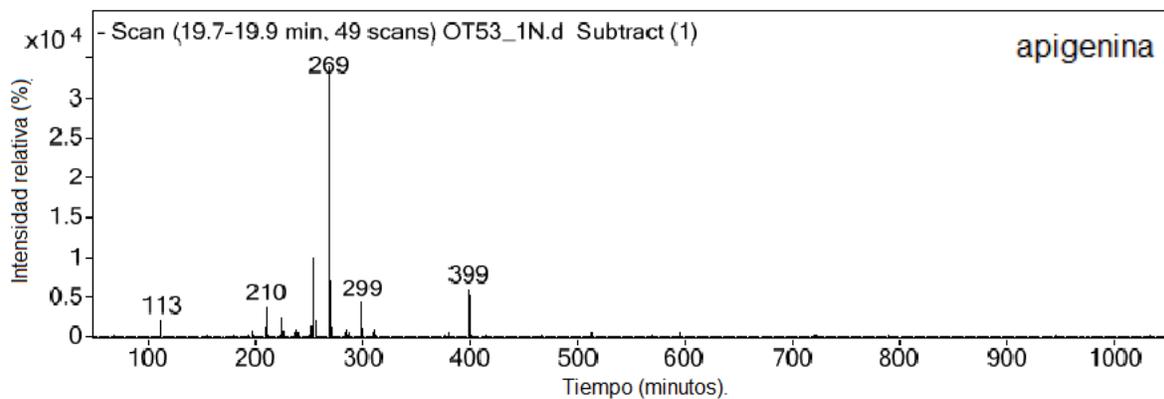


Figura 29. Espectro de masas de la apigenina del extracto de acetato de etilo.

Con diferentes tiempos de retención en todos los extractos se encontraron tentativamente derivados de kaempferol (figura 30) entre ellos un derivado en tiempo de retención 17.8 en los extractos de hexano (figura 31) y de acetato de etilo con un ion m/z en 285 (figura 32) y con un porcentaje de área de 9.92% en hexano y 43% en acetato de etilo que según Farag, et al (2015), Miceli, Buongiorno, Celi, Cacciola, Dugo, Donato & Taviano (2016) y Faccin, Loose, Viana, Lameira & de Carvalho (2017) se encuentran en el género Bauhinia.

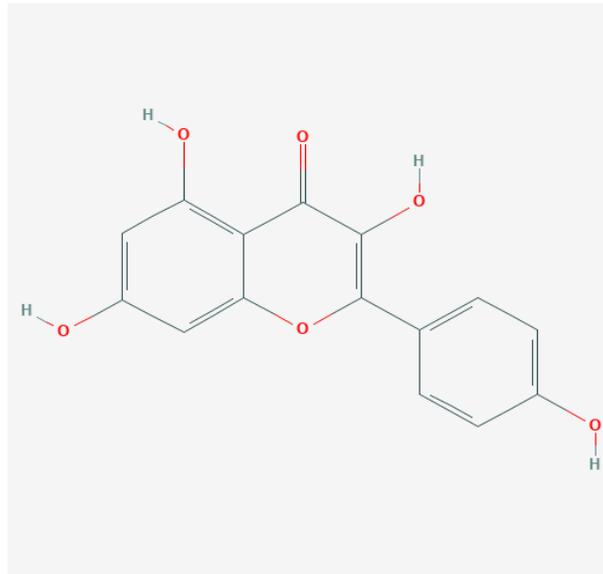


Figura 30. Estructura del kaempferol.

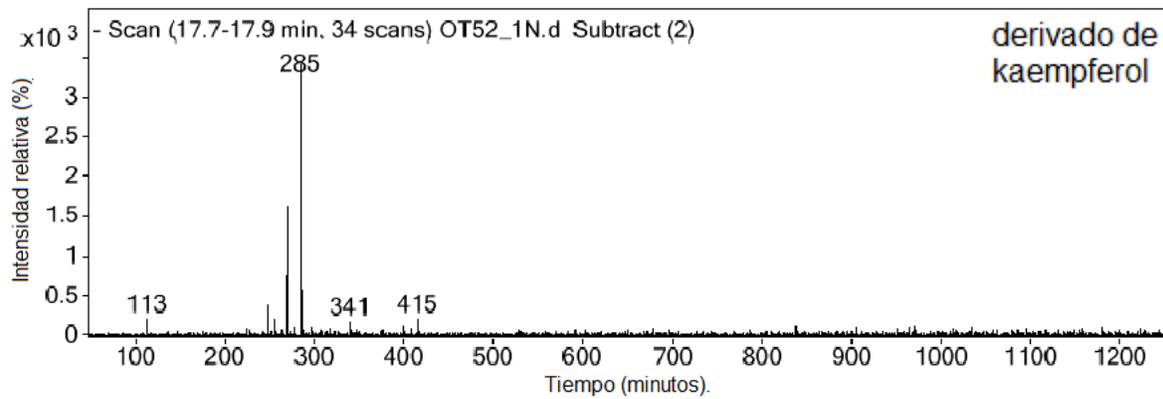


Figura 31. Espectro de masas del derivado de kaempferol en el extracto de hexano.

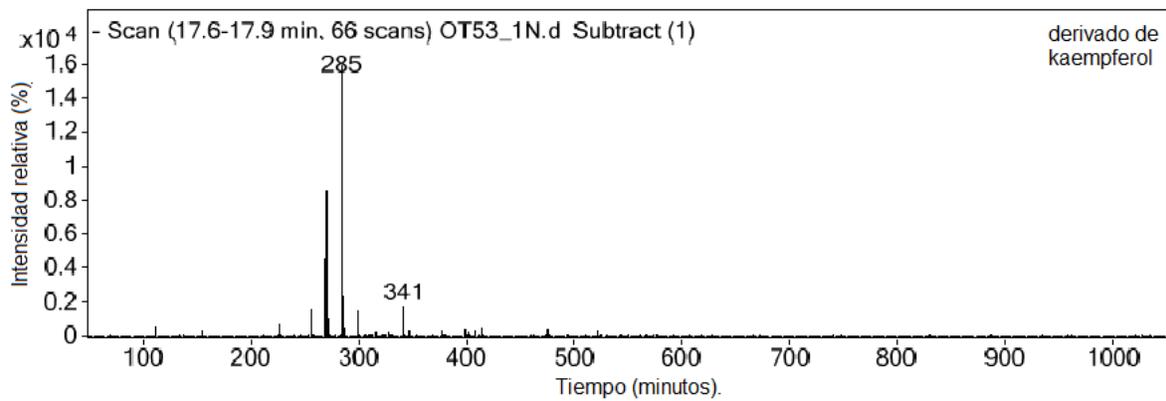


Figura 32. Espectro de masas del derivado de kaempferol del extracto de acetato de etilo.

Otro derivado de kaempferol aparece en el tiempo de retención 22.3 en todos los extractos, teniendo como porcentaje de área: en hexano 63.31% (figura 33), en acetato de etilo 100% (figura 34), en metanol 38.69% (figura 35) y en butanol 20.25% (figura 36).

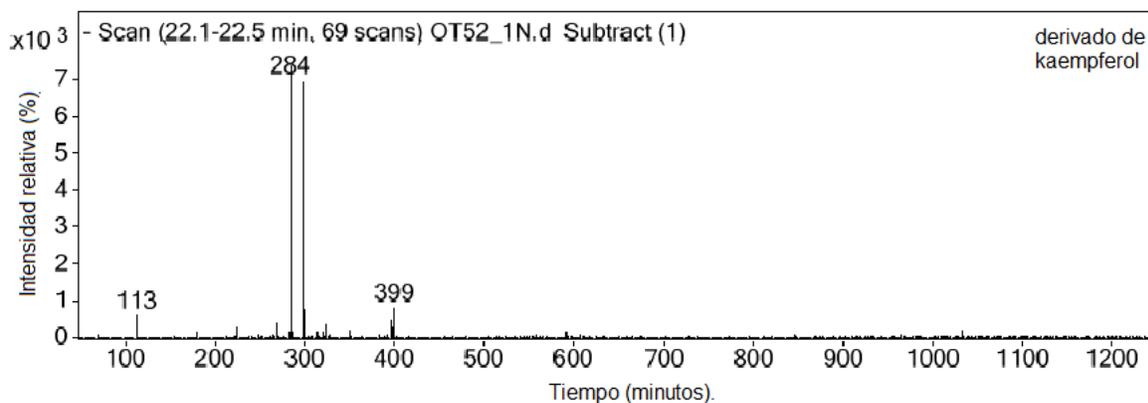


Figura 33. Espectro de masas del derivado de kaempferol del extracto de hexano.

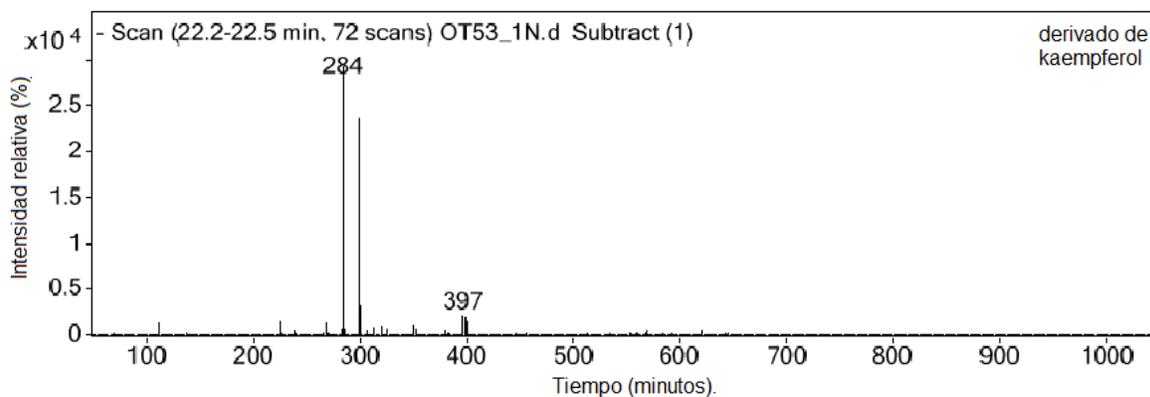


Figura 34. Espectro de masas del derivado de kaempferol del extracto de acetato de etilo.

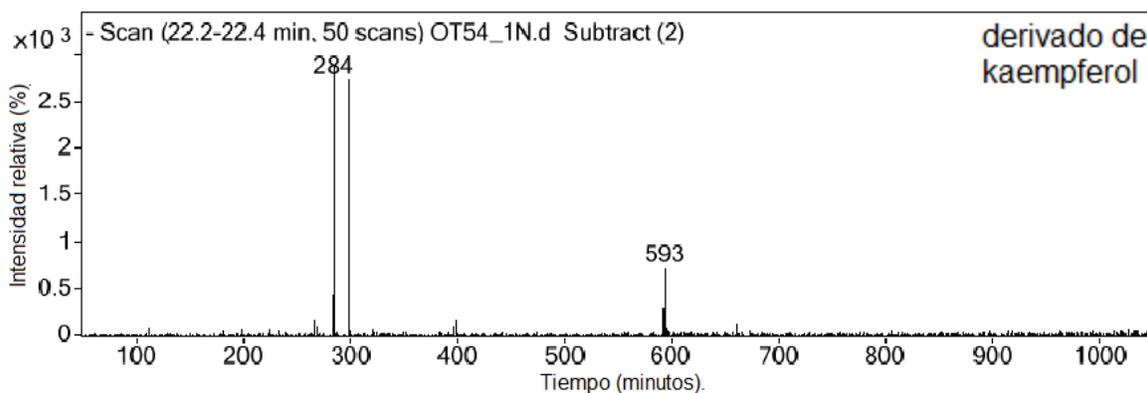


Figura 35. Espectro de masas del derivado de kaempferol del extracto de metanol.

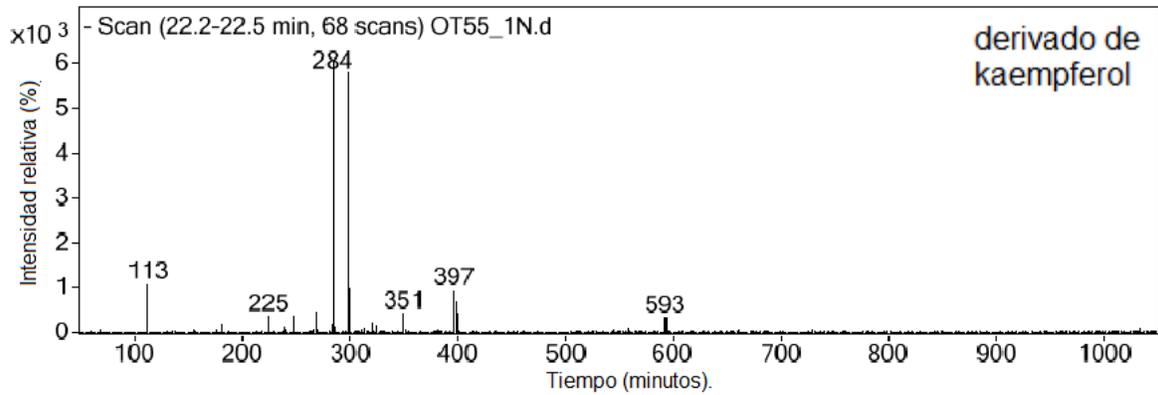


Figura 36. Espectro de masas del derivado de kaempferol del extracto de butanol.

Con un tiempo de retención de 11.9 en los extractos de acetato de etilo y butanol con un ion en m/z de 447 se identificó tentativamente un derivado de quercetina con un porcentaje de área de menos del 10% en el extracto de acetato de etilo (figura 38) y de 3.60% en el extracto butanólico (figura 39).

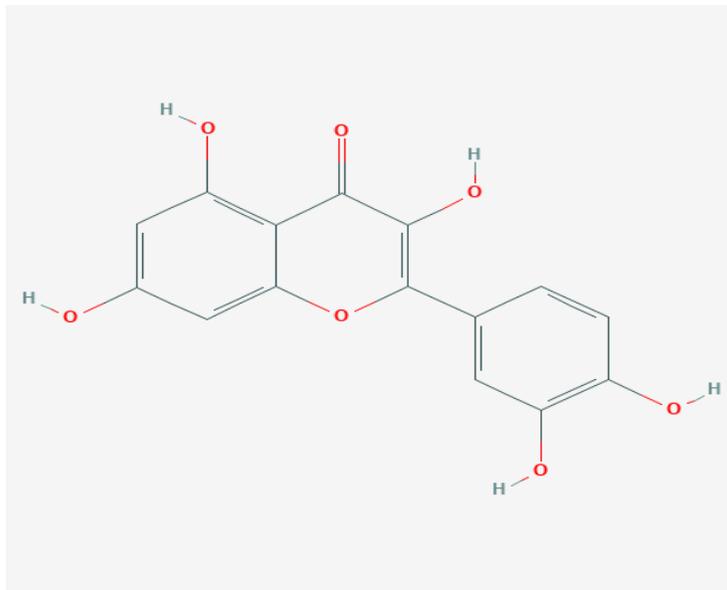


Figura 37. Estructura de la quercetina

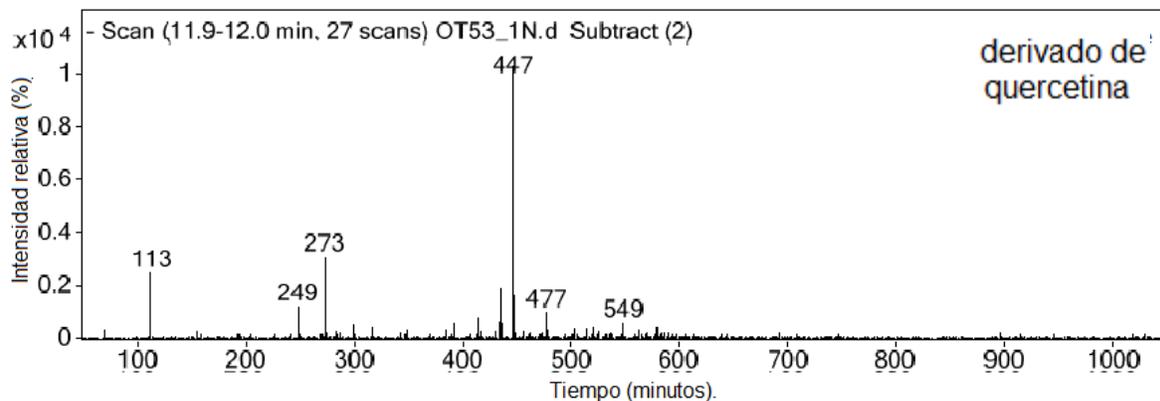


Figura 38. Espectro de masas del derivado de quercetina del extracto de acetato de etilo.

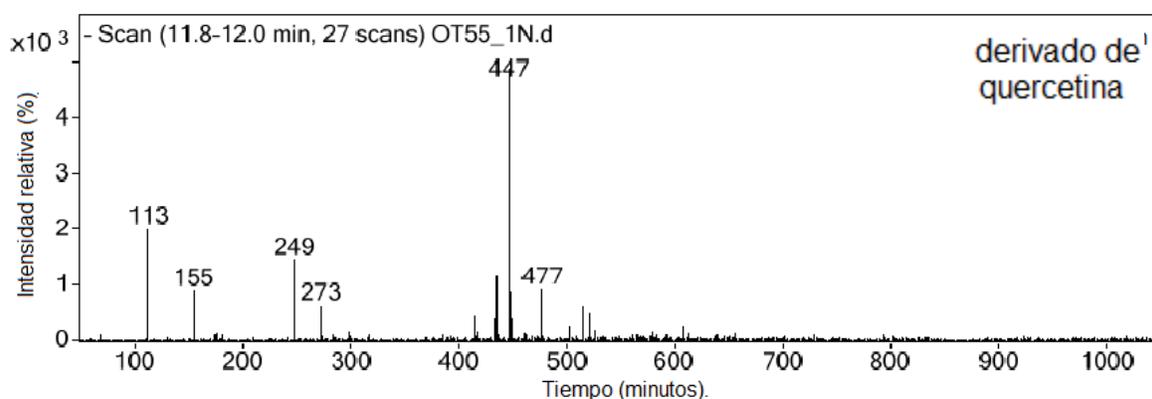


Figura 39. Espectro de masas del derivado de quercetina del extracto de butanol.

Con un tiempo de retención de 15.2 en los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol con un ion en m/z de 325 se identificó tentativamente al bauhinol (figura 40) con un porcentaje de área de 7.48% en el extracto hexánico (figura 41), 16.78% en el extracto de acetato de etilo (figura 42) y de menos de 2.5% en el extracto metanólico (figura 43).

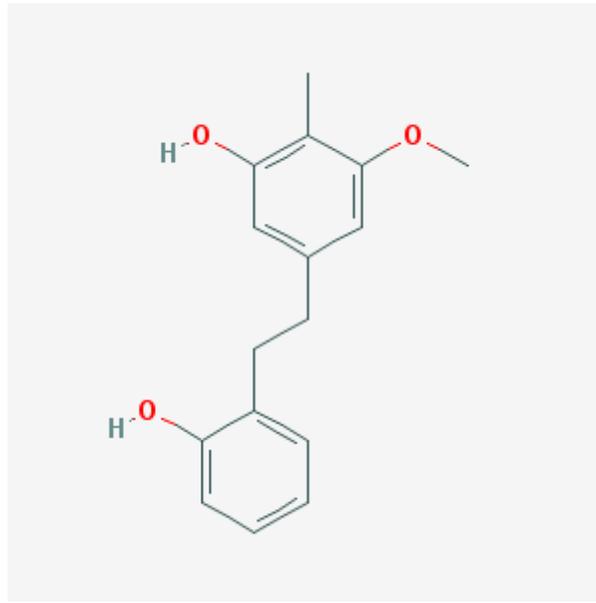


Figura 40. Estructura del bauhinol

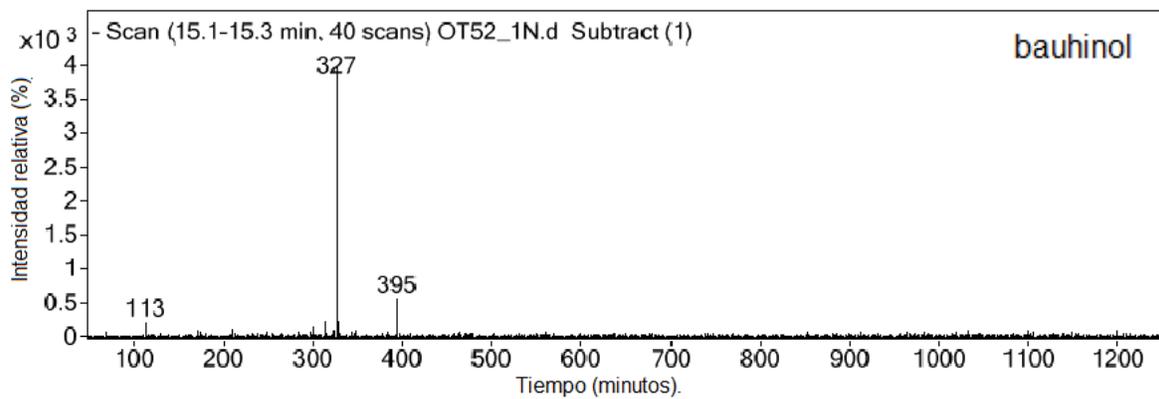


Figura 41. Espectro de masas del bauhinol del extracto de hexano

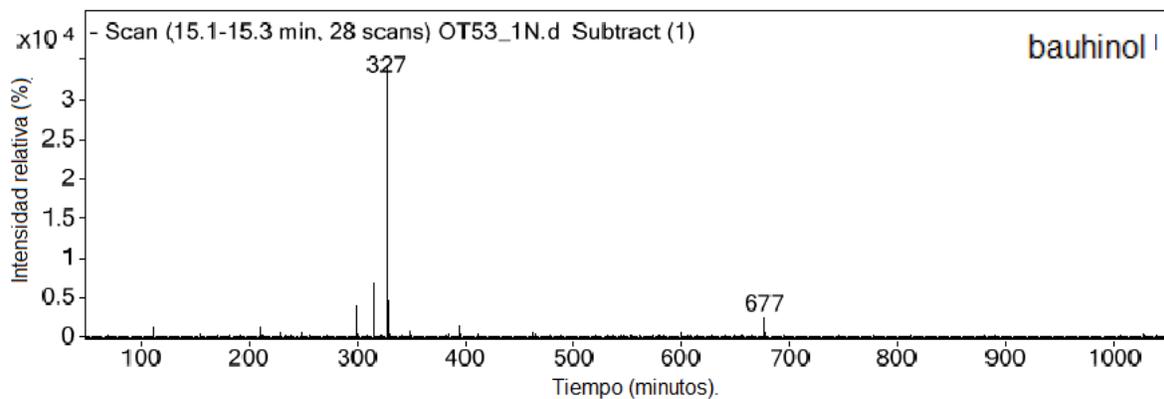


Figura 42. Espectro de masas del bauhinol del extracto de acetato de etilo.

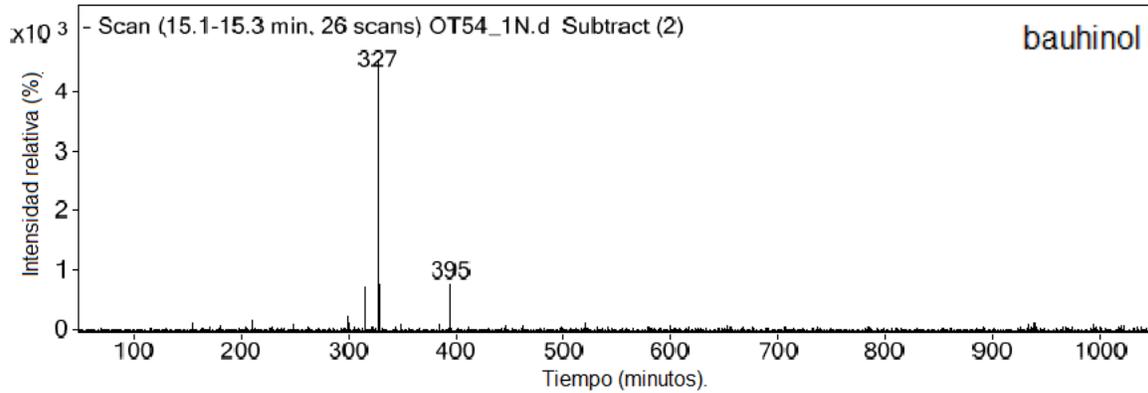


Figura 43. Espectro de masas del bauginol del extracto de metanol.

Los derivados de kaempferol identificados tentativamente podrían ser: kaempferol, kaempferol 7,4'-dimetil éter 3-O- β -D glucopiranosido y kaempferol 3-O- β -D glucopiranosido según Calderón-Montaño, Burgos-Morón, Pérez-Guerrero & López-Lázaro (2011) en *B. variegata* de Colombia, en México no se han reportado para la especie.

9. DISCUSIÓN

En éste estudio se utilizó el método de la patente de Khanna, para la extracción de proteínas de las hojas; el rendimiento que se obtuvo de proteínas fue del 3% y es un valor alto porque se realizó una purificación incompleta. Al extracto acuoso no se le midió el rendimiento ya que es una infusión.

Los extractos fueron fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico; el extracto con mayor rendimiento fue el hexánico con 44.15%, el siguiente en orden descendente fue el de acetato de etilo con 31.4%, el metanólico con 16.45% y el extracto butanólico con 13.8%.

El tamizaje fitoquímico o pruebas coloridas se hicieron con diferentes reactivos de los cuales; el reactivo de Dragendorff arrojó un resultado positivo a la presencia de alcaloides, pero se destaca que existen sustancias oxigenadas con alta densidad electrónica que pueden dar falsos positivos con este reactivo (Arango, 2002).

El reactivo Shinoda dio como resultado que el extracto metanólico tiene presencia de flavonoides al arrojar una coloración rojo-rosa.

Para el reactivo Lieberman-Buchard que indica presencia o ausencia de esteroides mostró que todos los extractos dieron positivo por su coloración azulada.

La prueba de Molisch indicó la presencia de glucósidos por la presencia de anillos rojizos.

CL⁵⁰

La concentración letal media en *Artemia salina* se reportó utilizando la herramienta de análisis probit con el software IBM SPSS statistics 20 por lo que se determinó que la concentración a la que el 50% de nauplios mueren dentro de las 24 horas de contacto con cada uno de los extractos fue de:

Extracto hexánico de 48.192 µg/mL, la hoja de 49.62 µg/mL, extracto acuoso de 78.486 µg/mL, de las proteínas de 142.45 µg/mL, del extracto metanólico de 182.51 µg/mL y del extracto de acetato de etilo de 236.84 µg/mL, por lo tanto, para *Artemia salina* el extracto butanólico es extremadamente tóxico, mientras que los extractos hexánico, de hoja y

acuoso son muy tóxicos y los extractos de proteínas, metanólico y acetato de etilo son moderadamente tóxicos, según la clasificación de Valdés-Iglesias et al, 2003 (cuadro 4).

El extracto metanólico de las hojas con mayor concentración de rutina, disminuyó significativamente la toxicidad contra *Artemia salina*. Se encontrado en estudios que altas concentraciones de flavonoides, disminuyen la toxicidad de los extractos contra *Artemia salina*. Los extractos de las hojas con alta concentración de rutina deben presentar mayor capacidad antioxidante y esto puede estar inhibiendo la toxicidad (Jaramillo, Jaramillo, D'Armas, Troccoli & Rojas 2016).

DL⁵⁰

Para el estudio de la dosis letal media se pesaron los órganos y se compararon con el control, arrojando como resultados para las hembras que el peso del hígado disminuyó en las dos diferentes dosis y en los dos extractos (metanólico, acuoso).

El peso del riñón izquierdo de los ratones del extracto acuoso fue igual al del grupo control, pero para el extracto metanólico en las dos dosis hubo aumento de peso.

Para el riñón derecho el extracto acuoso en la dosis de 2571 mg/kg fue igual al grupo control, pero la dosis de 1828 mg/kg aumentó en comparación al control; el extracto metanólico de 2571 mg/kg aumentó en comparación al control y la dosis de 1828 mg/kg fue igual al control.

En las dosis del extracto metanólico para el páncreas el peso fue igual al del grupo control; pero para las dosis del extracto acuoso en la dosis de 2571 mg/kg disminuyó en comparación al control y la dosis de 1828 mg/kg aumentó el peso del páncreas en comparación al control.

Para el bazo en todas las dosis y los dos extractos aumentó el peso con respecto al grupo control.

Con la infusión, el bazo aumento en la dosis de 2571 mg/kg pero éste aumento fue menor al grupo control; la dosis de 1828 mg/kg no produjo aumento o disminución y en el extracto metanólico hubo disminución de peso en las dos dosis.

El peso del hígado de los ratones machos disminuyó con todas las dosis de los diferentes extractos probablemente atribuible a los alcaloides.

El peso del riñón izquierdo tratado con las dosis de 1828 mg/kg del extracto acuoso y del extracto butanólico fue igual al grupo control. En la dosis de 1828 mg/kg del extracto metanólico el peso aumentó en comparación al control, en las dosis de 2571 mg/kg y 914 mg/kg de los extractos disminuyó el peso en comparación al grupo control.

El peso del riñón derecho tratado con todas las dosis de los diferentes extractos disminuyó; aunque en las dosis del extracto metanólico de 1828mg/kg y 914 mg/kg aumentó comparado con el control.

Para el páncreas con el extracto butanólico en la dosis de 1828mg/kg el peso aumentó en comparación al control; en las dosis de 2571 mg/kg y 1828 mg/kg del extracto metanólico fue igual al grupo control y en las dosis restantes de todos los extractos disminuyó el peso en comparación al grupo control.

En el bazo el peso aumentó con respecto al control para la dosis de 1828 mg/kg del extracto acuoso y la dosis de 2571 mg/kg de metanol; el peso obtenido con la dosis del extracto butanólico de 2571 mg/kg fue igual al grupo control y con todas las demás dosis de los diferentes extractos disminuyeron.

Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a masas -MASAS

El flavonoide más abundante que se encuentra en las hojas de *Bauhinia variegata* es la rutina la cual es un componente vital en los alimentos. Su nombre proviene de *Ruta graveolens*, la cual también contiene rutina. Químicamente es un glucósido de la quercetina como aglicona con un disacárido que es la rutinosa. Se ha demostrado que la rutina tiene varias actividades farmacológicas incluyendo: antioxidante, citoprotectora, vasoprotectora, anticarcinogénico, neuroprotectora y cardioprotectora. Puede funcionar como sedante y anticonvulsivo (Gúllon, Lú- Chau, Moreira, Lema & Eibes 2017 y Ganeshpurkar & Saluja, 2017).

Otro flavonoide que se encuentra en *Bauhinia variegata* es el kaempferol y sus derivados con actividad farmacológica, antioxidante, antiinflamatorio, anti-microbial, anti-cáncer,

cardio protectivo, neuroprotectivo, antidiabético, anti osteoporotico, estrogénico/antiestrogénico, ansiolítico, analgésico y actividad antialérgica (Calderón-Montaña et al, 2011).

10. CONCLUSIONES

El tamizaje fitoquímico mostró que las hojas de *Bauhinia variegata* L. contiene alcaloides, azúcares, esteroides y flavonoides.

De acuerdo a los valores obtenidos para la concentración letal media (CL^{50}) el extracto butanólico es extremadamente tóxico, mientras que los extractos hexánico, de hoja y acuoso son muy tóxicos y los extractos de proteínas, metanólico y acetato de etilo son moderadamente tóxicos para *Artemia salina*.

Los extractos metanólico, butanólico, de acetato de etilo y la infusión acuosa de *Bauhinia variegata* para la prueba de DL^{50} no resultaron tóxicos.

Bauhinia variegata tiene actividad biológica de acuerdo a los resultados de CL^{50} sobre *Artemia salina*, pero no presenta toxicidad (DL^{50}) en ratones.

Se identificó a la rutina en TR 10.8 en las hojas y es además el flavonoide mayoritario.

Se identificó tentativamente a un grupo de derivados de kaempferol en TR 22.3 y 17.8.

Se identificó tentativamente al bauhinol en TR 15.2, a derivados de quercetina en TR 11.9. y a la apigenina en TR 19.8.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Snafi, Ali Esmail (2013). The Pharmacological Importance of *Bauhinia variegata*. A Review, *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 4 **12**(160-164)
2. Alonso, F. A. Cálculo de las concentraciones letales ⁵⁰ (CL⁵⁰) a 96 horas para la toxicidad del nitrito en dos especies de invertebrados de agua dulce (*Eulimno gammarustoletanus* y *Polycelisfelina*). [En línea]. [Fecha de actualización 26 y 28 de febrero de 2013; acceso 16 de agosto de 2013]. Facultad de Biología, Universidad de Alcalá.
3. Anjaneyulu, A. S. R., Reddy, A. R., Reddy, D. S. K., Ward, R. S., Adhikesavalu, D., & Cameron, T. S. (1984). Pacharin: a new dibenzo (2, 3-6, 7) oxepin derivative from *Bauhinia racemosa lamk*. *Tetrahedron*, 40(21), 4245-4252.
4. Arencibia, D. F., Rosario, L. A., & Curveco, D. L. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de Toxicología*, 40-52.
5. B., Bhakuni D., Goel A., Kar K. y mehrotra. (1984). Screening of Indian plants for biological activity. *Indian Journal of Experimental Biology*, 22, 487-491.
6. Betancurt, D. C. P., Barrer, M. G., & Palacios, L. E. C. (2016). Actividad antibacteriana, determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu y toxicidad en *Artemia salina* de la especie vegetal *Bauhinia variegata*. *Hechos Microbiológicos*, 5(2).
7. Bodakhe, S. H., & Ram, A. (2007). Hepatoprotective properties of *Bauhinia variegata* bark extract. *Yakugaku zasshi*, 127(9), 1503-1507.
8. Boullata, J. I., & Nace, A. M. (2000). Safety issues with herbal medicine. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 20(3), 257-269.
9. Bowsher, C., Steer, M., & Tobin, A. (2008). *Plant biochemistry*. Garland Science.

10. Calderón-Montaño, J. M., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kampferol. Mini-reviews in medicinal chemistry. 11, 298-344.
11. Chen, Y., Yu, H., Wu, H., Pan, Y., Wang, K., Jin, Y., & Zhang, C. (2015). Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in pollen typhae for transformation rule exploration. *Molecules*, 20(10), 18352-18366.
12. Cechinel Filho, V. (2000). Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. *Quim. Nova*, 23(5), 680-685.
13. Cechinel Filho, V., Massignani, J. J., Lemos, M., Maistro, E. L., Schaphauser, H. P., Jorge, R. F., & Mohan, M. (2009). Chemical composition and biological potential of plants from the genus Bauhinia (p 1347-1354). *Phytotherapy Research*, 23(10), 1347-1496.
14. Da Silva, K. L., Biavatti, M. W., Leite, S. N., Yunes, R. A., Delle Monache, F., & Cechinel Filho, V. (2000). Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(5-6), 478-480.
15. Da Silva, K. L., & Filho, V. C. (2002). Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. *Química nova*, 25(3), 449-454.
16. Domínguez, X. A. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica Editorial Limusa. México DF.
17. Faccin, H., Loose, R. F., Viana, C., Lameira, O. A., & de Carvalho, L. M. (2017). Determination of phenolic compounds in extracts of Amazonian medicinal plants by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 9(7), 1141-1151.
18. Farag, M. A., Sakna, S. T., El-fiky, N. M., Shabana, M. M., & Wessjohann, L. A. (2015). Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight Bauhinia L.

- species from Egypt using UHPLC–PDA–qTOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry*, *119*, 41-50.
19. Finney DL. Statistical method in biological assay. London: High Wycombe; 1978.
 20. Gámez Rojas, C. M., & Ramírez Riveros, E. J. (2008). Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del glifosato sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con daphnia magna.
 21. Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K (2017) review the pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **25**, 149-164.
 22. Gúllon, B., Lú- Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G. (2017) Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*. **67** 220-235
 23. Guerrero Arroyo J. (2016) Evaluación de la toxicidad aguda y sub-crónica del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less, (Capitanija) licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
 24. Gupta, A. K., Vidyapati, T. J., & Chauhan, J. S. (1980). Chemical examination of the stem of *Bauhinia variegata*. *Planta Medica*, *38*(02), 174-176.
 25. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. *Clave geoestadística 16059*.
 26. Jaramillo, C., Jaramillo, A., D'Armas, H., Troccoli, L., & Rojas, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, *64*(3), 1171-1184.
 27. Jash, S.K, Roy, R, Gorai, D. (2014). Bioactive constituents from *Bauhinia variegata* Linn. *International Journal of Pharmaceutical and biomedical research*, **5** **2** (51-54).
 28. Khanna P., Nag T., Chandrajai S., Mohan S. (1976). Process for isolation of insulin from plant source. United States Patent number 3,945,998

29. Lagarto, A., Tillán, J., Bueno, V., Chávez, I., Guerra, I., Vega, Y., & Gabilondo, T. (2005). Toxicidad aguda oral y subcrónica en ratas de un extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. *Revista de toxicología*, 22(3).
30. Martínez, M. M., Ocampo, D. M., Galvis, J. H., & Valencia, A. (2011). Antibacterial activity and in vivo cytotoxicity of ethanol extracts from *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 313-323.
31. Meek, M. E., Boobis, a., Cote, I., Dellarco, V., Fotakis, G., Munn, S., ... & Vickers, C. (2014). New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode of action/species concordance analysis. *J. Appl. Toxicol.* 34: 1-18.
32. Miceli, N., Buongiorno, L. P., Celi, M. G., Cacciola, F., Dugo, P., Donato, P.,... & Taviano, M. F. (2016). Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) leaves extract. *Natural product research*, 30(11), 1229-1239.
33. Mishra, A., Sharma, A. K., Kumar, S., Saxena, A. K., & Pandey, A. K. (2013). *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *BioMed Research International*, 2013.
34. Neto, M. M., Neto. (2006) contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste do Brasil: *Bauhinia unguolata* L. (LEGUMINOSEAE) DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, Fortaleza – Ceará.
35. Neto, M. M., Neto, M. A., Braz Filho, R., Lima, M. A. S., & Silveira, E. R. (2008). Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. *Biochemical systematics and ecology*, 3(36), 227-229.
36. Pérez, P. M. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. *Revista Digital Universitaria*, 9.
37. Parekh, J., & Chanda, S. (2007). Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. *African Journal of Biomedical Research*, 10(2).
38. Pepato, M. T., Baviera, A. M., Vendramini, R. C., & Brunetti, I. L. (2004). Evaluation of toxicity after one-month treatment with *Bauhinia forficata* decoction in

- streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 4(1), 7.
39. Pettit, G. R., Numata, A., Iwamoto, C., Usami, Y., Yamada, T., Ohishi, H., & Cragg, G. M. (2006). Antineoplastic Agents. 551. Isolation and Structures of Bauhiniastatins 1– 4 from *Bauhinia purpurea*. *Journal of natural products*, 69(3), 323-327.
40. Pino Pérez, O., y Jorge Lazo, F. (2010). Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de protección vegetal*, 25(1), 34-43.
41. Pizzolatti, M. G., Cunha Jr., A., Szpoganicz, B., Sousa, E. D., Braz-Filho, R., & Schripsema, J. (2003). Flavonoids glycosides from leaves and flowers of *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Química Nova*, 26(4), 466-469.
42. Raj Kapoor, B., Jayakar, B., Muruges, N., & Sakthisekaran, D. (2006). Chemoprevention and cytotoxic effect of *Bauhinia variegata* against N-nitrosodiethylamine induced liver tumors and human cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology*, 104(3), 407-409.
43. Rao, Y., Fang, S. H., & Tzen, Y. M. (2008) Anti-inflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytotherapy Research*; 22: 957-962.
44. Reddy, M. V., Reddy, M. K., Gunasekar, D., Caux, C., & Bodo, B. (2003). A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. *Phytochemistry*, 64(4), 879-882.
45. Rivera Quijano, F. (2015). Características generales de bioterio de experimentación y su aplicación en control de calidad de vacuna antirrábica. Informe pasantía. Universidad la Salle. Colombia
46. Rojo García, O. (2016). Actividad hipoglucemiante de los extractos de las hojas de *Bauhinia variegata* L. en ratones de la cepa CD-1. licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

47. Rojas, C. G., & Riveros, E. R. (2008). Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*.
48. Roldan Reyes E. (2016). Introducción a la toxicología. UNAM, FES Zaragoza.
49. Román R., Alarcón F., Lara A., & Flores J. (1992). Hypoglycemic effect of plants used in México as antidiabetics. *Archives of Medical Research*. 23, 59-64.
50. Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México* (No. C/582.09725 F56/2001).
51. Steven G. Gilbert (2012). *A Small Dose of Toxicology*, 2nd Edition. Healthy World Pres
52. Torres-Colín, R., Duno de Stefano, R., y Lorena Can, L. (2009). El género *Bauhinia* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cercideae) en la península de Yucatán (México, Belice y Guatemala). *Revista mexicana de biodiversidad*, 80(2), 293-301.
53. Valdés-Iglesias O, Díaz N, Cabranes Y, Acevedo ME, Areces AJ, Graña L. (2003) Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia*; 16:36-45.
54. Yadava, R. N., & Reddy, V. M. S. (2001). A new flavone glycoside, 5-hydroxy 7, 3', 4', 5'-tetra-methoxyflavone 5-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside from *Bauhinia variegata* Linn. *Journal of Asian natural products research*, 3(4), 341-346.
55. Zhao, Y. Y., Cui, C. B., Cai, B., Han, B., & Sun, Q. S. (2005). A new phenanthraquinone from the stems of *Bauhinia variegata* L.

RECUPERADO DE:

Pubchem.<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Estructuras químicas

Recuperadas entre Junio y Noviembre de 2018.

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13056:sobre-toxicologia&Itemid=42283&lang=es