

Efecto de *Bauhinia variegata* sobre los niveles de glucosa

Carmen de los Ríos*, Herminia Gil y Doris Hidalgo Báez

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes
Mérida, Venezuela

Recibido: 22-06-98 Aceptado: 13-09-99

Resumen

La especie *Bauhinia variegata* L. "Casco de Vaca" (Caesalpinaceae) es usada ampliamente en la medicina tradicional venezolana para el tratamiento de la diabetes. Una evaluación biológica *in vitro* fue realizada a las hojas secas y molidas, extraídas con agua a ebullición durante 25 minutos. El extracto acuoso fue filtrado, liofilizado y sometido a una evaluación de su actividad hipoglucemiante. Los resultados obtenidos muestran el efecto de diferentes concentraciones de las hojas de la especie estudiada sobre la disminución de la concentración de la glucosa, esto sugiere que el "Casco de Vaca" podría tener un efecto hipoglucemiante.

Palabras clave: Actividad hipoglucemiante; *Bauhinia variegata*; Caesalpinaceae; diabetes.

Effect of *Bauhinia variegata* on glucose level

Abstract

The species *Bauhinia variegata* L. "Casco de Vaca" (Caesalpinaceae) is used for the treatment of diabetes in the folk medicine of Venezuela. A biological evaluation *in vitro* was carried out on the leaves dried and ground, which were submitted to extraction with boiling water for 25 minutes. The aqueous extract was filtered, lyophilized and was selected to accomplish an evaluation of its antidiabetic activity. The results show the effect of different concentrations of the leaves of this species in glucose level decrease and this suggest that the "Casco de Vaca" should have a hypoglucemiant activity.

Key words: *Bauhinia variegata*; Caesalpinaceae; diabetes; hypoglucemiante activity.

Introducción

Una de las enfermedades de mayor índice de morbilidad y mortalidad en la actualidad es la diabetes mellitus o diabetes sacarina, que consiste en un aumento del nivel de azúcar en la sangre (hiperglucemia), y es provocada por una insuficiencia en la producción y/o en la utilización de la insulina,

hormona producida por la actividad endocrina del páncreas. La insulina es necesaria para la utilización y el metabolismo de la glucosa sanguínea por las células del cuerpo; controla el uso de la glucosa por las células y regula el nivel de azúcar en la sangre. La energía derivada de la utilización de la glucosa es necesaria para el metabolismo de grasas y proteínas. Si existe una insuficiencia en la secreción de la insulina y/o en su

* Autor para la correspondencia. Fax: 074-401286. E-mail: dlosrios@ciens.ula.ve

utilización, la glucosa no es utilizada adecuadamente y se manifiesta la diabetes.

La diabetes ha sido clasificada en dos grupos: diabetes tipo I, cuando la secreción de la insulina es insuficiente, y diabetes tipo II, cuando los receptores específicos para la insulina son ineficientes (1). La hiperglucemia diabética es el factor de mayor contribución en el desarrollo de las complicaciones en la diabetes crónica. La presencia de altas concentraciones de glucosa circulante o intracelular causa daños irreversibles en los tejidos. Las complicaciones secundarias irreversibles que surgen con el tiempo, debido al deterioro que sufren muchos órganos y tejidos por la presencia de altos niveles de glucosa, son: cambios en los ojos, particularmente en la retina y en el cristalino, pérdida de la visión, cataratas, arteroesclerosis y envejecimiento prematuro.

La reacción de glucación no enzimática de proteínas es uno de los mecanismos propuestos para explicar el daño causado por el exceso de glucosa en sangre, asociado con la diabetes. Esta reacción se basa en la capacidad de la glucosa para reaccionar químicamente con las proteínas; consiste en la unión del grupo carbonilo de la molécula de azúcar y ciertos grupos libres de aminoácidos de las proteínas (2). Esta reacción, conocida como reacción de Maillard, aparece en alimentos horneados o almacenados (3-5), ocurre lenta e irreversiblemente bajo condiciones fisiológicas en individuos normales, y en consecuencia, contribuye a la patogénesis de la edad. La glucación no enzimática de proteínas probablemente inicia las complicaciones secundarias irreversibles conocidas como envejecimiento prematuro que están asociadas con la diabetes mellitus, y que son causadas por los productos finales de glucación avanzada, AGEs (6, 7).

La glucosa es el azúcar que más contribuye en el proceso de formación de estos productos irreversibles de glucación avanzada, ya que aún cuando es la menos reactiva, es la que se encuentra en mayor propor-

ción en nuestro organismo. Las proteínas glucadas sufren alteraciones en su estructura, cambiando sus propiedades funcionales y biológicas (8). La hemoglobina glucada aumenta su afinidad por el oxígeno, lo que ocasiona una disminución del transporte de oxígeno de los pulmones hacia los tejidos; en el lente cristalino se producen precipitaciones y formación de cataratas, y la glucación del colágeno causa la arteroesclerosis.

La diabetes es diagnosticada clínicamente a través de medidas de glucosa en sangre y de medidas de hemoglobina glucada.

El tratamiento usual para la diabetes es la administración subcutánea de insulina, particularmente en los niños y en pacientes tipo I, y la administración de sulfonamidas, unida a una dieta balanceada y pérdida de peso, para los diabéticos tipo II. Estos tratamientos no previenen las complicaciones secundarias irreversibles, conocidas como envejecimiento prematuro, por esto actualmente hay gran interés en las investigaciones que conduzcan al hallazgo de sustancias efectivas en la disminución de la glucosa sanguínea o inhibitorias de las reacciones de glucación no enzimáticas, que serían de gran beneficio terapéutico para las patologías relacionadas con la diabetes

Una gran variedad de plantas es utilizada por la Medicina Tradicional Venezolana para la terapia de la diabetes, siendo la especie *Bauhinia variegata* L. (Caesalpinaceae) Urape morado, "Casco de Vaca", la que goza de mayor popularidad dentro de la comunidad (9, 10).

Esta especie, ampliamente distribuida en Venezuela, es un árbol de mediana altura, flores de color blanco, rosado o violeta, muy parecidas a las orquídeas. El fruto es una legumbre de aproximadamente 25 cm de largo. Uno de sus modos de empleo es tomar, tres veces al día, una decocción o infusión de 20 gramos de hojas en un litro de agua (10).

Basándonos en la información etnobotánica se seleccionó el "Casco de Vaca" para ensayar una metodología *in vitro* sin la utilización de animales, no reportada anteriormente, para evaluar su actividad hipoglucemiante e inhibitoria de la glucación.

Materiales y Métodos

Colección de la planta

La especie *Bauhinia variegata* L. fue colectada en Mérida, en el Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes, (C. de los Ríos, D. Hidalgo Báez y J. Angulo, Abril 1996), autenticada por el Perito Forestal Giuseppe Adamo, Centro Jardín Botánico de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, y un voucher (# 1) está depositado en el Herbario MERC de esta Facultad.

Preparación del extracto vegetal

Aproximadamente 500 gramos de hojas secas y molidas fueron extraídos con agua a ebullición durante 25 minutos. El extracto fue filtrado, liofilizado y almacenado a -4°C para su estudio posterior. El sólido fue utilizado para preparar las muestras vegetales a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL en buffer Trizma 10 mM, pH 7,3 y evaluar *in vitro* su actividad hipoglucemiante utilizando reactivos para uso de diagnóstico *in vitro* (Sigma Diagnostics). Todas las soluciones utilizadas para preparar las muestras de reacción fueron esterilizadas por ultrafiltración (discos Nalgene 0,2 μ) y las muestras de reacción fueron preparadas a 0°C y bajo luz UV en tubos estériles (Nalgene).

Disminución de la glucosa

Para estudiar el efecto de la planta sobre los niveles de glucosa se incubaron a 37°C y pH 7,3 durante un período de 21 días, 6 mL de glucosa 50 mM, 2 mL de muestra vegetal (5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL) y 2 mL de buffer Trizma 10 mM.

El efecto de la planta sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina se estudió incubando a 37°C y pH 7,3 durante 21 días, 6 mL de glucosa 50 mM, 2 mL de hemoglobina humana 0,465 mM y 2 mL de muestra vegetal (5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL) en buffer Trizma 10 mM.

Para determinar la cantidad de glucosa en las muestras vegetales se incubaron muestras controles: Estándar: glucosa 16,7 mM, y Blancos: 5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL de muestra vegetal en buffer Trizma 10 mM, pH 7,3. La cantidad de glucosa fue determinada a diferentes intervalos de tiempo, usando el reactivo Glucose (Trinder) Kit N° 315, y midiendo la absorbancia (A) a 505 nm, en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2. La concentración final de glucosa se determinó cuantitativamente por medio de la siguiente relación:

$$[Glu\ cos\ a]_m\ (mM) = \frac{A_m - A_b}{A_s - A_b} [Glu\ cos\ a]_s\ (mM)$$

donde los siguientes símbolos fueron usados: [] = concentración mM; m = muestra; b = blanco; y s = estándar

Los valores de la concentración de glucosa en los blancos de 5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL de muestra vegetal fueron 0,225 mM, 0,244 mM y 0,273 mM, respectivamente.

Resultados y Discusión

La Tabla 1 muestra la concentración de glucosa en función del tiempo para las incubaciones de glucosa 30 mM en buffer Trizma 10 mM, pH 7,3 a 37°C , a diferentes concentraciones de muestra vegetal (1mg/mL, 2 mg/mL y 4 mg/mL). La concentración de glucosa disminuye con el tiempo de incubación y con el aumento de la concentración de la muestra vegetal. Observándose que al cabo de 498 horas de incubación y al aumentar la concentración de la especie vegetal (1-4 mg/mL) la concentración final de glucosa disminuyó en 26,60%, 38,12% y 52,93%, respectivamente. Estos valores in-

Tabla 1
Concentración consumida y concentración final de glucosa en las incubaciones de muestra vegetal con glucosa 30 mM, en buffer Trizma 10 mM, a 37°C y pH 7,3

Tiempo (h)	Concentración consumida de glucosa (mM)			Concentración final de glucosa (mM)		
	Concentración de la muestra vegetal			Concentración de la muestra vegetal		
	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
0	0,00	0,00	0,00	30,45	30,49	30,55
48	0,00	0,00	0,85	30,45	30,50	29,70
65	0,29	0,62	1,95	30,26	29,87	28,60
161	1,05	1,90	2,77	29,40	28,59	27,78
209	-	5,65	8,50	31,35	24,84	22,05
328	5,67	7,05	9,97	24,78	23,44	20,58
402	6,49	8,91	11,79	23,96	21,58	18,76
498	8,10	11,59	16,17	22,35	18,90	14,38
%[G] _{consumida}	26,60	38,12	52,93			

Tabla 2
Concentración consumida y concentración final de glucosa en las reacciones de glucación no enzimática de la hemoglobina humana nativa $9,3 \times 10^{-2}$ mM con glucosa 30 mM y muestra vegetal, a 37°C y pH 7,3

Tiempo (h)	Concentración consumida de glucosa (mM)			Concentración final de glucosa (mM)		
	Concentración de la muestra vegetal			Concentración de la muestra vegetal		
	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
0	0,00	0,00	0,00	30,45	30,49	30,55
48	9,36	11,25	13,05	21,09	19,24	17,50
65	10,22	12,46	14,31	20,23	18,03	16,24
161	14,90	15,81	16,23	15,55	14,68	14,32
209	16,04	16,97	19,08	14,41	13,52	11,47
402	16,37	19,02	20,62	14,08	11,47	9,93
498	18,85	21,05	23,45	11,60	9,44	7,10
%[G] _{consumida}	61,90	69,04	76,76			

dican que la muestra vegetal disminuye los niveles de glucosa con el tiempo de incubación y con el aumento de la concentración del extracto vegetal, lo cual es indicativo de un efecto hipoglucemiante del "Casco de Vaca".

La Tabla 2 muestra la concentración de glucosa en función del tiempo para las incubaciones de glucosa 30 mM en buffer Trizma 10 mM, pH 7,3 a 37°C, con hemoglobina humana nativa $9,3 \times 10^{-2}$ mM, a diferentes concentraciones de muestra vegetal (1mg/mL,

2 mg/mL y 4 mg/mL), la concentración de glucosa disminuyó en 61,90%, 69,04% y 76,76%, respectivamente. La cantidad de glucosa consumida en esta reacción es mayor que la cantidad de glucosa consumida sólo con la muestra vegetal a las diferentes concentraciones estudiadas. Este resultado es consistente con el efecto hipoglucemiante de la muestra vegetal (Tabla 1) y con la reacción de glucación no enzimática de la hemoglobina (11).

Las Figuras 1 y 2 representan gráficamente el efecto que ejerce la concentración de la planta sobre la concentración final de glucosa.

La glucosa *in vivo* no sólo reacciona con la hemoglobina sino también con otras proteínas en el organismo (6), por lo tanto, una disminución de los niveles de glucosa en un sistema *in vivo* puede ser debido a la reacción de glucación con las proteínas en el organismo, a la reacción de la glucosa con la muestra vegetal, y/o a la reacción de la glucosa con la muestra vegetal y con las proteínas.

Los resultados obtenidos indican que la disminución en los niveles de glucosa es debido a la reacción de la glucosa con la muestra vegetal (Tabla 1) y a la reacción de la glucosa con la hemoglobina (Tabla 2). La cantidad de glucosa consumida por la hemoglobina disminuye con la concentración de muestra vegetal (1-4 mg/mL) en 35,30%, 30,92% y 23,83%, respectivamente.

$$\%[\text{G}]_{\text{Consumida Total}} = \%[\text{G}]_{\text{Consumida por la Hemoglobina}} + \%[\text{G}]_{\text{Consumida por la Muestra vegetal}}$$

$$\%[\text{G}]_{\text{Consumida por la Hemoglobina}} = \%[\text{G}]_{\text{Consumida Tabla 2}} - \%[\text{G}]_{\text{Consumida Tabla 1}}$$

Este resultado revela una disminución en la glucación no enzimática de la hemoglobina, lo que hace suponer que la muestra vegetal inhibe la glucación de la hemoglobina. Una disminución en la glucación de la hemoglobina contribuye a disminuir los efectos secundarios de las complicaciones asociadas con la diabetes mellitus y con el normal envejecimiento. Estudios posteriores

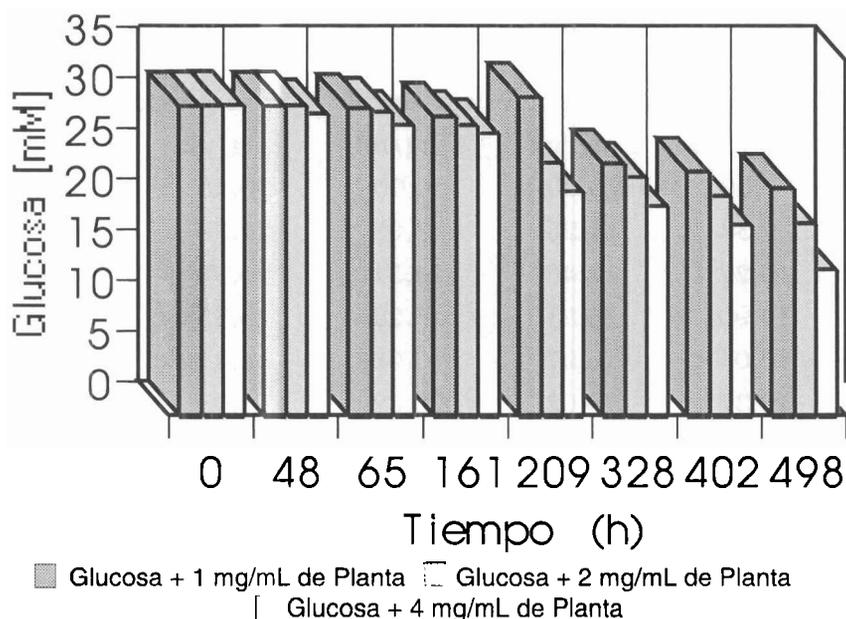


Figura 1. Efecto de la concentración de la muestra vegetal sobre la concentración final de glucosa en las incubaciones de glucosa 30 mM y muestra vegetal en buffer Trizma 10 mM, a 37°C y pH 7,3.

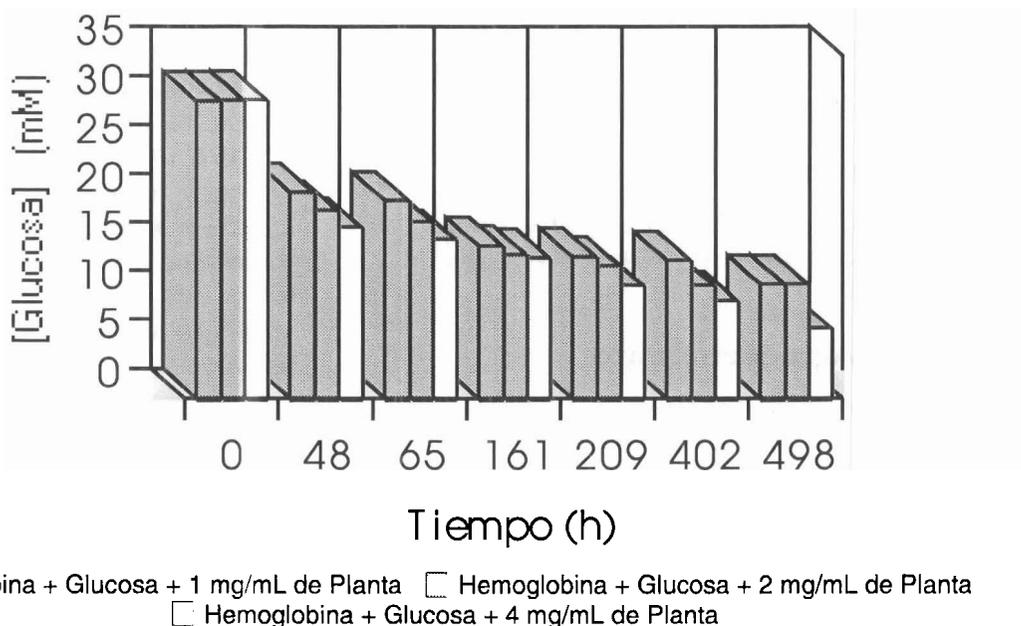


Figura 2. Efecto de la concentración de la muestra vegetal sobre la concentración final de glucosa en la glucación no enzimática de la hemoglobina humana $9,3 \times 10^{-2}$ mM con glucosa 30 mM, a 37°C y pH 7,3.

sobre la inhibición de la muestra vegetal con la hemoglobina y otras proteínas están en proceso.

Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten establecer una correlación entre la concentración de la planta y la concentración de la glucosa, y sugieren un efecto del "Casco de Vaca" sobre la disminución de los niveles de glucosa, lo que podría causar una disminución en el proceso de formación de los productos irreversibles de glucación avanzada, AGEs, que están asociados con la diabetes y así, reducir el riesgo a los daños irreversibles causados en los tejidos por la presencia de altas concentraciones de glucosa. Esto plantea una posible efectividad de esta planta como agente hipoglucemiante.

La metodología *in vitro* ensayada no requiere de sistemas biológicos, tiene la ventaja de ser un análisis rápido, reproducible y técnicamente sencillo que proporciona útil

información, como es, la cuantificación precisa y confiable de la concentración de glucosa y que puede ser utilizada como un ensayo preliminar para evaluar el efecto de las especies vegetales medicinales sobre la disminución de la glucosa y su posible actividad biológica, pues permite tener mayor certeza sobre el efecto del material vegetal estudiado, ya que *in vivo* la glucosa reacciona tanto con la hemoglobina como también con muchas otras proteínas, por consiguiente, una disminución de la glucosa no sólo sería causada por los principios activos que pudieran estar presentes en la especie estudiada, responsables de su actividad, sino también por la presencia de estas otras proteínas en los sistemas *in vivo*.

El extracto vegetal no sólo disminuye la glucosa sino que también disminuye la glucación no enzimática de la hemoglobina. Esto indica que la planta no sólo podría tener un efecto hipoglucemiante sino también un efecto inhibitorio sobre la reacción de glucación de la hemoglobina.

Los resultados estimulan posteriores estudios con sistemas *in vivo* que permitan confirmar su actividad etnomédica, y la realización de una evaluación fitoquímica bio-dirigida, con el fin de aislar el o los compuestos activos biológicamente.

Esta evaluación biológica *in vitro*, sin la utilización de animales, no ha sido reportada anteriormente.

Agradecimiento

Agradecemos al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico, CDCHT, de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, por el financiamiento de esta investigación (C-766-95-03-C y C-779-96-08A). También expresamos una especial gratitud a Betty Ramírez, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, por transcribir este trabajo.

Referencias Bibliográficas

1. LIPINSKI C., HUTSON N.J. **Annual Report in Medicinal Chemistry** 19: 169, 1984.
2. BUNN H.F., HANEY D.N., GABBAY K.H., GALLOP P.M. **Biochem Biophys Res Comm** 67: 103-109, 1975.
3. REYNOLDS T.M. **Adv Food Res** 14: 167-277, 1963.
4. ALHIKARI H.R., TAPPED A.L. **Journal of Food Sci** 38: 486-488, 1973.
5. MOHAMMAD A., OLCOTT H.S., FRAENKEL-CONRAT H. **Arch Biochem** 24: 157-167, 1977.
6. COHEN M.P. **Diabetes and Protein Glycosylation Measurement and Biologic Relevance**, Springer-Verlag, New York (USA), 1986.
7. MONNIER V.M., SELL D.R., MIYATA S., NAGARAJ R.H. The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology. **Advances in Life Science**, Birkhauser-Verlag Basel, p. 393-414, 1990.
8. VAN BOEKEL M.A.M., VAN DER BERGH P.J.P.C., HOENDERS H.J. **Biochimica et Biophysica Acta** 1120: 201-204, 1992.
9. LÓPEZ PALACIOS S. **Usos Médicos de Plantas Comunes**, Talleres Gráficos de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela), p. 46, 1987.
10. GIL OTAIZA R. **Plantas usuales en la medicina popular venezolana**, Editorial Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela), p. 82, 1997.
11. HIGGINS P.J., BUNN H.F. **Journal of Biological Chemistry** 256: 5204-5208, 1981.