

**Actividad antibacteriana, determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu y toxicidad en *Artemia salina* de la especie vegetal *Bauhinia variegata***

Antibacterial activity, determination of total polyphenols by Folin-Ciocalteu and toxicity in *Artemia salina* of plant species *Bauhinia variegata*

Diana Carolina Pimentel Betancurt<sup>||</sup>, Milton Gomez Barrera<sup>||</sup>, Luis Esteban Castillo Palacios<sup>||</sup>.

**RESUMEN**

Los compuestos fenólicos, entre los cuales se encuentran los flavonoides, poseen propiedades farmacológicas como antioxidantes, antibacterianos, vasodilatadores.

La especie *Bauhinia variegata* se caracteriza por su acción antidiabética y antibacteriana y es importante correlacionar la contribución de los constituyentes polifenólicos de la actividad funcional presentada, además determinar su toxicidad en *Artemia salina*. Para confirmar presencia de fenoles, se realizó análisis fitoquímico preliminar. Con la confirmación de fenoles y por su abundancia, se cuantificaron por Folin-Ciocalteu. La actividad antibacteriana se realizó usando técnica de difusión en disco. Para evaluar la toxicidad se emplearon nauplios de *A. salina*. Se observó presencia de compuestos fenólicos, saponinas, mostrando diferentes coloraciones. La cuantificación de polifenoles totales mostró 28, 5% mg de equivalentes de ácido gálico (EAG /100 g de extracto polar). El análisis frente a las bacterias presentó halos de inhibición. Se encontró una CL50 de 1205 µg/mL frente *A. salina*, indicando que el extracto polar no es tóxico. Los resultados obtenidos indican el potencial de compuestos fenólicos de la planta y su posible uso como agente antibacteriano.

**PALABRAS CLAVE**

Actividad antibacteriana, *Bauhinia variegata*, Poli fenoles, Folin-Ciocalteu, Toxicidad.

**ABSTRACT**

Phenolic compounds, which include flavonoids, possess pharmacological properties such as antibacterial, antioxidant, and vasodilating. The species of *Bauhinia variegata* is characterized by its antidiabetic and antibacterial action and it is important to correlate the contribution of the Polyphenolic constituents of the functional activity presented, in addition to determine its toxicity to *Artemia salina*. Preliminary phytochemical analysis was performed to confirm the presence of phenols. After confirming phenols and their abundance, Folin-Ciocalteu reagent was used to quantify phenols. The antibacterial activity was performed using the disk diffusion technique. *A. salina* nauplii were used to assess toxicity. Presence of saponins, phenolic compounds, was observed showing different colorations. The

quantification of total polyphenols showed 28, 5% mg equivalent of Gallic acid (EAG 100 g of extract polar). Against bacteria analysis presented inhibition halos. Found a CL50 of 1205 µg/mL front *A. salina*, indicating that the summary is not toxic. Results indicate the phenolic compound potential of the plant and its possible use as an antibacterial agent.

**KEY WORDS**

Antibacterial activity, *Bauhinia variegata*, Polyphenols, Folin-Ciocalteu, Toxicity.

**INTRODUCCIÓN**

Desde la antigüedad se ha conocido el uso empírico de las plantas para el beneficio de la salud del

<sup>||</sup> Grupo de investigación Búsqueda de Principios Bioactivos, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. Contacto: [dpimentell@uqvirtual.edu.co](mailto:dpimentell@uqvirtual.edu.co) Recepción: 3-07-2015. Aceptación: 3-14-2016.

hombre en múltiples culturas y la transmisión de estos conocimientos a través de generaciones. Hasta el siglo XVIII se conocían las propiedades curativas de algunas plantas, su efecto sobre el organismo y su modo de aplicación, pero se desconocían sus principios activos. Con el desarrollo de las teorías de la evolución y herencia genética, el uso del microscopio y el nacimiento de ciencias exactas y naturales, fue posible el reconocimiento y el aislamiento de los principios activos de muchas plantas medicinales.<sup>1</sup> Estos principios activos o metabolitos secundarios, son los responsables de los efectos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades y por lo tanto, en la fabricación de medicinas naturales, así también como sustancias alelopáticas para el control de plagas.

Las plantas medicinales conformadas por una variedad de metabolitos secundarios, han constituido desde tiempos remotos un recurso para cubrir las necesidades terapéuticas. Hoy en día su estudio se ha convertido en un hecho científico universal que trasciende no solo en beneficio de la salud, sino también en el sistema productivo y económico de un país.<sup>2</sup>

El género *Bauhinia*, pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Caesalpinieaceae*, que comprende alrededor de 400 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales.<sup>3</sup> Varias especies de este género, se le han atribuido efectos biológicos como es actividad anticancerígena,<sup>4</sup> anti-inflamatoria, antidiabética, antimicrobiana<sup>5</sup> y propiedades antitrombóticas.<sup>6</sup>

Dentro de este género, encontramos a la especie *Bauhinia variegata*, conocida como casco de buey, el cual es un árbol caducifolio que alcanza unos 6-8 metros de altura, sus hojas son simples, de suborbiculares a ovales, de 6-20 cm de longitud y lóbulos redondeados.<sup>7</sup> Se encuentra distribuida en un amplio rango de zonas tropicales a nivel mundial.<sup>8</sup> Es utilizada como astringente, tónico, para enfermedades de la piel, bronquitis, la lepra, úlceras y como antiinflamatorio en las medicinas tradicionales de Sur Asia oriental.<sup>9</sup>

El hombre ha venido utilizando los antibióticos desde hace tiempo para el control de microorganismos patógenos de una forma generalizada e indiscriminada, lo que ha generado una resistencia bacteriana; por lo tanto es relevante la búsqueda de compuestos bioactivos de especies vegetales como agentes antimicrobianos. Varias investigaciones han atribuido a los polifenoles (flavonoides) actividades antibacterianas<sup>10</sup> y según Barragan,<sup>11</sup> se han encontrado dichos

compuestos en especies del género *Bauhinia*.

Por lo tanto, en el presente estudio se determinó la actividad antibacteriana de *B. variegata* frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli*, cuantificación de polifenoles por Folin-Ciocalteu y toxicidad en *Artemia salina*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

Las hojas de *Bauhinia variegata* se recolectaron en la Universidad del Quindío, departamento del Quindío, municipio de Armenia, a una altitud de 1500 m.s.n.m. Las hojas se colectaron en horas de la mañana. Tres ejemplares fueron acondicionados y depositados en el Herbario de la Universidad del Quindío (HUQ), para la verificación de su identidad taxonómica, y permanecen en el CIBUQ bajo la serie de registro N°034139.

### PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA EL TRABAJO FITOQUÍMICO

Las hojas recolectadas se secaron en una incubadora (GALLENKAMP Economy sinze 2 incubator modelo INA.301.130G) por una semana a una temperatura de 40°C. Posteriormente el material seco, fue molido y después tamizado hasta obtener un tamaño de partícula aproximadamente de 1 a 2,5 mm, que permitiera un mejor contacto con el solvente.

### OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PLANTA

El material vegetal tamizado (590,2907 g) se maceró con 500 mL de etanol rectificado al 96% en un matraz de 1 litro por 24 horas, luego se pasó a un percolador de 1L y se hizo la extracción con etanol drenando a un flujo de 60 gotas/min. El extracto obtenido se concentró con la ayuda de un equipo de rotaevaporación LABCONCO a presión reducida de -0,56 BAR y a 60°C para reciclar el solvente y realizar el agotamiento del material vegetal.

Se realizaron pruebas fitoquímicas preliminares, según la metodología de Sanabria.<sup>12</sup> Luego se llevó a ultrasonido 30 g del extracto etanólico para realizar una extracción líquido sólido con solventes apolares como el éter de petróleo, hexano y diclorometano, la parte que no solubilizó (26,93g) se denominó extracto polar (EP) y a éste se le realizaron varios fraccionamientos por cromatografía líquida en columna (CLC), determi-

nación de polifenoles y además se evaluó la actividad antibacteriana y toxicidad en *A. salina*.

### FRACCIONAMIENTO POR CLC

Se empleó 1 g del extracto polar y alúmina ( $Al_2O_3$ ) estandarizada con un tamaño de partícula de 0,063-0,200 mm, se realizó un desarrollo elutrópico con diclorometano, acetato de etilo, metanol, mezcla de metanol-ácido acético-agua y por último agua caliente.

Una vez obtenidas las fracciones de la CLC, se procedió a realizar cromatografía en capa fina y de esta forma poder observar el perfil cromatográfico y agrupar las fracciones con Rf similares; también se verificó en cada fracción la presencia de flavonoides con las reacciones de coloración.

### DETERMINACIÓN DE POLIFENOLOS POR FOLIN-CIOALTEU

La concentración de polifenoles en el extracto polar fue determinada por espectrofotometría utilizando como agente oxidante el reactivo de Folin-Ciocalteu, empleando una curva de calibración con una solución estándar de ácido gálico y utilizando 100 mg del extracto polar.

El procedimiento consistió en adicionar a cada uno de los estándares y muestras, 500  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y sonificar por 5 minutos. Posteriormente se adicionó 1,5 mL de  $Na_2CO_3$  al 20% y se dejó reposar por 45 minutos a temperatura ambiente y alejada de la radiación solar. La absorbancia fue medida a 760 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg EAG/g extracto).<sup>13</sup>

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Las bacterias patógenas que se utilizaron en el presente trabajo fueron *Escherichia coli* (BL21) y *Staphylococcus aureus* (aislado clínico), las cuales fueron donadas por El Centro de Investigaciones de Ciencias Biomédicas de la Universidad del Quindío, grupo de investigación GYMOL.

La evaluación de la actividad antibacteriana se le determinó al extracto polar y a la fracción F21 por el método de difusión en discos,<sup>14</sup> utilizando agar Mueller-Hinton preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Las concentraciones evaluadas del extracto fueron las siguientes: 40000  $\mu$ g/mL (E40), 2000  $\mu$ g/mL (E4) y la fracción F21 a 2000  $\mu$ g/mL (F4) y 1000  $\mu$ g/mL

(F3) para la evaluación frente a *E. coli*. Para la evaluación frente a *S. aureus* se utilizaron concentraciones del extracto a 1000 y 2000  $\mu$ g/mL (E3 y E4) y la fracción F21 a 1000 y 2000  $\mu$ g/mL (F3 y F4).

Todas las soluciones del extracto y la fracción F21 se solubilizaron en DMSO al 10%; se usó como control positivo discos impregnados con Ciprofloxacina (100  $\mu$ g/mL) y Ampicilina (500  $\mu$ g/mL) y DMSO como control negativo.

### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se esterilizaron en autoclave todos los materiales y medios de cultivo a utilizar. Las bacterias fueron inoculadas en tubos de ensayo tapa rosca que contenían 7 mL de tioglicolato y se adicionó 100  $\mu$ L de las bacterias que se encontraban en glicerina, luego se incubó a 37°C por 24 horas. Cuando se alcanzó una turbidez equivalente al estándar No. 0,5 de la escala de MacFarland equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL; se sumergió un hisopo (estéril y seco) en la suspensión bacteriana con el cual se inoculó en las placas de agar Mueller-Hinton, estriándola en al menos 3 direcciones, dando vuelta la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría, procurando cubrir la superficie total del agar.<sup>15</sup> Pasados 30 minutos de la siembra se ubicaron los discos impregnados con 0,1 mL de las diferentes concentraciones del extracto polar y los respectivos controles; se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se determinaron las actividades antibacterianas midiendo el diámetro de la zona de inhibición en milímetros, para todos los ensayos se realizaron 3 réplicas.

### EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

Se preparó una solución salina al 3,8 %, se utilizó aproximadamente 500 mL de esta solución para la eclosión de *Artemia salina*.

A partir de una solución de 2000  $\mu$ g/mL del extracto polar en DMSO al 10%, se prepararon diluciones seriadas de 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 y 5  $\mu$ g/mL. En recipientes de 5 mL se adicionaron 20 nauplius de *Artemia salina* con 1 mL de DMSO al 10%, 1 mL de las diluciones y fueron aforados con solución salina.<sup>16</sup>

Para el control se tomaron también 20 nauplius de *Artemia salina*, un mililitro de DMSO al 10% y aforado con solución salina. Se realizó el conteo de larvas muertas a las 24 horas y los datos se analizaron con el programa Statgraphics Centurion empleando el método

do PROBIT; este ensayo se realizó por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Las hojas de *B. variegata* presentaron cantidad abundante de flavonoides mediante dos pruebas realizadas (Shinoda y HCl al 10%); la reacción de Shinoda nos demostró la presencia de flavonoides con el núcleo  $\gamma$ -benzopirona (flavonas, flavononas, flavonoles, flavonoles o xantonas) debido a la coloración abundante rojo intenso y la prueba HCl al 10% indicó la presencia de leucoantocianidinas por su coloración abundante rojo-café.<sup>17, 18</sup> Este resultado es concordante con varias investigaciones donde han encontrado dichos metabolitos secundarios en varias especies del género *Bauhinia*.<sup>9, 25, 26</sup>

En el análisis fitoquímico preliminar también se encontró presencia de taninos y saponinas al obtener coloración verde oscuro para la reacción de  $\text{FeCl}_3$  (taninos) y formación abundante de espuma (saponinas) después de una vigorosa agitación.<sup>18</sup> En la tabla 1, se resumen los resultados de los ensayos cualitativos de coloración y precipitación para la detección de metabolitos secundarios en *B. variegata*.

### DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES POR FOLIN- CIICALTEU

Según los resultados del análisis fitoquímico preliminar, se encontró presencia abundante de flavonoides y taninos, los cuales pertenecen al grupo de los polifenoles, debido a esto, se procedió a realizar una cuantificación por Folin-Ciocalteu del extracto polar.

Se encontró que la cantidad porcentual de polifenoles de la muestra (extracto polar) era de 28,52033 (mg EAG/ g de extracto polar) con una desviación estándar de  $\pm 0,1432$ ; dicho resultado indica abundancia de polifenoles en la especie vegetal, puesto que solo se evaluó la presencia en el extracto polar. Otras investigaciones han encontrado valores oscilantes entre  $402.79 \pm 2.81$  mg EAG/g, en el extracto etanólico de corteza de *B. variegata* y  $14.16 \pm 1.24$  mg EAG/ g, en el acuoso de hojas de *B. malabárica*,<sup>1</sup> por lo tanto se deduce que *B. variegata* presenta mayor contenido de polifenoles tanto en su corteza como hojas en comparación con la especie malabárica, convirtiendo a la especie en candidato para el aislamiento de compuestos fenólicos como son los flavonoides, responsables de varias actividades biológicas, destacándose su capacidad antioxidante y antibacteriana.<sup>26</sup>

### FRACCIONAMIENTO POR CLC

Por medio de la extracción líquido-sólido realizada

**Tabla 1.** Resultado del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de hojas de *B. variegata*.

Prueba efectuada	Resultado	
Alcaloides	Dragendorff	-
	Mayer	-
	Wagner	-
	Hager	-
Flavonoides	Shinoda	+++
	HCl al 10%	+++
Nafto y/o antraquinonas	Borntrager-Kraus	-
Taninos	Gelatina Sal	+
	$\text{FeCl}_3$	+++
Saponinas	Espuma	+++
Esteroides y/o triterpenoides	CCD Libermann-Burchard	-

(+++): Presencia abundante, (+): Presencia escasa, (-): No detectado

al extracto con solventes de baja polaridad (éter de petróleo, hexano y diclorometano), se desengrasó y se logró separar algunos compuestos por sus afinidades con dichos solventes;<sup>12</sup> además verificar si la especie presentaba flavonoides de baja polaridad realizando un seguimiento a cada extracción con la prueba de Shinoda,<sup>17</sup> dando un resultado negativo, también se realizó dicha prueba a la parte polar, encontrándose resultado positivo; debido a esto se realizó cromatografía líquida en columna (CLC) para lograr la separación de los compuestos.

De la CLC se obtuvieron 4 fracciones con el solvente diclorometano, con el acetato de etilo se obtuvieron 6 fracciones, el metanol aportó un total de 11 fracciones, la mezcla metanol-ácido acético-agua (8:1,5:0,5) proporcionó 23 fracciones y el agua caliente 4 fracciones. Al realizar el seguimiento de las fracciones con la prueba de Shinoda, se observó que la fracción 21 a la 25 presentaron una coloración intensa roja, por lo cual se infiere la presencia de flavonoides en dichas fracciones; además la mezcla de solventes que se empleó fue metanol, ácido acético, agua (8:1,5:0,5); según la literatura esta mezcla de solventes es utilizada para la extracción de estos metabolitos.<sup>19</sup> El perfil cromatográfico de la fracción 21 a la 25 fue similar, por lo cual se decidió mezclar las fracciones y denominarlas F21.

#### ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Todos los bioensayos se realizaron por triplicado, los promedios de los halos de inhibición para cada concentración presentaron desviaciones estándar con valo-

res menores o iguales a 0,5, lo que indica que los datos obtenidos en los tres ensayos presentan distribuciones homogéneas y por lo tanto existe poca dispersión.

Como se observa en la **Tabla 2**, en general las bacterias (*E.coli* y *S. aureus*) presentaron sensibilidad al extracto polar y la fracción evaluada. Para *E. coli*, el mayor porcentaje de inhibición obtenido fue de 57,1 % para F4 (2000 µg/mL); para *S. aureus* se obtuvo porcentaje de 64,3% para E4 (2000 µg/mL), se concluye que *E. coli* fue más sensible a la fracción que al extracto, mientras que *S. aureus* presentó mayor sensibilidad al extracto que a la fracción.

Se evidencia que la bacteria con mayor respuesta de inhibición fue *S. aureus* puesto que se observó halos a concentraciones menores que las evaluadas para *E. coli*; según lo reportado por Cabrera,<sup>20</sup> las bacterias Gram negativas (*E.coli*) poseen una membrana adicional compuesta por lipolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos lo que le confiere un mayor grado de resistencia a los agentes antimicrobianos.

Estos resultados muestran que el extracto y la fracción tienen propiedades antibacterianas y teniendo en cuenta que en el extracto se identificaron en abundancia metabolitos como flavonoides, taninos y saponinas, se podría afirmar que son los directos implicados en la actividad de *B. variegata* manifestada frente a *S. aureus* y *E. coli*.

En relación con la fracción F21, se podría decir que los metabolitos responsables de dicha actividad son los flavonoides y tal como lo reporta Coloma,<sup>21</sup> la actividad antibacteriana de los flavonoides se debe a la

**Tabla 2.** Resultados de la inhibición del extracto polar y fracción frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*

CEPA	Muestra	D	C+	% I
<i>E. coli</i>	F4 (2000 µg/mL)	14 ± 0,35	20	57,1
	E40 (40000 µg/mL)	8 ± 0,2	20	14,3
<i>S. aureus</i>	F3 (1000 µg/mL)	10 ± 0,11	20	28,6
	F4 (2000 µg/mL)	13 ± 0,36	20	50
	E3 (1000 µg/mL)	13 ± 0,5	20	50
	E4 (2000 µg/mL)	15 ± 0,25	20	64,3
Diámetro control negativo = 6 mm				

D: Diámetro de inhibición de extractos (mm), C+: Diámetro de control positivo (mm), %I: Porcentaje de inhibición

presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos, los cuales penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos.<sup>21</sup>

Estos resultados concuerdan con una investigación en la India, donde se comprobó la actividad antibacteriana de esta especie frente a *S. aureus* y *E. coli*, al encontrarse zonas de inhibición de 22 mm para una concentración del extracto etanólico de 1000 µg/mL frente a *E. coli* y 18 mm frente a *S. aureus*. En dicha investigación mencionan que la actividad antibacteriana podría residir en el contenido fitoquímico de la especie, fuente potencial principalmente de fenoles, taninos y flavonoides.<sup>22</sup> Sin embargo, una investigación realizada en Colombia (Manizales) no presentó halos de inhibición frente a *E. coli*, dicha variabilidad podría ser atribuida a la diferente composición química de una especie vegetal influenciada por factores geográficos, climáticos, altitud, época de cosecha y su estado de crecimiento.<sup>24</sup>

#### EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD EN ARTEMIA SALINA

Los resultados de los nauplios muertos de *A. salina* después de la exposición a diferentes concentraciones del extracto polar durante 24 horas se muestran en la tabla 3.

En el análisis Probit, el valor del percentil 50 (CL50) fue de 1205,61 µg/mL con un intervalo de confianza del 95%, y con un p-valor para el modelo menor que 0,01, indicando una relación estadísticamente significativa entre las variables.

El grado de toxicidad del extracto se definió en fun-

ción del rango en que se encontró el valor de CL50 de acuerdo con las categorías siguientes: extremadamente tóxico (CL50 < 10 µg/mL), muy tóxico (10 < CL50 < 100), moderadamente tóxico (100 < CL50 < 1 000) y no tóxico (CL50 > 1 000 µg/mL).<sup>23</sup> Por lo tanto, el extracto polar de *B. variegata* se considera no tóxico.

#### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las hojas de *Bauhinia variegata* presenta un considerable contenido de poli fenoles con un valor de 28,5 mg EAG/ g de extracto polar.

El extracto polar a 2000 µg/mL presentó actividad antibacteriana frente a *S. aureus* con un 64% de inhibición, y la fracción a 2000 µg/mL presentó un 57% de inhibición frente *E.coli*.

El extracto no presentó toxicidad frente *Artemia salina*, lo cual permite continuar los estudios enfocados a la evaluación de los efectos farmacológicos del extracto de esta especie vegetal.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a investigadores del grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, por su cooperación para la ejecución de este trabajo.

Agradecemos a la Universidad del Quindío y al Grupo de Inmunología Molecular GYMOL.

**Tabla 3.** Resultados del ensayo de toxicidad del extracto polar a diferentes concentraciones frente *A. salina*.

Concentración	Larvas totales	Prom larvas Muertas	% larvas muertas
1000 µg/mL	20	6,7	33,3
500 µg/mL	20	6,3	31,7
250 µg/mL	20	4,7	23,3
100 µg/mL	20	3	15
50 µg/mL	20	2,3	11,7
25 µg/mL	20	2	10
10 µg/mL	20	0,7	3,3
5 µg/mL	20	0,3	1,7

## FUENTE DE FINANCIACIÓN

Este trabajo recibió apoyo para su ejecución de un proyecto financiado por Colciencias, proyecto código 596-2013 y la Universidad de Antioquia. PAU es Joven Investigador CODI, UdeA, años 2012-2015.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses en esta publicación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fonnegra R, Jiménez R, Silvia L.** Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 1ªed. Medellín : Editorial Universidad de Antioquia; 2007.
- Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T.** Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. Santiago de Chile : Editorial Universitaria; 2004. p. 15-16.
- Kannan N, Guruvayoorappan C.** Protective effect of *Bauhinia tomentosa* on acetic acid induced ulcerative colitis by regulating antioxidant and inflammatory mediators. *Int Immunopharmacol.* 2013; 16: 57-66.
- Yuenyongsawad S, Bunluepuech K, Tewtrakul S.** Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem. *J Intercult Ethnopharmacol.* 2013; 150: 765-769.
- Ahmed A, Elgorashi E, Moodley N, McGaw L, Naidoo V, Eloff J.** The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. *Intercult Ethnopharmacol.* 2012; 143: 826-839.
- Brito M, Oliveira C, Salu B, Andrade S, Malloy P, Sato A, et al.** The Kallikrein Inhibitor from *Bauhinia bauhinioides* (BbKI) shows antithrombotic properties in venous and arterial thrombosis models. *Thrombosis Research.* 2014; 133: 945-951.
- Zoobotánico Jerez** [Internet]. España: Zoobotánico Jerez [Consultado agosto 2012]. Disponible en: <http://www.zoobotanicojerez.com/index.php?id=799>
- Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A.** Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. 2009. [En línea] [Consultado el 12 de septiembre del 2011]. Disponible en <<http://www.worldagroforestrycentre.org/af/treedb/>>
- Rao Y, Fang SH, Tzeng YM.** Anti-inflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytotherapy Research.* 2008; 22: 957-962.
- Alberto M, Rinsdahl M, Manca M.** Antimicrobial effect of polyphenols from Apple skins on human bacterial pathogens. *Electronic J Biotechnol.* 2006; 9: 1-5.
- Barragán H, Murillo-Perea E, Méndez-Arteaga JJ.** Taxonomía y funcionalidad del género *Bauhinia*. *Rev Tumbaga.* 2010; 5: 119-134.
- Sanabria A.** Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. 1983. Santa fe de Bogotá. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Química Farmacéutica.
- Dastmalchi K, Dorman D, Kosarb M, Hiltunen R.** Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a watersoluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *LWT - Food Sci Tech.* 2007; 240: 239-248.
- Ramírez L, Díaz H.** Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica.* 2007; 33: 397-400.
- Barranco SL.** Búsqueda de compuestos antimicrobianos en *Heterotheca inuloides*, *Gnaphalium oxyphyllum*, *Passiflora incarnata*, *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens*. Tesis de grado Licenciatura en Químico farmacobiología. 2004. México: Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Química y Biología.
- Henao J, Muñoz LJ.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y del aceite esencial obtenidos de *Lippia organoides* H.B.K. cultivada en el Quindío. 2009. Tesis de grado. Universidad Del Quindío.
- Bilbao M.** Bilbao M. Análisis Fitoquímico Preliminar. Oficina de Publicaciones Universidad del Quindío; 1997.
- Domínguez X.** Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México, D.F; 1973.
- Øyvind M, Andersen KR, Markham.** Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, Boca Raton Florida: CRC Press; 2006.
- Cabrera C, Gómez R, Zúñiga A.** La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica.* 2007; 38: 149-158.

- 21. Coloma J.** Evaluación "in vitro" de la actividad antifúngica de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis de grado Bioquímico farmacéutico. 2009. Riobamba, Ecuador: Escuela superior politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. 92 p
- 22. Gunalan G, Saraswathy A, Krishnamurthy V.** Antimicrobial Activity of Medicinal Plant *Bauhinia variegata* Linn. Int J Pharm Biol Sci. 2011; 1: 400-408.
- 23. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, et al.** Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. Rev Cubana Med Trop, Dic 2009; 61: 254-8.
- 24. Soto A; García R; Ramírez Y; Morán J, Serrano L.** El Extracto Acuoso de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) del Norte de México Tiene Actividad Antioxidante sin Mostrar un Efecto Tóxico in vitro e in vivo. Int. J. Morphol. 2012; 30:937-44
- 25. Martínez M, Ocampo D, Galvis J, Valencia A.** Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). Rev Cubana de Plantas Medicinales. 2011; 16: 313-323.
- 26. Faraga M, Saknaa S, Nabaweya M, Shabanaa M, Wessjohannb L.** Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC –PDA- qTOF- MS and chemometrics. Phytochemistry. 2015; 119: 41-50.