



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Actividad gastroprotectora del extracto acuoso de las  
vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara"  
frente a la injuria aguda inducida en ratas**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

**AUTOR**

Rosalía CALLOHUARI QUISPE

**ASESOR**

Miguel Hernán SANDOVAL VEGAS

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Callohuari R. Actividad gastroprotectora del extracto acuoso de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" frente a la injuria aguda inducida en ratas [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina / Unidad de Posgrado; 2018.

---



12 20  
93 13

Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú. Decana de América



Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado  
Sección Maestría

**ACTA DE GRADO DE MAGISTER**

En la ciudad de Lima, a los 07 días del mes de setiembre del año dos mil dieciocho siendo la 03:00 pm, bajo la presidencia del Dra. Doris Virginia Huerta Canales con la asistencia de los Profesores: Dra. Silvia Suárez Cunza (Miembro), Mg. Óscar Gustavo Huamán Gutiérrez (Miembro), Mg. Luis Clever Arias Caycho (Miembro) y el Mg. Miguel Hernán Sandoval Vegas (Asesor); la postulante al Grado de Magíster en Bioquímica, Bachiller en Ciencias Biológicas, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **"ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS VAINAS DE Caesalpinia spinosa (MOLINA) KUNTZE "TARA" FRENTE A LA INJURIA AGUDA INDUCIDA EN RATAS"** con el fin de optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **B MUY BUENO 18**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA** a la postulante **ROSALÍA CALLOHUARI QUISPE**.

Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo las 04:18 pm, se da por concluido el acto académico de sustentación.

**Dra. Silvia Suárez Cunza**  
Profesora Principal  
Miembro

**Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez**  
Profesor Asociado  
Miembro

**Mg. Luis Clever Arias Caycho**  
Profesor Asociado  
Miembro

**Mg. Miguel Hernán Sandoval Vegas**  
Profesor Principal  
Asesor

**Dra. Doris Virginia Huerta Canales**  
Profesora Principal  
Presidente

## DEDICATORIA

*A la Memoria de  
La Dra. María Raquel Oré Sifuentes  
Su carisma, fortaleza y amistad siempre vivirán en  
mí.*

*A Dios por tantas bendiciones.  
A mis queridos padres Jorge y Saturnina por tanto amor y  
ejemplo de vida.  
A mis muy apreciados hermanos Hilda y Yony por ser los mejores  
aliados en esta vida, mi gratitud eterna.  
A mi preciosa hijita Isabella Marie, mi sentimiento indescriptible  
cada día.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM (CIBN).

A mis profesores por todos los conocimientos y experiencia brindada, muy agradecida.

A mi asesor de Tesis Mg. Miguel Sandoval Vegas, las palabras no reflejan lo agradecida que estoy con Ud., por haber creído en mí, por su infinita paciencia y orientación brindada en todo momento para la culminación de mi tesis.

Al Blgo. Juan Trabucco Ricaldi por su valioso apoyo en el análisis de fenoles y actividad antioxidante. Al Mg. Oscar Huamán Gutiérrez por su apoyo en el tratamiento de los especímenes, gracias.

A los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, a la Dra. Bertha Jurado Texeira y al Dr. Pablo Bonilla, por la oportunidad de realizar la marcha fitoquímica.

Agradecer también al personal técnico del Bioterio de Farmacia y Bioquímica, en especial al Sr. Ernesto Soncco, un perito en la administración de las dosis en animales.

Al Instituto de Patología y Biología Molecular ARIAS STELLA, en especial al Dr. Javier Arias Stella, quien mostró mucho interés en la tesis y brindó su apoyo incondicional en la realización de los cortes histológicos y su posterior lectura.

A mis compañeros de la promoción y a mis compañeros tesisistas por permitirme compartir un pedazo del tiempo con Uds.

Finalmente quiero agradecer de manera muy especial al Mg. Roberto Castellanos, que de no haber sido por él y la Dra. M<sup>a</sup> Raquel Oré no habría logrado realizar la maestría. Muchas gracias por guiarme y permitirme seguir vuestros pasos.

Además agradecer a mis queridos tíos, Felipe y Julia Arhuata, a Linda, Mary, Carlos y Willy, gracias por acogerme en vuestro hogar, por tantos momentos compartidos y cariño brindado.

***Muchas gracias.***

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	v
ABREVIATURAS .....	viii
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Situación problemática .....	1
1.2 Formulación del problema.....	3
1.3 Justificación de la investigación.....	3
1.4 Objetivos .....	4
1.4.1 Objetivo general .....	4
1.4.2 Objetivos específicos .....	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 Antecedentes de investigación .....	5
2.2 Bases teóricas .....	7
2.2.1 Mucosa gástrica.....	7
2.2.1.1 Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica.....	7
2.2.1.2 Modelo experimental de daño gástrico inducido con etanol.....	11
2.2.2 <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	14
2.2.2.1 Descripción taxonómica de la planta.....	14
2.2.2.2 Distribución geográfica. ....	16
2.2.2.3 Usos tradicionales de <i>Caesalpinia spinosa</i> . ....	17
2.2.3 Taninos .....	18
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA .....	23
3.1 Estudio.....	23
3.1.1 Tipo y diseño de investigación.....	23
3.1.2 Unidad de análisis .....	23
3.1.3 Tamaño de muestra .....	23
3.1.4 Selección de muestra.....	23

3.1.5	Lugar .....	23
3.1.6	Técnicas de recolección de datos .....	24
3.2	Materiales y Métodos .....	24
3.2.1	Material biológico .....	24
3.2.2	Reactivos .....	24
3.2.3	Equipos.....	25
3.2.4	Software .....	25
3.3	Método descriptivo.....	25
3.4.1	Selección y procesamiento de las vainas de tara <i>C. spinosa</i> .....	25
3.4.2	Preparación del extracto acuoso a partir de las vainas de <i>C. spinosa</i> ...	26
3.4.3	Análisis fitoquímico del EAVT <i>C. spinosa</i> .....	26
3.4.4	Cuantificación de fenoles totales del EAVT <i>C. spinosa</i> .....	28
3.4.5	Evaluación de la actividad antioxidante in vitro .....	29
3.4.6	Evaluación de la toxicidad aguda del EAVT .....	30
3.4	Diseño experimental.....	31
3.4.1	Evaluación del efecto protector de la mucosa gástrica del EAVT <i>C. spinosa</i> . Método de lesión gástrica inducida por etanol .....	32
3.4.1.1	Análisis Macroscópico.. .....	34
3.4.1.2	Análisis Microscópico.....	34
3.4.2	Evaluación del efecto protector de la mucosa gástrica del EAVT <i>C. spinosa</i> . Método de ligadura pilórica .....	35
3.4.2.1	Determinación de moco gástrico.....	37
3.4.2.2	Determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos (GS-NP) .....	39
3.4.2.3	Determinación de lipoperoxidación .....	40
3.4.2.4	Efecto del EAVT <i>C. spinosa</i> en la secreción gástrica.....	41
a)	Determinación de la actividad péptica.....	41
b)	Determinación de la acidez total.....	42
c)	Determinación de acidez libre.....	43
3.4.3	Consideraciones éticas .....	43
3.4.4	Análisis de datos .....	44
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		45
4.1	RESULTADOS:.....	45
4.1.1	Análisis fitoquímico del EAVT <i>C. spinosa</i> . .....	45
4.1.2	Determinación del contenido de fenoles totales del EAVT .....	46



4.1.3	Actividad antioxidante del EAVT por el método de DPPH. ....	46
4.1.4	Determinación de la toxicidad aguda del EAVT <i>C. spinosa</i> .....	47
4.1.5	Evaluación del efecto protector de la mucosa gástrica del EAVT <i>C. spinosa</i> . Por el método de lesión gástrica inducida por etanol .....	48
4.1.5.1	Resultados del análisis macroscópico .....	48
4.1.5.2	Resultados de análisis histopatológico.....	49
4.1.6	Evaluación del efecto protector de la mucosa gástrica del EAVT <i>C. spinosa</i> . Por el método de ligadura pilórica.....	49
4.1.6.1	Determinación de moco gástrico.....	49
4.1.6.2	Determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos .....	50
4.1.6.3	Determinación de lipoperoxidación .....	50
4.1.6.4	Determinación del efecto del EAVT en la secreción gástrica.....	51
4.2	DISCUSIÓN.....	52
	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	62
	CAPITULO VI: RECOMENDACIONES.....	63
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
	ANEXOS.....	76

## ABREVIATURAS

AINEs	antinflamatorios no esteroideos
ABTS	ácido 2,2-azinobis-3-etil benzotiazolina-6-sulfónico
DMBT1	deleted in malignant brain tumors 1
DNTB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico). Reactivo de Ellman
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	equivalente de ácido gálico
EAVT	extracto acuoso de las vainas de tara <i>C. spinosa</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EROs (ROS)	especies reactivas de oxígeno
EtOH	etanol
Gp-340	glicoproteína-340
GSH	L- glutation reducido
GS-NP	grupos sulfhidrilos no proteicos
IgG-Fc (FCGBP)	Fragmento cristalizable de IgG (Fragmento Fc de unión a la proteína a IgG)
MDA	malondialdehído
PGs	prostaglandinas
TFF	Familia del factor trefoil
TBA	ácido 2-tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético

## LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Análisis químico de la tara (%)	21
<i>Tabla 2.</i> Contenido de galotaninos contenidos en la tara ( <i>C. spinosa</i> ) y otras fuentes vegetales importantes.	22
<i>Tabla 3.</i> Resultados del estudio fitoquímico	45
<i>Tabla 4.</i> Índice de lesión y porcentaje de protección de cada grupo experimental.	48
<i>Tabla 5.</i> Determinación de moco en el tejido gástrico inducido por el EAVT	49
<i>Tabla 6.</i> Determinación de GS-NP en el tejido gástrico inducido por el EAVT	50
<i>Tabla 7.</i> Determinación de lipoperoxidación en el tejido gástrico inducido por el EAVT.	50
<i>Tabla 8.</i> Determinación de la actividad péptica, volumen, pH y acidez total del jugo gástrico inducido por el EAVT.	51

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Defensa de la mucosa gástrica. ....	10
<i>Figura 2.</i> Representación diagramática de la lesión aguda de la mucosa gástrica.. ..	13
<i>Figura 3.</i> <i>Caesalpinia spinosa</i> . ....	15
<i>Figura 4.</i> Clasificación de los taninos.....	20
<i>Figura 5.</i> Algunos galotaninos.....	20
<i>Figura 6.</i> Efecto protector de la mucosa gástrica EATV <i>C. spinosa</i> “tara” modelo de lesión inducida por etanol 70%. ....	33
<i>Figura 7.</i> Efecto protector de la mucosa gástrica del EAVT. Modelo de ligadura pilórica.....	37
<i>Figura 8.</i> Comparación de la gráfica del EAVT-ácido ascórbico en $\mu\text{g/mL}$ versus % inhibición. ....	46
<i>Figura 9.</i> Ganancia de peso en el ensayo de toxicidad aguda a dosis única en el grupo control y tratamientos a los 7 y 14 días de ensayo.....	47

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la actividad gastroprotectora del extracto acuoso de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” (EAVT), frente a la injuria aguda inducida en ratas. **Metodología:** El extracto acuoso se preparó a partir de vainas secas molidas (1:4 p/v) a 65°C por 1 hora. Se realizó la marcha fitoquímica, el contenido de fenoles, la actividad antioxidante (DPPH) y la toxicidad aguda a dosis límite (2 000 mg/kg) del EAVT. Los ensayos para evaluar la actividad gastroprotectora del EAVT fueron: Lesión gástrica inducida por etanol 70% (Robert et al.,1979), 36 especímenes fueron distribuidas aleatoriamente en 6 grupos (n=6): I (SSF-SSF), II (SSF-EtOH), III (EAVT 100 mg/kg-EtOH), IV (EAVT 400 mg/kg-EtOH), V (EAVT 800 mg/kg-EtOH) y VI (antiácido 500 mg/kg-EtOH); y ligadura pilórica (método modificado por Sandoval et al.,2002), 30 ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 5 grupos (n=6): I (SSF), II (EAVT 100 mg/kg), III (EAVT 400 mg/kg), IV (EAVT 800 mg/kg) y V (antiácido 500 mg/kg). **Resultados:** Los metabolitos secundarios presentes en el EAVT fueron: compuestos fenólicos, taninos y flavonoides. El contenido de fenoles totales fue de 383,76 mg EAG/g EAVT. La capacidad antioxidante del extracto se ha clasificado como de buena actividad ( $IC_{50} = 1,12 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ ). No se observaron signos de toxicidad aguda. El EAVT mostró actividad gastroprotectora de manera dosis dependiente contra la injuria aguda inducida por el etanol, siendo significativos ( $p < 0,01$ ) a las dosis de 400 y 800 mg/kg, lo cual fue confirmado por el análisis histo-patológico. El EAVT a dosis de 400 mg/kg incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) la producción de mucus comparado con el grupo control, sin guardar una protección dependiente de la dosis, el contenido MDA disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) de manera dosis dependiente, sin embargo, presentó depleción de GS-NP siendo significativa ( $p < 0,05$ ) a la dosis de 800 mg/kg y no presentó actividad antisecretora. **Conclusiones:** El EAVT tiene buena actividad antioxidante por su alto contenido en taninos y polifenoles, su efecto gastroprotector está relacionado con el incremento del porcentaje de mucus y reducción de MDA, y el mecanismo por el cual el extracto protege la mucosa gástrica no implica inhibición de la secreción de ácido.

**Palabras clave:** *Caesalpinia spinosa*, gastroprotección, injuria aguda, ligadura pilórica, taninos.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the gastroprotective activity of the aqueous extract of *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" pods (EAVT), against acute injury induced in rats. **Methodology:** The aqueous extract was prepared from dried pods powder (1:4 p/v) at 65°C for 1 hour. The phytochemistry screening, content of phenols, determination of antioxidant activity (DPPH) and acute toxicity using the limit dose test (2000 mg/kg). were performed. The gastroprotective activity assays of EAVT were performed on: Gastric injury induced by 70% ethanol (Robert et al.,1979), 36 specimens were randomized into 6 groups (n=6): I (SSF-SSF), II (SSF-EtOH), III (EAVT 100 mg/kg-EtOH), IV (EAVT 400 mg/kg-EtOH) , V (EAVT 800 mg/kg-EtOH) and VI (antacid 500 mg/kg-EtOH); and pyloric ligation (method modified by Sandoval et al.,2002), 30 rats were randomized into 5 groups (n=6): I (SSF), II (EAVT 100 mg/kg), III (EAVT 400 mg/kg), IV (EAVT 800 mg/kg) and V (antacid 500 mg/kg). **Results:** The secondary metabolites present in the EAVT were: phenolic compounds, tannins and flavonoids. The content of total phenols was 383,76 mg EAG/g EAVT. The antioxidant capacity of the extract has been classified as good activity ( $IC_{50}=1,12\pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ ). No signs of acute toxicity was observed. The EAVT showed gastroprotective activity in a dose-dependent manner against acute injury induced by ethanol, being significant ( $p<0,01$ ) at the doses of 400 and 800 mg/kg of extract, which was confirmed by the histopathological analysis. The EAVT at a dose of 400 mg/kg significantly increased ( $p<0,05$ ) the production of mucus as compared to control group, without to provide a dose-dependent protection, the content of MDA decreased significantly ( $p<0,05$ ) in a dose-dependent manner, nevertheless, the extract showed depletion of NP-SH being significant ( $p<0,05$ ) at dose of 800 mg/kg, and the EAVT did not present antisecretory activity. **Conclusions:** The EAVT has good antioxidant activity due to its high content of tannins and polyphenols, its gastroprotective effect is related to increase in percentage of mucus and reduction of MDA, and the mechanism by which the extract protects the gastric mucosa not involves inhibition of acid secretion.

**Key words:** *Caesalpinia spinosa*, gastroprotection, acute injury, pyloric ligation, tannins.

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Situación problemática**

La gastritis es una de las enfermedades más frecuentes a nivel mundial y su incidencia varía en las diferentes regiones y países, siendo mayor en países en desarrollo en comparación con los países desarrollados. En el Perú, es una de las causas que con más frecuencia motivan la consulta gastroenterológica (Valdivia, 2011).

En la actualidad, la gastritis se considera de etiología multifactorial, observándose que en un solo paciente pueden intervenir múltiples factores tanto exógenos como endógenos, que se resumen en: alimentarias; irritantes químicos, mecánicos y térmicos; radiación; alérgicas e infecciosas (bacteriana o viral); metabólicas; enfermedades sistémicas; inmunológicos; genéticos y psicológicos, ya que los datos epidemiológicos indican que el estrés emocional y la depresión pueden influir en el desarrollo de trastornos gastrointestinales y cánceres (Lee et al., 2015; Mucio, 2007; Sagaró, 2009), por lo tanto en los próximos años se espera que incrementará el número de casos.

Por otro lado, existe un gran interés por el uso de medicinas alternativas, para el tratamiento de diversas enfermedades. La medicina tradicional, particularmente el empleo de plantas con finalidad terapéutica, constituye una práctica remota realizada de manera tradicional y empírica. Se estima que el 50% de la población de América Latina usa plantas medicinales al no tener acceso a productos médicos (Busmann & Sharon, 2015).

Una de éstas plantas es *Caesalpinia spinosa* “tara”, una leguminosa nativa de Sudamérica, de la cual las vainas han sido ampliamente utilizadas para tratar diversas dolencias debido a su efecto antibiótico contra enfermedades respiratorias e infecciones de la piel, inflamación de amígdalas, estómago, diarreas y cicatrización de heridas cutáneas (Arellano, 1992; Busmann & Sharon, 2015; De la Cruz, 2004).

Entre las propiedades atribuidas a la tara, están su carácter antioxidante, astringente, antiinflamatorio, antimicrobiano y antitumoral, además de ser empleada para tratar úlceras y ayudar a la cicatrización (Aguilar et al., 2014; Castañeda et al., 2012; Sanchez et al., 2011), el cual se debería a la presencia de los taninos, el cual representa entre 40 y 60% de su peso seco dependiendo de su hábitat ecológico, los cuales son del tipo hidrolizables o galotaninos (De la Cruz, 2004; Flores & Briones, 2011).

Es conocido que los taninos además de sus propiedades antioxidantes, modifican la capa más externa de la mucosa, la vuelven menos permeable, más resistente al daño químico, mecánico e irritación. Sin embargo la correlación entre la estructura molecular de los taninos y la actividad astringente/antiulcerosa es poco conocida. Cuando concentraciones bajas de taninos son aplicadas en la mucosa, solamente la capa más externa es modificada, se torna menos permeable y se produce un incremento en la protección de las capas subyacentes en contra de la acción de las bacterias e irritación química (Amiruddin et al., 2014), en cambio a concentraciones elevadas o uso excesivo puede tener una actividad prooxidante (Nowak et al., 2014).

Por tanto, se estudiará la actividad del extracto acuoso de las vainas de tara, a tres diferentes concentraciones, con la finalidad de lograr dar un sustento científico al poder gastroprotector de esta planta.



## 1.2 Formulación del problema

¿Cuál es el efecto del extracto acuoso de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” sobre el tejido gástrico frente a la injuria aguda inducida en ratas?

## 1.3 Justificación de la investigación

Las plantas medicinales son un recurso nacional de bajo costo que está considerado en la política nacional de salud. Sin embargo en la mayoría de los casos en que se usan éstos productos naturales, el conocimiento es empírico; de allí que surge la necesidad de sentar las bases científicas acerca de sus propiedades medicinales.

La tara es una leguminosa nativa de Sudamérica, de la cual las vainas han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional en forma de infusión. Perú cuenta con una gran variedad de ecotipos de ésta planta, sus propiedades medicinales y su forma de cultivo rústico hacen de esta planta, ideal para estar considerado entre las especies promisorias más importantes ante el cambio climático y fuente natural de antioxidantes.

La importancia de la presente investigación radica en brindar un aporte al estudio fitoquímico y farmacológico de las vainas de tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Se busca demostrar que esta especie posee un potencial terapéutico en el tratamiento de gastritis, en forma de extracto acuoso como tratamiento alternativo a la medicina convencional.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 *Objetivo general*

- Evaluar la actividad gastroprotectora del extracto acuoso de las vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” frente a la injuria aguda inducida en ratas *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann.

### 1.4.2 *Objetivos específicos*

- Identificar los metabolitos secundarios del extracto acuoso de las vainas de *C. spinosa*
- Determinar actividad antirradical libre *in vitro* del EAVT por el método de DPPH.
- Determinar la toxicidad aguda a dosis límite del EAVT en ratas *Rattus norvegicus* cepa Sprague-Dawley.
- Estimar el grado de protección en la mucosa gástrica del EAVT.
- Estimar la actividad protectora en la mucosa gástrica del EAVT.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes de investigación

La tara, es una planta originaria del Perú, utilizada desde la época prehispánica en la medicina folclórica, como antiinflamatorio, curación de úlceras y cicatrizante, además de antibacteriano (Bussmann & Sharon, 2015; Cabello, 2010). Las plantas ricas en taninos se han usado tradicionalmente por sus efectos medicinales y en varios modelos de lesión gástrica, los taninos purificados han demostrado estar implicados en las actividades antiinflamatorias, antisecretora, antiulcerogénica, antioxidante y anti-*Helicobacter pylori* (de Jesus et al., 2012; Meira et al., 2012).

Avilés et al. (2010) estudiaron la actividad antioxidante, polifenoles totales y contenido de taninos de extractos de tara, siendo los extractos acuosos obtenidos por maceración y Soxhlet, los que presentaron una alta actividad antioxidante, con un  $IC_{50}$  entre 10 y 12,1  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, con un contenido de polifenoles totales de 150 mg EAG/g de muestra y el contenido de taninos totales del 32%. Resultados similares obtuvieron Valachová et al. (2014) con el extracto acuoso de la harina de tara con valores de  $IC_{50}$  de 30,8  $\mu\text{g/mL}$ .

López et al. (2011) han reportado la capacidad antioxidante del extracto acuoso de poblaciones silvestres de *C. spinosa* de dos localidades del departamento de Junín (Picoy y Santa Fe), mostrando mediante DPPH un  $IC_{50}$  de 1,24 mg/mL e  $IC_{50}$  de 1,37 mg/mL, con ABTS un 35,3% y 37% de inhibición y contenido de fenoles totales de 563 mg/g y 413 mg/g de muestra respectivamente, estas diferencias podrían deberse al ambiente geográfico de la cual proceden.

Skowrya et al. (2015), realizaron la extracción de los componentes fenólicos de las vainas de tara provenientes de Perú, usando como solvente metanol/agua (1:1v/v), determinando la actividad antioxidante usando el método del DPPH, utilizando como control al butilhidroxianisol (BHA) y ácido gálico. Siendo el ácido gálico y el extracto del hidrolizado de tara los captadores de radicales más fuertes con  $IC_{50}$  de 7,3 y 8,3  $\mu\text{mol EAG/L}$ , respectivamente. El valor  $IC_{50}$  de BHA fue de 50,8  $\mu\text{mol/L}$  y el del extracto sin hidrolizar de tara fue de 468,2  $\mu\text{mol EAG/L}$ . Atribuyéndole estos resultados al aumento del número de ácido gálico de 16,9 mg EAG/g de vainas a 130,7 mg EAG/g al ser hidrolizados del extracto de las vainas de tara.

Se considera que, los modelos de uso de las plantas medicinales por las poblaciones locales varían en función de la colecta, de hábitat, de planta, cambios culturales, los aspectos ecológicos y bioquímicos (Briceño & Ríos, 2012; Flores & Briones, 2011; Melo et al., 2013; Radanovic et al., 2006).

Se han realizado estudios acerca del efecto gastroprotector de las vainas de tara *C. spinosa* con resultados contradictorios. Chia et al. (2013) en un estudio acerca del efecto del pre-tratamiento con un extracto alcohólico de las vainas de tara a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg, ante lesiones inducidas con ácido acetil salicílico en ratas Holtzman, reportan que dicho extracto no mostró efecto protector.

Por otro lado, Flores & Flores (2017) estudiaron el efecto gastroprotector y curativo del consumo de harina de la vaina de tara (*C. spinosa*) en animales de experimentación inducidos a gastritis con etanol, concluyendo que el consumo de 1g/kg/día de harina de vaina tiene igual efecto gastroprotector que el Omeprazol a 500 mg/kg/día en el tratamiento de lesión gástrica y presenta mejor resultado en la evaluación de la inflamación de la mucosa gástrica inducido por 1,5 mL de etanol al 96% como única dosis en animales de experimentación.

Respecto a su toxicidad, solo se dispone de un solo reporte para el extracto acuoso de la tara del norte del Perú, probado en larvas de camarones de agua salobre, exhibiendo una  $DL_{50}$  de 168 ( $\mu\text{g/mL}$ ), considerándose como altamente tóxico, pero la prueba no necesariamente constituye una relación directa a los efectos

toxicológicos en los mamíferos según Sánchez et al., (1993) en (Bussmann et al., 2011).

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Mucosa gástrica**

La mucosa gástrica es el principal mecanismo de protección para el estómago, sin embargo, está constantemente expuesta a numerosos factores agresivos endógenos (HCl, pepsina, ácidos biliares, enzimas pancreáticas) y exógenos (*Helicobacter pylori* y otros agentes infecciosos, AINEs, alcohol, tabaco, radiación) que dañan la mucosa gástrica, pero bajo condiciones normales existe un balance entre los agentes agresivos versus sustancias protectoras (Díaz, 2015; Fernández, 2014).

#### **2.2.1.1 Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica.**

La protección del epitelio gástrico es un problema único debido al pH ácido del jugo gástrico. Los geles mucosos que cubren la mucosa superficial y sus glándulas, están diseñadas para mantener la homeostasis de la mucosa. La defensa de la mucosa gástrica en condiciones normales se puede visualizar como una barrera de tres niveles (ver *Figura 1*).

a) *El componente pre-epitelial*: La "barrera" mucosa-bicarbonato-fosfolípido, es un gel viscoelástico que actúa como primera línea de defensa contra los agentes agresivos químicos, físicos y biológicos. El moco gástrico es uno de los principales agentes de citoprotección de la mucosa, por contribuir con una barrera física para la defensa de la mucosa contra bacterias; o actuar como un lubricante para reducir los efectos abrasivos en la mucosa, y participar en la protección contra el daño provocado por los ácidos y toxinas en el lumen gástrico (Wallace & Granger, 1996).

Las células mucosas superficiales y parcialmente las células parietales estimuladas secretan un moco viscoso para cubrir las células epiteliales, de alrededor de 1 mm<sup>3</sup> de

grosor. Los componentes principales son mucinas (glicoproteínas), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), lípidos y agua (95%) (Díaz, 2015; Hoffmann, 2015).

El moco gástrico además contiene iones;  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  entre otros, proteínas como IgA, IgG, IgM, péptidos TFF, gastroquinas, proteína de unión a IgG-Fc (FCGBP), DMBT1/gp-340, galectinas,  $\beta$ -defensinas, catelicidina, lisozima y lipasa gástrica extremófila. Esta “barrera” tiene múltiples funciones fisiológicas: lubrica el paso de los alimentos no digeridos, protege al epitelio de los daños mecánicos y la digestión de la pepsina, mantiene un gradiente de pH hacia el jugo gástrico ácido y restringe la adhesión y colonización de microorganismos (Hoffmann, 2015).

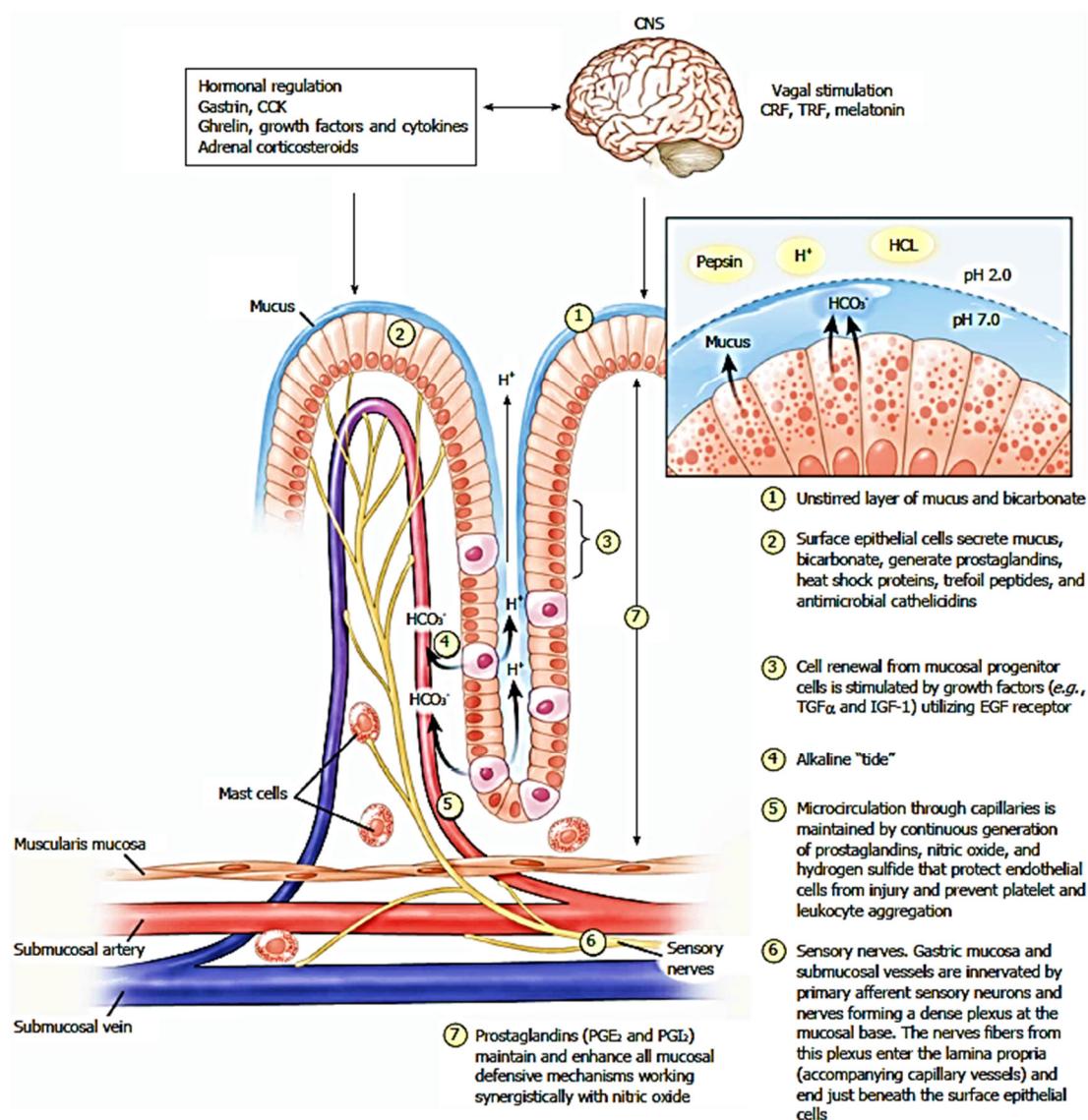
En ratas, se ha descrito que el moco que cubre la mucosa gástrica está compuesto de dos capas; una capa (externa) débilmente adherente, que se puede eliminar por succión suave, denominada también moco soluble es menos viscosa debido a la falta de enlaces disulfuro entre las moléculas de mucina que contiene. Esta capa se encarga de la liberación constante de óxido nítrico (producida por las células endoteliales de los microvasos) y de la unión con agentes nocivos, se mezcla con los alimentos y se desprende; y una capa (interna) firmemente adherida al epitelio, su grosor es de aproximadamente 80 y 154  $\mu\text{m}$  en el cuerpo y el antro, respectivamente, también denominada moco visible, forma un recubrimiento gelatinoso con una alta concentración de bicarbonato para mantener un pH neutral (7,0), protegiendo a la mucosa del ácido corrosivo, retardando la difusión retrógrada de iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ), pepsina, inhibición de la activación del pepsinógeno y manteniendo el  $\text{HCO}_3^-$  secretado por el epitelio. Las moléculas de mucina contenidas en esta capa se entrelazan por puentes disulfuro confiriéndole una consistencia altamente viscosa y con la capacidad de expansión al hidratarse (Hoffmann, 2015; Díaz, 2015). Ambas capas de moco tienen un engrosamiento al estímulo de prostaglandina E2 (Allen & Flemström, 2005; Phillipson et al., 2008).

La estabilidad de la mucosa se incrementa por la presencia de péptidos pequeños conocidos como factores trefoil. Las hormonas gastrointestinales como la gastrina y secretina; la PGE2 y agentes colinérgicos estimulan la secreción de moco. También

algunos medicamentos activos tópicamente (tales como los antiácidos) estimulan la secreción de moco (Díaz, 2015 & Tarnawski, 1995).

b) *El componente epitelial*: Constituye la segunda línea de defensa y consta de una capa continua de células epiteliales unidas por uniones estrechas, formando la "barrera" epitelial. Estas células epiteliales generan y secretan bicarbonato, moco, fosfolípidos, péptidos trefoil, prostaglandinas (PGs) y proteínas de shock térmico. La integridad de la capa de células epiteliales se mantiene por renovación celular continua que se lleva a cabo mediante la proliferación de células progenitoras reguladas por factores de crecimiento, PGE2 y survivina, un anticuerpo antiapoptosis y la proteína promotora de mitosis (Tarnawski *et al.*, 2014). Por otro lado al mismo tiempo que ocurre la renovación epitelial tiene lugar la angiogénesis cuyos principales reguladores son el factor de crecimiento de fibroblasto, el factor de crecimiento del endotelio vascular y las prostaglandinas (Díaz, 2015).

c) *El componente post-epitelial*: Incluye el flujo sanguíneo continuo a través de microvasos mucosos alineados con células endoteliales formando una "barrera" endotelial, nervios sensoriales que liberan el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, por lo tanto regulan el flujo sanguíneo de la mucosa; y, la generación de PGs y óxido nítrico. La defensa de la mucosa gástrica también está regulada por el sistema nervioso central a través de la inervación vagal, la liberación del factor liberador de corticotropina, el factor liberador de tirotrópina, melatonina y otros; por hormonas incluyendo gastrina, colecistoquinina, corticosteroides suprarrenales; y por factores de crecimiento y citoquinas (Tarnawski *et al.*, 2014).



**Figura 1. Defensa de la mucosa gástrica.** Diagrama esquemático modificado y actualizado de Tarnawski. Fuente. Datos tomados de Laine, Takeuchi, & Tarnawski (2008).



### *2.2.1.2 Modelo experimental de daño gástrico inducido con etanol.*

De acuerdo a este modelo el daño gástrico producido es una consecuencia de muchos factores que interactúan, cada uno de los cuales puede ser considerado como un potencial objetivo terapéutico.

Algunos factores involucrados serían: disminución de la producción de la mucosidad gástrica, incremento de la generación de radicales libres, incremento de “retrodifusión” del ácido, disminución de la motilidad gástrica, disminución de la diferencia de potencial transmucosal, disminución de la producción de grupos sulfhidrilos endógeno, incremento de liberación de 5-hidroxitriptamina, incremento de liberación de histamina, incremento del eflujo de sodio y potasio, incremento del influjo de calcio, incremento de la producción de leucotrienos, disminución de la producción de prostaglandinas, disminución del flujo sanguíneo en la mucosa gástrica, incremento de isquemia, incremento de permeabilidad vascular gástrica (Glavin & Szabo, 1992).

Gillespie & Lucas (1961) observaron los efectos de la administración de etanol en dosis única sobre la mucosa gástrica de ratas, administraron mediante canulación orogástrica diferentes diluciones (15, 30, 60 y 95% v/v) de etanol en agua. A concentraciones menores de 60% en animales bien nutridos el daño fue insignificante, en cambio observaron hemorragias ocasionales y erosiones de la mucosa gástrica a concentraciones de 60% a más. En ratas con desnutrición grave, se encontraron lesiones gástricas mínimas más frecuentemente a concentraciones menores de etanol (30%). No observaron ulceración en ninguno de los dos grupos al 95% de etanol.

De acuerdo con Szabo (1987), las lesiones de la mucosa gástrica inducidas por etanol pueden ser producidas de manera confiable y sencilla con la administración intragástrica de cantidades variables (0,5 - 2,0 mL) de etanol concentrado (50 - 100%). Dependiendo de la cantidad de etanol administrado, entre el 10 y 40% del estómago glandular de ratas y ratones se cubre de erosiones hemorrágicas y úlceras

cuando se examinan 1-2 horas después de administrado el etanol (Glavin & Szabo, 1992).

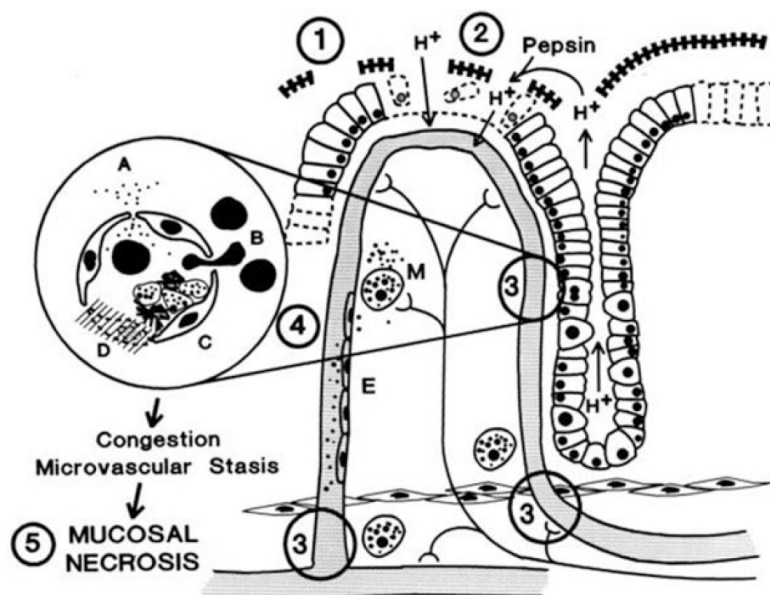
Entre los efectos agudos en el estómago por la aplicación orogástrica de etanol en ratas, está la inhibición de la motilidad gástrica. El umbral para el daño de la mucosa en el epitelio gástrico canino oscila entre el 8 y 14% (v/v) de etanol. Se cree que la lesión de la mucosa gástrica ocurre por el debilitamiento de la función de la barrera mucosal contra el ácido gástrico. A concentraciones >14% (v/v) conducirían a un aumento de la permeabilidad epitelial como consecuencia de los cambios en la diferencia de potencial celular causada por la redifusión de iones  $H^+$  a través de la mucosa lesionada. Concentraciones <10% (v/v) causarían una adherencia dosis-dependiente de neutrófilos con posterior daño celular al epitelio gástrico en ratas. Concentraciones más altas resultan en daño independiente de neutrófilos de la mucosa gástrica, debido principalmente al daño vascular temprano y disminución del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (Siegmund et al., 2005).

Por lo tanto, para conseguir lesiones gástricas en animales es frecuente utilizar concentraciones elevadas de etanol (90-100% v/v). Exámenes posteriores en ratas expuestas a etanol intragástrico agudo más humo de tabaco, revelaron un efecto deletéreo sinérgico sobre la mucosa gástrica, debido a la disminución del flujo sanguíneo de la mucosa, el agravamiento de la inflamación y un aumento en la producción de radicales libres (Siegmund et al., 2005).

Altas concentraciones de etanol inducen lesión del endotelio vascular de la mucosa gástrica, que se convierte en edematosa y congestiva; puntos y lesiones diseminadas de sangrado, hemorragia focal, necrosis y úlceras gigantes y profundas. Las células principales y parietales son ricas en mitocondrias y al ser expuestas al alcohol incrementan y disminuyen su volumen lesionándose fácilmente. El ADNmt es el principal objetivo del estrés oxidativo intracelular asociado al etanol, esto altera la morfología y función de la mucosa gástrica. La disfunción mitocondrial altera la síntesis de ATP y esto conllevaría a la acidosis metabólica, edema celular, sobrecarga de calcio intracelular y daño adicional a las células de la mucosa gástrica. Además la mucosa gástrica, rica en grupos sulfhidrilo puede ser el blanco de ROS.

Los grupos sulfhidrido de proteínas oxidadas conducen a la desnaturalización de la misma o la inactivación de la enzima y el daño al receptor o la modificación de la membrana celular, contribuyendo así a la lesión de la mucosa (Singh et al., 2015).

Entonces el desarrollo y la extensión de la lesión de la mucosa dependerían de la naturaleza y concentración del agente dañino. La lesión abarcaría la disrupción de la capa de moco-bicarbonato-fosfolípido sin remover (ver *Figura 2,1*), exfoliación del epitelio superficial con pérdida de su barrera y funciones eléctricas (ver *Figura 2,2*); en tanto que, la lesión de las capas mucosas gástricas más profundas incluiría las células endoteliales microvasculares, células progenitoras, parietales y principales (ver *Figura 2,3abc*). El daño al endotelio capilar conduciría a la estasis microvascular. El daño microvascular ocurre tempranamente en la lesión de la mucosa, llevando a la hipoxia y a la necrosis de las células glandulares, agregando así un componente isquémico a la lesión tóxica directa de las células (ver *Figura 2,4*). Los cambios vasculares producidos por la liberación de mediadores vasoactivos y proinflamatorios de mastocitos dañados, macrófagos y células endoteliales deterioran adicionalmente la microcirculación de la mucosa y finalmente resultan en necrosis mucosa en forma de erosiones o úlceras (Tarnawski et al., 2013).



**Figura 2. Representación diagramática de la lesión aguda de la mucosa gástrica.**  
Fuente. Datos tomados de Tarnawski et al. (2013).

## 2.2.2 *Caesalpinia spinosa*

### 2.2.2.1 Descripción taxonómica de la planta.

Reino	Vegetal
Sub reino	Embryophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Caesalpinaceae
Genero	<i>Caesalpinia</i>
Especie	<i>C. spinosa</i>

**Etimología:** *Caesalpinia*, en honor a de Andrea Caesalpini (1524-1603), botánico y filósofo italiano; *spinosa*, del latín *spinosus-a-um*, con espinas.

#### **Sinonimias**

*Ponciana spinosa* Molina

*Caesalpinia pectinata* Cavanilles

*Caesalpinia tara* Ruiz & Pavon

*Caesalpinia tinctoria* HBK

*Coulteria tinctoria* HBK

*Tara spinosa* (Molina) Britton & Rose

*Tara tinctoria* Molina

**Biotipos:** Los biotipos Morocha, Roja Ayacuchana, Almidón Corriente, Almidón Gigante, Precoz, Verde Esmeralda se encuentran en la Región Ayacucho. Los cultivares comerciales son: Moroco, Almidón y Premium, siendo la última variedad obtenida a partir de una selección masal y multiplicación vía biotecnología o multiplicación clonal y tendría alto contenido de tanino y goma (Villanueva, C. en Cabello-Liu, 2010).

**Nombre común:** “Tara”, “taya” (Perú); “divi divi de tierra fría”, “guarango”, “cuica”, “serrano”, “tara” (Colombia); “vinillo”, “guarango” (Ecuador); “tara” (Bolivia, Chile, Venezuela), spiny holdback (USA) (ver *Figura 3*).



*Figura 3. Caesalpinia spinosa.* Fuente. Datos tomados de Spach, E., *Histoire naturelle des végétaux, Atlas (coloured version), t. 2, fig. 1* (1834-1847). Illustration contributed by: Missouri Botanical Garden, St. Louis, U.S.A.

### 2.2.2.2 Distribución geográfica.

El Perú es el mayor productor de tara en el mundo, con el 80% de la producción mundial, seguido por Bolivia, Chile, Ecuador y Colombia. Se distribuye entre los 4° y 32° S. Se presentan de forma natural en lugares semiáridos con un promedio de 230 a 500 mm de lluvia anual. En el Perú se distribuye en casi toda la costa, desde Piura hasta Tacna, y en algunos departamentos de la sierra. De acuerdo al Mapa Forestal del Perú la tara se encuentra ocupando el estrato del matorral arbustivo en donde se asocia con especies como: *Capparis prisca* "Palillo", *Salix humboldtiana* "Sauce", *Schinus molle* "Molle", *Puya sp*, *Acacia sp*, algunas gramíneas, y una gran diversidad de especies de los géneros *Calliandra*, *Rubus*, *Croton*, entre otras (De la Cruz, 2004).

A nivel internacional, hay una tendencia creciente demanda de productos de origen vegetal, tanto en la industria de la curtiembre como en la alimenticia, que son los principales mercados a los que se dirigen el polvo y la goma de tara, por tanto se viene investigando acerca de la distribución de la tara, en el país; por ejemplo, se ha realizado la evaluación del estado de conservación de *Caesalpinia spinosa* "tara" en el departamento de Ayacucho, y se encontró que en los puntos muestreados el 81% de la tara procede de predios de propiedad privada y 19% de formaciones vegetales silvestres (Novoa & Ramírez, 2007). En Huánuco se ha logrado identificarlas y establecer su importancia, el gobierno impulsa los proyectos de reforestación con tara, como el caso de las lomas de Atiquipa con sistema de atrapanieblas, entre otros (Moreno, 2007).

Cabe mencionar que la tara de la zona norte tiene menor contenido de taninos que la del sur, a pesar de poseer vainas grandes (De la Cruz, 2004). La altitud; temperatura; la edad de la planta de la cual se recolectan, siendo la edad adecuada entre los 4 y 20 años, descendiendo a los 50 años y siendo improductiva a los 65 años; periodo de cosecha, al respecto el contenido de taninos, acidez y sólidos solubles se concentran mejor entre los 5 y 5,5 meses después de la floración (Melo et al., 2013); el tipo de suelo y el pH, siendo mejor los suelos ácidos (pH 5,1) y menor en suelos neutros (Flores & Briones, 2011), son condiciones que influyen en la producción de la tara y

contenido de taninos; tal como reportan Briceño & Ríos (2012) acerca del contenido de taninos de vainas de tara provenientes de tres distritos de la provincia de Otuzco, obtenidas por extracción hidroalcohólico (1:1v/v) siendo la muestra proveniente del distrito de Coina el que presentó el mayor porcentaje (40.83%). En Huamanga se han obtenido taninos totales en extractos acuosos, etanólico, metanólico e hidroalcohólico (1:1v/v) de 31,6; 39; 50,8 y 54,6% respectivamente (Avilés et al., 2010).

### 2.2.2.3 *Usos tradicionales de Caesalpinia spinosa.*

En Medicina: El uso etnomédico de la tara es diverso, básicamente su modo de uso como infusión de vainas maduras en la curación de amigdalitis, en forma de gárgaras, la infusión de las hojas se utiliza para la estomatitis, la cocción de las ramas tiernas se usa como abortivo e igualmente se prepara una bebida que se toma como depurativo del colesterol. Industrialmente forma parte de los medicamentos gastroenterológicos, para curar úlceras, cicatrizantes, por sus efectos astringentes, antiinflamatorios, antisépticos, antidiarréicos, antimicóticos, antibacterianos, antiescorbúticos, odontálgicos y antidisentéricos (Cabello, 2010; De la Cruz, 2004).

En la Industria: Son utilizados como mordientes para la aplicación de tintes en tejidos, coagulantes de gomas, o aprestos para papeles o sedas, en el curtido de pieles por la capacidad de sus taninos de brindarle resistencia a la descomposición, como precipitantes para suspensión de arcilla y como parte de las pinturas otorgándole una acción anticorrosiva (De la Cruz, 2004).

Agricultura: Se usa frecuentemente en asociación con cultivos como el maíz, papa, habas, alfalfa, sorgo o pastos. No ejerce mucha competencia con los cultivos, por su raíz pivotante y profunda y por ser una especie fijadora de nitrógeno; así como tampoco por su copa, que no es muy densa y deja pasar la luz. Debido a su pequeño porte y a su sistema radicular profundo y denso, es preferida para barreras vivas, control de cárcavas y otras prácticas vinculadas a conservación de suelos en general, sobre todo en zonas áridas o semiáridas (De la Cruz, 2004).

Otros usos: La madera sirve para la confección de vigas, para construir viviendas; mangos de herramientas de labranza de buena calidad y postes para cercos. Así como leña y carbón debido a sus bondades caloríficas.

Derivados y sus usos: *Ácido Tánico*: Agente Clarificador en la fabricación de vinos, cerveza y alimentos, por ejemplo, el Galitan es usada en la clarificación de vinos blancos y rosados, además de poseer capacidad antioxidante y de reaccionar con proteínas (AGROVIN, 2010). *Ácido Gálico*: Industria farmacéutica para la producción de Trimethoprim antibiótico base del Bactrim, trimethobenzamida (antiemético), tritiozina (antisecretor gástrico), tricetamida (sedante), trocimina (antidepresante), trixolano (espasmolítico, vasodilatador), entre otros (Cabello, 2010).

### 2.2.3 *Taninos*

Los principales grupos de polifenoles son flavonoides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolizables y condensados), estilbenos y lignanos (Oliveira, et al., 2014). Los taninos están distribuidos ampliamente en el reino vegetal y por ende están presentes en alimentos y bebidas, son de gran valor económico y de interés ecológico. Forman complejos con proteínas insolubles en agua, alcaloides y gelatina. Son responsables del sabor astringente de muchas frutas y verduras, causando la precipitación de proteínas ricas en prolina como las salivales y reduciendo la lubricación oral. Son químicamente reactivos y forman enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares (de Jesus et al., 2012).

Según Bate-Smith y Swain los taninos son solubles en agua, con pesos moleculares entre 300 y 3 000 Da, reaccionan con cloruro de hierro y precipitan alcaloides, gelatinas y otras proteínas. Sin embargo, recientemente se han aislado moléculas con una masa molar de hasta 20 000 Da que también deberían clasificarse como taninos en función de sus estructuras moleculares. Griffith definió los taninos como "sustancias fenólicas macromoleculares" y los agrupó en dos grupos, los taninos "hidrolizables" y "condensados" (Khanbabaee & Ree, 2001), esta es una clasificación



clásica y muy reportada en la literatura, pero actualmente existen otras clasificaciones basados en sus características estructurales como el de Khanbabaee y Ree (2001), que los agrupa en cuatro grupos principales: galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados (ver *Figura 4*)

- 1) Los galotaninos son aquellos taninos en los cuales las unidades de galoilo o sus derivados metadepsídicos están unidos a diversas unidades de poliol, catequina o triterpenoides.
- 2) Los elagitaninos son taninos en los que al menos dos unidades de galoilo están acopladas entre sí C-C, y no contienen una unidad de catequina unida glicosídicamente.
- 3) Los taninos complejos son taninos en los que una unidad de catequina se une glicosídicamente a una unidad de galotanino o elagitanino.
- 4) Los taninos condensados son todos proantocianidinas oligoméricas y poliméricas formadas por el enlace de C-4 de una catequina con C-8 o C-6 de la siguiente catequina monomérica.

Según Okuda & Ito (2011), categorizan a los taninos y polifenoles relacionados en dos tipos: tipo A, con estructuras constantes y tipo B de composición variable, basados en los avances recientes en la química del tanino comenzando con el aislamiento de los elagitaninos.

Galotaninos de Tipo A (ver *Figura 5*) tienen una estructura central en las que un carbohidrato o ácido quínico es galoilado en varios grupos hidroxilo. Los grupos galoilo en estas estructuras centrales luego se galoilan adicionalmente mediante uniones depsídicas formando mezclas de galotaninos de tipo B. Sin embargo, se pueden aislar algunos galotaninos tipo A con estructuras estables.

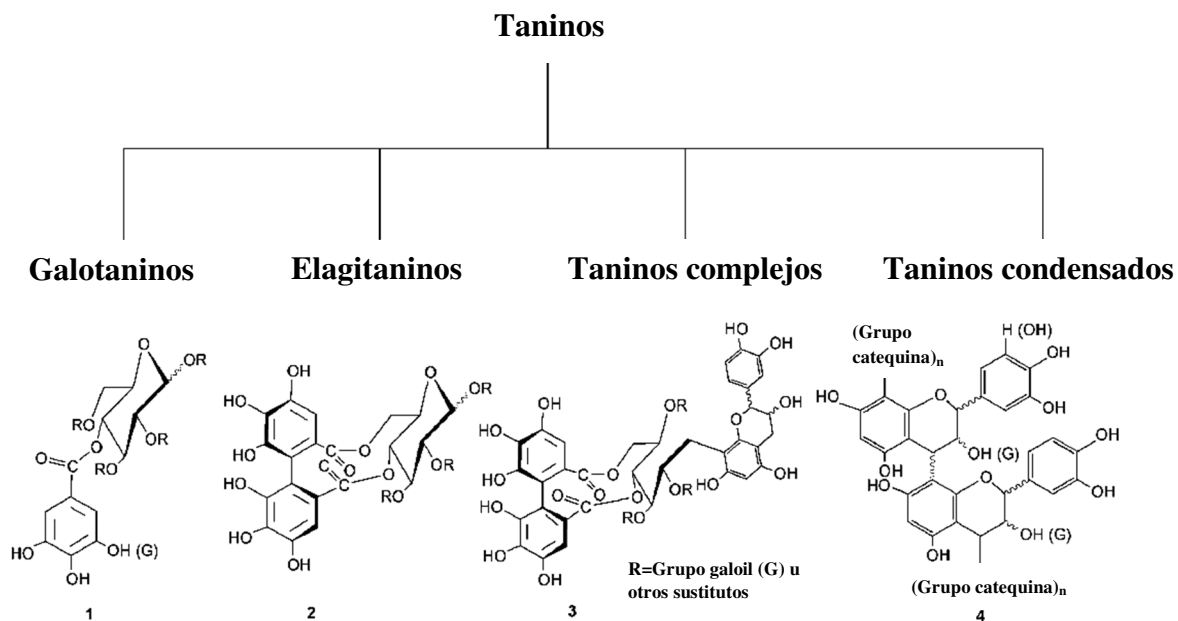


Figura 4. Clasificación de los taninos. Fuente. Datos tomados de Khanbabaee & Ree (2001).

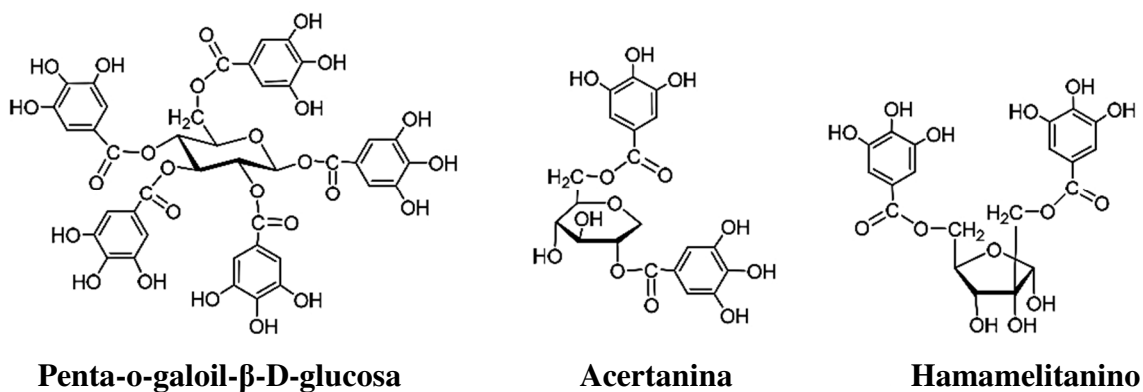


Figura 5. Algunos galotaninos. Fuente. Datos tomados de Takuo Okuda & Ito (2011).

La distribución de los galotaninos y elagitaninos en las plantas es similar, ya que a diferencia de los primeros, los elagitaninos están ausentes en la mayoría de las ordenes de *Sympetalae*, que tienen un rango más alto en el sistema de evolución de plantas dicotiledóneas, pero los elagitaninos presentan mayor diversidad estructural y, a diferencia de los galotaninos, son aislables como compuestos puros y estables (Okuda et al., 2009).

En el caso de la tara, la vaina representa el 62% del peso de los frutos y posee la mayor concentración de taninos (entre 40 y 62%), según las condiciones ecológicas en las que crece (De la Cruz, 2004). El análisis químico porcentual de las vainas en comparación con las semillas, goma, germen y cáscara se presenta en la *Tabla 1*.

*Tabla 1. Análisis químico de la tara (%)*

<b>Descripción</b>	<b>Vainas</b>	<b>Semillas</b>	<b>Goma</b>	<b>Germen</b>	<b>Cáscara</b>
Humedad	11,70	12,01	13,76	11,91	10,44
Proteínas	7,17	19,62	2,5	40,22	1,98
Cenizas	6,24	3,00	0,53	8,25	3,05
Fibra bruta	5,30	4,00	0,86	1,05	1,05
Extracto etéreo	2,01	5,20	0,48	12,91	0,97
Carbohidratos	67,58	56,17	81,87	25,66	83,56
Taninos	62,00	-	-	22,67	-
Azúcares	-	-	83,20	-	-

*Fuente. Datos tomados de De la Cruz, 2004.*

Garro et al. (1997) realizaron estudios del extracto acuoso de las vainas de tara, en donde el ácido gálico (53%), fue el principal constituyente del tanino, azúcares totales (9,6%) de los cuales la glucosa tuvo la más alta concentración (3,1%), entre otros constituyentes presentes menos importantes (ácido elágico 6,9%). Por tanto los taninos de la tara son predominantemente galotaninos en lugar de elagitaninos.

A partir de las vainas de tara *Caesalpinia spinosa*, mediante hidrólisis ácida o básica, como por hidrólisis enzimáticas, es factible obtener ácido gálico o taninos remanentes, los cuales muestran una mayor capacidad antioxidante que los taninos

sin hidrolizar, por la exposición de grupos hidroxilo del ácido gálico liberados después de la hidrólisis (Chambi et al., 2013). Asimismo, el contenido total de galotaninos ha sido comparado con otras fuentes de taninos (ver *Tabla 2*).

**Tabla 2. Contenido de galotaninos contenidos en la tara (*C. spinosa*) y otras fuentes vegetales importantes.**

<b>Especie</b>	<b>Parte de la planta</b>	<b>Contenido de galotanino</b>	<b>Referencia</b>
<i>Galla chinensis</i>	Agalla	61,6 g EAG/100g	Tian et al. (2009)
<i>Caesalpinia spinosa</i>	Vainas	55,1 g EAG/100g	Chambi et al. (2013)
<i>Acer saccharum</i>	Hojas	3,48 g/100 g	Inoue and Hagerman (1988)
<i>Liquidambar styraciflua</i>	Hojas	1,5 g/100 g	Inoue and Hagerman (1988)
<i>Betuna pubescens</i>	Hojas	6,0 g/100 g	Salminen (2003)
<i>Terminalia chebula</i>	Fruto	40 g/100 g	Lokeswari and Jaya Raju (2007)
<i>Quercus persica</i>	Hojas	4,6 g/100 g	Yousef Elahi and Rouzbehan (2008)
<i>Quercus infectoria</i>	Hojas	8,7 g/100 g	Yousef Elahi and Rouzbehan (2008)
<i>Quercus libani</i>	Hojas	6,2 g/100 g	Yousef Elahi and Rouzbehan (2008)

Fuente. Datos tomados de Chambi et al. (2013)

## **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

### **3.1 Estudio**

#### ***3.1.1 Tipo y diseño de investigación***

El tipo de investigación es experimental y transversal.

#### ***3.1.2 Unidad de análisis***

Animales de experimentación: *Rattus norvegicus* cepas Holtzmann machos y Sprague Dawley hembras y machos.

#### ***3.1.3 Tamaño de muestra***

Setenta y ocho (78 ratas albinas distribuidas del siguiente modo: 36 especímenes machos para el modelo de lesión inducida por etanol 70%, 30 especímenes machos para el modelo de ligadura pilórica y 12 (06 hembras y 06 machos) para evaluar la toxicidad aguda del EAVT.

#### ***3.1.4 Selección de muestra***

Posterior al período de aclimatación de siete días en el bioterio, las ratas provenientes del bioterio del centro de producción de la Universidad Agraria la Molina (UNALM), se distribuyeron en los grupos experimentales en forma aleatoria.

#### ***3.1.5 Lugar***

- Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN).
- Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

- Instituto de Investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM.

### **3.1.6 Técnicas de recolección de datos**

Los datos se recolectaron mediante la información personalizada de las observaciones *in situ*, durante el procesamiento de la muestra vegetal y de los experimentos *in vivo* con las mediciones físicas y bioquímicas, los cuales se describen a continuación en materiales y métodos.

## **3.2 Materiales y Métodos**

### **3.2.1 Material biológico**

Las vainas de la planta *Caesalpinia spinosa* “tara”, fueron adquiridas del fundo del Ing. Mostacero ubicado en la localidad de Magollo a 150 m.s.n.m de la provincia y departamento de Tacna. La identificación taxonómica se realizó en el Herbario Takana, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna (ver *Anexo 1*).

### **3.2.2 Reactivos**

Todos los reactivos fueron de grado analítico.

Alcian Blue, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), fosfato monohidrogenado de sodio, fosfato dihidrogenado de sodio, L(+)-ácido ascórbico, L- glutation reducido (GSH), L-tirosina, reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio , hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido acético, éter dietílico, formol 10% y fenoftaleina fueron de la marca MERCK.

1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH); Ellman’s Reagent; trizma HCl; trizma base; 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH); ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), albúmina sérica bovina y ácido gálico fueron de la marca SIGMA - ALDRICH).

Otros reactivos utilizados fueron: Dextrosa 5% (Laboratorio TRIFARMA), solución salina fisiológica (Medifarma - Perú), etanol (LAQUIFAZA), cloruro de magnesio (Fisher Scientific Company) y ácido tricloroacético (TCA) (Scharlau Chemie) y metanol absoluto (Induquímica SRL).

### **3.2.3 Equipos**

Espectrofotometro Spectro UV-Vis Double Beam PC (LABOMED, INC.), espectrofotómetro Genesys 10S Vis Thermo Scientific, balanza analítica Sartorius BP 2, homogenizador TissueTearor model 985370, 5 000 – 32 000 RPM, potenciómetro (Accumet-Basic/AB15, Fischer Scientific), agitador Vortex VM-300 (GEMMY), molino eléctrico de cuchillas (Willey Mill St. Model N° 3), baño maría Tomos CDK-S22, equipo de filtración al vacío, Estufa, bidestilador y cámara fotográfica Canon PowerShot SD890IS.

### **3.2.4 Software**

ImageJ 1.48v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA.

## **3.3 Método descriptivo**

### **3.4.1 Selección y procesamiento de las vainas de tara *C. spinosa***

**Secado:** Las vainas enteras y uniformes, previamente limpiadas y extraídas las semillas, fueron secadas en una estufa de aire circulante entre 37°C a 40°C durante 48 horas o hasta que el peso se mantuvo constante.

**Molienda:** Las vainas secas fueron molidas utilizando un molino de cuchillas eléctrico (Willey Mill St. Model N° 3) del Laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM; y almacenadas en frascos de color ámbar, sellados herméticamente y debidamente rotulado.

### 3.4.2 *Preparación del extracto acuoso a partir de las vainas de C. spinosa (EAVT).*

A 50 g de las vainas de tara molidas, se añadió 200 mL de agua destilada (1:4 p/v) a 65° C en un baño María (marca TOMOS) por una hora (Garro et al.,1997). Posteriormente, fue filtrado a través de una gasa y por último filtrado al vacío nuevamente por papel de filtro N° 40. El extracto así obtenido fue de color caramelo y colocado en placas Petri, las cuales se llevaron a una estufa de aire circulante alrededor de 40° C por 72 horas. Posteriormente se pesó y almacenó en frascos de color ámbar en refrigeración a 4° C hasta su uso (ver *Anexo 2*), esta masa seca se denomina EAVT.

### 3.4.3 *Análisis fitoquímico del EAVT C. spinosa*

La determinación semicuantitativa de los metabolitos secundarios fue llevado a cabo en el Laboratorio del Instituto de Investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM.

Se utilizó para determinar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de la especie vegetal, basada en la aplicación de pruebas de coloración y precipitación, (Lock, 1994), para lo cual, se usó 400 mg del EAVT disuelto en 10 mL de agua destilada; luego se colocó 1 mL de ésta solución en tubos de ensayos, a los cuales se realizaron las siguientes reacciones y se añadieron los siguientes reactivos:

- Tubo I: Control: 1 mL de EAVT (40 mg/mL).
- Tubo II. **Reacción de Ninhidrina:** Ninhidrina al 1% en etanol (1 gota), para determinar la presencia o ausencia de aminoácidos. La positividad se manifiesta por la aparición de un color violáceo o amarillo (prolina e hidroxiprolina). Algunas soluciones de amonio y aminas, dan la coloración característica, aparentemente debido a una oxidación y reducción intramolecular de la ninhidrina en presencia de amoníaco.



- Tubo III. **Reacción de la gelatina:** Gelatina al 1% (1-2 gotas), para determinar la presencia de taninos. Los taninos precipitan a las soluciones de proteínas dando como resultado desde opalescencia blanca hasta precipitado
- Tubo IV. **Reacción de FeCl<sub>3</sub>:** FeCl<sub>3</sub> al 1% (1-2 gotas), para determinar la presencia o ausencia de compuestos fenólicos. La disolución de tricloruro férrico al formar complejos coloreados con los fenoles se torna verde oscuro, hasta azul negruzco.
- Tubo V: **Reacción de Dragendorff:** Reactivo de Dragendorff (tetrayodobis mutatopotásico) (1-2 gotas), para determinar la presencia o ausencia de alcaloides. La formación de precipitado naranja o rojo naranja indica la reacción positiva.
- Tubo VI. **Reacción de Mayer:** Reactivo de Mayer (tetrayodomercuriato potásico). (1-2 gotas), La presencia de turbidez o precipitado blanco indica positivo para alcaloides.
- Tubo VII. **Reacción de Borntrager:** NaOH 5% (1-2 gotas), la aparición de color rojo indica presencia de naftoquinonas, antronas y antranonas.
- Tubo VIII. **Reacción de Molisch:**  $\alpha$ -naftol 2% en etanol (3 gotas) agitar + H<sub>2</sub>SO<sub>4cc</sub> (5 gotas) por las paredes del tubo. La reacción se basa en la formación de furfural o derivados de éste, originados por el H<sub>2</sub>SO<sub>4cc</sub> que provocan la deshidratación de los azúcares para obtener el furfural que se combina con el  $\alpha$ -naftol sulfonato originando un complejo púrpura o violeta. Es una reacción muy sensible puesto que soluciones de glucosa al 0,001% y sacarosa al 0,0001% dan positiva la prueba.
- Tubo IX. **Reacción de Shinoda:** Mg metálico + HClcc (2 gotas), para determinar la presencia o ausencia de flavonoides. En esta reacción, el magnesio metálico es oxidado por el HClcc, dando como productos al H<sub>2</sub>, que es eliminado en forma de gas y el MgCl<sub>2</sub>, que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones

características. El magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado. Si en estas condiciones se observa la aparición de coloración rojiza hasta violeta, la reacción es positiva para compuestos con el núcleo de la  $\gamma$ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, xantonas e isoflavonoides).

#### **3.4.4 Cuantificación de fenoles totales del EAVT *C. spinosa***

La determinación de fenoles se realizó mediante la técnica de Singleton et al., (1999).

**Fundamento:** Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul, el cual es evaluado para determinar el contenido en polifenoles.

Sin embargo este reactivo mide los fenoles totales y cualquier sustancia reductora, por lo que mide la capacidad reductora total de una muestra.

La lectura de la absorbancia del complejo se realizó a 760 nm en un espectrofotómetro ultravioleta - visible. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico. La cuantificación del contenido total de fenoles se realizó mediante un patrón externo, expresando el resultado en mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) / por gramo de extracto seco de las vainas de la tara (EAVT).

*El ácido gálico:* A partir de la solución patrón de ácido gálico de 6  $\mu\text{g/mL}$ , se procedió a realizar una serie de diluciones con agua destilada para obtener concentraciones de 0,25; 0,75; 1,25 y 1,75  $\mu\text{g/mL}$ . Para ello se colocó en distintos

viales protegidos de la luz 50, 150, 250 y 350  $\mu\text{L}$  de la solución patrón antes descrita. A cada vial se le adicionó 400  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu (1/3), se agitó y luego se agregó 400  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 10%. La mezcla se llevó a un volumen final de 1 200  $\mu\text{L}$  usando agua destilada y se dejó reposar por 2 h. Finalmente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 760 nm. El blanco tuvo los mismos componentes excepto el ácido gálico.

*El EAVT:* Se procedió a realizar las diluciones del extracto desecado a partir de una disolución de 50 mg/mL. Se tomó 400  $\mu\text{L}$  de la dilución (1/1 000) a la cual se le adicionó 400  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu (1/3). Se dejó reposar alrededor de 5 minutos y se adicionó 400  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 10%. Se agitó y se dejó reposar por 2 horas. La lectura se realizó a 760 nm.

#### **3.4.5 Evaluación de la actividad antioxidante in vitro**

**Método del DPPH:** Para la determinación de la actividad antirradical se utilizó una modificación del método 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), descrito por Yamaguchi et al., 1998 con algunas modificaciones (Oré, 2008). Este método evalúa la actividad de las sustancias frente a una solución metanólica de DPPH de color violeta intenso, cuya intensidad disminuye de acuerdo a la cantidad de sustancias que contenga la muestra con capacidad de neutralizar a este radical libre. El DPPH se disolvió en metanol a una concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$ , se preparó inmediatamente antes de ser utilizada y se protegió de la luz para evitar su degradación (Mosquera et al., 2005). El estándar utilizado fue la solución de ácido ascórbico diluida a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  en metanol protegida de la luz. El EAVT fue disuelto hasta obtener una concentración de 8  $\mu\text{g/mL}$ .

- En una batería de 6 tubos se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de las diluciones del EAVT o de ácido ascórbico, al cual se adicionó 800  $\mu\text{L}$  de solución de DPPH.
- La solución resultante se agitó por vortex y se incubó, a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz, durante 15 min.

- La disminución de la absorbancia fue leída en el espectrofotómetro Spectro UV-Vis Double Beam PC (LABOMED, INC.) a 517 nm.
- La capacidad de captación de radicales del extracto fue expresado como % de inhibición, determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \left( \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \right)$$

Donde:

A control es la absorbancia a tiempo cero.

A muestra es la absorbancia a tiempo de 15 minutos.

- Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se promediaron las lecturas.

**Coefficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>):** El cálculo del correspondiente valor de IC<sub>50</sub>, se determinó mediante un análisis de regresión de los porcentajes de inhibición versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir el 50% del radical DPPH. Se determinó el IC<sub>50</sub> para el ácido ascórbico y para el extracto acuoso de la tara *C. spinosa*.

#### 3.4.6 Evaluación de la toxicidad aguda del EAVT

**Método:** Procedimiento de Dosis Fijas (PDF), internacionalmente aceptado y validado (OECD, 2001). Está basado en un estudio cualicuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas.

**Sustancia de ensayo:** Se utilizó el EAVT *Caesalpinia spinosa* a una concentración de 2000 mg/mL.

**Modelo biológico:** Se utilizaron 12 ratas albinas *Rattus norvegicus* cepa. Sprague-Dawley, de ambos sexos con una masa corporal de  $210 \pm 20,5$  g y 8 semanas de edad, con desarrollo normal (ver *Anexos 6 y 8*) por ser la especie más conveniente para la administración por vía oral (Repetto y Repetto, 2009). Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM en jaulas metálicas de crianza para su aclimatación por siete días, a una temperatura de 23 - 25 ° C, con humedad relativa de 70 - 80 % y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Recibieron como alimento dieta balanceada, y agua apta para consumo humano. El acceso a los alimentos y el agua fue *ad libitum*. Los animales fueron sometidos a cuarentena e inspección clínica diaria durante 5 días antes del inicio de experimento.

### 3.4 Diseño experimental

Aleatoriamente se conformaron cuatro grupos experimentales. Las sustancias de ensayo fueron administradas con un ayuno previo de 16 a 18 horas por vía oral mediante cánula intragástrica, a dosis única de 2 000 mg/kg de masa corporal, teniendo en cuenta la ausencia de signos o síntomas de toxicidad por esta vía de administración. Se dosificaron y administraron al peso de cada rata un volumen de 10 mL/kg masa corporal del EAVT y de suero fisiológico para el grupo control.

Los animales fueron observados individualmente durante 30 minutos, con especial atención durante las primeras 24 horas y diariamente hasta los 14 días del experimento. Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: muerte y tiempo de ocurrencia de la misma, signos de toxicidad incluyendo su comienzo y duración, además de cambios en la piel, membranas de mucosas y ojos, en el sistema nervioso central, en el sistema respiratorio, en la actividad somatomotora y en la conducta. Se prestó especial atención a la ocurrencia de convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma.(Bermúdez et al., 2007).

Se controló el peso vivo de los animales en los días 1, 7 y 14 del experimento como uno de los parámetros demostrativos de toxicidad. Al concluir el experimento se sacrificaron los animales por inhalación de éter etílico para el posterior estudio

anatomopatológico macroscópico del estómago, hígado, bazo, pulmones y riñones, se evaluó, peso, coloración y tamaño de los diferentes órganos.

#### **3.4.1 Evaluación del efecto protector de la mucosa gástrica del EAVT *C. spinosa*. Método de lesión gástrica inducida por etanol (Robert et al., 1979).**

**Fundamento:** Este modelo de estudio se basa en una producción rápida de necrosis (1 hora) de las células de la mucosa, que origina la liberación de mediadores vasoactivos, seguido de vasoconstricción y dilatación arteriolar; que se traduce en la aparición de hiperemia, edema y hemorragia. Las lesiones se caracterizan por presentarse como bandas alargadas rojizas de 1-10 mm de largo por 1-3 mm de ancho, generalmente paralelas al eje longitudinal del estómago. Esto ocurre independientemente de la secreción gástrica. Las lesiones se ubican principalmente en el corpus en tanto que el antro es menos afectado.

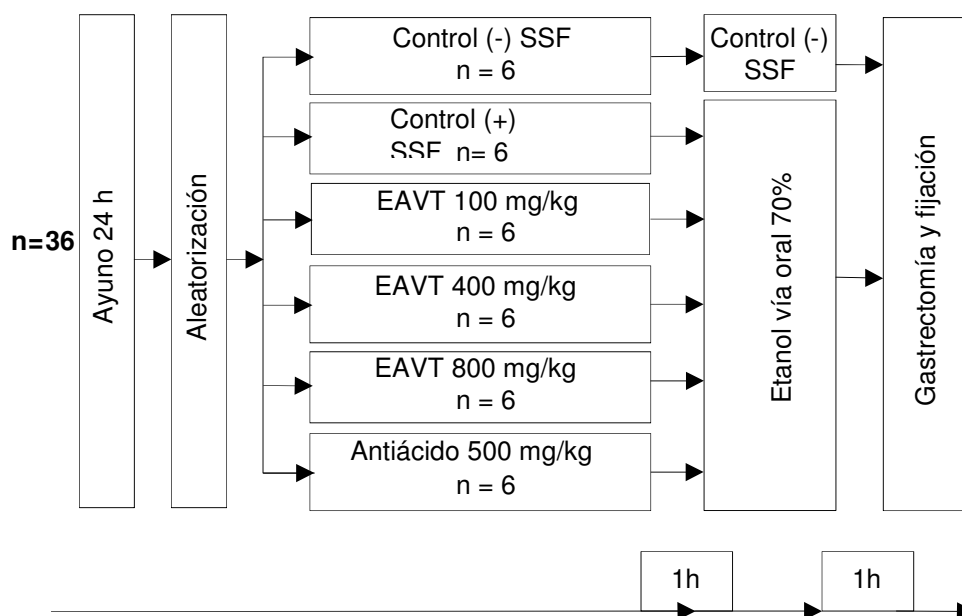
**Preparación de los animales.** Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM en jaulas metálicas de crianza para su aclimatación, a una temperatura de 23 - 25 ° C, con humedad relativa de 70 - 80 % y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Recibieron como alimento dieta balanceada, y agua apta para consumo humano. El acceso a los alimentos y el agua fue *ad libitum*. Previo al experimento las ratas se transfirieron a jaulas anticoprofágicas, y se mantuvieron en condiciones de ayuno de sólidos 24 horas antes del ensayo con dextrosa 5% *ad libitum*. Al inicio del experimento, se registró el peso de cada rata y se realizó la identificación de las mismas.

El diseño experimental para este estudio fue el diseño completamente aleatorio con cuatro tratamientos y dos grupos testigo con seis repeticiones.

#### **Procedimiento:**

- Se utilizaron 36 ratas macho de 8,5 ± 0,5 semanas de edad; con peso corporal promedio de 217 g ± 22 g de peso, divididas en seis grupos a los cuales se administró las diferentes sustancias de acuerdo a la *Figura 6*.

- El extracto seco de *C. spinosa* (EAVT) fue disuelto en agua destilada, obteniéndose una solución de 100, 400 y 800 mg/kg de peso
- Luego de inmovilizar al animal, se administró vía orogástrica con una cánula rígida de punta roma, las sustancias indicadas en la *Figura 6*, en un volumen de 1 mL/100g del peso de la rata.
- Transcurrida 1 hora después de la administración de las sustancias, se administró vía orogástrica 1 mL de etanol al 70% / 100g del peso de la rata a los grupos del II al VI, al grupo I se administró nuevamente suero fisiológico.
- Luego de 1 hora, se procedió a anestesiarse a las ratas con vapores de éter etílico, para realizar la gastrectomía, el cual fue abierto por la curvatura mayor, posteriormente se realizó lavados con solución salina fisiológica y fijado en una plancha de tecnopor con alfileres.



**Figura 6. Efecto protector de la mucosa gástrica EATV *C. spinosa* “tara” modelo de lesión inducida por etanol 70%.**

### **3.4.1.1 Análisis Macroscópico.** (Método propuesto por Khan, 2004).

Para la versión de Windows, la evaluación macroscópica se realizó empleando el software ImageJ 1.48v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA (Júnior *et al.*, 2014; Viana *et al.*, 2013).

Se realizó de la siguiente manera:

Las imágenes se obtuvieron con una cámara fotográfica Canon PowerShot SD890IS que almacena directamente las imágenes en formato JPEG, y para obtener la mayor calidad de las imágenes se seleccionó la compresión más baja.

Para los estudios de índice de lesión (IL) gástrica, cualquier daño presente en la mucosa de la porción glandular, se registró como la media aritmética del área de lesión (mm<sup>2</sup>) para cada tratamiento. El cálculo del índice de lesión (IL) y el porcentaje de protección de la mucosa gástrica fueron calculados por la siguiente fórmula (Dengiz *et al.*, 2007; Sandoval *et al.*, 2010).

$$IL = \frac{\text{Area lesionada}}{\text{Area total del estómago}} \times 100$$

$$\% \text{ Protección} = 100 - \left( \frac{ALt}{ALc} \times 100 \right)$$

Donde:

ALc = Promedio del área de lesión gástrica del control.

ALt = Promedio del área de lesión gástrica del tratamiento.

### **3.4.1.2 Análisis Microscópico.**

Los tejidos gástricos fueron conservados en formol al 10% para su estudio histopatológico. De cada uno de los estómagos, se tomaron un total de seis muestras de la mucosa glandular (tres del lado derecho y tres del lado izquierdo del extendido



de la muestra de estómago). Los cortes micrométricos posteriormente fueron teñidos con hematoxilina-eosina. El tratamiento de las muestras y la lectura de las láminas fueron realizadas por un médico patólogo en el Instituto de Patología ARIAS STELLA.

### 3.4.2 *Evaluación del efecto protector de la mucosa gástrica del EAVT C. spinosa. Método de ligadura pilórica (Visscher et al., 1954 y modificado por Sandoval et al, 2002)*

**Fundamento:** El modelo permite estudiar *in situ* el efecto sobre la secreción gástrica de una determinada droga, e inferir el mecanismo por lo que una droga actúa como agente protector gástrico o antiulcerogénico. Las lesiones gástricas inducidas por este modelo ocurren por la acumulación de jugo gástrico debido a la obstrucción pilórica y subsiguiente digestión de la mucosa, y la interferencia en el flujo sanguíneo gástrico, conllevando al daño del revestimiento del tejido gástrico y formación de úlceras. Posteriormente, el contenido gástrico es colectado y al cual se mide el volumen, acidez libre (pH) y acidez total, actividad péptica y en la parte glandular del estómago; cuantificación de moco gástrico, determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos, lipoperoxidación entre otros. Para estimular la secreción gástrica, ésta es estimulada por la inyección vía subcutánea de histamina (50 µg/kg).

**Preparación de los animales.** Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM en jaulas metálicas de crianza para su aclimatación, a una temperatura de 23 - 25 ° C, con humedad relativa de 70 - 80 % y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Recibieron como alimento dieta balanceada, y agua apta para consumo humano. El acceso a los alimentos y el agua fue *ad libitum*.

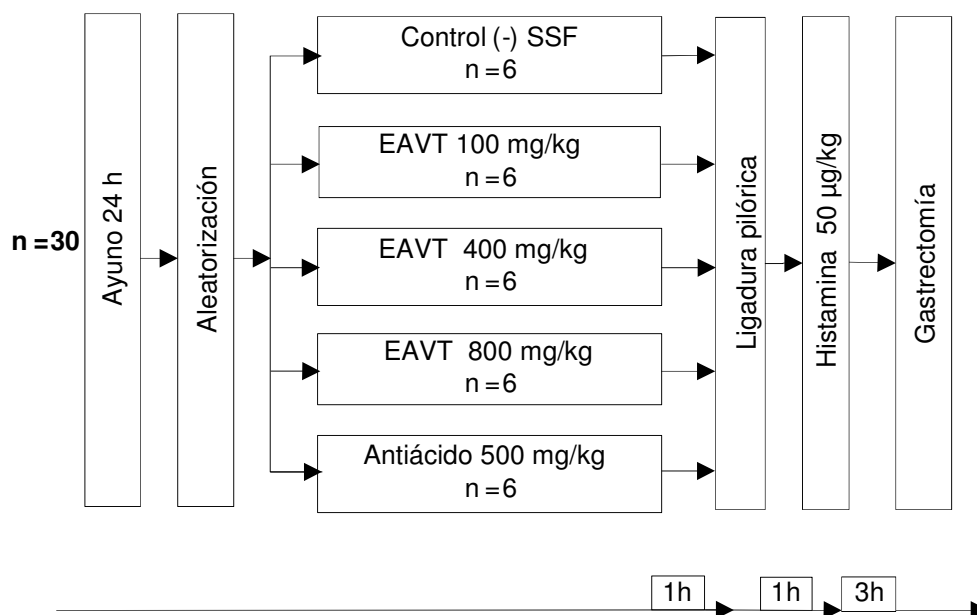
Previo al experimento las ratas se transfirieron a jaulas anticoprofágicas y se mantuvieron en condiciones de ayuno de sólidos 24 horas antes del ensayo con dextrosa 5% *ad libitum*.

Al inicio del experimento, se registró el peso de cada rata y se realizó la identificación de las mismas.

El diseño experimental para el estudio fue el diseño completamente aleatorio con cuatro tratamientos y un grupo testigo con seis repeticiones.

### **Procedimiento:**

- El EAVT fue disuelto en agua destilada, obteniéndose una solución para administrar en las ratas de 100, 400 y 800 mg/kg de peso.
- Se utilizaron 30 ratas macho cepa Holtzman de  $8,5 \pm 0,5$  semanas de edad; con un peso corporal promedio de  $253,5 \text{ g} \pm 30,5$  a los cuales se administró las diferentes sustancias de acuerdo a la *Figura 7*, en un volumen de 1 mL/100g del peso de la rata.
- Después de 1 hora, las ratas fueron sometidas a anestesia por inhalación con éter. Se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm de longitud en el tercio anterior de la línea media abdominal, localizándose el estómago y ligando el esfínter pilórico, posteriormente la pared abdominal fue cerrada y se colocó a los animales en jaulas de observación.
- Una hora después de la intervención quirúrgica se aplicó histamina 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , disuelto en suero fisiológico, vía subcutánea, para inducir la secreción gástrica.
- Transcurrido 4 horas de la intervención quirúrgica, los animales nuevamente fueron anestesiados con vapores de éter, y se retiraron los puntos de la incisión en el abdomen para ligar el cardias y extraer el estómago.
- El contenido gástrico fue recolectado en frascos con tapa y mantenida sobre una placa de hielo (aprox.  $4^{\circ}\text{C}$ ).
- El estómago fue abierto por la curvatura mayor y lavado con suero fisiológico, se aisló la sección glandular (*corpus o pars glandularis*) (Robert, 1971) (ver *Anexo 3*), del cual se tomó la mitad cercana al píloro. La manipulación del tejido se realizó sobre una superficie de hielo para conservar el tejido.



**Figura 7. Efecto protector de la mucosa gástrica del EAVT. Modelo de ligadura pilórica.**

#### 3.4.2.1 Determinación de moco gástrico

**Método:** Método de Corne (CYTED/CNP, 2001) modificado por Sandoval et al, 2010.

**Fundamento:** El alcian blue en medio acuoso posee carga positiva, el cual va a interactuar con los grupos sulfhidrilos de los restos de azúcares de glicoproteínas del moco gástrico, el cual posteriormente es extraído con  $MgCl_2$ ; el  $Mg^{2+}$  desplaza al alcian blue adherido a la glicoproteína de la mucosa gástrica y finalmente el alcian blue es solubilizado en etanol 70% y cuantificado por espectrofotometría a 598 nm.

#### Procedimiento:

- Se obtuvo una porción glandular del tejido gástrico, la cual fue pesada en una balanza analítica y su peso fue registrado.

- Luego se colocó el tejido en un frasco con tapa y se agregó 7 mL de solución de alcian Blue 0,2 g%, mezclado suavemente y dejado colorear por 1 hora.
- Posteriormente se eliminó el colorante y se lavó dos veces con 7 mL de sacarosa 0,25 mol/L (entre el primer y segundo lavado se esperó 15 min). El exceso de sacarosa fue eliminado.
- Se agregó 5 mL de cloruro de magnesio 0,5 mol/L y se agitó vigorosamente.
- Luego se colocó en un tubo de centrifuga 3 mL del contenido y se añadió 1 mL de éter dietílico. Se agitó y centrifugó a 5 000 rpm por 5 min.
- Se dejó el moco y se agregó 5 mL de solución de ácido acético 0,1 mol/L en etanol 70%, se agitó constantemente por 10 segundos.
- Finalmente se llevó a centrifugar a 5 000 rpm por 5 min.
- Las lecturas de absorbancias se realizaron a una longitud de onda de 598 nm.
- Se preparó una curva de calibración de alcian blue, con las siguientes concentraciones de 10 a 50 µg/mL.
- Los resultados fueron expresados en g alcian blue/mL/g de tejido, y en porcentaje de incremento de mucus gástrico, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ incremento de mucus} = \frac{(IMt - IMc)}{IMc} \times 100 \%$$

Donde:

IMt: índice de mucus del tratamiento,

IMc: índice de mucus del control.

### 3.4.2.2 *Determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos (GS-NP)*

**Método:** Método de Sedlak y Lindsay, 1968.

**Fundamento:** Se basa en la reacción del reactivo de Ellman, el 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) es reducido por grupos SH para formar un mol de ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico por mol de SH. El anión ácido mercaptobenzoico tiene un color amarillo intenso y puede ser usado para medir grupos SH. La medida del producto formado es realizada por espectrofotometría.

**Procedimiento:**

- Se homogenizó el segmento glandular de un peso aprox. de 150 mg con c.s.p. 5 mL de EDTA 0,02 mol/L mantenido a 4°C.
- En un tubo de ensayo se agregó 2 mL de homogenizado, 1,6 mL de agua destilada y 0,8 mL de ácido tricloroacético al 50%. Luego de agitar vigorosamente por 10 -15 minutos, se centrifugó a 3 000 g por 15 minutos.
- A 1 mL del sobrenadante se adicionó 4 mL de buffer Tris 0,4 mol/L a pH 8,9 y 0,05 mL de DNTB al 0,01 mol/L y se agitó para mezclar.
- Las lecturas de absorbancias se realizaron a una longitud de onda de 412 nm dentro de los 5 minutos.
- Se preparó una curva de calibración de glutation (GSH), con las concentraciones de 10 a 50 µg/mL. Los resultados se expresaron en g de GS-NP/mL/g de tejido y en porcentaje de incremento de GS-NP, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ incremento de GS - NP} = \frac{(IGSt - IGSc)}{IGSc} \times 100 \%$$

Donde:

IGSt: índice de grupo sulfhidrilos no proteico del tratamiento,

IGSc: índice de grupo sulfhidrilos no proteico del control.

### 3.4.2.3 *Determinación de lipoperoxidación*

**Método:** Método de Buege y Aust (1978), con algunas modificaciones (Sandoval et al., 2006).

**Fundamento:** La lipoperoxidación se estima midiendo las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). El grupo aldehído del malondialdehído generado como producto de la descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado (TBA- MDA) cromóforo rosado, el cual posee una absorbancia máxima a 532 nm y su coeficiente de extinción es  $1,56 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

**Procedimiento:**

- La muestra fue homogenizada con volumen c.s.p. 5mL con buffer fosfato de sodio (0,05M, pH 7).
- Luego se colocó 0,6 mL de homogenizado.
- Se añadió 1,2 mL de TCA 20 %. Se llevó a baño maría de 100 °C por 10 min.
- Posteriormente se agregó 1,8 mL de TBA 0,67% en HCl 0,25 N.
- Se llevó a baño maría de 100 °C por 30 min. Se enfrió y centrifugó por 8 min. La lectura de absorbancia fue a 535nm.
- Finalmente los resultados fueron expresados como moles de malondialdehído (MDA)/g de tejido y fueron calculados en base al coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de malondialdehído de  $1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 3.4.2.4 Efecto del EAVT *C. spinosa* en la secreción gástrica.

##### a) Determinación de la actividad péptica.

**Método:** Método modificado de Anson, 1938 (CYTED/CNP, 2001).

**Fundamento:** La pepsina es una endoproteasa que hidroliza enlaces peptídicos formados por leucina, tirosina o fenilalanina. La reacción de reconocimiento de los productos de la hidrólisis ocurre por lo menos en dos pasos, primero se forma un complejo de Biuret, entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y el enlace peptídico, esta reacción favorecería la reducción a  $\text{Cu}^+$ : El segundo paso, el  $\text{Cu}^+$  reduce el reactivo de Folin-Ciocalteu, lo cual da lugar a un cromógeno de color azul. También contribuyen a la oxidación del reactivo del reactivo de Folin-Ciocalteu las cadenas laterales de algunos aminoácidos como la tirosina, fenilalanina, triptófano y en menor medida cisteína e histidina.

##### **Procedimiento:**

- Se centrifugó a 3 500 rpm por 5 min el jugo gástrico, se trabajó con el sobrenadante.
- Se dispuso en un tubo de ensayo 1 mL de albúmina (mg/mL en HCl 0,06 N) a 37°C por 5 minutos.
- Se agregó 0,2 mL de jugo gástrico y se incubó a 37 °C por 10 min.
- Luego se añadió 1 mL de ácido tricloroacético a 10 g% y se centrifugó a 5 000 rpm por 10 min.
- Del sobrenadante se tomó 0,5 mL a otro tubo y se agregó 2,5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,55 mol/L, y fue mezclado.
- Finalmente se añadió 0,25 mL de reactivo de Folin, se mezcló y se dejó reposar por 30 min.
- Las lecturas de absorbancias se realizaron a una longitud de onda de 660 nm.
- Se preparó una curva de calibración de tirosina, con las siguientes concentraciones: 3,125; 6,25; 12,5; 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$  (2 mL/tubo).

- Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{g}$  tirosina /mL y en porcentaje de incremento de la actividad péptica mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ incremento de la actividad péptica} = \frac{(IAP_t - IAP_c)}{IAP_c} \times 100 \%$$

Donde:

IMt: índice de la actividad péptica del tratamiento,

IMc: índice de la actividad péptica del control.

#### ***b) Determinación de la acidez total.***

**Método:** Método descrito por Sandoval et al. (2005). La valoración se efectúa con el indicador de fenolftaleína por titulación con NaOH 0,01 N, y los resultados son expresados en mEq- $\text{H}^+$ /L.

#### **Procedimiento:**

- Se centrifugó a 3500 rpm por 5 min el jugo gástrico, se trabajó con el sobrenadante.
- Se colocó en un beaker de 50 mL: 0,1 mL de jugo gástrico.
- Luego se agregó 5 mL de agua destilada, mezclando por rotación.
- Seguidamente se agregó 2 gotas de fenolftaleína y se tituló con una solución de NaOH 0,01 N y el gasto fue registrado. Los resultados fueron expresados en mEq[ $\text{H}^+$ ]/L/4h.

$$\% \text{ incremento de la acidez total} = \frac{(IAT_t - IAT_c)}{IAT_c} \times 100 \%$$

Donde:

IMt: índice de la acidez total del tratamiento,

IMc: índice de la acidez total del control.



### ***c) Determinación de acidez libre***

**Método:** Método descrito por Sandoval et al., (2005) por potenciometría.

**Procedimiento:**

- Se centrifugó a 3 500 rpm por 5 min el jugo gástrico, se trabajó con el sobrenadante.
- El jugo gástrico se centrifugó a 3500 rpm por 5 min, se trabajó con el sobrenadante.
- Se colocó en un tubo 0,1 mL de jugo gástrico.
- Luego se agregó 9,9 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 10 minutos.
- Finalmente se midió el pH con el potenciómetro restando 2 unidades a la lectura del equipo. Las lecturas se realizaron por duplicado.

#### ***3.4.3 Consideraciones éticas***

Para los ensayos en ratas, *Rattus norvegicus* cepas Holtzmann machos y Sprague Dawley hembras y machos, se tuvo en consideración el título IV: de la Experimentación e Investigación y la Docencia, de la Ley N° 11794-2000, Ley Peruana de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio. Para evitar el sufrimiento de los animales fue necesario la administración de un anestésico para realizar la ligadura pilórica y antes de sacrificar a los animales. En el caso del ensayo de toxicidad aguda, ésta fue realizadas de acuerdo al procedimiento de dosis fijas de la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), cuyo objetivo es reducir el número de animales empleados y minimizar el sufrimiento de éstos.

#### 3.4.4 *Análisis de datos*

Se realizó el análisis de regresión lineal y se determinó el coeficiente de correlación para la cuantificación de fenoles y DPPH. Se reportan los valores medios  $\pm$  SD de tres réplicas. El coeficiente de correlación considerando como criterio  $R^2 > 0,990$ ; de la relación % Inhibición/ concentración de extracto.

Los resultados son expresados como media $\pm$ SD (n=6) y las diferencias entre grupos fueron determinados por análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y las diferencias significativas fueron determinadas realizando una comparación *post hoc* por la prueba de Dunnett, para establecer las posibles diferencias entre parejas de grupos; y para resultados no paramétricos, la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de U Mann–Whitney U.

En cada caso, se verificaron las condiciones de aplicación pertinentes: la prueba de Shapiro-Wilk, para determinar la normalidad, y el análisis de la homocedasticidad, mediante la prueba de Levene o Welch.

La significancia estadística fue considerada como  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ .

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 RESULTADOS:

#### 4.1.1 *Análisis fitoquímico del EAVT C. spinosa.*

Se realizó el análisis fitoquímico semicuantitativo de los metabolitos secundarios de una solución del EAVT al 0,4% p/v, los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 3*.

*Tabla 3. Resultados del estudio fitoquímico*

Ensayos	Metabolitos	EAVT
R. Ninhidrina	Aminoácidos libres y amino grupos	+
R. Gelatina 1%	Taninos	++
R. Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++
R. Dragendorf	Alcaloides	-
R. Mayer	Alcaloides	-
R. NaOH 5%	Cumarinas	-
R. Molish	Glicósidos	-
R. Shinoda	Flavonoides	+

Leyenda: (-) = ausente; (+) = poca cantidad, (++)= mediana cantidad; (+++) = mayor cantidad.

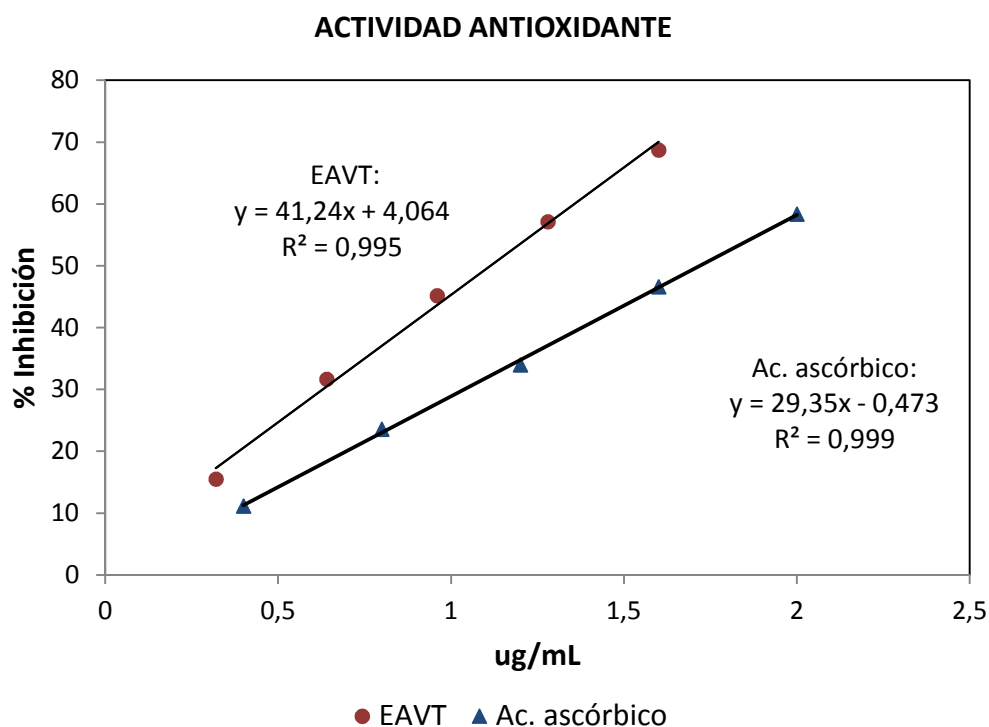
Al realizar el análisis fitoquímico del extracto acuoso de vainas de tara (EAVT) se evidenció la presencia de taninos, compuestos fenólicos y flavonoides (ver también *Anexo 4*). El pH del extracto acuoso obtenido por baño María a 65°C x 1 hora (EATV), re-disuelto después del secado fue de 3,8 a 25°C.

#### 4.1.2 Determinación del contenido de fenoles totales del EAVT *C. spinosa*.

De acuerdo al método utilizado para determinar el contenido total de fenoles totales, el EAVT contiene 383,76 mg EAG/g EAVT.

#### 4.1.3 Actividad antioxidante del EAVT por el método de DPPH.

La actividad antioxidante es expresada como porcentaje de inhibición, en la *Figura 8* se puede observar la cantidad de radical DPPH neutralizado por el EAVT, y de la sustancia antioxidante de referencia, el ácido ascórbico.



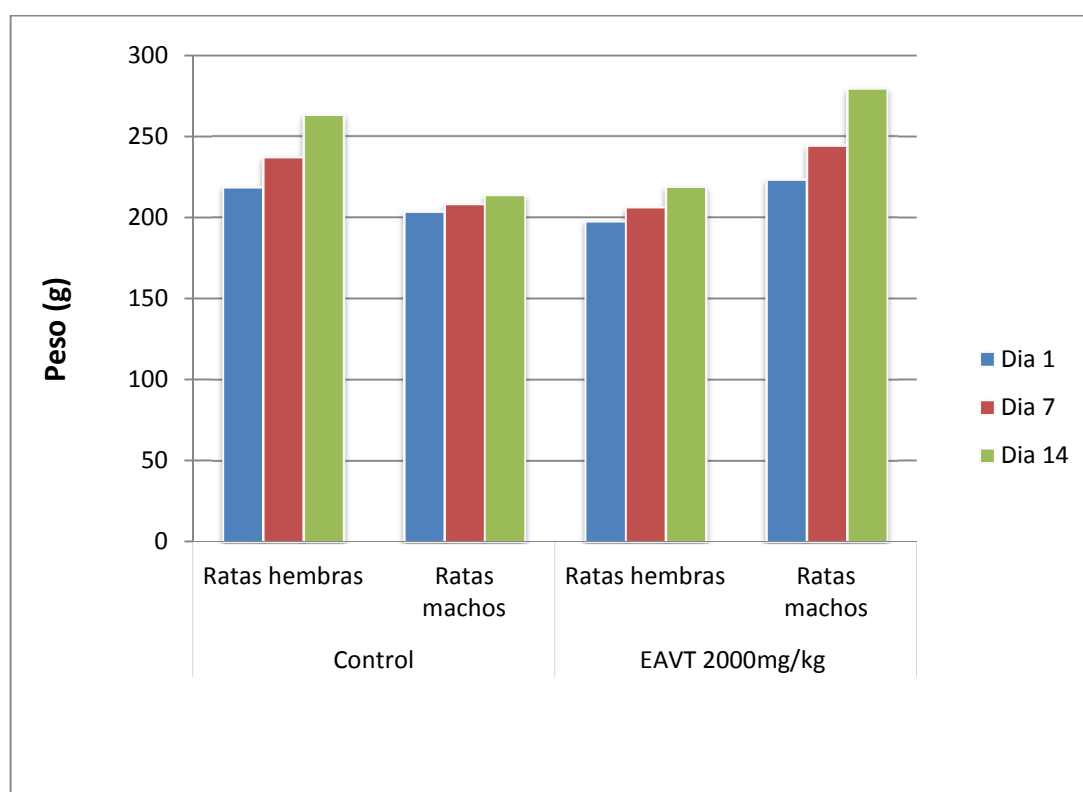
**Figura 8. Comparación de la gráfica del EAVT-ácido ascórbico en  $\mu\text{g/mL}$  versus % inhibición.**

El EAVT es el más activo, pues necesita de una menor cantidad de extracto para inhibir el 50 % del radical DPPH empleado en la evaluación ( $IC_{50} = 1,12 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ ), comparado con el estándar ácido ascórbico ( $IC_{50} = 1,72 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ ) (ver *Anexo 5a y b*).

#### 4.1.4 Determinación de la toxicidad aguda del EAVT *C. spinosa*:

En la evaluación de la toxicidad aguda no se produjo mortalidad a la dosis fija de 2000 mg/kg, que se considera límite para los estudios de toxicidad aguda oral a las clases de toxicidad establecidas por la Comunidad Europea. La masa corporal como indicador de toxicidad, se comportó estadísticamente similar en los grupos de ambos grupos respecto al grupo control (ver *Figura 9* y *Anexos 6 - 8 y 10*).

La coloración de los diferentes órganos investigados no evidenció patologías macroscópicamente. Bazo: Rojo vinoso, homogéneo. Corazón: Rojizo. Hígado: granate amarronado brillante. Consistencia firme y elástica. Riñón: Rojo pardo de consistencia firme. Estómago: Zona glandular rosada y presencia de moco (ver *Anexo 11*).



**Figura 9. Ganancia de peso en el ensayo de toxicidad aguda a dosis única en el grupo control y tratamientos a los 7 y 14 días de ensayo.**

#### 4.1.5 Evaluación del efecto protector de la mucosa gástrica del EAVT *C. spinosa*. Por el método de lesión gástrica inducida por etanol

##### 4.1.5.1 Resultados del análisis macroscópico

Los resultados se obtuvieron de los análisis macroscópicos de las fotografías tomadas a los estómagos de cada grupo, usando el software, ImageJ 1.48v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA (ver *Anexos 12 a y b*).

**Tabla 4. Índice de lesión y porcentaje de protección de cada grupo experimental. Los datos son presentados como media± DS.**

Grupo (n=6)	Promedio del área de lesión (mm <sup>2</sup> )	Media del índice de lesión (mm <sup>2</sup> )	% Protección
Control	62,02 ± 27,52	5,86 ± 2,27	-
Antiácido (OHMg-OHAI)	67,34 ± 25,45	8,01 ± 3,31	-
EAVT 100 mg/kg	21,24 ± 12,93 <sup>a,c</sup>	2,24 ± 1,40 <sup>a,c</sup>	65,75
EAVT 400 mg/kg	16,66 ± 14,45 <sup>b,c</sup>	1,57 ± 1,45 <sup>b,c</sup>	73,14
EAVT 800 mg/kg	0,21 ± 0,51 <sup>b,c</sup>	0,02 ± 0,05 <sup>b,c</sup>	99,66

Prueba de U Mann-Whitney:

(a) p<0,05 comparado con el control

(b) p<0,01 comparado con el control

(c) p<0,01 comparado con el antiácido (OHMg-OHAI)

En la *Tabla 4*, se puede observar que el efecto del tratamiento de la mucosa gástrica con el EAVT previo a la agresión con etanol a 70%, brindó protección a la mucosa de manera significativa (p<0,01) a las dosis más altas, comparadas con el control y el grupo con el antiácido comercial (OHMg-OHAL), el EAVT a dosis de 800 mg/kg presentó una área de lesión de 0,21 mm<sup>2</sup>, representando un 99,66% de protección de la mucosa. En el *Anexo 12a*, se puede observar el daño gástrico causado por el etanol y el antiácido comercial, disímil con aquellos en los que se administró el EAVT.

#### 4.1.5.2 Resultados de análisis histopatológico

Las microfotografías de los cortes histológicos se resumen en el *Anexo 13*. El grupo control negativo, muestran una apariencia histológica de la mucosa gástrica normal, con una superficie homogénea, arquitectura glandular conservada, lámina propia bien delimitada y vasos no congestionados (ver *Anexo 14a*), en contraste el grupo control positivo, presenta un amplio foco de erosión y necrosis de la mucosa superficial, profundidad de daño que compromete más de la mitad de la mucosa y congestión vascular (ver *Anexo 14b*). El grupo que recibió el extracto 100 mg/kg, presentó pequeñas zonas de necrosis asociada a una anoxia provocada por el etanol y erosión leve superficial en algunos cortes y congestión de vasos (hematíes) (ver *Anexo 14c*). A dosis de 400 mg/kg, se observó focos de erosión pero mínimas y sólo una de las muestras presentó necrosis superficial (ver *Anexo 14d*). El grupo del EAVT 800 mg/kg presentó erosión superficial en una de las muestras pero mínima (ver *Anexo 14e*). El grupo tratado con el antiácido (OHMg-OHAL) presentó necrosis en todas las muestras (ver *Anexo 14f*).

#### 4.1.6 Evaluación del efecto protector de la mucosa gástrica del EAVT *C. spinosa*. Por el método de ligadura pilórica

##### 4.1.6.1 Determinación de moco gástrico

*Tabla 5. Determinación de moco en el tejido gástrico inducido por el EAVT.*

Grupo	Moco gástrico (g Alcian Blue /mL/g tejido)	Incremento de mucus (%)
Control	0,34 ± 0,04	-
EAVT 100 mg/kg	0,43 ± 0,08	26,69
EAVT 400 mg/kg	0,47 ± 0,09 <sup>a</sup>	38,13
EAVT 800 mg/kg	0,34 ± 0,09	-1,30
Antiácido (OHMg-OHAL)	0,44 ± 0,07	28,82

(a)  $p < 0,05$  comparado con el control

En la *Tabla 5* se muestra que el tejido gástrico que presentó un incremento significativo de mucus (38%), fue el EAVT a 400 mg/kg ( $p < 0,05$ ) comparado con el control.

#### 4.1.6.2 Determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en la mucosa gástrica.

*Tabla 6. Determinación de GS-NP en el tejido gástrico inducido por el EAVT.*

Grupo	GS-NP (g GS-NP/mL/g)	Incremento GS-NP (%)
Control	4,61 ± 0,59	-
EAVT 100 mg/kg	4,48 ± 0,78	- 2,67
EAVT 400 mg/kg	4,62 ± 0,77	0,41
EAVT 800 mg/kg	3,36 ± 0,32 <sup>a</sup>	- 26,98
Antiácido (OHMg-OHAL)	4,51 ± 0,40	- 2,04

(a)  $p < 0,01$  comparado con el control.

En la *Tabla 6*, respecto al contenido de GS-NP de la mucosa gástrica, se observó una menor concentración de GS-NP en todos los grupos de tratamientos, siendo el grupo del EAVT 800 mg/kg el que disminuyó significativamente con respecto al grupo control ( $p < 0,01$ ).

#### 4.1.6.3 Determinación de lipoperoxidación

*Tabla 7. Determinación de lipoperoxidación en el tejido gástrico inducido por el EAVT.*

Grupo	Malondialdehído (10 <sup>-6</sup> M/g tejido)	Incremento de MDA (%)
Control	62,24 ± 19,61	-
EAVT 100 mg/kg	51,06 ± 12,18	-17,95
EAVT 400 mg/kg	52,18 ± 11,94	-16,16
EAVT 800 mg/kg	37,68 ± 07,80 <sup>a</sup>	-39,45
Antiácido (OHMg-OHAL)	50,72 ± 15,34	-18,50

(a)  $p < 0,05$  comparado con el control



En los resultados de la *Tabla 7*, se puede observar que todos los grupos de tratamiento disminuyeron los niveles de MDA, pero a 800 mg/kg de EAVT disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

#### 4.1.6.4 Determinación del efecto del EAVT en la secreción gástrica.

Los parámetros examinados después de cuatro de la ligadura pilórica, se muestran en la *Tabla 8*. Respecto a la actividad péptica, volumen de jugo gástrico, pH y acidez total, no hubo ninguna significancia estadística entre los grupos de tratamiento con EAVT y el grupo control. Pero hubo diferencia significativa en el pH entre el antiácido comercial y el grupo control ( $p < 0,05$ ). Asimismo hubo diferencia significativa entre el antiácido comercial y los grupos de tratamiento con EAVT de 100 y 400 mg/kg ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 8. Determinación de la actividad péptica, volumen, pH y acidez total del jugo gástrico inducido por el EAVT.**

Grupo	Actividad péptica ( $\mu\text{g}$ tirosina / mL) <sup>NS</sup>	Volumen (mL) <sup>NS</sup>	pH	Acidez total (mEq H <sup>+</sup> /mL) <sup>NS</sup>
Control	347,84 $\pm$ 171,99	6,25 $\pm$ 2,66	1,41 $\pm$ 0,93	0,37 $\pm$ 0,05
EAVT 100 mg/kg	289,83 $\pm$ 162,23	8,32 $\pm$ 6,55	1,45 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,41 $\pm$ 0,12
EAVT 400 mg/kg	308,64 $\pm$ 275,92	7,75 $\pm$ 3,83	1,41 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	0,44 $\pm$ 0,09
EAVT 800 mg/kg	401,59 $\pm$ 284,58	6,90 $\pm$ 3,23	1,62 $\pm$ 0,39	0,41 $\pm$ 0,11
Antiácido (OHMg-OHAL)	162,37 $\pm$ 99,03	8,27 $\pm$ 2,58	2,70 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,15

(a)  $p < 0,05$  comparado con el control.

(b)  $p < 0,05$  comparado con el antiácido (OHMg-OHAL).

(NS) no hubo significancia con el control ni con el antiácido (OHMg-OHAL) a  $p < 0,05$ .

## 4.2 DISCUSIÓN

El presente estudio investigó la actividad gastroprotectora del extracto acuoso obtenido de las vainas de tara *C. spinosa* (EAVT), en modelos experimentales de lesión gástrica con injuria aguda de etanol al 70%, y ligadura pilórica.

Los estudios que muestran un efecto protector gástrico, antiinflamatorio y actividad antioxidante de los polifenoles y taninos se encuentran en la literatura (Avilés et al., 2010; Barbehenn et al., 2011; López et al., 2011; Doroteo et al., 2012) y atendiendo a que los mayores componentes de las vainas de la tara son los taninos hidrolizables, polifenoles (Campos et al., 2009; De la Cruz, 2004), que son los componentes que le dan el atributo astringente, antiinflamatorio y antioxidante (Bate-Smith, 1973; Lock, 1994; Laloo et al., 2013), se procedió a realizar la extracción acuosa, debido a que diversos autores sugieren que en los métodos de preparación tradicionales, la mayoría de los remedios se preparan como extractos acuosos, evitando así los efectos tóxicos potenciales (Calixto, 2006; Busmann et al., 2011).

El análisis fitoquímico confirma la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos en mayor cantidad (ver *Tabla 3* y *Anexo 4*), lo cual concuerda con los resultados reportados por López et al. (2011), y el pH obtenido del EAVT redissuelto fue de 3,8; por lo tanto el extracto es ligeramente ácido y está dentro de los valores referenciales para esta especie (Hourdebaigt et al., 2007).

Estudios realizados en muestras de vainas de tara en el país muestran resultados similares respecto al contenido de fenoles totales, en distintos tipos de solventes de extracción. Campos et al., (2009), encontraron que el pH y la relación materia prima/solvente no influyen de forma significativa ( $p < 0,05$ ); mientras que el solvente presenta una influencia significativa, obteniéndose mejores resultados con acetona (80%), seguido de agua, luego etanol (80%) y finalmente metanol (80%); obteniendo una recuperación de taninos hidrolizables en el solvente agua de 473,4 mg EAG/g.

Garro et al. (1997) aplicando la misma metodología de extracción acuosa seguida en el presente estudio de las vainas de *C. spinosa* procedentes de Perú, realizaron análisis espectrofotométricos para cuantificar las cantidades de componentes libres y

combinados de los taninos presentes en dicho extracto, encontrando que los taninos de la tara son del tipo galotanino (53,1%) con un porcentaje mínimo de elagitanino (6,9%), y hubo también presencia de ácido gálico y elágico libre (2,6 y 1,6 % respectivamente).

Chambi et al. (2013) realizando la extracción acetónica al 80% (acetona/agua) de las vainas de tara obtenidas de Ancash, informan que los fenoles totales fueron de 551 mg EAG/g, los contenidos de galotaninos y de ácido gálico libre fueron de 50,4% y 1,7% respectivamente, y la suma de ambos compuestos representa el 95% de los compuestos fenólicos totales y el 5% restante de tara fenólicos podría estar compuesto por elagitaninos y otros compuestos fenólicos. Por tanto, en el EAVT podrían estar presentes los mismos componentes.

De igual forma, Avilés et al. (2010), con muestras provenientes de Huamanga realizaron diversos extractos de las vainas (polvo, fibra, semilla y cáscara); acuoso, metanólico, etanólico e hidroalcohólico, siendo el extracto acuoso por maceración del polvo, el que presentó mayor contenido de polifenoles totales, 149 mg EAG/g de muestra y 31,59% de taninos. Asimismo, López et al. (2011), encontraron diferencias, al realizar extracciones acuosas de las vainas provenientes de dos localidades de Junín; Picoy (3 000 msnm) y Santa Fe (2 860 msnm), y presentaron 563,70 y 413,20 mg EAG/g de extracto seco respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares, a los reportados para el contenido de fenoles totales; 383,76 mg EAG/g EAVT.

La capacidad de un extracto para eliminar los radicales libres, se puede fundamentar en sus propiedades antioxidantes dados sus componentes, y este mecanismo también podría ser una de las razones por las que el extracto ejerce su efecto protector y reparador del daño gástrico que causa el etanol. Así, la actividad antioxidante del EAVT fue determinada *in vitro* y comparada con un control positivo antioxidante, el ácido ascórbico.

Los resultados de la actividad antioxidante obtenidos en el presente estudio por el método del DPPH (ver *Figura 8* y *Anexos 5a* y *b*), indican que el EAVT presenta un

valor  $IC_{50}$  levemente superior comparado con el ácido ascórbico para captar el radical DPPH, con un  $IC_{50}$  de 1,12  $\mu\text{g/mL}$  y 1,72  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente; dicha capacidad antioxidante se atribuiría al alto contenido de fenoles totales que presenta, esto de acuerdo con estudios previos que indican una relación directa entre actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en hierbas, vegetales y frutos (Zhang & Lin, 2008) y esta a su vez con el contenido de taninos y su eficiencia antirradical (Gülçin et al.,2010; Valero et al.,2012). Sin embargo, esta correlación no se presenta en todas las plantas (Sáenz et al.,2010), ya que se encontró una correlación negativa entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de cinco variedades de *Ipomoea batatas*.

En el estudio de Avilés et al. (2010) la actividad antioxidante mediante el radical estable DPPH, la extracción acuosa por maceración de tara (polvo y fibra), presentaron la mayor actividad antioxidante con un  $IC_{50}$  de 10,1  $\mu\text{g/mL}$  y 11,4  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que la extracción acuosa en Soxhlet fue de 12,1 y 13  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. López et al. (2011) también investigaron la capacidad antioxidante reportando un  $IC_{50}$  de 1,24  $\text{mg/mL}$  y 1,37  $\text{mg/mL}$  para las localidades de Picoy y Santa Fe respectivamente.

Doroteo et al. (2012) con miras a explorar el potencial de la tara (*C. spinosa*) para el desarrollo de bloqueadores solares naturales y productos antiedad, realizaron una extracción hidroalcohólica de las vainas de tara por 4 días a temperatura ambiente, determinando un  $IC_{50}$  de 4,97  $\mu\text{g/mL}$ , indicando que posee buena actividad antioxidante inclusive mayor a la del control positivo, el flavonoide rutina ( $IC_{50}$  de  $6,43 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$ ); y Valachová et al. (2014) reportaron valores de  $IC_{50}$  de 30,8  $\mu\text{g/mL}$  para el extracto acuoso de la harina de tara.

La variación en los valores de  $IC_{50}$  de los estudios mencionados y comparados con los resultados obtenidos en el presente estudio, dejando de lado el método de extracción, se deberían a; la influencia del medio ambiente, nutrición y genotipo, así como el tiempo de cosecha y su tratamiento postcosecha, pueden afectar en la calidad y niveles de antioxidantes en las plantas, de hecho la altitud, el tipo de suelo

y el pH tienen un efecto directo en la concentración de taninos (Briceño & Ríos, 2012; Flores & Briones, 2011; Melo et al., 2013).

De acuerdo con la clasificación de Melo et al. (2010), la actividad antioxidante de un extracto crudo puede ser clasificado en: I - buena actividad ( $IC_{50} < 65 \mu\text{g/mL}$ , hasta tres veces la concentración inhibitoria del estándar); II - moderada actividad ( $65 \mu\text{g/mL} < IC_{50} < 152 \mu\text{g/mL}$ , entre tres y siete veces la concentración inhibitoria del estándar); III - baja actividad ( $IC_{50} > 152 \mu\text{g/mL}$ , exceden siete veces la concentración inhibitoria del estándar). Usando esta clasificación el EAVT muestra una buena actividad antioxidante.

La capacidad secuestrante probada *in vitro* del EAVT, podría prever un posible efecto gastroprotector *in vivo*. De este modo se realizaron los experimentos en modelos animales. Comenzando con el estudio de la toxicidad aguda. Las ratas tratadas con EAVT no mostraron ningún signo de toxicidad aguda a dosis límite de 2 000 mg/kg (ver *Figura 9, Anexos 6 y 8*), lo cual según las clases de toxicidad establecidas por la Comunidad Europea, el EAVT *C. spinosa* se considera como “no clasificado” (ver Anexo 7) y según la EPA la toxicidad oral aguda del tanino de la tara es baja ( $DL_{50}=3\ 700 \text{ mg/kg}$ ) y en experimentos con dosis de 800 mg/kg.día durante doce semanas, no produjo cambios significativos en el peso corporal, ingesta de alimento, peso del hígado y del riñón, ni cambios macro e histopatológicos (EPA, 2006). Estos datos permitieron una opción segura para las dosis utilizadas en los protocolos experimentales agudos *in vivo*.

El modelo de lesión gástrica aguda por etanol al 70% es útil para medir la actividad citoprotectora de una sustancia o elemento (Robert et al., 1979). Para determinar la dosis efectiva, se realizaron pruebas piloto (ver Anexo 15) y a partir de allí se establecieron tres concentraciones del EAVT; 100, 400 y 800 mg/kg. La *Figura 6* muestra el esquema experimental de los estómagos sometidos a los diferentes tratamientos por el modelo de lesión inducida por etanol.

Los resultados mostrados en *Tabla 4 y Anexo 12a*, indican que el EAVT presentó una relación de tipo dosis-efecto ya que a las dosis de 400 y 800 mg/kg, se obtuvo

actividad protectora significativa ( $p < 0,01$ ), con una protección de 73,14 y 99,66% respectivamente, la dosis de 100 mg/kg tuvo actividad protectora menor (65,75%), pero igualmente significativa comparados con el control ( $p < 0,05$ ). Asimismo, cuando se compararon las tres dosis del EAVT con el antiácido comercial, estas tuvieron una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Wang et al. (2010) señalan que el extracto acuoso de las hojas de *Punica granatum* L. “granada”, contienen gran cantidad de galotaninos responsables de la protección gástrica, al inhibir la secreción de ácido gástrico y disminuir la incidencia de úlcera gástrica, en cambio el extracto del pericarpio de la misma planta caracterizado por contener mayor cantidad de elagitaninos brinda una protección del daño de la mucosa gástrica inducida por el etanol de 53-80%, así como una mejora en la curación de la úlcera gástrica con una tasa curativa del 97,4%.

Relaciones dosis efecto similares al encontrado en el presente estudio, se han obtenido con fracciones de flavonoides (Akuodor et al., 2013), pero con fracciones de taninos se encontró una relación dosis-efecto inversa, presentándose el mejor efecto gastroprotector a la menor dosis (25 mg/kg), atribuyéndole esta propiedad a que los taninos tienen la propiedad de precipitar mucoproteínas en el sitio de la úlcera, construyendo una película protectora que evita que las sustancias tóxicas puedan ser absorbidos y de esta manera promueve la resistencia a los agentes nocivos (Vasconcelos et al., 2010). En las fotos del *Anexo 12a*, se puede observar el precipitado gelatinoso al realizar las observaciones macroscópicas de los estómagos tratados con dosis de 800 mg/kg y en menor cantidad a la dosis de 400 mg/kg.

Respecto al antiácido (OHMg-OHAl) usado en éste estudio, no mostró ninguna protección de la mucosa gástrica. Estudios acerca de un antiácido similar, la hidrotalcita, se ha comprobado que reduce significativamente la lesión inducida por etanol y AINEs, mediante la preservación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la mucosa y las células progenitoras epiteliales (Tarnawski et al., 2013). En otro estudio se demostró que la administración oral de magnesio reduce el recuento de células parietales y el aumento de las células mucosas de úlceras inducidas por indometacina en ratas. Es probable que el mecanismo por el cual el magnesio ejerce su propiedad antiulcerosa sea mediante la reducción de la masa

celular parietal, estimular la producción de prostaglandina el cual estimula la producción de células mucosas (Adewoye & Salami, 2013).

Para contrastar los resultados encontrados, al estudio de Chia et al. (2013) acerca del efecto del pretratamiento con el extracto alcohólico de vainas de *C. spinosa* ante lesiones en mucosa gástrica inducidas con ácido acetil salicílico en ratas Holtzman, no presentó efecto protector a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg, atribuyéndole estos resultados al modelo de inducción de lesión utilizado, a la cepa de ratas usadas que serían menos vulnerables, al efecto del ácido acetil salicílico y también al tipo de taninos predominante en el extracto. Se sabe que los taninos están involucrados en la actividad antioxidante y antiulcerosa de diversas plantas medicinales (Al-Howiriny et al., 2010; de Jesus et al., 2012; Wang et al., 2010).

En la evaluación histológica, el estudio mostró que las ratas pretratadas con el EAVT redujeron las lesiones gástricas. El grupo control positivo mostró que el etanol a 70% provoca lesiones que conducen a una hemorragia severa, inflamación y lesión petequiral en la mucosa gástrica, amplios focos de erosión, necrosis y congestión vascular, sin infiltración de leucocitos, ni tejido de granulación y sin alterar la submucosa; similares resultados hemos observado con el pretratamiento con el antiácido comercial (OHMg-OHAL) (ver *anexos 13, 14a y 14f*). A dosis de 100 mg/kg aún se observan zonas de necrosis y erosión (ver *anexo 14c*), pero a dosis de 400 mg/kg las zonas de erosión son mínimas ((ver *anexo 14d*), y a la dosis de 800 mg/kg se observa en una de las muestras una pequeña erosión superficial pero mínima asociado a una anoxia (ver *anexo 14e*), esto podría deberse a que dicha zona no ha sido protegida por el EAVT.

Para garantizar que la actividad gastroprotectora del EAVT no es simplemente una actividad protectora tópica, probablemente por la formación directa de una barrera física, como sucede en otros extractos (Sandoval et al., 2010), se realizaron las evaluaciones bioquímicas a través del modelo de ligadura pilórica en ratas, en dicho modelo la génesis de la ulceración del estómago, un factor importante fue el ácido gástrico, la cual fue inducida por estimulación con histamina en el receptor H2 (Sandoval et al., 2002; Huamán et al., 2007).

Los resultados muestran que el EAVT administrada por vía oral a la dosis de 400 mg/kg, induce significativamente ( $p < 0,05$ ) al incremento de mucus (38,13%), contra la acción irritante del ácido clorhídrico presente en la secreción gástrica, (ver *Tabla 5*), pero a dosis de 100 y 800 mg/kg no se observaron cambios comparados con el control, por lo tanto no hay una relación entre la concentración de EAVT y el incremento de mucus. El EAVT tiene un efecto protector contra el etanol, y este efecto puede deberse al aumento de los mecanismos de protección de la mucosa. Al respecto diversos autores indican la capacidad de incrementar la secreción de prostaglandinas y la actividad de NOS, con la estimulación de la secreción de moco a nivel gástrico como efecto del extracto de plantas (Cadirci et al., 2007; Freitas et al., 2011; Meira et al., 2012; Viana et al., 2013). Es posible que dichos mediadores bioquímicos estén involucrados en el mecanismo de gastroprotección del EAVT.

Existen dos enfoques principales para el tratamiento de la úlcera péptica; el primero es el de reducir la producción de ácido gástrico y el segundo mejorar la protección de la mucosa gástrica. Se sabe que el incremento de prostaglandina E2 luminal estimula la actividad secretora de mucus y ha sido demostrada en el uso de los antiácidos  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , Mylanta II y Maalox, (Sandoval et al., 2002), como parte importante de la protección de las células de la mucosa gástrica durante el proceso de cicatrización (Vasconcelos et al., 2010), en cambio el antiácido (OHMg-OHAL) usado en el experimento no mostró una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el porcentaje de incremento de mucus.

Desde los estudios de Robert (1979) no cabe duda de que las PG tienen un rol fundamental en el mantenimiento de la integridad mucosal, que incluye la secreción continua de aniones bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y la producción de mucus en el estómago y el duodeno; otro grupo denominado grupos sulfhidrilos no proteicos (GS-NP) glutatión reducido en su mayoría (GSH,  $\gamma$ -glutamyl-cisteinil glicina) además de cisteína, coenzima A y otros tioles en la mucosa gástrica también juegan un rol importante en la gastroprotección, ya que participan en la producción de mucus y se unen a los radicales libres formados durante y después de la exposición a los agentes dañinos (Nagy, Nagata, & Szabo, 2007). Se ha informado que algunos flavonoides,



como la catequina y la quercitina, suprimen las secreciones de ácido gástrico principalmente al inhibir la gastrina y la histamina (De Lira Mota et al., 2009).

Varios productos químicos como etanol (50% - 95%), HCl (0,6 N), NaOH (0,2 N), NaCl (25%), amoníaco (1%) o agua hirviendo, provocan una lesión hemorrágica aguda en la mucosa gástrica en minutos (Nagy et al., 2000; Robert, 1979). Tanto el etanol, HCL y NaCl provocan una rápida depleción en el contenido de sulfhidrilos endógenos y de glutatión reducido (Nagy et al., 2000), en tanto que, la administración parenteral de glutatión en humanos ha demostrado que previene la depleción inducida por etanol (80°) de los compuestos sulfhidrilo gástrico (Loguercio et al., 1993).

El glutatión, está presente en altas concentraciones en la mucosa gástrica de ratas, perros, y humanos (Victor et al.,1989), la actividad del GSH ocurre por dos mecanismos; remoción de radicales libres y actuando como cofactor para la glutatión peroxidasa, eliminando peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos en el citosol y mitocondrias.

En los resultados obtenidos en el presente estudio, el pretratamiento de ratas con el EAVT a diferentes dosis, ni el antiácido (OHMg-OHAL) de referencia impidieron la depleción de los GS-NP (ver *Tabla 6*). A la dosis de 800 mg/kg se observa una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) respecto al control, en los demás tratamientos también presentaron una disminución del contenido de los GS-NP no existiendo diferencia significativa ( $p < 0,01$ ), lo que sugiere que la prevención de la lesión gástrica no guarda relación con su capacidad para prevenir el estrés oxidativo.

Investigaciones realizadas *in vitro* en taninos, refieren que estos tienen la propiedad de unirse a las proteínas en medio acuoso ácido a ligeramente básico. La actividad de los taninos no solamente se deberían a su capacidad antioxidante, y de unión con iones metálicos y polisacáridos formando complejos, sino a su capacidad de unirse de manera específica a las proteínas y péptidos, lo cual estaría relacionado al número de grupos galoilo del tanino, de tal modo que a mayor número mayor afinidad por las proteínas; por otro lado, las características estructurales de las proteínas como la

conformación y tamaño del polímero influyen también en esa afinidad por los taninos (Simões et al., 2003).

Asimismo, taninos de mayores pesos moleculares son mejores precipitantes de proteínas que los taninos más pequeños. La proporción de proteína-tanino también afecta a la precipitación *in vitro*. Una combinación de los factores anteriores determina si los complejos proteína-tanino permanecen solubles o si se vuelven insolubles. Las enzimas, incluyendo proteasas, son comúnmente inactivados por taninos *in vitro*. (Barbehenn & Constabel, 2011) lo cual explicaría que a dosis menores no haya tal disminución en el contenido de GS-NP.

El MDA es uno de los productos finales que resultan de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y ésteres relacionados en las membranas celulares, y la medición de esta sustancia representa un índice adecuado de peroxidación lipídica por las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Kwiecień, Brzozowski, & Konturek, 2002). La acumulación de MDA en los tejidos o fluidos biológicos es indicativo de la magnitud de la generación de radicales libres, el estrés oxidativo y el daño tisular (Pereira et al., 2014). El presente estudio mostró una reducción de los niveles de MDA del EAVT de modo concentración-dependiente, ya que a la dosis de 800 mg/kg la disminución fue significativa ( $p < 0,05$ ) comparado con el grupo de control (ver *Tabla 7*), lo que sugiere una actividad protectora de las membranas biológicas en condiciones de estrés oxidativo del EAVT, como resultado de su capacidad para secuestrar EROs producidos por la injuria aguda con el HCL endógeno durante la ligadura pilórica.

Amarowicz (2007) afirma que los taninos pueden funcionar como antioxidantes primarios y secundarios. Así como también debido a su capacidad para quelar iones metálicos como Fe (II) interferir con uno de los pasos de reacción en la reacción de Fenton y retar la oxidación. La inhibición de la peroxidación lipídica por los componentes de los taninos pueden actuar a través de la inhibición de la ciclooxigenasa.

El efecto del EAVT en la secreción gástrica, se investigó mediante el análisis de los parámetros bioquímicos del jugo gástrico (actividad péptica, volumen de la secreción gástrica, pH y acidez total). Los datos obtenidos muestran que no hubo significancia en los valores medios de actividad péptica, volumen de secreción gástrica, así como el pH y la acidez total en comparación con el control (ver *Tabla 8*). Mientras que el antiácido (OHMg-OHAL) exhibe una diferencia significativa del pH respecto al control ( $p < 0,05$ ), lo cual confirma su denominación como antiácido, en tanto que, las dosis de 100 y 400 mg/kg exhiben una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al antiácido (OHMg-OHAL).

Por lo tanto, se sugiere que el EAVT no tiene efecto antisecretor en este modelo, y el mecanismo por el cual el extracto protege la mucosa gástrica posiblemente no implica la inhibición de la secreción de ácido, probablemente porque los metabolitos secundarios presentes en el EAVT no son antagonistas de los receptores H<sub>2</sub>. Similares resultados en el mismo modelo de estudio con diferentes extractos vegetales fueron reportados en *Bixa orellana* “achiote” y *Croton palanostigma* “sangre de grado” (Huamán et al., 2007; Sandoval et al., 2002). Asimismo, es posible que el efecto protector del EAVT sea de manera tópica, por su capacidad de adherencia a la mucosa gástrica, efectos similares fueron encontrados en “el tocosh de papa” *Solanum tuberosum* y *Croton palanostigma* atribuido a sus propiedades antioxidante y citoprotector (Loli et al, 2016; Sandoval et al., 2002).

Su mecanismo gastroprotector es multifactorial y posiblemente implica un mecanismo antioxidante, ya que EAVT logró el aumento de la mucosidad y disminuyó los niveles de lipoperoxidación lipídica.

Dado que no existen datos en la literatura sobre la actividad gastroprotectora del EAVT, los resultados obtenidos en el presente trabajo proveen, por primera vez, una base farmacológica del uso popular de esta especie para tratamientos de gastritis aguda, ofreciendo una perspectiva de un posible adyuvante con una propiedad gastroprotectora. Posteriores estudios son necesarios para aislar los componentes activos presentes en esta planta y ampliar el estudio del mecanismo de acción.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demostraron que:

1. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara”, son principalmente compuestos fenólicos, taninos y flavonoides. Presenta un contenido de fenoles totales de 383,76 mg de EAG/g EAVT.
2. El extracto acuoso de vainas *C. spinosa* posee actividad antioxidante, superior al estándar ácido ascórbico, con un valor de  $IC_{50} = 1,12 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$  clasificado como buena actividad.
3. En las condiciones del ensayo el extracto acuoso de vainas de *C. spinosa* no presentan toxicidad aguda a dosis de 2 000 mg/kg, calificándose como “No clasificadas”.
4. El extracto acuoso de vainas de *C. spinosa* posee una actividad gastroprotectora en el modelo experimental de lesión gástrica inducida por etanol al 70%, de manera dosis dependiente.
5. El efecto del extracto acuoso de *C. spinosa* en el modelo de ligadura pilórica, demostró que tiene acción gastroprotectora al incrementar el porcentaje de mucus sin guardar una relación dosis efecto y al reducir los valores de MDA de manera dosis dependiente, en cambio provocó la depleción de GS-NP, y la actividad péptica, volumen del jugo gástrico, pH y la acidez total no mostraron diferencias significativas comparados con el control.

## **CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES**

Para continuar en el estudio del EAVT como gastroprotector se debería continuar con las siguientes recomendaciones:

- Llevar a cabo el estudio acerca de la viscosidad del EAVT.
- Analizar el contenido de GSH del EAVT.
- Determinar el contenido de glutatión, prostaglandinas y las enzimas catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa en el contenido de la mucosa gástrica después de la administración del EAVT.
- Llevar a cabo el estudio acerca de la curación de gastritis aguda y crónica del EAVT en modelos animales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AGROVIN. (2010). Galitan, clarificante y antioxidante para vinos blancos y rosados.
2. Aguilar, A., Noratto, G., Chambi, F., Debaste, F., & Campos, D. (2014). Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. *Food Chemistry*, *156*, 301–304.
3. Akuodor, G., Essien, A., Chilaka, K., Akpan, J., Ezeokpo, B., & Ezeonwumelu, J. (2013). Gastroprotective effect of the aqueous leaf extract of *Guiera senegalensis* in albino rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *6*(10), 771–775.
4. Al-Howiriny, T., Alsheikh, A., Alqasoumi, S., Al-Yahya, M., Eltahir, K., & Rafatullah, S. (2010). Gastric antiulcer, antisecretory and cytoprotective properties of celery (*Apium graveolens*) in rats. *Pharmaceutical Biology*, *48*(7), 786–793.
5. Allen, A., & Flemström, G. (2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol. Cell Physiol*, *288*(1), C1-19.
6. Amarowicz, R. (2007). Tannins: The new natural antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, *109*(6), 549–551.
7. Amiruddin, Z., Balan, T., & Suppaiah, V. (2014). Mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of *Muntingia calabura*. *Journal of Ethnopharmacology*, *151*(3), 1184–1193.
8. Arellano, P. (1992). *El Libro Verde. Guia de Recursos Terapeuticos Vegetales*. Lima, Perú.: Instituto Nacional de Medicina Tradicional (INMETRA).
9. Avilés, R., Carrión, J., Huamán, J., Bravo, M., Rivera, D., Rojas, N., & Santiago, J. (2010). Actividad antioxidante, polifenoles totales y contenido de taninos de

- extractos de tara, *Caesalpinia spinosa*. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.*, 13, 5–11.
10. Barbehenn, R. V, & Constabel, C. P. (2011). Tannins in plant - herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72, 1551–1565.
  11. Bate-Smith, E. C. (1973). Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemistry*, 12, 907–912.
  12. Bermúdez, D., Monteagudo, E., Boffill, M., Díaz, L. E., Roca, A., Betancourt, E., & Silveira, E. A. (2007). Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VIII(3), 1–7.
  13. Briceño, Y., & Ríos, J. (2012). “*Cuantificación de taninos del fruto de Caesalpinia spinosa ‘tara’ procedente de cinco distritos de la provincia de Otuzco.*” Tesis para optar el grado de Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
  14. Buege, J. A. y Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, 52;302-6
  15. Bussmann, R., Malca, G., Glenn, A., Sharon, D., Nilsen, B., Parris, B., ... Townesmith, A. (2011). Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 121–40.
  16. Bussmann, R., & Sharon, D. (2015). *Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía. La flora mágica y medicinal del norte del Perú*. La Libertad. Perú.: St. Louis: Centro William L. Brown – Jardín Botánico de Missouri.
  17. Cabello, I. (2010). Monografía para el cultivo de la tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Lima, Perú.: Perúbiodiverso.
  18. Cadirci, E., Suleyman, H., Aksoy, H., Halici, Z., Ozgen, U., Koc, A., & Ozturk, N. (2007). Effects of *Onosma armeniacum* root extract on ethanol-induced oxidative stress in stomach tissue of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 170(1), 40–8.

19. Calixto, M. (2006). Plantas medicinales utilizadas en odontología (Parte I). *Kiru*, 3(2), 80–85.
20. Campos, D., Chirinos-Gallardo, R., Ureña, M., Betalleluz, I., Aguilar, A., Yavar, F., ... Jallurana, C. (2009). Obtención y caracterización de taninos hidrolizados de tara (*Caesalpinia spinosa*) y evaluación de su eficacia antioxidante en carnes y aceites vegetales. *Perú Biodiverso. Avances de los proyectos Perubiodiverso en ejecución*, 6, 2009.
21. Castañeda, D., Pombo, L. M., Uruña, C. P., Hernandez, J. F., & Fiorentino, S. (2012). A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 38.
22. Castell, J., Sorolla, S., Jorba, M., Aribau, J., & Ollé, L. (2011). Tara (*Caesalpinia spinosa*): The sustainable source of tannins for innovative tanning processes. *XXXI IULTCS Congress. Valencia (Spain) - September 27th-30th 2011*, 1–12.
23. Chambi, F., Chirinos, R., Pedreschi, R., Betalleluz-Pallardel, I., Debaste, F., & Campos, D. (2013). Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from tara (*Caesalpinia spinosa*) pods. *Industrial Crops and Products*, 47, 168–175.
24. Chia, A., Basilio, J., Azurin, J., Quispe, L., Veramendi, L., & Villa, N. (2013). Efecto del pre-tratamiento con un extracto de *Caesalpinia spinosa* ante lesiones en mucosa gástrica inducidas con ácido acetil salicílico en ratas Holtzman. *CIMEL*, 18(1), 30–35.
25. CYTED/CNP. (2001). *Metodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais* (2ª Edición, Vol. 28). Rio de Janeiro.
26. de Jesus, N. T. Z., Falcão, H. S., Gomes, I. F., Leite, T. J. A., Lima, G. R. M., Barbosa-Filho, J., ... Batista, L. M. (2012). Review: Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3203–28.



27. De la Cruz, P. (2004). Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*. *Revista Del Instituto de Investigación FIGMMG-UNMSM*, 7(14), 64–73.
28. De Lira Mota, K. S., Dias, G. E. N., Pinto, M. E. F., Luiz-Ferreira, Â., Souza-Brito, A. R. M., Hiruma-Lima, C. A., ... Batista, L. M. (2009). Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules*, 14(3), 979–1012.
29. Dengiz, G. O., Odabasoglu, F., Halici, Z., Cadirci, E., & Suleyman, H. (2007). Gastroprotective and Antioxidant Effects of Montelukast on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats. *J Pharmacol Sci*, 105(1), 94–102.
30. Díaz, L. (2015). Mucosa gástrica: mecanismos protectores y efectos dañinos del ácido acetilsalicílico. Enfoques fisiológico y bioquímico. *Medicina E Investigación*, 3(1), 100–103.
31. Doroteo, V., Terry, C., & Díaz, C. (2012). Compuestos fenólicos y actividades antioxidante , antielastasa , anticolagenasa y fotoprotectora in vitro de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Caesalpinia spinosa* (tara). *Rev Soc Quím Perú*, 78(4), 254–263.
32. Fernández, J. C. (2014). Incidencia actual de la gastritis : una breve revisión. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 45(1), 10–17.
33. Flores, F., & Briones, L. (2011). Influencia del material parental y zonas de vida en el contenido de taninos en *Caesalpinia spinosa* L(Mol.) Kuntze. *FIAT LUX*, 7(1), 13–19.
34. Flores, R., & Flores Rivas, Y. (2017). *Efecto gastroprotector y curativo del consumo de harina de la vaina de tara (Caesalpinia spinosa) en animales de experimentación inducidos a gastritis-Arequipa*. Tesis para optar el grado de Lic.Nutrición Humana. Facultad de Ciencias Biológica.Univ.Nac.San Agustín. Arequipa.
35. Freitas, F., Fernandes, H., Piauilino, C., Pereira, S., Carvalho, K., Chaves, M., ... Oliveira, F. (2011). Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 700–708.

36. Garro, J., Riedl, B., Conner, A. (1997). Analytical studies on tara Tannins. *Holzforschung*, 51(3), 235–243.
37. Gillespie, R., & Lucas, C. (1961). Effect of single intoxicating doses of ethanol on the gastric and intestinal mucosa of rats. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 39(2), 237–241.
38. Glavin, G., & Szabo, S. (1992). Experimental gastric mucosal injury : laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *The FASEB Journal*, 6, 825–831.
39. Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43–53.
40. Hoffmann, W. (2015). TFF2, a MUC6-binding lectin stabilizing the gastric mucus barrier and more (Review). *International Journal of Oncology*, 47, 806–816.
41. Hourdebaigt, R., Iade, J., Le Rose, C., & Damonte, D. (2007). Estudio comparativo de taninos de tara, mimosa y pino como recurtientes. *INN-TEC. Publicacion Anual Del Laboratorio Tecnologico Del Uruguay*, (2), 24–27.
42. Huamán, O., Arnao, I., Béjar, E., & Sandoval, M. (2007). Efecto del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en la secreción gástrica de ratas. *An Fac Med.*, 68(4), 314–320.
43. Júnior, F., Oliveira, D. R. De, Augusti, A., Linde, M., Paul, J., Echeverria, G., ... Posser, T. (2014). Protective effects of *Croton campestris* A . St-Hill in different ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(2), 469–477.
44. Khan, H. A. (2004). Computer-assisted visualization and quantitation of experimental gastric lesions in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 49(2), 89–95.

45. Khanbabae, K., & Ree, T. van. (2001). Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports*, 18(6), 641–649.
46. Kwiecień, S., Brzozowski, T., & Konturek, S. J. (2002). Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 53(1), 39–50.
47. Laine, L., Takeuchi, K., & Tarnawski, A. (2008). Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, 135(1), 41–60.
48. Laloo, D., Prasad, S. K., Krishnamurthy, S., & Hemalatha, S. (2013). Gastroprotective activity of ethanolic root extract of *Potentilla fulgens* Wall. ex Hook. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(2), 505–14.
49. Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., & Tomás-barberán, F. A. (2010). Molecular aspects of medicine ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 513–539.
50. Lee, S. P., Sung, I.-K., Kim, J. H., Lee, S.-Y., Park, H. S., & Shim, C. S. (2015). The effect of emotional stress and depression on the prevalence of digestive diseases. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 21(2), 273–282.
51. Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica, Métodos en el Estudio de Productos Naturales*. (Fondo Editorial PUCP. Lima, Ed.).
52. Loguercio, C., Taranto, D., Beneduce, F., del Vecchio Blanco, C., de Vincentiis, a, Nardi, G., & Romano, M. (1993). Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut*, 34(2), 161–165.
53. Loli, R., Sandoval, M., Callohuari, R., & Mundaca, L. (2016). Tratamiento regenerativo de la mucosa gástrica con la mazamorra de tocosh de papa, en animales de experimentación. *Theorēma*, 3(4), 91–97.
54. López, A., Oré, R., Miranda, C., Trabucco, J., Orihuela, D., Linares, J., ... Siles, M. (2011). Capacidad antioxidante de poblaciones silvestres de “tara”

- Caesalpinia spinosa*) de las localidades de Picoy y Santa Fe (Provincia de Tarma, departamento de Junín). *Scientia Agropecuaria*, 2, 25–29.
55. Meira, F., Cristina, A., Almeida, A., Luiz-ferreira, A., José, R., Takayama, C., ... Souza-Brito, M. (2012). Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(1), 234–243.
56. Melo, J. G., Araújo, T. A. S., Castro, V. T. N., Cabral, D. L., Rodrigues, M., Nascimento, S., ... Albuquerque, U. P. (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(12), 8534–42.
57. Melo, M., Glorio, P., & Tarazona, G. (2013). Efecto de la madurez en los componentes de valor comercial (taninos y goma) de tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Rev Soc Quím Perú.*, 79(3), 218–228.
58. Moreno, C. (2007). Fabaceae potencialmente útiles de la provincia de Huánuco. *Investigacion Valdizana*, 1(1), 30–34.
59. Mosquera, O., Niño, J., Correa, Y., & Buitrago, D. (2005). Estandarizacion del metodo de captura de radicales libres para la evaluacion de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia Et Technica*, (27), 231–234.
60. Mucio, J. S. (2007). La neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opioides. *REB*, 26(4), 121–128.
61. Nagy, L., Nagata, M., Nagy, G., & Szabo, S. (2000). Investigation of protein and nonprotein sulfhydryls and disulfides in the gastric mucosa after exposure to gastrotoxic chemicals and sucralfate. *Gastroenterology*, 118(4), A1281.
62. Nagy, L., Nagata, M., & Szabo, S. (2007). Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrotoxic chemicals and sucralfate: possible new targets of pharmacologic agents. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13(14), 2053–60.
63. Nowak, R., Olech, M., & Nowacka, N. (2014). Plant polyphenols as

- chemopreventive agents. In *Polyphenols in Human Health and Disease Vol. 2* (pp. 1289–1307). California: Elsevier Inc.
64. Okuda, T., & Ito, H. (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, *16*(12), 2191–2217.
65. Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., & Ito, H. (2009). Ellagitannins renewed the concept of tannins. In *chemistry and biology of ellagitannins - an underestimated class of bioactive plant polyphenols* (pp. 1–54).
66. Oliveira, Livia de Lacerda de, Carvalho, M. V. D. &, & Melo, L. (2014). Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. *Rev. Ceres*, *61*(61), 764–779.
67. Olugbemiro, M., Oyewole, M., & Idowu, M. (2013). Antioxidant Activity of African Medicinal Plants. In *Medicinal Plant Research in Africa* (pp. 787–804). Elsevier Inc.
68. Oré, M. R. (2008). *Efectos hipolipémico y antioxidante de Lepidium meyenii Walp en ratas*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima.
69. Organization for Economic Co-operation and Development. (2001). Environment Directorate Joint Meeting of The Chemicals Committee and The Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing.
70. Pereira, A., Dionísio, A., Wurlitzer, N., Alves, R., de Brito, E., Silva, A., ... Mancini Filho, J. (2014). Effect of antioxidant potential of tropical fruit juices on antioxidant enzyme profiles and lipid peroxidation in rats. *Food Chemistry*, *157*, 179–185.
71. Phillipson, M., Johansson, M. E. V, Henriksnäs, J., Petersson, J., Gendler, S. J., Sandler, S., ... Holm, L. (2008). The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *295*(4), G806-12.
72. Radanovic, D., Antic-Mladenovic, S., Nastovski, T. (2006). *Proceedings from*

*the Third Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (Proceedings from the 3 rd CMAPSEEC ) Belgrade , Serbia. World Health.*

73. Repetto, M., & Repetto, G. (2009). *Toxicología Fundamental. Toxicología Fundamental. 4ta. Edición.* (4ta ed.). Ediciones Díaz de Santos, 2009.
74. Robert, A. (1971). Proposed Terminology for the Anatomy of the Rat Stomach. *Gastroenterology*, 60(2), 344–345.
75. Robert, A. (1979). Cytoprotection by Prostaglandins. *Gastroenterology*, 77, 761–767.
76. Robert, A., Nezamis, J., Lancaster, C., & Hanchar, A. (1979). Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*, 77(3), 433–43.
77. Sáenz, M. D. L. Á., Rosales Castro, M., Rocha Guzmán, N. E., Gallegos Infante, J. A., & González Laredo, R. F. (2010). Contenido fenólico y acción antioxidante de extractos de acículas de *Pinus cooperi* , *P. durangensis* , *P. engelmannii* y *P. teocote* *Madera Y Bosques*, 16(3), 37–48.
78. Sagaró, E. (2009). Gastritis. *Revista Gastrohnp*, 11(3), 156–161.
79. Sanchez, J., Beltran, J., & Gragera, J. (2011). *Caesalpinia spinosa* and *Castanea sativa* tannins: A new source of biopolymers with adsorbent capacity. Preliminary assessment on cationic dye removal. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1238–1240.
80. Sandoval, M., Ayala, S., Oré, R., & Arroyo, J. (2002). Inducción de la formación de moco gástrico por sangre de grado (*Croton palanostigma*). *An Fac Med.*, 63(4), 251–256.
81. Sandoval, M., Ayala, S., Oré, R., Loli, A., Huamán, Ó., Béjar, E., & Valdivieso, R. (2006). Capacidad antioxidante de la sangre de grado (*Croton palanostigma*) sobre la mucosa gástrica , en animales de experimentación. *An Fac Med.*, 67, 199–205.

82. Sandoval, M., Huamán, O., Oré, R., Loli, A., & Ayala, S. (2010). Efecto antioxidante y citoprotector del *Solanum tuberosum* (papa) en la mucosa gástrica de animales de experimentación. *An Fac Med.*, 71(3), 147–152.
83. Sandoval, M., Loli, R., Ricra, V., & Huaman, O. (2005). Evaluación de la toxicidad hepática y renal aguda y subaguda del látex de *Croton palanostigma* (sangre de grado) en animales de experimentación. *An Fac Med.*, 66(2), 119–126.
84. Sedlak, J., & Lindsay, R. (1968). Estimation of total, protein-bound, and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192–205.
85. Siegmund, S. V, Haas, S., & Singer, M. V. (2005). Animal models and their results in gastrointestinal alcohol research. *Digestive Diseases*, 23, 181–94.
86. Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., & Mentz, L. A. (2003). *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. (E. da UFRGS, Ed.) (5th ed). rto Alegre, Brasil.
87. Singh, S., Sangam, S. R., Joginapally, V. R., & Rajagopal, S. (2015). Alcohol, glycine, and gastritis. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 5(1), 1–5.
88. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. in Enzymol.*, 299, 152–178.
89. Skowrya, M., Janiewicz, U., Salejda, A. M., Krasnowska, G., & Almajano, M. P. (2015). Effect of tara (*Caesalpinia spinosa*) pod powder on the oxidation and colour stability of pork meat batter during chilled storage. *Food Technology and Biotechnology*, 53(4), 419–427.
90. Sowndhararajan, K., & Kang, S. C. (2013). Protective effect of ethyl acetate fraction of *Acacia ferruginea* DC. against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1), 175–81.
91. Tarnawski, A. (1995). Mecanismos celulares y moleculares de la mucosa gástrica: La injuria a la mucosa y la acción protectora de los antiácidos. *Revista*

*de Gastroenterología Del Perú*, 15(1), 74–78.

92. Tarnawski, A., Ahluwalia, A., & Jones, M. K. (2013). Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. *Current Pharmaceutical Design*, 19(1), 126–132.
93. Tarnawski, A. S., Ahluwalia, A., & Jones, M. K. (2014). Increased susceptibility of aging gastric mucosa to injury: the mechanisms and clinical implications. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(16), 4467–82.
94. United States Environmental Protection Agency. Office of prevention, pesticides and toxic substances. (2006).
95. Valachová, K., Topols'ká, D., Nagy, M., Gaidau, C., Niculescu, M., Matyasovský, J., ... Soltés, L. (2014). Radical scavenging activity of *Caesalpinia spinosa*. *Neuroendocrinology Letters*, 35, 197–200.
96. Valdivia, M. (2011). Gastritis y gastropatías. *Revista de Gastroenterología Del Perú*, 1(31), 38–48.
97. Valero, Y., Colina, J., & Ineichen, E. (2012). Efecto del procesamiento sobre la capacidad antioxidante de la ciruela criolla (*Prunus domestica*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 62(4), 363–369.
98. Vasconcelos, P. C. P., Andreo, M. A., Vilegas, W., Hiruma, C. A., & Pellizzon, C. H. (2010). Effect of *Mouriri pusa* tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 146–153.
99. Viana, A. F. S. C., Fernandes, H. B., Silva, F. V., Oliveira, I. S., Freitas, F. F. B. P., Machado, F. D. F., ... Oliveira, R. C. M. (2013). Gastroprotective activity of *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire leaves on experimental ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(1), 316–23.
100. Victor, B., Schmidt, K., Smith, G., Reed, R., Thompson, D., & Miller, T. (1989). Prostaglandin- induced gastric mucosal protection against stress injury. Absence of a relationship to tissue glutathione levels. *Ann.Surg.*, 209(3), 289–



296.

101. Wallace, J., & Granger, N. (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB*, *10*, 731–740.
102. Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., & Du, L. (2010). Pomegranate : constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology*, *4*(2), 77–87.
103. Williams de Castro, M., Castillo, A., & Rosas, C. (2003). Observaciones preliminares sobre comportamiento prenatal y postnatal de *Rattus rattus* var. *Norvegicus* (Linneo 1758) en el laboratorio. *Ecología Aplicada*, *2*(1), 2(1), 143–148.
104. Zhang, L., & Lin, Y. (2008). Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *9*(5), 407–15.

**Anexo 1. Identificación botánica de la especie.**



**Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann - Tacna**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

Escuela Académico Profesionales de: Biología, Microbiología,  
 Ingeniería en Informática y Sistemas, Ingeniería Química y Física Aplicada



**HERBARIO TAKANA**

**CONSTANCIA**

La que suscribe, Jefe encargada del Herbario Takana (HTK) – Facultad de Ciencias, Universidad nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna – Perú:

Hace constar que:

De acuerdo a la identificación botánica, la muestra analizada procedente de la provincia de Tacna, corresponde a la especie denominada comúnmente como “tara” o “taya” y tiene como nombre científico *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, la misma que presenta la siguiente clasificación taxonómica según Takhtajan (1987) y Cronquist (1988) mencionado en Mostacero, 2002.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae


Género: *Caesalpinia*

Especie: *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze

Leguminosa de porte arbustivo natural del Perú.

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada, para fines que considere conveniente.

Tacna, 13 de Octubre del 2008

  
 Blgo. Liduvina Sulca Quispe  
 Jefe encargada del Herbario Takana



Anexo 2. Fotografías de las vainas, EAVT, y el extracto desecado y pulverizado de *C. spinosa*.



Anexo 3. Aspecto macroscópico de un estómago abierto por la curvatura mayor.

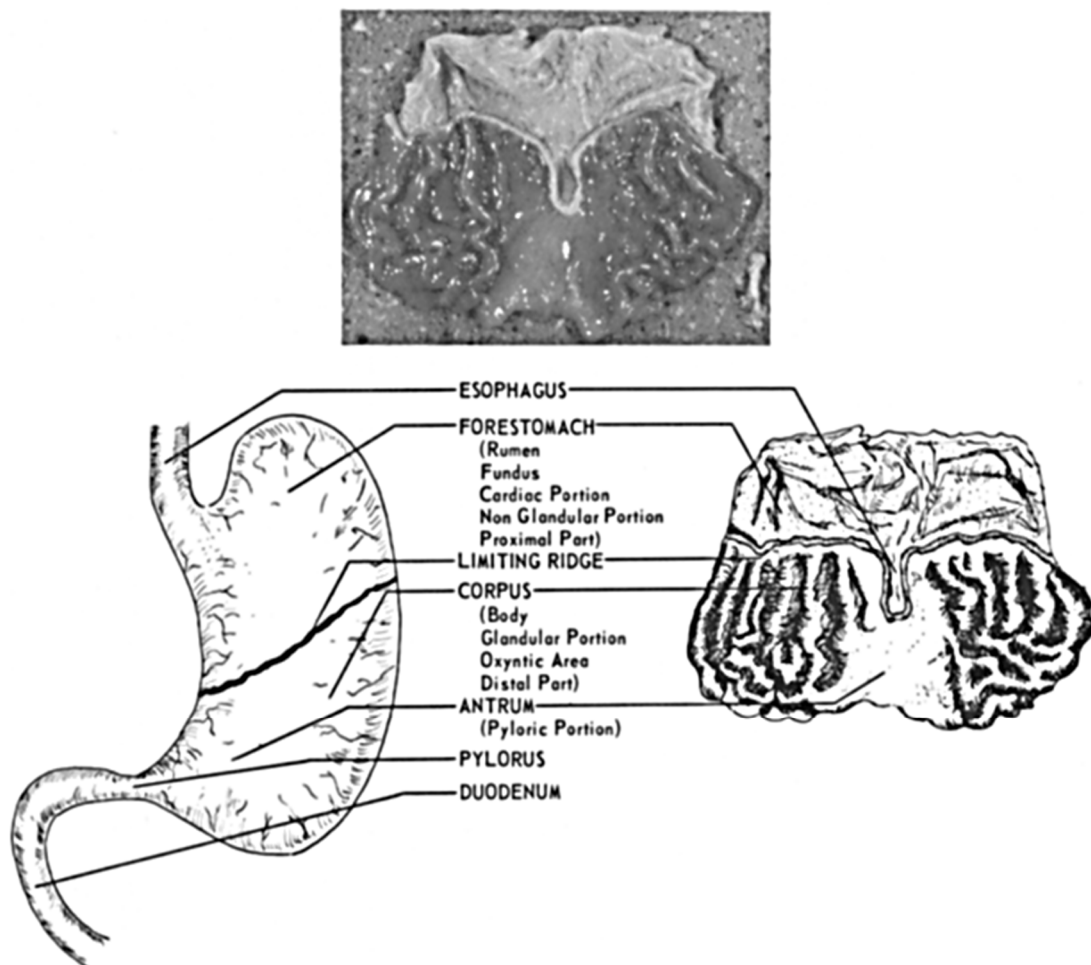


FIG. 1. Anatomy of the rat stomach. The photograph is that of a stomach opened along the greater curvature. Names in **bold face capital letters** are the proposed anatomical terms. Names in *parentheses* are synonyms that should be abandoned.

**Anexo 4. Fotografía de la marcha fitoquímica del EAVT *C. spinosa*.**



1      2      3      4      5      6      7      8      Control

**Anexo 5. Datos de la actividad antioxidante del EAVT por el método de DPPH.**

**Anexo 5a. Actividad antioxidante del EAVT *Caesalpinia spinosa***

V (µg/mL)	% Inhibición
0,32	15,51 ± 1,29
0,64	31,68 ± 5,96
0,96	45,18 ± 0,82
1,28	57,16 ± 1,72
1,60	68,76 ± 2,86
Lectura de Abs. DPPH: 0,405      IC <sub>50</sub> = 1,12 ± 0,04 µg/mL	

Datos expresados en media ± SD, n = 3

**Anexo 5b. Actividad antioxidante del ácido ascórbico**

Concentración Ácido ascórbico ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inhibición
0,4	11,17 $\pm$ 0,77
0,8	23,62 $\pm$ 0,04
1,2	33,99 $\pm$ 2,88
1,6	46,63 $\pm$ 1,69
2,0	58,37 $\pm$ 1,09
Lectura de Abs. DPPH: 0,406	IC <sub>50</sub> = 1,72 $\pm$ 0,05 $\mu\text{g/ mL}$

Datos expresados en media  $\pm$  SD, n = 3

**Anexo 6. Rango de masa corporal con relación a la edad en semanas de la especie y línea del modelo biológico.**

Edad (semanas)	Masa corporal (g)
7 - 8	180 - 200
8 - 9	200 - 220
9 - 10	220 - 240

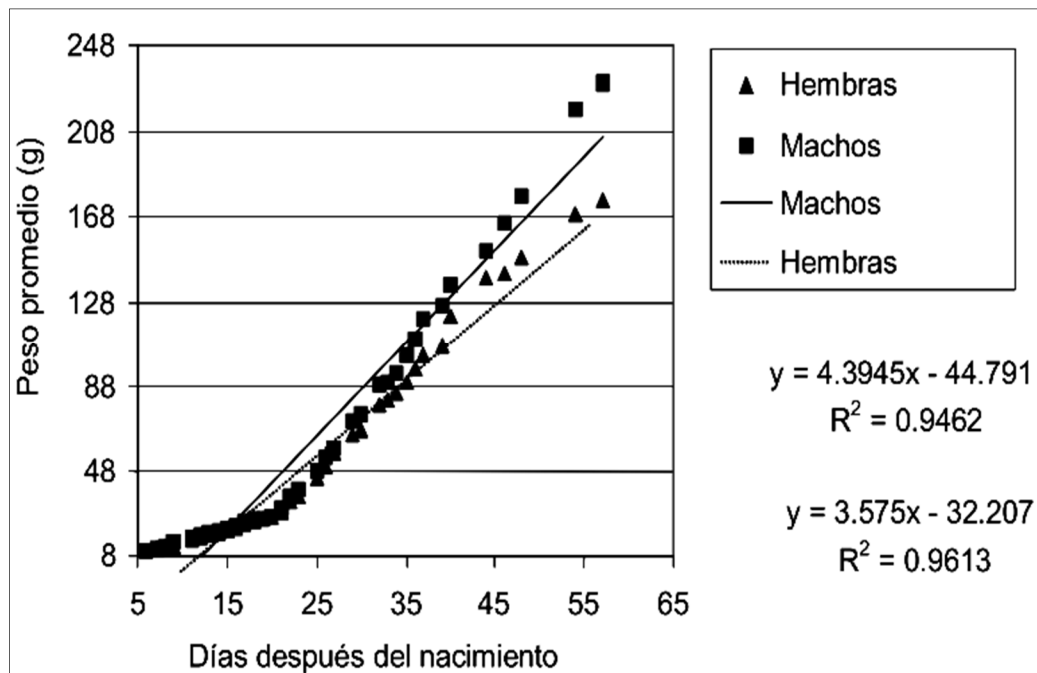
Fuente. Datos tomados de Bermúdez et al. (2007).

**Anexo 7. Rango de toxicidad aguda**

Dosis	Clasificación
< 25mg/kg	Muy tóxica
<200 mg/kg	Tóxica
<2 000mg/kg	Dañina
>2 000mg/kg	No clasificado

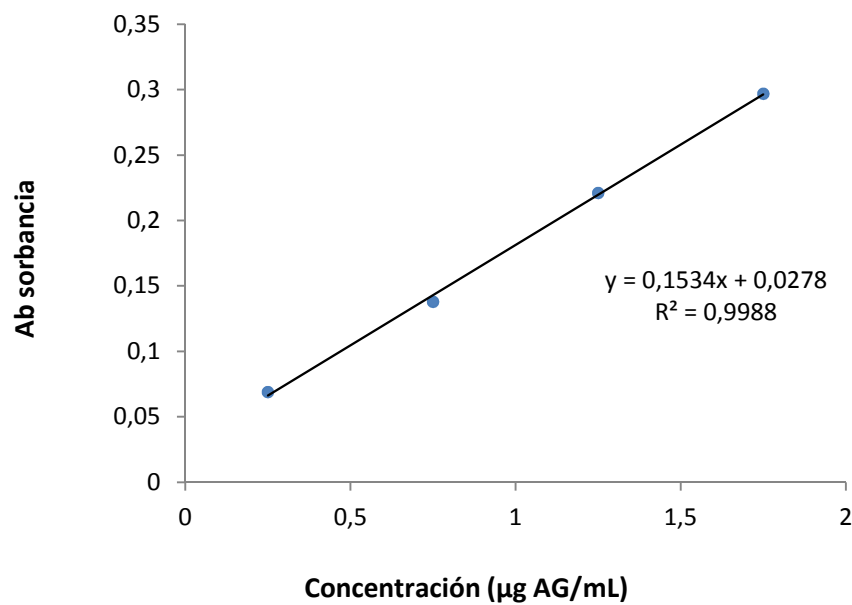
Fuente. Datos tomados de Bermúdez et al. (2007).

**Anexo 8. Línea de tendencia en el aumento de peso en hembras y machos de *Rattus norvegicus* (Linneo 1758).**



Fuente. Datos tomados de Williams de Castro et al. (2003).

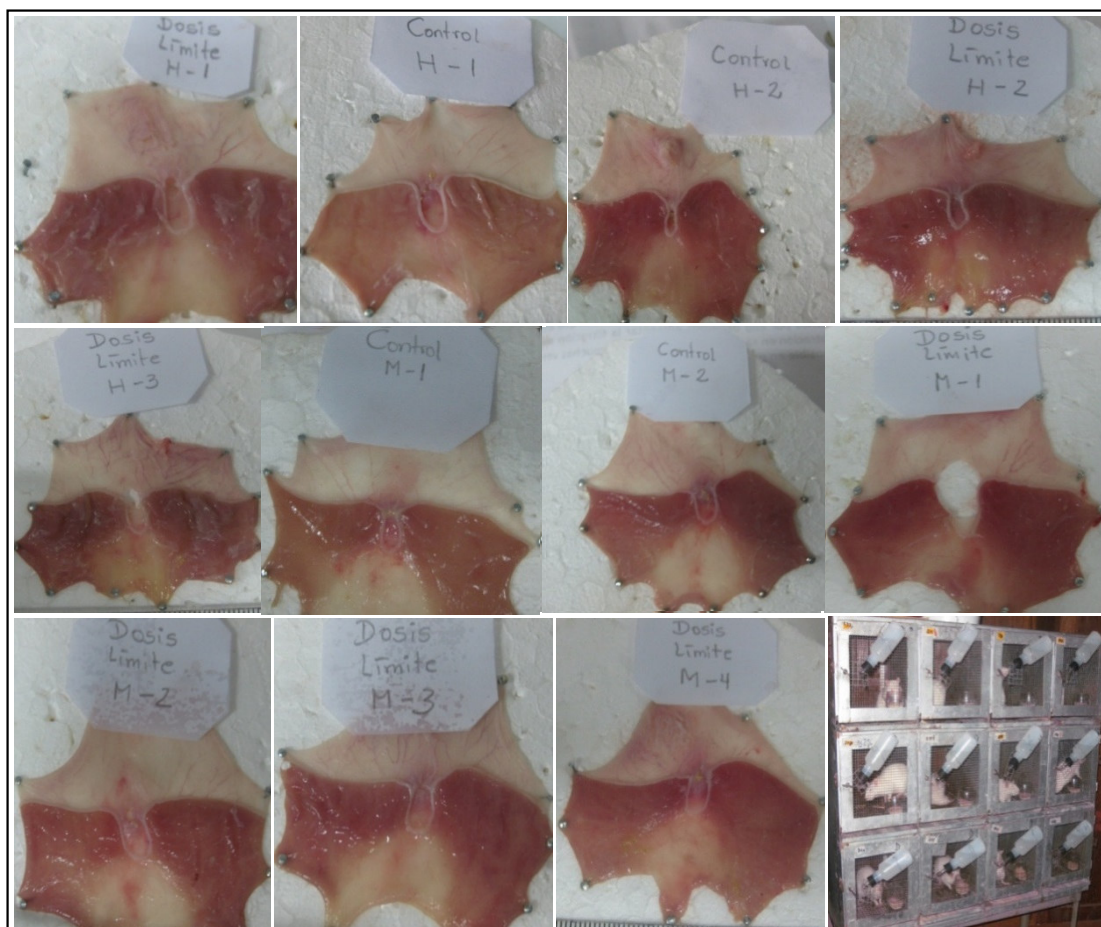
**Anexo 9. Curva de calibración del ácido gálico.**



**Anexo 10. Evolución de la masa corporal de *Rattus norvegicus* cepa Sprague-Dawley en función del tiempo.**

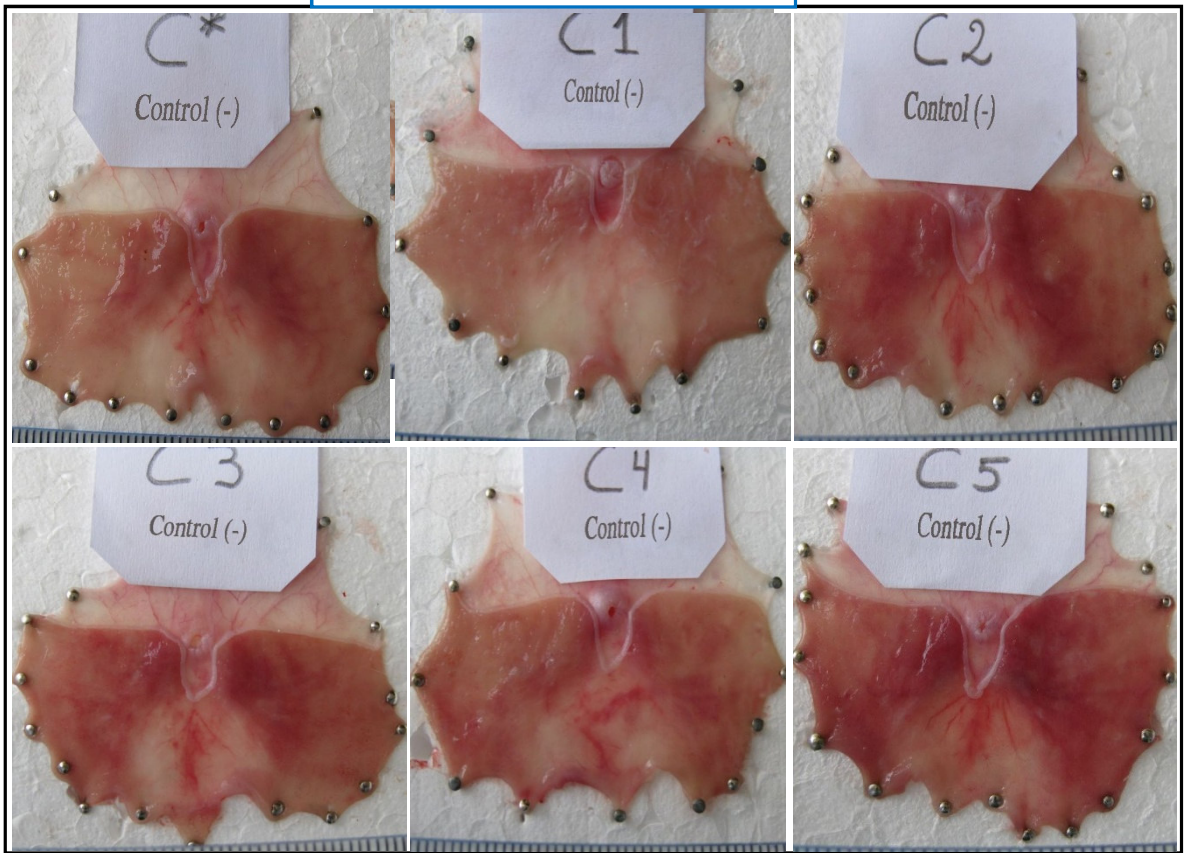
Tratamiento	Grupo experimental	Masa corporal (g)			
		Día 1	Día 7	Día 14	Diferencia
Control	Ratas hembras	222,0	246,0	264,0	42,0
		215,0	228,0	262,0	47,0
	Ratas machos	199,0	204,0	206,7	7,7
		208,0	212,6	220,6	12,6
EAVT 2 000 mg/kg de peso de rata	Ratas hembras	198,0	201,0	210,0	12,0
		204,0	217,0	228,0	24,0
		192,0	202,0	220,5	28,5
		196,0	204,7	217,7	21,7
	Ratas machos	233,0	247,0	281,0	48,0
		210,0	232,0	262,0	52,0
		217,0	241,0	306,0	89,0
		233,0	257,0	268,0	35,0

**Anexo 11. Fotografías del ensayo de la toxicidad aguda a dosis límite del EAVT C. spinosa (H: Rata hembra, M: Rata macho).**

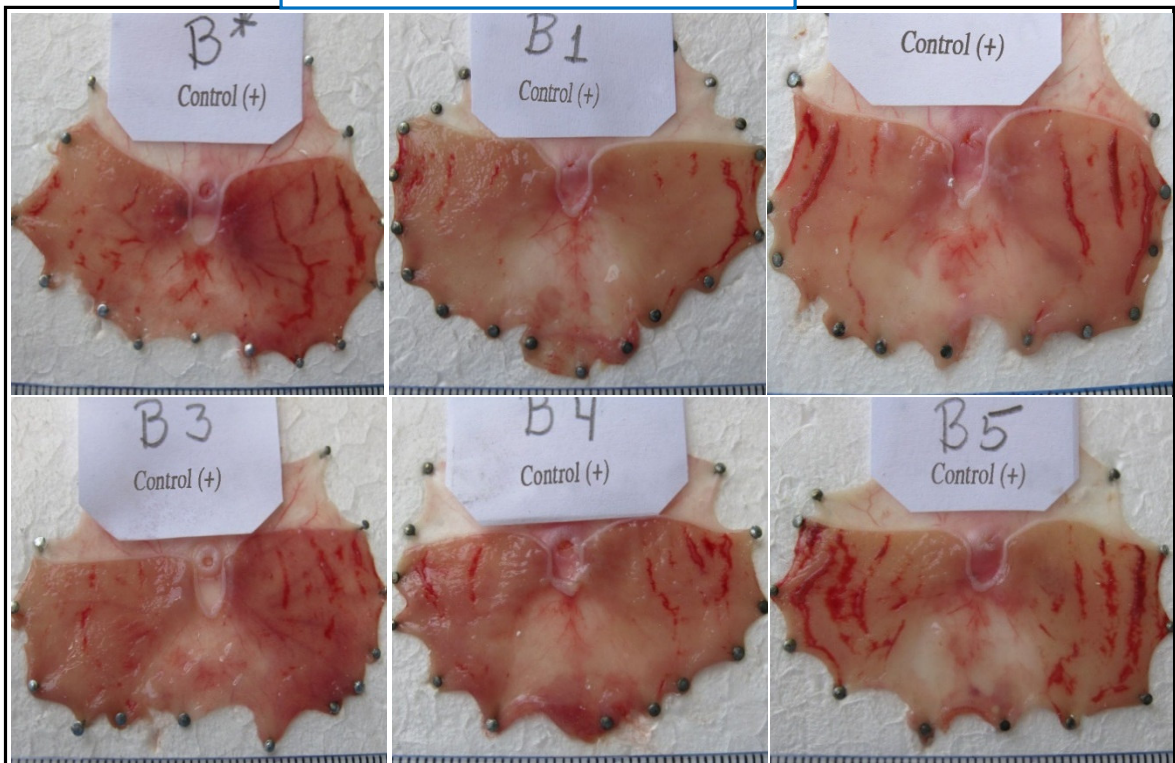


**Anexo 12a . Fotografías de la porción glandular de cada estómago para el cálculo del área de lesión y % de protección.**

**G-I: Control negativo (SSF - SSF)**

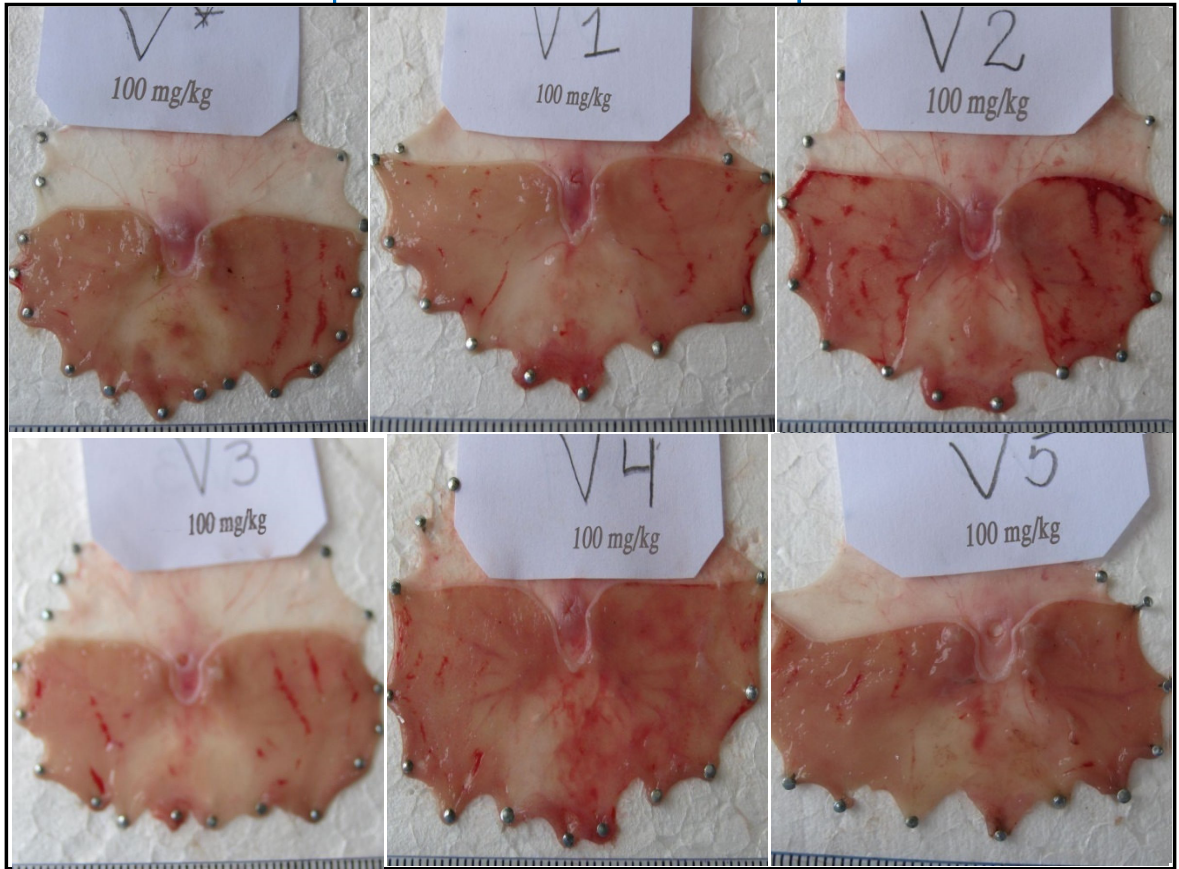


**G-II: Control Positivo (SSF - EtOH)**

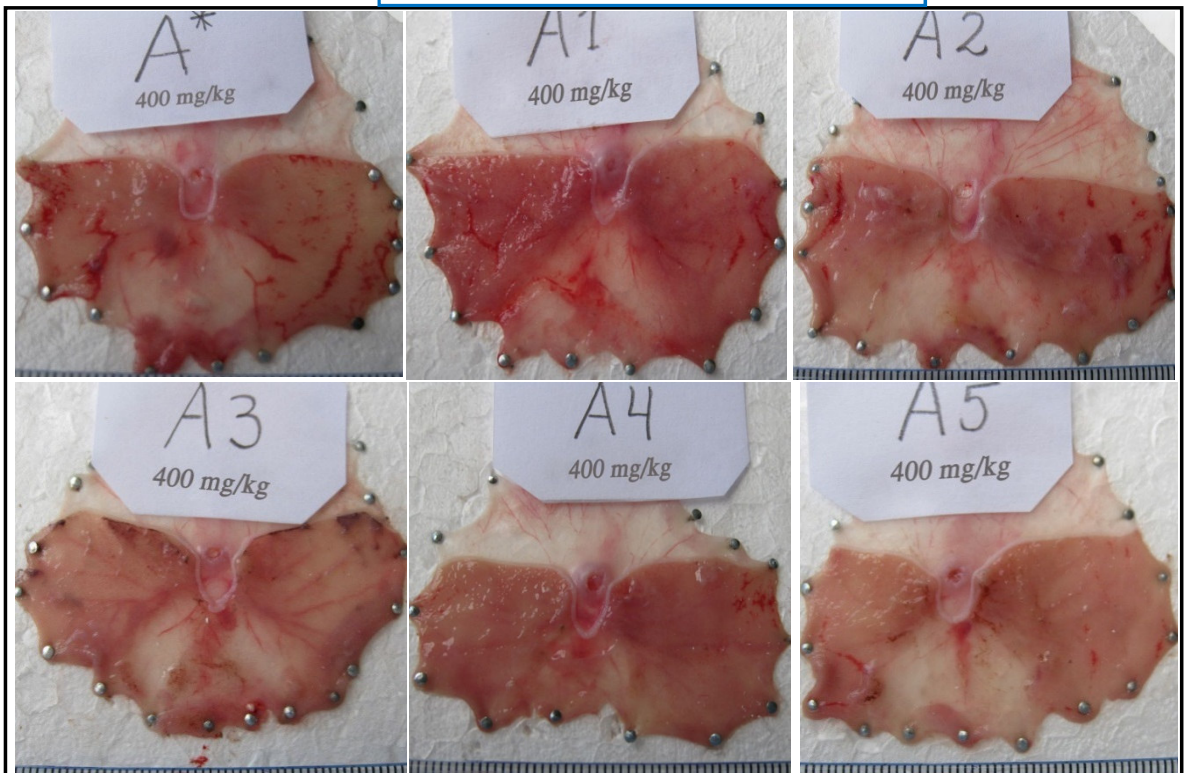




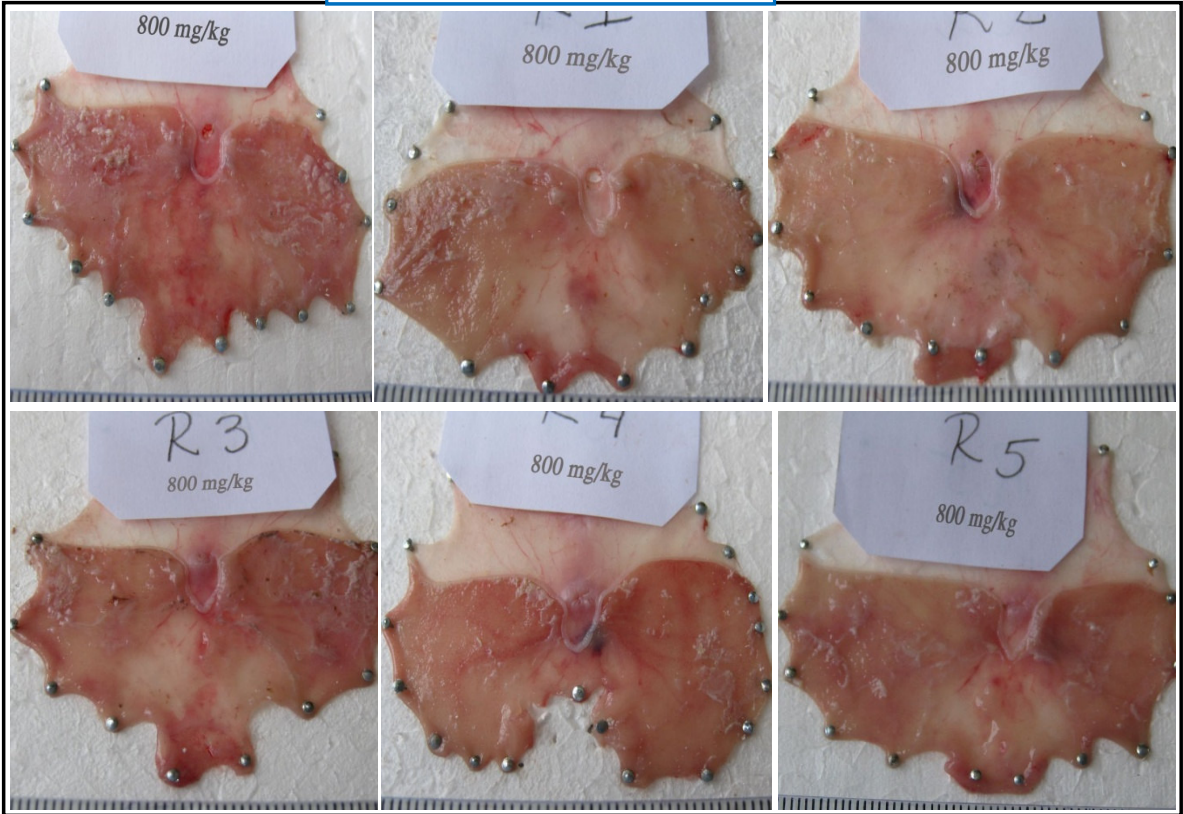
G-III: EAVT 100 mg/kg - EtOH



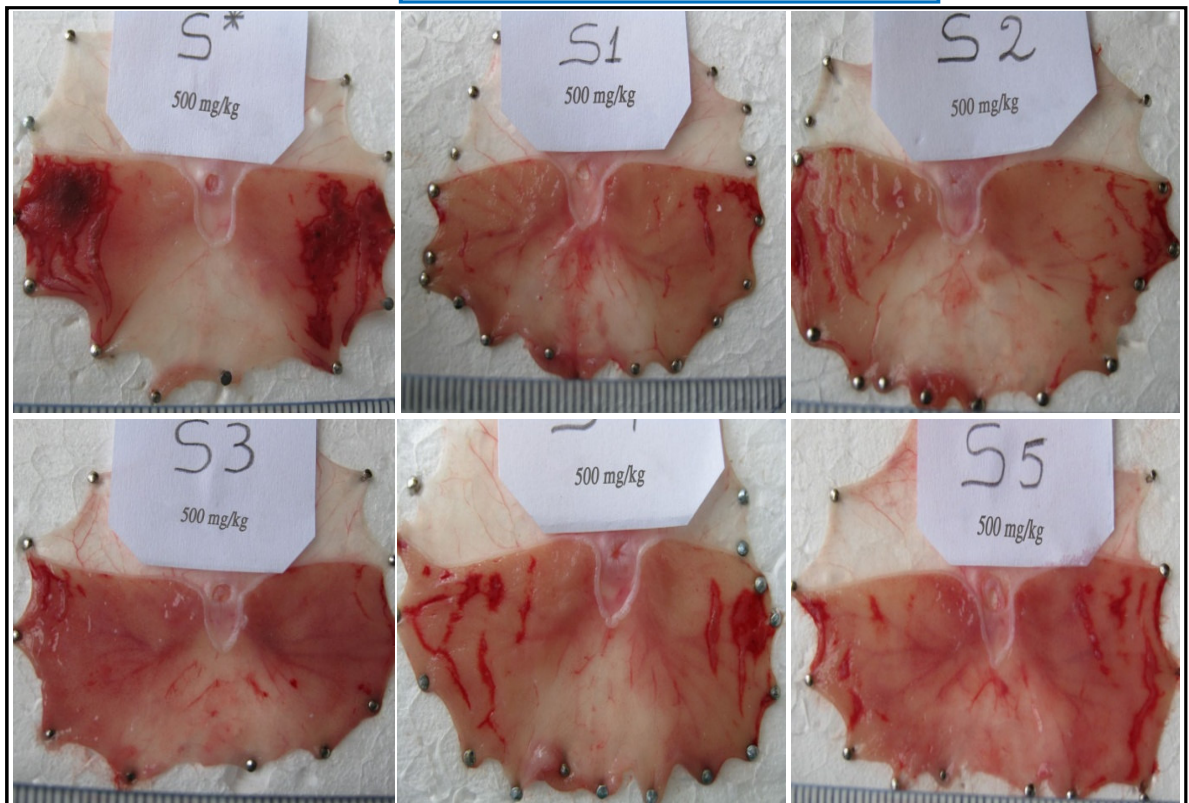
G-IV: EAVT 400 mg/kg - EtOH



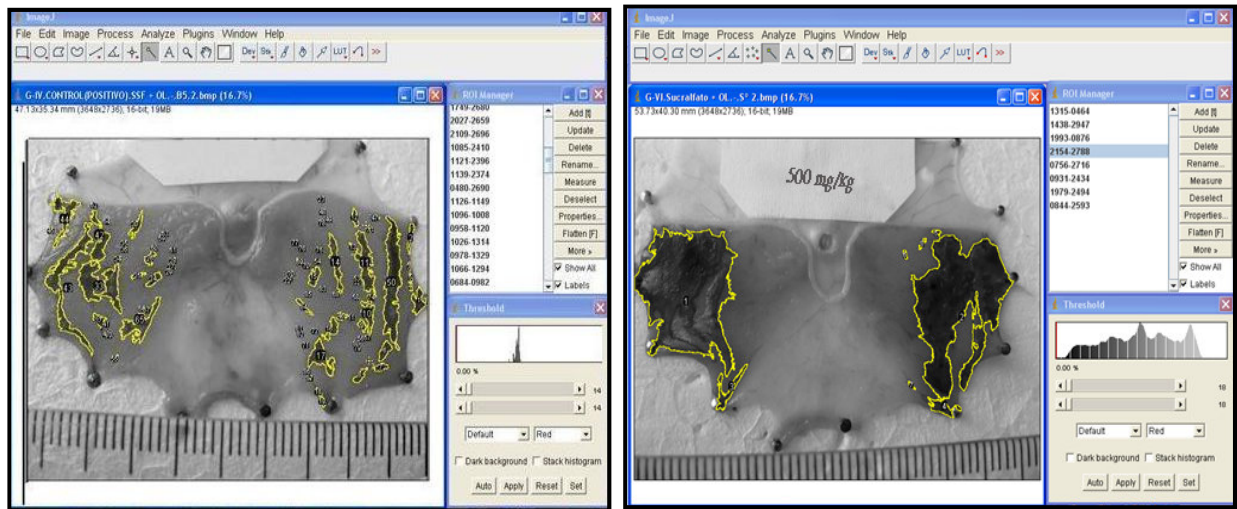
G-V: EAVT 800 mg/kg - EtOH



G-VI: Antiácido 50 mg/100kg - EtOH



*Anexo 12b.* Imagen del uso del software ImageJ 1.48v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA; para el cálculo del áreas de lesión.



*Anexo 13.* Resumen del examen microscópico de las muestras de tejido gástrico

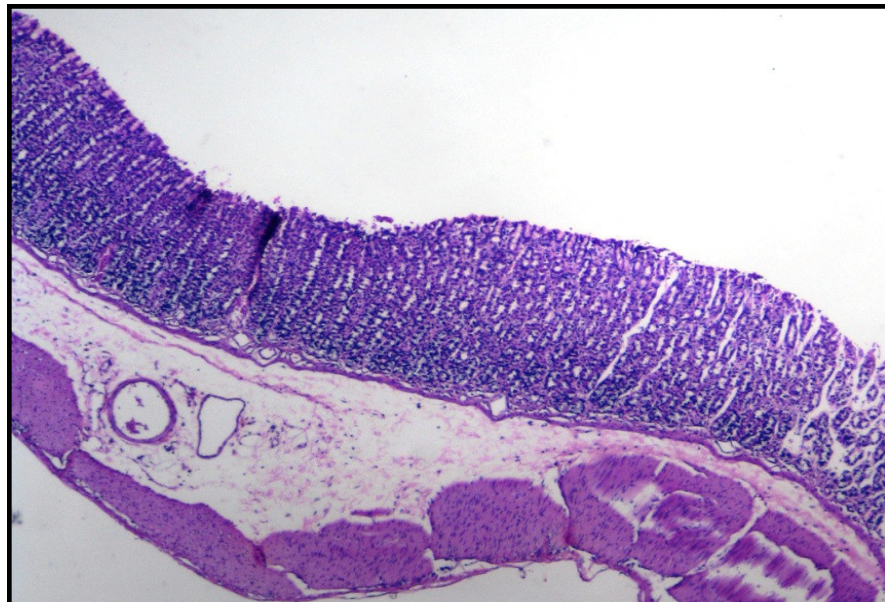
Grupo (n=6)	Etiqueta	Examen microscópico
<b>Control negativo</b>	Cn	Mucosa gástrica sin lesión
<b>Control positivo</b>	Bx-1	Amplio foco de erosión y necrosis de la mucosa superficial.
	B1-2	Erosión focal.
	B2-1	Erosión superficial.
	B2-2	Congestión y erosión.
	B3-1	Desnaturalización del epitelio, no sólo de células superficiales. Un proceso hiperagudo. Zona de erosión.
<b>Extracto 100 mg/kg</b>	B4-1	Focos de erosión epitelial.
	B5-2	Amplio foco de erosión y necrosis de la mucosa superficial.
	Vx-1	Mucosa gástrica sin lesión.
	Vx-2	Necrosis
	V1-1	Erosión leve superficial
	V1-2	Mucosa gástrica sin lesión.
	V2-1	Necrosis pérdida del epitelio, erosión extravasada.
	V2-2	congestión de vasos (hematíes)
	V3-2	Pequeña necrosis asociada a una anoxia. Por la intoxicación de la rata con etanol. Pérdida del epitelio.
	V4,V5-1	Mucosa gástrica sin lesión.
V5-2	Foco de erosión y necrosis.	

<b>Extracto 400 mg/kg</b>	Ax-1	Foco de erosión mínimo.
	Ax-2	Foco de erosión y necrosis del epitelio superficial extenso.
	A1, A2-1	Mucosa gástrica sin lesión.
	A2-2	necrosis
	A3-A5	Mucosa gástrica sin lesión.
<b>Extracto 800 mg/kg</b>	Rx-1	Erosión superficial en la unión gastroesofágica.
	Rx-2, R1-1	Mucosa gástrica sin lesión.
	R1-2	Erosión superficial.
	R2-1	Erosión superficial mínima.
	R3-R5	Mucosa gástrica sin lesión.
<b>Antiácido (OHMg-OHAL)</b>	Sx-S3-2	Necrosis (presencia de hematíes)
	S4-1	Necrosis mínima (presencia de hematíes)
	S5-1	Amplia Necrosis (presencia de hematíes)++

Cn= Control negativo, Bx-1= Estómago de la rata x-muestra de la porción glandular izquierdo, B1-2 = Estómago de la rata 1-muestra de la porción glandular derecha.

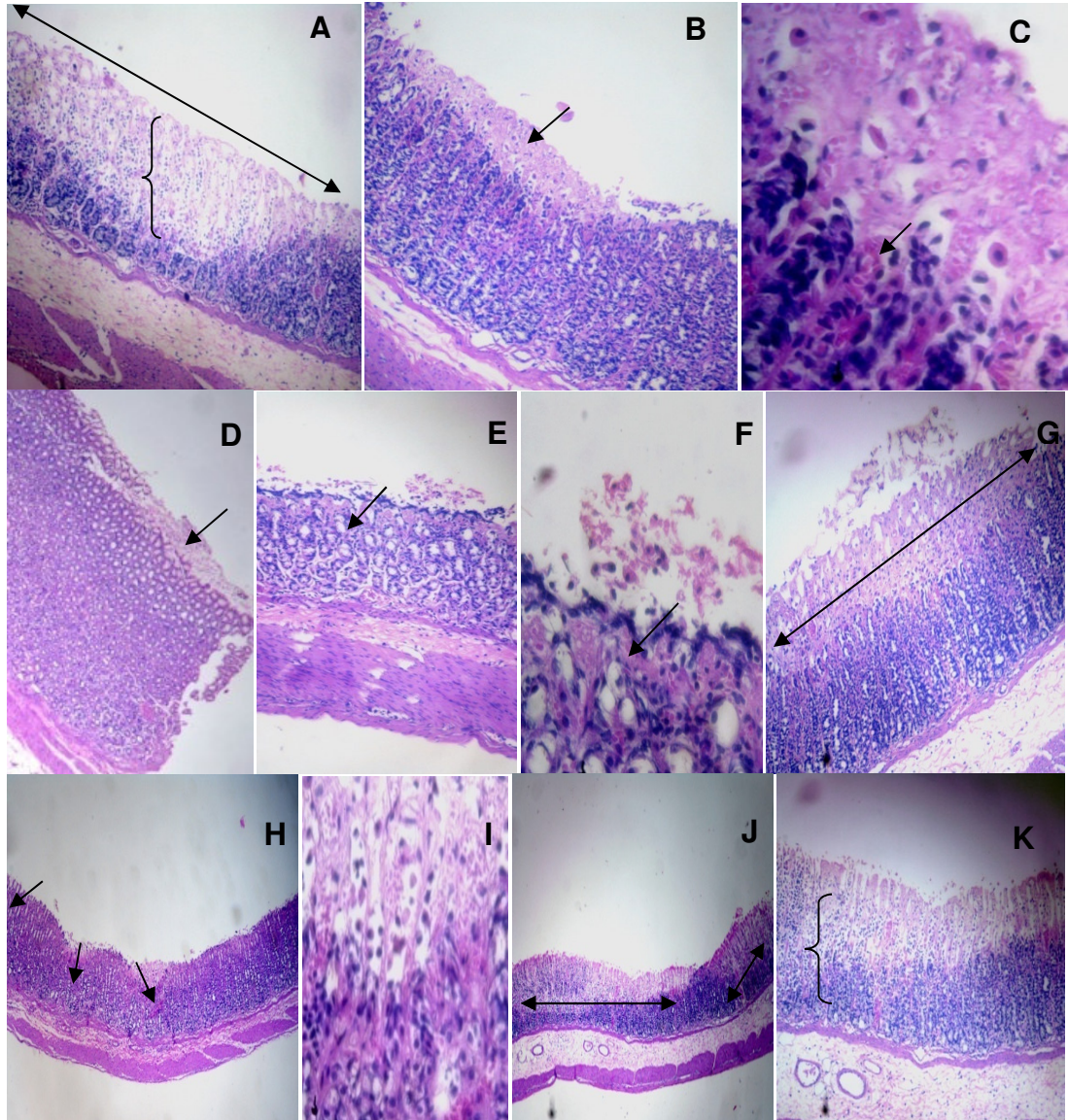
**Anexo 14. Fotografías del estudio histopatológico de tejido gástrico de los seis grupos de estudio.**

**Anexo 14 a. Estudio histopatológico del estómago de rata *Rattus norvegicus* cepa Holtzman G-I: Control negativo (SSF - SSF)**



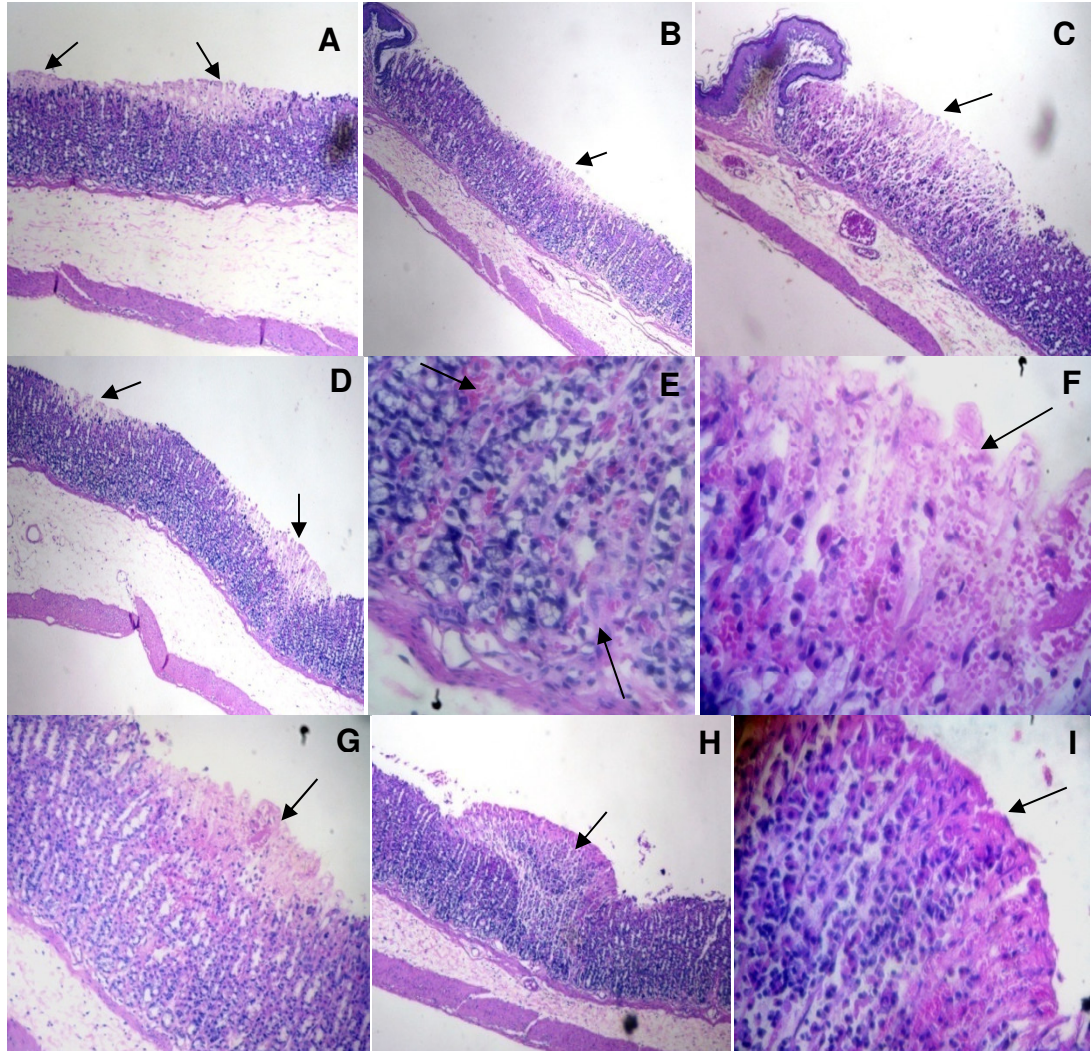
Apariencia histológica de la mucosa gástrica normal: superficie homogénea, arquitectura glandular conservada, lámina propia bien delimitada y vasos no congestionados (10x H-E).

*Anexo 14 b. Estudio histopatológico del estómago de Rattus norvegicus cepa. Holtzmann, G-II: Control positivo (SSF - EtOH)*



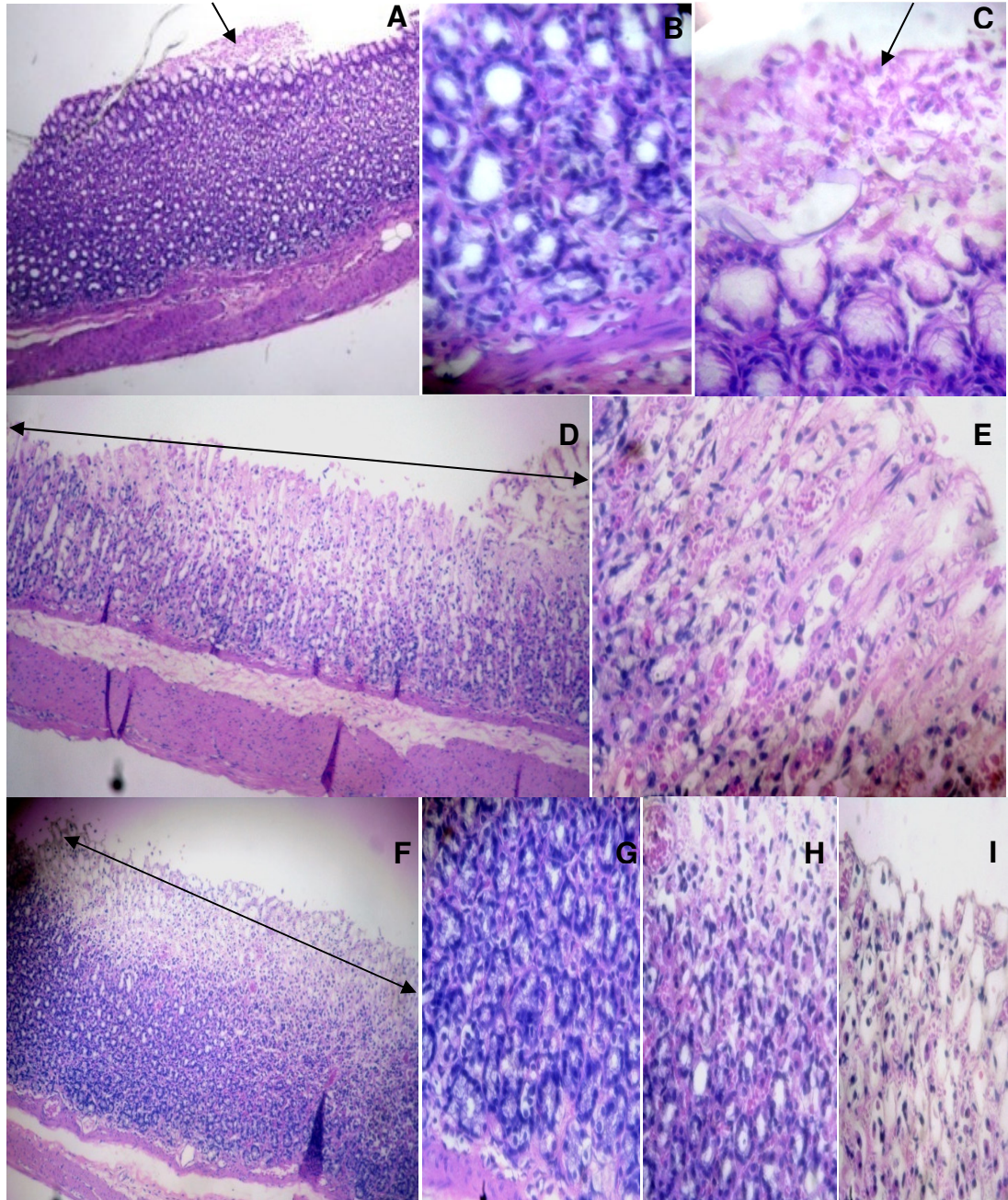
**A.** Bx-1, Amplio foco de erosión y necrosis de la mucosa superficial (  $\leftrightarrow$  ), profundidad de daño que compromete más de la mitad de la mucosa ( { } ) (10x), **B.** B1-2 erosión focal (  $\surd$  ) (10x). **C.** Congestión vascular (  $\surd$  ) (40x), **D.** B2-1, Erosión superficial (  $\surd$  ) (10x), **E.** B2-2 Congestión y erosión (  $\surd$  ) (10x), **F.** Congestión vascular (  $\surd$  ) (40x), **G.** B3-1 Desnaturalización del epitelio, no sólo de células superficiales. Daño ocurrido cerca al cardias (  $\leftrightarrow$  ) (10x); **H.** B4-1 Focos de erosión epitelial (  $\surd$  ) (4x), **I.** Congestión vascular (40x), **J.** B5-2 Amplio foco de erosión y necrosis de la mucosa superficial (  $\leftrightarrow$  ) (4x), **K.** Necrosis profunda ( { } ) (10x).

*Anexo 14 c. Estudio histopatológico del estómago de rata *Rattus norvegicus* cepa. Holtzmann, G-III: EAVT 100 mg/kg - EtOH.*



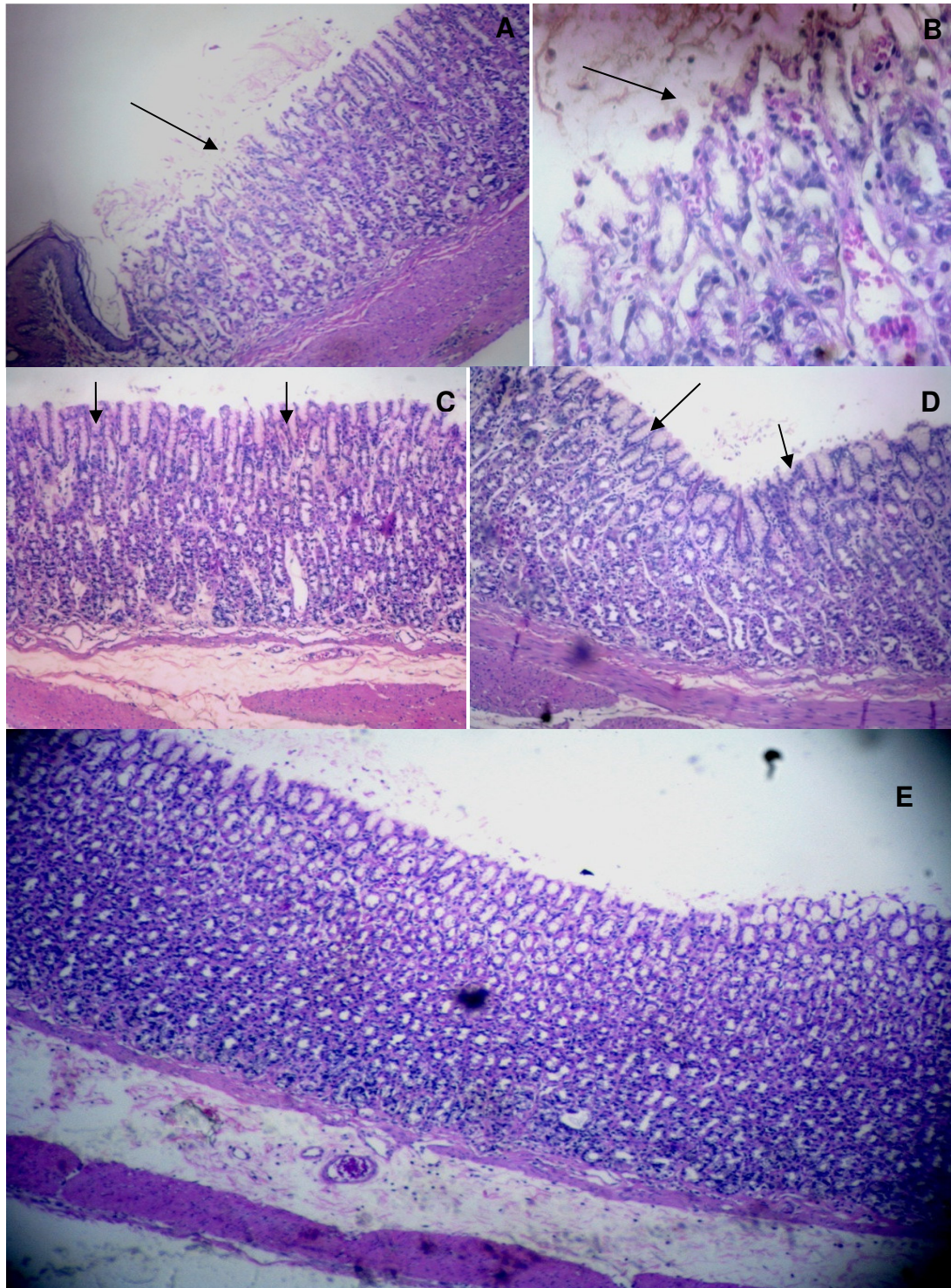
**A.** VX-2 Necrosis ( ✓ ) (4x), **B.** V1-1 Erosión leve superficial ( ✓ ) (4x), **C.** V2-1 Necrosis pérdida del epitelio, erosión extravasada ( ✓ ) (10x), **D.** V2-2 Focos de erosión y congestión de vasos sanguíneos ( ✓ ) (4x), **E** y **F** Congestión de vasos sanguíneos ( ✓ ) (40x), **G.** V3-2 Necrosis pequeña, asociada a una anoxia provocada por el etanol. Pérdida del epitelio ( ✓ ) (10x), **H.** V5-2 Foco de erosión y necrosis, pero sin llegar a la lámina propia ( ✓ ) (4x), **I.** Necrosis y hemorragia ( ✓ ) (40x).

*Anexo 14 d. Estudio histopatológico del estómago de rata *Rattus norvegicus* cepa. Holtzmann, G-IV: EAVT 400 mg/kg - EtOH.*



**A.** Ax-1 Foco de erosión mínimo (↙) (4x), **B.** Congestión vascular (40x), **C.** Erosión superficial (↙) (40x), **D.** Ax-2 Foco de erosión y necrosis del epitelio superficial extenso (↔) (40x), **E.** Congestión vascular (40x), **F.** A2-2 Necrosis (↔) (10x), **G,H,I** Amplificación a 40x. Necrosis que no compromete a la lámina propia.

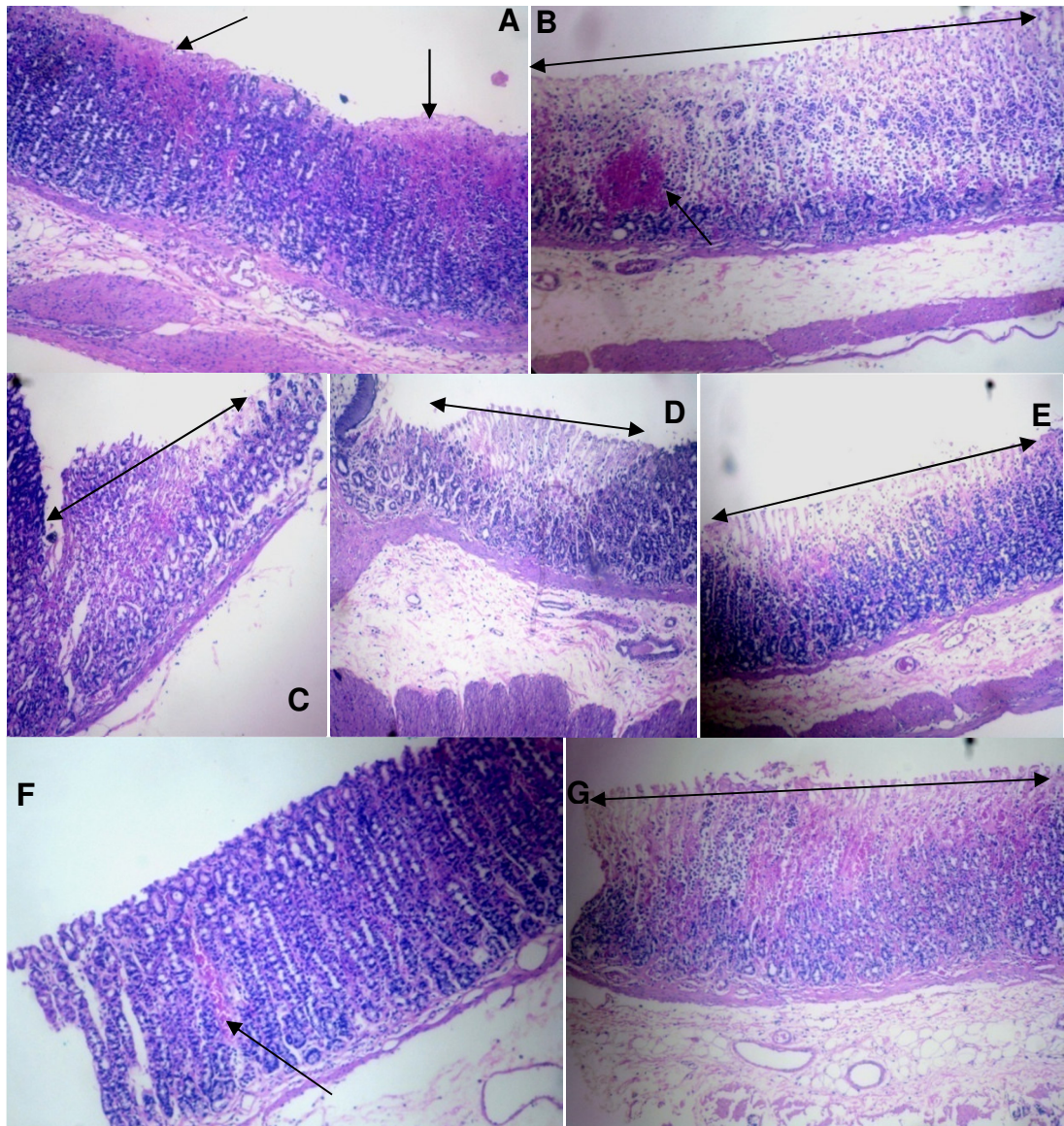
Anexo 14 e. Estudio histopatológico del estómago de rata *Rattus norvegicus* cepa. Holtzmann, G-V: EAVT 800 mg/kg - EtOH.



**A.** Rx-1 Erosión superficial en la unión gastroesofágica (↙) (10x), **B.** Magnificación a 40x, **C.** R1-2 Erosión superficial (↙) (10x), **D.** R2-1 Erosión superficial mínima (↙) (10x), **E.** Mucosa normal (10x).

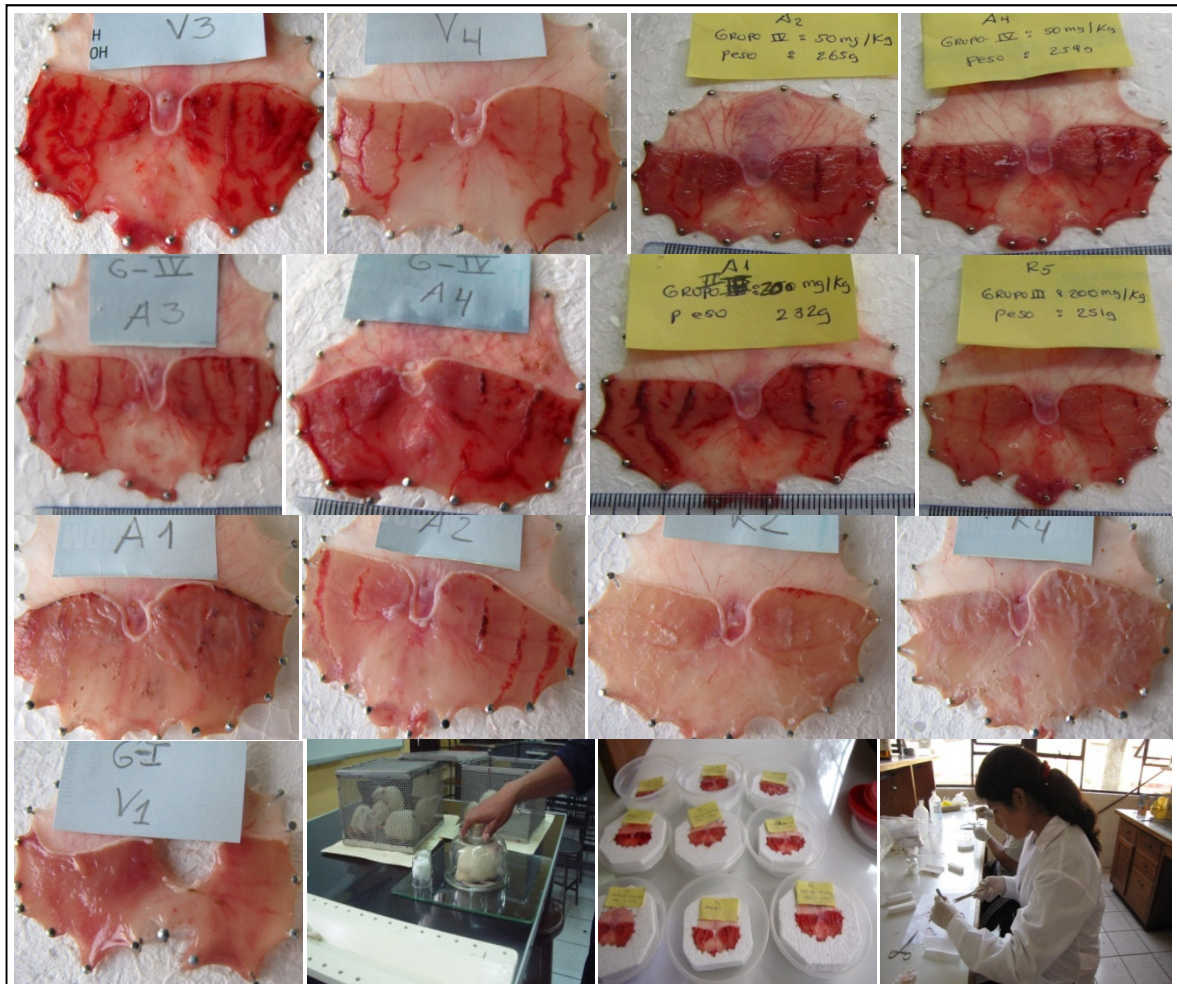


*Anexo 14 f. Estudio histopatológico del estómago de rata *Rattus norvegicus* cepa. Holtzmann, G-VI: Antiácido 500mg/kg - EtOH.*



**A.**Sx-1 Necrosis (presencia de hematíes) (↔) (10x), **B.** Sx-2 Necrosis (presencia de hematíes) (10x), **C.** S1-2 Necrosis (presencia de hematíes) (10x), **D.** S2-1 Necrosis (presencia de hematíes) (10x), **E.** S3-2 Necrosis (presencia de hematíes) (10x), **F.** S4 Necrosis mínima (presencia de hematíes) (↙) (10x), **G.** S5-1 Amplia necrosis (presencia de hematíes) (10x).

**Anexo 15. Algunas fotografías de los ensayos piloto para determinar la dosis del efecto protector del EAVT *C. spinosa* sobre la mucosa gástrica con injuria aguda inducida por etanol al 70%.**



**Esquema de trabajo del 1er piloto**

Grupo	n	Tratamiento	Etiqueta	Peso
I	1	Control + SF + o'l 70º	A5	232
			R1	242
II	3	EAVT 400 mg + o'l 70º	R2	258
			R3	245
			R4	215
III	3	EAVT 200 mg + o'l 70º	R5	251
			A1	232
			A2	265
IV	3	EAVT 50 mg + o'l 70º	A3	280
			A4	254

**Esquema de trabajo del 2do piloto**

Grupo	n	Tratamiento	Etiqueta	Peso
I	2	Control + SF + SF	V1	250
			V2	265
II	2	Control + SF + o'l 70º	V3	258
			V4	250
III	2	EAVT 400 mg sin o'l	A1	239
			A2	254
IV	3	EAVT 100 mg + o'l 70º	A3	265
			A4	270
			R1	235
V	3	EAVT 800 mg + o'l 70º	R2	282
			R3	219
			R4	255

**Anexo 16 . Fotografías del procedimiento en la determinación del moco gástrico.**



**Anexo 17. Fotografías del procedimiento en la determinación de lipoperoxidación y GSNP.**



**Anexo 18. Fotografías de la determinación de acidez total y PH.**

