

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIENZIMÁTICA *IN VITRO* Y ANTIINFLAMATORIA *IN VIVO* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Caesalpinia spinosa* "TARA"

Activities anti-enzymatic and antioxidant *in vitro* and anti-inflammatory *in vivo* of hydroalcoholic extract from *Caesalpinia spinosa* "tara"

Wilder J. Nuñez¹, Raomír Quispe¹, Norma J. Ramos¹, Américo J. Castro², Gloria Gordillo³

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica. ²Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara", ³Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología Marco Antonio Garrido Malo Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

Se tuvo como objetivo explorar los potenciales antioxidante, antienzimático y antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de vainas de *Caesalpinia spinosa* "tara". La actividad antioxidante se determinó por neutralización de los radicales 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH^{•+}) y del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+}). La actividad antienzimática se evaluó por inhibición de las enzimas colagenasa y elastasa. La actividad antiinflamatoria se determinó por el método de inducción de edema plantar en ratas por λ -carragenina. Se emplearon 30 ratas albinas de cepa Holtzman, con peso promedio de 200 ± 20 g, distribuidas al azar en cinco grupos de seis, un control con suero fisiológico, un grupo con el estándar farmacológico indometacina y los grupos de intervención con el extracto hidroalcohólico en dosis de 50, 100 y 250 mg/kg, respectivamente. El extracto mostró actividad antioxidante en los métodos DPPH ($EC_{50} = 4,52 \mu\text{g/mL}$) y ABTS^{•+} ($EC_{50} = 14,48 \mu\text{g/mL}$), mayor que la del patrón de referencia trolox $EC_{50} = 5,04 \mu\text{g/mL}$ y $EC_{50} = 17,04 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. En la actividad antienzimática, el extracto presentó mayor potencial de inhibición de la enzima colagenasa ($IC_{50} = 196,752 \mu\text{g/mL}$) respecto al control positivo galato de epigallocatequina (EGCG) ($IC_{50} = 216,99 \mu\text{g/mL}$), sin presentar actividad significativa para la inhibición de la enzima elastasa. En la actividad antiinflamatoria con el extracto de 250 mg/kg la inflamación disminuyó en 44,854% a la sexta hora, sin embargo, a la misma hora la indometacina de 5 mg/kg disminuyó 48,267%; los extractos de 100 y 50 mg/g también disminuyeron el edema pero en menor proporción que el estándar. A los valores obtenidos se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnet, con nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$), mostrando diferencias significativas en las medias de cada extracto en el transcurso de las horas. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de la vainas de *Caesalpinia spinosa* "tara", presenta actividad antioxidante, antienzimática, antiinflamatoria.

Palabras clave: *Caesalpinia spinosa* "tara", actividad antioxidante, antienzimática, antiinflamatoria.

SUMMARY

The aim of this studio was explore the antioxidant, anti-inflammatory anti-enzymatic potential of hydro-alcoholic extract of *Caesalpinia spinosa* "tara" pods. The antioxidant activity was determined by neutralization of radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hidrazilo (DPPH^{•+}) and 2,2'-azinobis acid (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}). The antienzymatic activity was assessed by inhibition of the enzymes collagenase and elastase. The antiinflammatory activity was determined by the method of induction of plantar edema in rats λ -carrageenan. 30 albino rats Holtzman strain were used, with average weight 200 ± 20 g, randomly distributed in five groups of six, a control with saline, a group with indomethacin pharmacological standard and intervention groups with alcoholic extract doses of 50, 100 and 250 mg/kg, respectively. The extract showed antioxidant activity in DPPH ($EC_{50} = 4,52 \mu\text{g/mL}$) y ABTS^{•+} ($EC_{50} = 14,48 \mu\text{g/mL}$), respectively, greater than the reference pattern trolox $EC_{50} = 5,04 \mu\text{g/mL}$ and $EC_{50} = 17,04 \mu\text{g/mL}$. Antienzymatic activity in the extract showed greater inhibition to potential enzyme collagenase ($IC_{50} = 196,752 \mu\text{g/mL}$) compared to the positive control epigallocatechin gallate (EGCG) ($IC_{50} = 216,99 \mu\text{g/mL}$), without exhibiting significant activity for inhibiting the enzyme elastase. Antiinflammatory activity with the extract 250 mg/kg decreased inflammation 44,854% at the sixth hour, however, at the same time indomethacin 5 mg/kg decreased 48,267%; extracts of 100 and 50 mg/kg also reduced edema but less so than the standard. The values obtained analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's test, with confidence level of 95% ($p \leq 0,05$) showing significant differences in the mean of each extract during the hours it were applied. It is concluded that the hydro-alcoholic extract of *Caesalpinia spinosa* "tara" pods, has antioxidant, anti-enzymatic, anti-inflammatory activity.

Keywords: *Caesalpinia spinosa* "Tara" antioxidant activity, anti-enzymatic, anti-inflammatory.

INTRODUCCIÓN

La "tara" es una planta originaria del Perú, empleada desde la época prehispanica en la medicina popular y en años

recientes materia prima en el mercado mundial de hidrocoloides alimenticios ⁽¹⁾. Su contenido de metabolitos secundarios como los taninos, flavonoides y gomas hace que tenga uso medicinal y fotoprotector

ante daños oxidativos ⁽²⁾. Los antioxidantes son sustancias que hallándose presentes a bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable, retardan o previene la oxidación de ese sustrato ⁽³⁾. La tara es una planta promisoría que puede actuar como antioxidante, antienzimático y antiinflamatorio ante los efectos de la radiación ultravioleta. En los últimos años se ha despertado interés por los extractos de plantas con actividades anticlagenasa y antielastasa, por la amplia variedad de constituyentes químicos que poseen, como polifenoles, flavonoides, tocoferoles, esteroides, ácidos fenólicos y taninos; que pueden actuar como poderosos bioflavonoides ⁽⁴⁾.

La vaina es la parte más importante de la planta, ya que allí se encuentran los mayores niveles de taninos, principalmente en la cáscara. El Perú es el principal abastecedor de “tara”, gracias a que posee climas y suelos que posibilitan el desarrollo de esta especie en numerosos departamentos del país. Sin embargo, pese a su importancia económica y ecológica aún no hay estudios integrales acerca de las características bioquímicas y genéticas de este recurso; ni tampoco estudios bioquímicos y genéticos relacionados con su procedencia geográfica.

El objetivo de la investigación fue determinar la actividad antioxidante antienzimática *in vitro* y antiinflamatorio *in vivo* del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* “tara”.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación es experimental, prospectiva y longitudinal.

Material biológico

Las vainas de *Caesalpinia spinosa* “tara” fueron colectadas en la provincia de Huanta, región Ayacucho a 2628 metros de altitud y su clasificación taxonómica se realizó en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según el sistema de clasificación de Cronquist (1988).

Obtención del extracto hidroalcohólico

Las vainas fueron seleccionadas, limpiadas y desinfectadas con solución de cloro al 1%. Posteriormente se secaron, trituraron y molieron en molino de cuchillas. El extracto hidroalcohólico se obtuvo en proceso de maceración tratando 2,0 Kg de

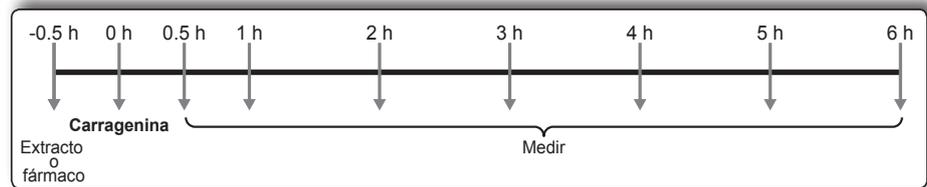


Figura 1. Esquema de administración en el edema plantar por carragenina.

polvo de tara con una mezcla de etanol agua (7:3) y luego se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio.

Determinación de la actividad antioxidante

Se desarrolló aplicando dos métodos.

El método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) según Brand-Williams ⁽⁵⁾, que consiste en preparar una solución stock de 40 mg/100 mL de (DPPH), 1 mM en metanol y almacenamiento a 4°C protegida de la luz. Se calibra el espectrofotómetro con un blanco que contiene 400 µL del solvente de la muestra y 800 µL de metanol, luego se coloca en un tubo de ensayo de 400µL de la muestra problema y 800 µL de la solución de trabajo de DPPH y se agita. Se deja en un reposo durante 30 minutos alejado de la luz y se lee la absorbancia a 517 nm. Todos los extractos son medidos por triplicado a concentraciones de 0; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,4 µg/mL. Se emplea el mismo procedimiento para la sustancia patrón Trolox®. Con los valores de las absorbancias obtenidas se determina el porcentaje de captación de radicales libres (DPPH), mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{muestra})}{Abs_{DPPH}} \times 100$$

El IC₅₀ se determina a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales libres del DPPH.

El método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+}), se trabajó *in vitro* según la metodología descrita por Kuskosqui ⁽⁶⁾, el radical ABTS^{•+} se obtiene por la reacción de ABTS 7 mM con persulfato potásico 2,45 mM mantenidos a 25°C y en la oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluye en agua bidestilada hasta obtener un valor de absorbancia (A) comprendido entre 0,7±0,02 a longitud máxima de absorción 734 nm. Cada extracto se diluye con dos mL de etanol absoluto. A 20 µL de esta solución se añaden 980 µL de disolución de ABTS^{•+} y se lee la absorbancia del blanco y del extracto a los siete minutos. Para reconocer la capacidad antioxidante de los extractos se

elaboraron curvas estándar de Trolox®. El antioxidante de referencia se ensaya a una concentración de 1,2 a 10 µg/mL (concentración final) en etanol, bajo las mismas condiciones. Para las curvas a obtenerse, se calcula la regresión lineal. Con los resultados se determina el IC₅₀ a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición en función de la concentración, y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales libres del ABTS^{•+}. Con los valores de la absorbancia se determina el porcentaje de radicales libres (ABTS^{•+}) de manera semejante al método DPPH.

Determinación de la actividad antienzimática

Inhibición de enzima elastasa: el ensayo se hizo según el método descrito por Thring⁽⁷⁾ y consistió en incubar 25 µL de muestra (a las concentraciones finales de 5, 65, 125, 180 y 250 µg/mL) con 100 µL de la enzima elastasa pancreática porcina (PE, 2,5 µg/mL en agua HPLC) por 15 minutos y luego agregar 125 µL del sustrato N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (AAPVN, 1,6 mM en buffer THAM, Sigma 7-9^o, pH 8,0) para que la reacción se inicie. Luego de 11 minutos se leyó la absorbancia a 410 nm usando una lectora de placas multifunción CHAMELEON V. Se realizó un control sin muestra y se utilizó galato de EGCG como compuesto de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Las EC₅₀ (concentración efectiva media) se calcularon por análisis de regresión lineal, donde la abscisa está representada por las concentraciones de los extractos y la ordenada por el promedio de porcentaje de actividad antienzimática obtenido a partir de tres mediciones independientes.

Inhibición de enzima colagenasa: se aplicó el método descrito por Thring⁽⁷⁾ y consistió en incubar 100 µL de muestra (a las concentraciones finales de 80, 160 y 250 µg/mL) con 260 µL de la enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum* (ChC, 1,54 unidades/mL en buffer pH 7,5 de Tricine (N-[Tris(hidroximetil)metil]glicina) 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM CaCl₂) por 15 minutos y luego se agregaron 240 µL del sustrato N-[3-(2-furil)acrilil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA, 2 mM en buffer pH 7,5 de Tricine 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM CaCl₂) para que la reacción se inicie. Luego de 5 minutos se leyó la absorbancia a 348 nm usando un espectrofotómetro UV-Visible. Se realizó un control sin muestra y se utilizó galato de EGCG como compuesto de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Las EC₅₀ se calcularon por análisis de regresión lineal de forma similar a la elastasa.

Los porcentajes de inhibición para cada una de las dos enzimas se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de la enzima} = \frac{(Abs^o - Abs^m)}{Abs^o} \times 100$$

Dónde:

Abs^o = Absorbancia del control (sin muestra)

Abs^m = Abs. de la mezcla con sustrato - Abs. de la mezcla sin sustrato

Determinación de la actividad antiinflamatoria

Se evaluó por el método del edema de pata inducido por λ-carragenina^(8,9). Se utilizaron 30 ratas de cepa Holtzman, procedentes del Instituto Nacional Salud (INS), con peso 200 ± 20 g. Los animales fueron aclimatados por una semana, y distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 6 ratas, y tratados vía oral de la siguiente manera:

a) Grupo control: suero fisiológico (con carragenina)

b) Grupo con estándar farmacológico: indometacina (con carragenina)

c) Grupo con extractos hidroalcohólicos: 50, 100 y 250 mg/kg, respectivamente (con carragenina)

Media hora después se inyectó 0,1 mL de carragenina al 1% en la aponeurosis subplantar de la pata derecha. El diámetro de la pata inyectada fue determinado con pletismómetro digital a 0 (basal); 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 y 6 horas después de inducir la inflamación y aplicar los tratamientos. El edema se expresa como la diferencia entre el incremento de volumen de las patas (figura 3).

La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la expresión matemática:

$$\% I = \frac{(\Delta VC - \Delta Vp)}{\Delta VC}$$

Dónde:

%I: Porcentaje de inhibición del edema

ΔVC = Media aritmética del incremento de volumen de las patas en el grupo control (λ-carragenina)

ΔVp = Media aritmética del incremento de volumen de las patas en el grupo problema (extractos o fármaco).

RESULTADOS

Actividad antioxidante

Los resultados obtenidos con los métodos DPPH y ATBS se muestran en las tablas 1 y 2 y en las figuras 2 y 3.

Actividad antienzimática

Los resultados del ensayo de inhibición de la enzima colagenasa se encuentran en la tabla 3, figura 4, mientras que los correspondientes a inhibición de elastasa están en la tabla 4 y figura 5.

Se obtuvo IC_{50} de 216,991 $\mu\text{g/mL}$ con el patrón de referencia galato de EGCG.

Tabla 1. Resultados de las actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de tara por el método de DPPH.

Extracto de tara ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio absorbancia a 517 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de absorbancia	Porcentaje inhibición
0	0,774 (a)	0,003	0
0,8	0,492 (b)	0,007	36,44
1,6	0,472 (c)	0,004	38,94
3,2	0,433 (d)	0,010	43,99
6,2	0,358 (e)	0,014	53,72
12,4	0,130 (f)	0,002	83,19
EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			4,520

*Las letras distintas en las columnas indica diferencias estadísticamente significativas usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95% ($p < 0,05$).

Tabla 2. Resultados de la actividad antioxidante de extracto hidroalcohólico de tara por el método de ABTS.

Extracto de tara ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio absorbancia a 734 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de absorbancia	Porcentaje inhibición
0	0,778 (a)	0,010	0
10	0,161 (b)	0,007	39,72
15	0,217 (c)	0,017	51,8
20	0,296 (d)	0,012	61,95
25	0,375 (e)	0,013	72,11
30	0,469 (f)	0,033	79,31
EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			14,48

*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95% ($p < 0,05$).

Tabla 3. Resultados de la actividad de la enzima anticlagenasa del extracto hidroalcohólico de tara.

Extracto de tara ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio absorbancia a 348 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de absorbancia	Porcentaje inhibición
0	0,837 (a)	0,0187	0
100	0,555 (b)	0,0098	33,63
200	0,370 (c)	0,0130	55,78
400	0,208 (d)	0,0095	75,14
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			196,752

*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa usando en método de Tukey con un nivel de confianza al 95% ($p < 0,05$).

Tabla 4. Resultados de la actividad de la enzima elastasa del extracto de tara.

Extracto de tara ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio absorbancia a 410 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de absorbancia	Porcentaje inhibición
0	0,144 (a)	0,0045	0
50	0,137 (b)	0,0017	4,640
125	0,107 (c)	0,0247	25,754
180	0,095 (d)	0,0151	33,643
250	0,078 (e)	0,0100	34,339
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			348,396

*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95% ($p < 0,05$).

Actividad antiinflamatoria

El análisis estadístico para los resultados son expresados en promedios (o medias) para todas las mediciones obtenidas. Se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett y la prueba de Grubbs para la determinación de valores atípicos, con un nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$) empleando el programa Minitab ⁽¹⁷⁾.

DISCUSIÓN

Las vainas secas de Tara son conocidas en la medicina tradicional por aliviar problemas inflamatorios de garganta, ojos, sinusitis, infecciones vaginales y micóticas, heridas crónicas, reumatismo, etc. En ratas, se ha descrito que durante las primeras tres horas después de la administración por vía plantar, produce un comportamiento bifásico; la primera fase es mediada por la liberación de

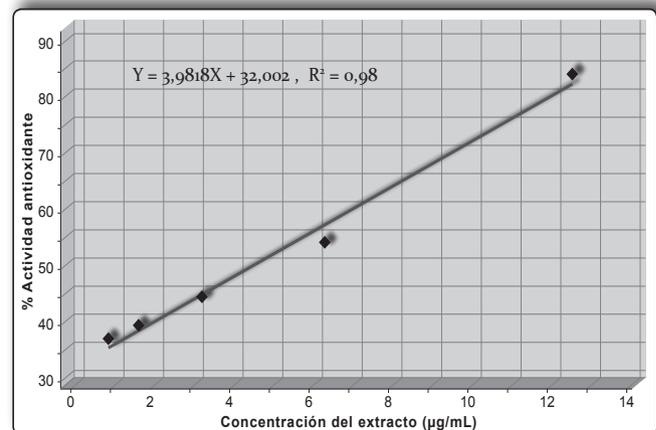


Figura 2. Correlación entre extractos hidroalcohólico de la vaina de tara vs % de inhibición del radical DPPH.

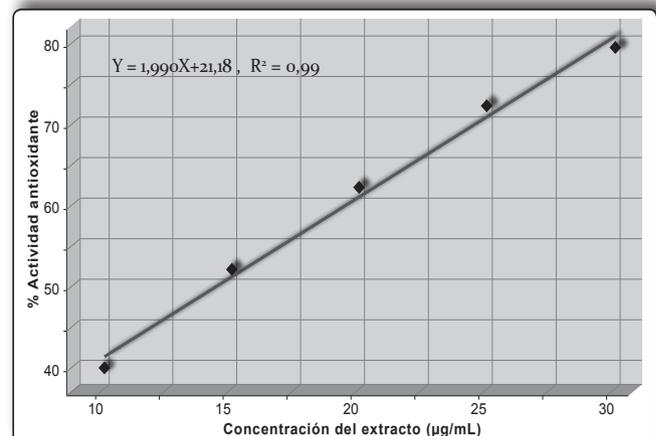


Figura 3. Correlación entre extractos hidroalcohólico de la vaina de tara vs % de inhibición del radical ABTS*.

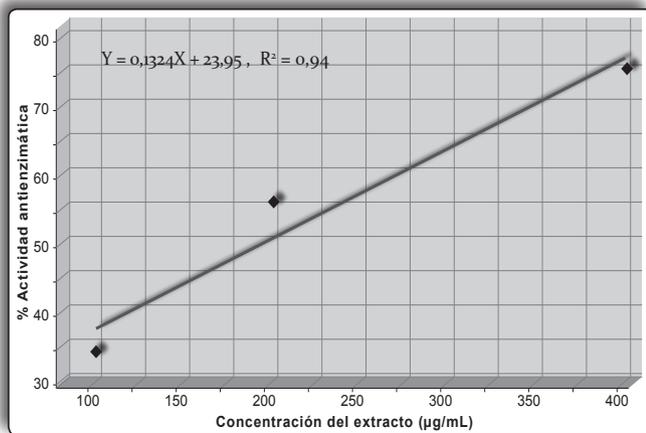


Figura 4. Correlación entre extractos hidroalcohólicos de la vaina de tara vs % de inhibición de la enzima colagenasa.

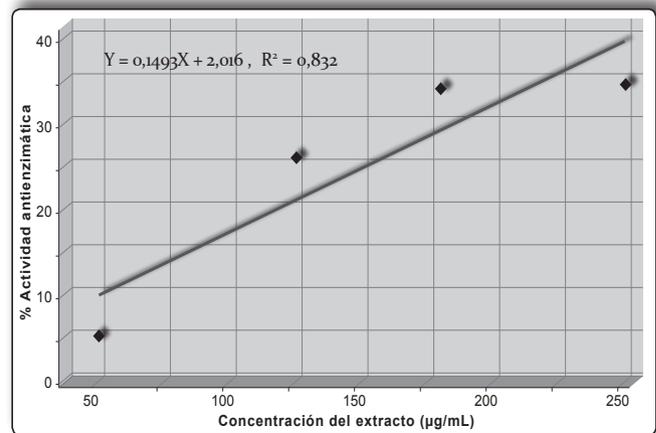


Figura 5. Correlación entre extractos hidroalcohólico de la vaina de tara vs % de inhibición de la enzima elastasa.

histamina y serotonina, mientras que en la segunda se liberan prostaglandinas, bradiquinina, proteasa y lisosoma, con un efecto máximo alrededor de tres horas ⁽¹⁰⁾.

En la figura 6 se observa el aumento del volumen de la pata inflamada siendo notorio el efecto de la carragenina. En en la sexta hora disminuyó la curva de carragenina, posiblemente por la acción antiinflamatoria del propio organismo. Los resultados indican que la acción del extracto con mayor concentración es comparable con indometacina a la quinta hora.

No se evidenciaron diferencias significativas entre los extractos y el fármaco de referencia en los primeros 30 y 60 minutos de aplicación, en cuanto a la actividad antiinflamatoria ($p=0,78$ y $p=129$, respectivamente, método Dunnett). A partir de la segunda hora, los extractos empezaron a diferenciarse del patrón, observándose a la sexta hora el pico más alto de inhibición de la indometacina y el extracto 250 mg/kg (48,267% y 44,854% de disminución de la inflamación, respectivamente).

En la figura 6, se evidencia que a mayor concentración del extracto hay mayor eficiencia antiinflamatoria. La disminución del edema se debe

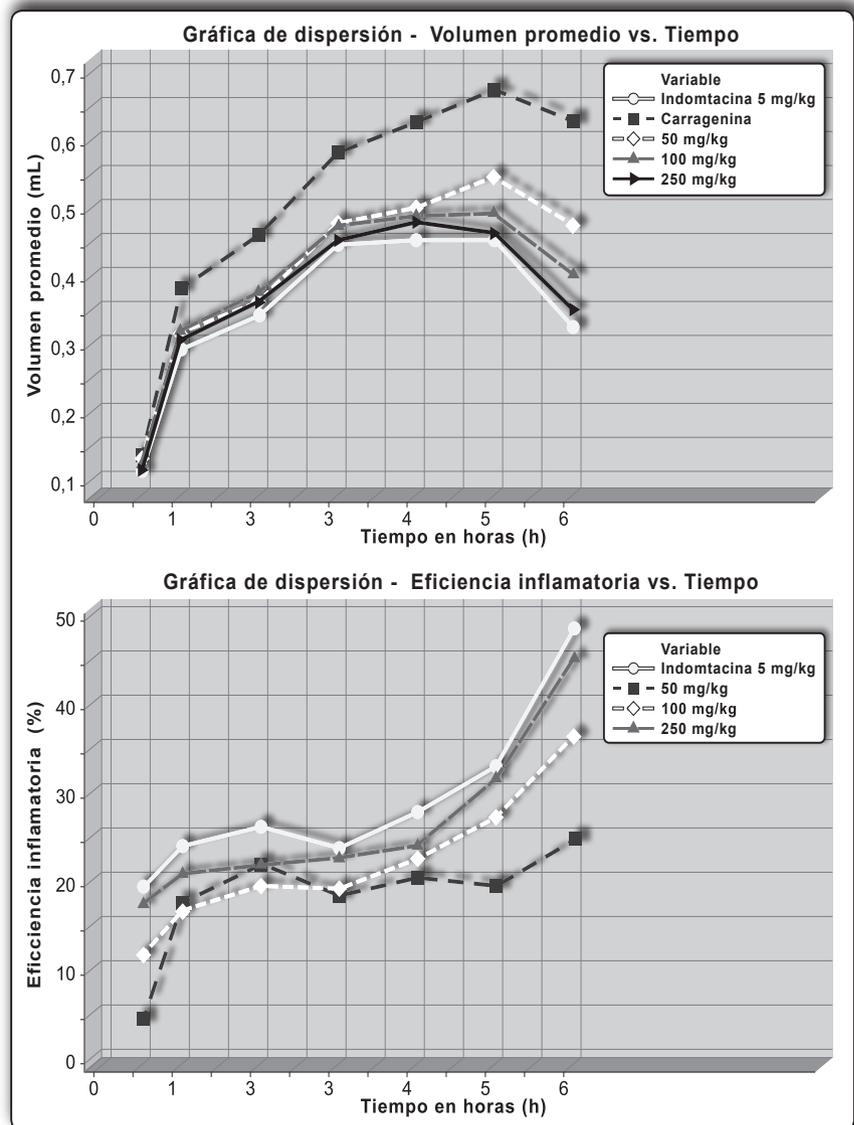


Figura 6. Volumen promedio de la pata inflamada y eficiencia inflamatoria.

Tabla 5. Promedio del volumen de la pata inflamada en las distintas horas.

Sustancias	Volumen promedio de pata inflamada (mL)						
	0.5 hora	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas	6 horas
Carragenina	0,1342 ^A	0,3787 ^A	0,4583 ^A	0,5785 ^A	0,6242 ^A	0,670 ^A	0,625 ^A
Extracto 50 mg/kg	0,1287 ^A	0,3134 ^A	0,3600 ^A	0,4731 ^A	0,4976	0,5425	0,4717
Extracto 100 mg/kg	0,1192 ^A	0,3168 ^A	0,3717	0,4700 ^A	0,4850	0,4904	0,4000
Extracto 250 mg/kg	0,1111 ^A	0,3017 ^A	0,3600	0,4500	0,4774	0,4609	0,3447
Indometacina 5 mg/kg	0,1085 ^A	0,2891	0,3400	0,4433	0,4518	0,4508	0,3233
ANOVA	p=0,781	p=0,129	p=0,027	p=0,026	p=0,001	p=0,000	p=0,000

*p<0.05 existe diferencias significativas (ANOVA).

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control "carragenina" (DUNNETT).

a la acción de grupos fenólicos, relacionados con la inhibición de diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico –ciclooxigenasa, lipoxigenasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa–, que reducen el estrés oxidativo y a flavonoides ⁽¹¹⁾. *In vitro*, los flavonoides polihidroxilados actúan preferentemente por la vía 5-lipooxigenasa, mientras que los menos hidroxilados inhiben fundamentalmente la vía ciclooxigenasa. *In vivo*, sin embargo, parecen comportarse como inhibidores duales ⁽¹²⁾. Esta diferencia de comportamiento, no exclusiva de flavonoides, se debe a la biotransformación que sufren en el organismo.

La indometacina 5mg/kg es un AINE que actúa sobre la cascada del ácido araquidónico inhibiendo no selectivamente a la COX, que suprime la formación de prostaglandinas y también inhibe la marginación, adhesión y migración de leucocitos, por lo que se considera un eficaz agente antiinflamatorio.

Como la vaina de tara presenta alto porcentaje de compuestos fenólicos –comprobado *in vitro* por diversos autores–, en el presente estudio se esperaba mayor actividad antiinflamatoria ya que esta propiedad es atribuible a la biodisponibilidad de estos grupos. Sin embargo, los polifenoles, en mayor porcentaje, no siempre son los más activos en el organismo, ya sea por su menor actividad intrínseca, baja absorción intestinal, que son altamente metabolizados o de excreción rápida; en general su metabolismo se produce a través de una secuencia de reacciones similares a la decodificación metabólica que sufren muchos xenobióticos.

Para evaluar la actividad antioxidante se utilizaron los métodos *in vitro* ABTS y DPPH, que proporcionan una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* ⁽¹³⁾.

El DPPH reportó un EC₅₀ de 4,520 µg/mL para el extracto hidroalcohólico de tara y 5,04

µg/mL para la solución patrón trolox. El ensayo con ABTS presentó un EC₅₀ de 14,48 µg/ml para el extracto hidroalcohólico y 17,04 µg/mL para la solución patrón trolox. En las tablas 1 y 2 se puede observar que el extracto hidroalcohólico de tara posee buena actividad antioxidante en los ensayos DPPH y ABTS, siendo inclusive mayor a la del control positivo.

Se demostró que todos los valores obtenidos en ambas pruebas, según el análisis estadístico de ANOVA, presentan un p<0,05, por lo que se acepta que las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de tara poseen estadísticamente diferencias significativas entre sí.

Los flavonoides son antioxidantes, estando sus propiedades anti-radicales libres dirigidas fundamentalmente a los radicales hidróxidos y superóxidos, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica.

Existen diferencias entre los resultados aquí obtenidos y los de otros investigadores. Esto podría deberse a diversos factores que influyen en su producción y productividad, ya que se ha descrito que la capacidad antioxidante en un alimento vegetal no proviene sólo de la suma de las capacidades antioxidantes de sus componentes, sino que el microambiente en que se halla, influiría sobre dichos componentes para que interactúen entre sí produciendo efectos sinérgicos ⁽¹⁴⁾. Sin embargo, en la tara hay que considerar la presencia de metabolitos antioxidantes ⁽¹⁵⁾, como fenoles y flavonoides, cuyo contenido puede ser influido por la altitud y la radiación de la región de origen.

El 80% del peso seco de la piel está constituido por colágeno, que es responsable de su textura; de otro lado, la elastina proporciona elasticidad a arterias, pulmones, ligamentos y, por supuesto, la piel. La colagenasa y elastasa son enzimas que

degradan, respectivamente, ambas proteínas causando la aparición de arrugas, y la tara podría tener características inhibitorias para las dos.

La actividad anticolagenasa del extracto de tara aparece desde las concentraciones bajas y se incrementa en las altas. La prueba usada posee concentraciones constantes de enzima y sustrato, aunque se incrementa la concentración de la muestra, habrá un límite que se expresa en la absorbancia. En la tabla 3 se muestran valores de inhibición que oscilan en el rango de 33,63 a 75,14%, con IC_{50} 196,752 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el extracto de tara, que comparado con el IC_{50} 216,991 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del compuesto de referencia demuestran que el extracto posee mayor actividad anticolagenasa que el EGCG. Según el análisis estadístico ANOVA presentan un $p < 0,05$, por lo que las medias de las absorbancia son estadísticamente diferentes en cada concentración del extracto.

La capacidad de inhibir esta enzima se debe a la presencia de taninos condensados, los cuales tienen actividad quelante, formando precipitados con iones metálicos, como el zinc, metal componente del centro activo de la colagenasa, que impide la unión de ésta con el sustrato; por tanto, un mayor contenido de taninos podría asociarse con un incremento en la fuerza de interacción de sus componentes con la colagenasa, que a su vez podría relacionarse con su actividad inhibitoria ⁽¹⁶⁾. Es un tipo de inhibición reversible competitiva.

Respecto a los resultados, el potencial antielastasa (tabla 4) se obtuvo un IC_{50} de 348,396 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los extractos de tara, en comparación de 12,1266 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el compuesto de referencia EGCG. La figura 3 muestra la creciente inhibición de las enzimas en presencia del extracto, que posiblemente se debió a la presencia de flavonoides libres, glucósidos y taninos condensados. Se observó que no presenta actividad antielastasa considerable.

Los valores de la actividad antiinflamatoria, antioxidante y la capacidad enzimática, fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

El extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* tara mostró actividad antioxidante *in vitro* (DPPH y ABTS) mayor que el estándar de referencia Trolox, asimismo inhibe la enzima colagenasa con

mayor potencia que el control positivo EGCG, aunque no inhibe la elastasa.

La planta posee antiinflamatoria dosis dependientes con diferencias significativas entre las medias de las sustancias entre la segunda y sexta horas, sin embargo, esta no es significativa al compararla con el patrón de referencia (indometacina) a las mismas concentraciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De la Cruz P. Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*. Revista de Investigación FIGMMG. 2004; 7(14): 64-73.
2. Tomás-Lorente F. Aportación al estudio de los flavonoides. Madrid: Ed. Real Academia de Doctores de España; 2004.
3. García BL, Vicente GG, Rojo DD, Sánchez GE. Plantas con propiedades antioxidantes. Rev Cubana Invest Biomed, 2001; 20(3): 231-35.
4. Kim Y, Uyama H, Kobayashi S. Inhibition effects of (+) -catechins-dehide polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 320: 256-61.
5. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science And Technology. 1995; 25(1): 25-30.
6. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Cienc Tecnol Aliment. 2005; 25(4): 726-32.
7. Thring TS, Hili P, Naughton DP. Anti-Collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of 21 plants. BMC Complement Altern Med. 2009; 9:t 27.
8. Sughisita E, Amagaya S, Ogihara Y. Antiinflammatory testing methods: Comparative evaluation of mice and rats. J Pharmacobiodyn. 1981; 4(8): 565-75.
9. Winter CA, Porter CA. Effect of alteration in side chain upon antiinflammatory and liver glycogens activities of hydrocortisone esters. J Am Pharm Assoc. 1957; 46(9): 509-15.
10. Chakraborty A, Devi R, Rita S, Sharatchandra K, Singh T. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. Indian J Pharmacol. 2004; 36(3): 148-50.
11. Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. J Exp Bot. 2002; 53(372): 1305-19.
12. Ferrándiz L, Alcaraz M. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. Agents Actions. 1991; 32: 283-8.

13. Castañeda C, Ramos LI, Ibañez V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*. 2008; 8(1): 56-72.
14. Muñoz J, Ramos E, Alvarado-Ortiz U, Castañeda C. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev Soc Quím Perú*. 2007; 73(3): 142-19.
15. Fukumoto L, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 3597-3604.
16. Melzig MF, Loser B, Ciesielski S. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie*. 2001; 56: 967-70.

Manuscrito recibido el: 15/02/2016

Aceptado para su publicación el: 20/04/2016

Correspondencia

Nombre: Wilder Javier Núñez Enero
Dirección: Mz G1 Lt. 25 Urb. Santo Domingo - Carabayllo
e-mail: wilderNE@hotmail.com