



Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas**

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Evaluación de la Actividad Citotóxica de Caesalpinia Spinosa (TARA)
sobre Células de Cáncer de Mama, Arequipa - 2024**

Tesis presentada por:

Mamani Hualpa, Jessica Jaquelin

ORCID: 0009-0009-4085-5111

Yallerco Sabina, Yuly Maribel

ORCID: 0009-0003-0712-1243

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Asesora:

Dr. Choquenaira Quispe, Celia

ORCID: 0000-0002-2272-5585

Arequipa - Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FARMACIA Y BIOQUIMICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 06 de Abril del 2026

Dictamen: 014610-C-EPFyB-2026

Visto el borrador del expediente 014610, presentado por:

2020898532 - MAMANI HUALPA JESSICA JAQUELIN

2020899202 - YALLERCO SABINA YULY MARIBEL

Titulado:

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CAESALPINIA SPINOSA (TARA) SOBRE
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA, AREQUIPA - 2024**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Titulo Profesional/Titulo de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**29440909 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**



**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



**70541954 - CANDIA PUMA MAYRON ANTONIO
DICTAMINADOR**



Evaluación de la Actividad Citotóxica de Caesalpinia Spinosa (TARA) sobre Células de Cáncer de Mama, Arequipa - 2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

7%

INDICE DE SIMILITUD

5%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María	4%
	Trabajo del estudiante	
2	repositorio.uladech.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
3	www.scielo.org.pe	1%
	Fuente de Internet	
4	repositorio.unheval.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
5	revistadiagnostico.fihu.org.pe	1%
	Fuente de Internet	

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

DEDICATORIA

En memoria de mi querido padre Neptalí, cuyo amor sigue iluminando mi camino. Este logro es un tributo a su memoria y a la eterna gratitud que siento en mi corazón. Te extraño siempre.

A mi valiente madre Adriana, esta tesis es el resultado de su amor, apoyo y sacrificio en mi viaje educativo. Te amo.

A mis hermanos Fredy, Richard, Consuelo y María, este logro también es de ustedes. Los quiero.

Yallerco Sabina, Yuly Maribel

Dedico este trabajo a Dios por darme la vida y haberme permitido llegar hasta esta etapa tan importante de mi formación profesional.

A mis queridos padres Valentin y Benita, quienes me dieron apoyo incondicional en este largo camino, comprensión y motivación para alcanzar esta meta, brindándome sus consejos para hacer de mí una mejor persona.

A mi familia por sus palabras y confianza.

Mamani Hualpa, Jessica Jaquelin

AGRADECIMIENTOS

Agradecida con Dios por darme valentía, empeño y fuerza para continuar en lo adverso, por conducirme en el camino de lo prudente y sabiduría para mejorar día a día en mi quehacer profesional.

A todas aquellas personas que Dios puso en mi camino y que han sido parte de este logro.

Yallerco Sabina, Yuly Maribel

Agradezco a Dios por guiarme y darme fortaleza para seguir adelante en los momentos difíciles.

A mis padres que me apoyaron, su paciente espera y creer en mí, por cada consejo y palabras que me guiaron durante trayecto de la vida.

A las personas que nos abrieron las puertas y compartido sus conocimientos guiándome para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Mamani Hualpa, Jessica Jaquelin

RESUMEN

El cáncer representa un grave problema de salud pública a nivel mundial y se estima que para el año 2040 más de 30 millones de personas vivirán con esta enfermedad. En el Perú, las neoplasias más frecuentes en mujeres son el cáncer de mama y el de cuello uterino, siendo el primero la principal causa de muerte femenina. A pesar de la eficacia de la quimioterapia, su uso prolongado genera efectos adversos severos y deterioro en la calidad de vida, lo que motiva la búsqueda de terapias complementarias más seguras. En este contexto, los productos naturales como *Caesalpinia spinosa* (Tara) han despertado interés por su potencial como adyuvantes en el tratamiento oncológico, gracias a su alto contenido de polifenoles y taninos con propiedades antioxidantes y antitumorales.

Este estudio buscó evaluar la actividad citotóxica de los extractos de Tara sobre células de cáncer de mama, explorando su potencial como alternativa complementaria en la terapia anticancerígena, para ello se realizó una marcha fitoquímica para poder detectar un perfil fitoquímico y evidenciar la presencia de diferentes metabolitos secundarios, seguido a ello se realizó el ensayo de capacidad antioxidante por DPPH, y la cuantificación de ácido gálico presente en las muestras, por último se realizó la evaluación de la capacidad citotóxica del extracto.

La marcha fitoquímica reveló que, para flavonoides, las vainas presentaron mayor concentración que las semillas y hojas, en el caso de la prueba de taninos, la mayor concentración fue de las hojas seguido de las vainas y finalmente las semillas, para el ensayo de compuestos fenólicos por el reactivo de folin, las vainas demostraron tener mayor concentración, seguido de las semillas y por último las hojas, y para el ensayo de capacidad antioxidante por DPPH, las semillas presentaron mayor concentración, seguido de las hojas y finalmente las vainas. Una vez culminada la marcha fitoquímica se procedió a realizar la cuantificación de ácido gálico obteniéndose como resultado que las semillas poseían una concentración de 390.133 ppm, el resultado de ácido gálico para hojas y vainas fue negativo. En el ensayo de viabilidad por MTT se determinó que el extracto de semilla poseía una mejor actividad citotóxica en comparación a hojas y vainas, obteniéndose como IC₅₀ 3.9 µg/mL y 1.9 µg/mL para MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente.

El extracto de *Caesalpinia spinosa*, resultó poseer un perfil fitoquímico rico en metabolitos secundarios bioactivos, el cual, se encuentra directamente correlacionado con su potente actividad antioxidante y su capacidad citotóxica, los hallazgos obtenidos pretenden marcar una ruta para continuar estudios de esta planta.

Palabras Clave: Cáncer de mama, *Caesalpinia spinosa*, citotoxicidad

ABSTRACT

Cancer represents a serious public health problem worldwide, and it is estimated that by 2040 more than 30 million people will be living with this disease. In Peru, the most frequent neoplasms in women are breast and cervical cancer, with the former being the leading cause of death among women. Despite the effectiveness of chemotherapy, its prolonged use generates severe adverse effects and a decline in quality of life, which motivates the search for safer complementary therapies. In this context, natural products such as *Caesalpinia spinosa* (Tara) have attracted interest for their potential as adjuvants in cancer treatment, thanks to their high content of polyphenols and tannins with antioxidant and antitumor properties.

This study aimed to evaluate the cytotoxic activity of Tara extracts on breast cancer cells, exploring their potential as a complementary alternative in cancer therapy. A phytochemical screening was performed to detect a phytochemical profile and identify the presence of different secondary metabolites. This was followed by an antioxidant capacity assay using the DDPPH method, and the quantification of gallic acid present in the samples. Finally, the cytotoxic capacity of the extract was evaluated.

The phytochemical screening revealed that, for flavonoids, the pods showed a higher concentration than the seeds and leaves. In the tannin test, the highest concentration was found in the leaves, followed by the pods, and then the seeds. For the phenolic compound assay using the Folin reagent, the pods showed the highest concentration, followed by the seeds, and then the leaves. Finally, for the DPPH antioxidant capacity assay, the seeds showed the highest concentration, followed by the leaves, and then the pods. Once the phytochemical screening was completed, gallic acid quantification was performed, revealing a concentration of 390.133 ppm in the seeds. Gallic acid levels in the leaves and pods were negative. The MTT viability assay determined that the seed extract exhibited superior cytotoxic activity compared to the leaves and pods, with IC₅₀ values of 3.9 µg/mL and 1.9 µg/mL for MCF-7 and MDA-MB-231, respectively.

The *Caesalpinia spinosa* extract demonstrated a phytochemical profile rich in bioactive secondary metabolites, which is directly correlated with its potent antioxidant activity and cytotoxic capacity. These findings suggest a path for further research on this plant.

Keywords: Breast cancer, *Caesalpinia spinosa*, cytotoxicity

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

HIPÓTESIS 2

OBJETIVOS: 3

OBJETIVO GENERAL: 3

OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 3

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO 4

1. Cáncer 5

1.1. Tipos de cáncer 6

1.1.1. Cáncer de mama 6

1.2. Signos y síntomas 9

1.3. Diagnóstico 9

1.4. Tratamiento 10

1.5. Muerte celular 11

1.6. Líneas Celulares 12

2. Tara 14

2.1. Clasificación taxonómica 14

2.2 Actividad Antioxidante 15

2.3 Actividad Antimicrobiana 16

2.4 Metabolitos secundarios 16

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS 19

1. Lugar de ejecución: 20

2. Materiales:	20
3. Métodos:	22
3.1. Recolección y estabilización de Tara <i>Caesalpinia spinosa</i> Tara:	22
3.1.1. Extracción por percolación:	22
3.2. Marcha fitoquímica:	23
a. Identificación de flavonoides totales por el método de AlCl_3 :	23
b. Identificación de taninos por el método de la fenantrolina:	24
c. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu:	25
d. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH:	27
e. Identificación y Cuantificación de ácido gálico por TLC:	28
3.3. Determinación de la actividad citotóxica por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio):	30
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS:	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Molecular del cáncer de mama	8
Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de los extractos	33
Tabla 3. Datos de la curva de calibración de Flavonoides	33
Tabla 4. Datos del ensayo Flavonoides en muestras de Tara.....	34
Tabla 5. Datos de la curva de calibración de Taninos.....	35
Tabla 6. Datos del ensayo de Taninos en muestras de Tara.....	36
Tabla 7. Datos de la curva de calibración de Compuestos Fenólicos	37
Tabla 8. Datos del ensayo de Compuestos Fenólicos en muestras de Tara	38
Tabla 9. Datos de la curva de calibración de DPPH	39
Tabla 10. Datos de ensayo de DPPH en muestras de Tara	40
Tabla 11. Cuantificación de ácido gálico por Image J	41
Tabla 12. Datos de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con Caesalpinia spinosa (Semilla).....	42
Tabla 13. Datos de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con Caesalpinia spinosa (Vaina).....	43
Tabla 14. Datos de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con Caesalpinia spinosa (Hoja)	44
Tabla 15. Datos de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con Caesalpinia spinosa (Semilla).....	45
Tabla 16. Datos de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con Caesalpinia spinosa (Vaina).....	46
Tabla 17. Datos de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con Caesalpinia spinosa (Hoja)	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Línea celular MCF-7(8).....	13
Figura 2. Línea celular MDA-MB-231(9).	13
Figura 3. Ubicación geográfica de la recolección.....	22
Figura 4. Ensayo de Flavonoides	23
Figura 5. Ensayo de Taninos.....	25
Figura 6. Ensayo de Folin - Ciocalteu.....	26
Figura 7. Ensayo de DPPH	27
Figura 8. Principio de cromatografía en Capa Fina (TLC)	29
Figura 9. Fundamento del Ensayo MTT	31
Figura 10. Gráfica de la curva de calibración de Flavonoides	34
Figura 11. Gráfica de la curva de calibración de Taninos.....	36
Figura 12. Gráfica de la curva de calibración de Compuestos Fenólicos	37
Figura 13. Gráfica de la curva de calibración de DPPH	39
Figura 14. Placa procesada por ImageJ.....	41
Figura 15. Gráfica de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con <i>Caesalpinia spinosa</i> (Semilla).....	42
Figura 16. Gráfica de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con <i>Caesalpinia spinosa</i> (Vaina)	43
Figura 17. Gráfica de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con <i>Caesalpinia spinosa</i> (Hoja)	44
Figura 18. Gráfica de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con <i>Caesalpinia</i> <i>spinosa</i> (Semilla).....	45
Figura 19. Datos de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con <i>Caesalpinia</i> <i>spinosa</i> (Vaina)	46
Figura 20. Gráfica de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con <i>Caesalpinia</i> <i>spinosa</i> (Hoja)	48

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un importante problema de salud pública en el mundo. Para el 2040, se espera que 30.2 millones de personas vivan con cáncer, el diagnóstico de la mayoría de neoplasias se realiza en etapas avanzadas cuando las opciones de tratamiento son limitadas o no accesibles. A nivel mundial, se estima que una de cada seis muertes se debe a cáncer en estadio avanzado, además el 70 % de los fallecimientos por esta causa ocurren en países de ingresos bajos y medios.

Las neoplasias con más frecuencia en mujeres en Perú son el cáncer de mama y cáncer de cuello uterino. El cáncer de mama representa un problema de salud de gran impacto en la población femenina siendo la primera causa de muerte y en los últimos años ha ascendido mundialmente la tasa de mortalidad, teniendo como factores más relevantes: obesidad, antecedentes familiares, reproductivos y hormonales, consumo de tabaco, alcohol y diagnóstico tardío. El deterioro en la calidad de vida comienza después del diagnóstico y persiste debido a la naturaleza vigorosa del tratamiento. La quimioterapia tiene un efecto terapéutico, pero esta se asocia al desarrollo de reacciones adversas graves, además el tratamiento contra el cáncer requiere una duración prolongada afectando la calidad de vida de las personas.

Para el tratamiento del cáncer se da en modalidad de coadyuvante y neoadyuvante, el tipo coadyuvante está dado para prevenir el desarrollo de la patología y el tratamiento neoadyuvante tiene como finalidad reducir el tumor primario y reducir el riesgo de la metástasis. Sin embargo, existen productos naturales como adyuvantes en la quimioterapia debido a su potencial, eficacia y reducir la toxicidad de los fármacos convencionales, como la *Caesalpinia spinosa*. Nuestro país es el mayor productor y exportador de Tara en el mundo con un aproximado del 80% de producción, desarrollándose en zonas semiáridas de distintas regiones del Perú. Los importantes compuestos de la Tara son los polifenoles, que posee la propiedad antioxidante. La cantidad de taninos en los frutos es de 40 y 60% con ácido gálico como principal componente que posee actividad anti mutagénica, antialérgica y disminuye la proliferación de células de cáncer, y también el ácido tánico inhibe el crecimiento de tumores, la semilla destaca por su contenido de gomas e hidrocoloides, el principal tanino de la Tara se basa en la estructura del ácido gálico.

Con este trabajo se busca evaluar la actividad citotóxica de la Tara *caesalpinia spinosa* sobre células de cáncer de mama.

HIPÓTESIS

Dado que *Caesalpinia spinosa* (Tara) contiene compuestos bioactivos como el ácido gálico y etil galato, es probable que el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) muestre actividad citotóxica sobre células de cáncer de mama reduciendo su viabilidad celular.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad citotóxica del extracto de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre células de cáncer de mama.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Realizar la extracción etanólica de las hojas, vainas y semillas de *Caesalpinia spinosa* (Tara).
2. Realizar la marcha fitoquímica de los extractos de *Caesalpinia spinosa* (Tara).
3. Cuantificar ácido gálico en los extractos de *Caesalpinia spinosa* (Tara).
4. Evaluar la actividad citotóxica del extracto con mayor contenido de ácido gálico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.



CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1. **Cáncer**

El cáncer se define como una enfermedad en la cual las células transformadas crecen sin control y se diseminan hacia otras partes del organismo (1). Se le considera también como un agrupamiento celular conocido bajo el nombre de tumor, clasificándose como tumores cancerosos (malignos) y los tumores no cancerosos (benignos); únicamente los tumores malignos los que diseminan a otros tejidos (2).

El proceso de carcinogénesis no ocurre de manera abrupta; por el contrario, es un fenómeno que progresa a lo largo del tiempo. Este proceso incluye fases de iniciación, promoción y progresión, donde las células acumulan mutaciones que les otorgan ventajas proliferativas y adaptativas. A lo largo de este proceso, las células transformadas adquieren características conocidas como "capacidades distintivas del cáncer", entre las que se incluyen: proliferación sostenida, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la apoptosis, angiogénesis, replicación ilimitada, capacidad invasiva y evasión del sistema inmunitario. Estos atributos permiten que el cáncer avance y se consolide como una enfermedad sistémica (1).

El cáncer está considerado como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Dentro de los primeros lugares de causa de muerte se encuentran el cáncer de mama y el cáncer de cuello uterino (1,2). Según estimaciones recientes, aproximadamente una de cada seis defunciones en el mundo se relaciona con algún tipo de cáncer, reflejando su enorme impacto social y sanitario. Su incidencia ha aumentado en las últimas décadas debido al envejecimiento poblacional, la exposición prolongada a factores ambientales carcinógenos (como el tabaquismo, la radiación ultravioleta y sustancias químicas), así como cambios en el estilo de vida, incluyendo dietas poco saludables, sedentarismo y obesidad. Además, ciertos agentes infecciosos, como virus oncogénicos, contribuyen de manera significativa al desarrollo de neoplasias en regiones específicas (1,2).

Desde una perspectiva de salud pública, el cáncer representa un desafío debido a su elevada carga económica, la complejidad de su manejo y las disparidades en su diagnóstico y tratamiento entre países y regiones.

A pesar de los avances científicos, el diagnóstico tardío sigue siendo un problema recurrente, especialmente en contextos con recursos limitados. Por ello, la

investigación continúa en detección temprana, prevención, biología tumoral y desarrollo de terapias dirigidas es fundamental para reducir su impacto.

1.1. Tipos de cáncer

Los tipos de cáncer se clasifican en función del tejido y de la célula de origen, existen cientos de diversas formas siendo los siguientes tres los principales tipos:

- a) Sarcomas: Los cuales tienen su origen principalmente en tejido conectivo, por ejemplo, el cáncer de hueso.
- b) Carcinomas: Cuyo origen se encuentra principalmente en tejido epitelial y tejidos glandulares; constituyen el tipo de cáncer más frecuente por ejemplo el cáncer de próstata.
- c) Leucemias y linfomas: Formado por los tipos de cáncer que afecta a tejidos formadores de las células sanguíneas, estas causan inflamación de ganglios, invasión del bazo y médula ósea y un incremento en la producción de células blancas (2).

1.1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es considerado un fuerte problema de salud pública de primer orden debido a su elevada incidencia (3). Este tipo de cáncer representa la principal causa de muerte en mujeres por tumores malignos, posee una fuerte vinculación con factores hormonales u reproductivos (4).

La comprensión del cáncer de mama ha evolucionado de forma notable en las últimas décadas, pasando de un enfoque meramente anatómico a una visión molecular más precisa. Este avance ha permitido reconocer que la enfermedad no es homogénea, sino que engloba múltiples entidades con comportamientos biológicos diferenciados. De esta manera, la identificación de subtipos moleculares ha transformado el diagnóstico, tratamiento y pronóstico, permitiendo implementar intervenciones personalizadas dirigidas a características específicas del tumor (4).

Asimismo, diversos factores de riesgo contribuyen al desarrollo del cáncer de mama, entre ellos la edad, antecedentes familiares, mutaciones germinales en genes como BRCA1 y BRCA2, exposición prolongada a estrógenos, inicio temprano de la menstruación o menopausia tardía, nuliparidad y estilos de vida poco saludables. La

interacción entre estos determinantes ambientales, hormonales y genéticos configura un escenario complejo que influye no solo en la aparición, sino también en la agresividad del tumor (5).

En salud pública, la detección temprana es una herramienta esencial para mejorar la supervivencia. Sin embargo, la disparidad en el acceso a programas de tamizaje y atención especializada genera importantes brechas entre regiones y grupos poblacionales. El fortalecimiento de estrategias de prevención, educación sanitaria y diagnóstico precoz resulta imprescindible para reducir la carga global de la enfermedad y mejorar los resultados clínicos (4)(5).

Existen diferentes tipos de cáncer de mama que pueden clasificarse dependiendo del aspecto molecular y genético (5).

a) Luminal A:

- Expresión positiva de receptores hormonales (ER + y/o PR +).
- Negativo para HER2 (o muy bajo) y baja proliferación celular (por ejemplo, índice Ki-67 bajo) según criterios usados.
- Generalmente tumores de grado más bajo, crecimiento más lento, mejor pronóstico, menor recurrencia.
- Son los subtipos más frecuentes en muchas series (~50-60 % de los casos) aunque puede variar por regiones (6).

b) Luminal B:

- También ER +, pero con menor expresión de PR o ausencia, y/o puede presentar sobreexpresión de HER2, o bien índice de proliferación Ki-67 más elevado que en Luminal A.
- Crecimiento más rápido, mayor grado histológico, peor pronóstico que Luminal A.
- En cuanto al tratamiento, además de terapia hormonal, muchas veces se recomienda quimioterapia u otros tratamientos más agresivos que los que típicamente se usan en Luminal A (6).

c) Sobreexpresión de Her2 +:

- Sobreexpresión o amplificación del gen ERBB2/HER2, sin expresión (o baja) de receptores hormonales (ER/PR).
- Antes de los tratamientos anti-HER2, este subtipo tenía un pronóstico muy desfavorable, pero la aparición de terapias dirigidas (ej. trastuzumab) ha mejorado sustancialmente los resultados.
- Clínicamente puede presentar características de mayor agresividad, mayor involucramiento ganglionar, etc. (6).

d) Subtipo basal o Triple Negativo:

- No expresa ER, ni PR, ni HER2 (“triple negativo”).
- Es un subtipo muy heterogéneo, generalmente de alto grado, con mayor tasa de recurrencia, metástasis temprana, y peor pronóstico en comparación con los otros.
- Tratamiento más limitado en términos de terapias dirigidas hormonales o anti-HER2; frecuentemente se recurre a quimioterapia, investigaciones en inmunoterapia, PARP inhibitors, etc. (5,6).

Tabla 1. Clasificación Molecular del cáncer de mama

Subtipo molecular	Frecuencia	RE/PR/HER2	CK5/6 EGFR	Proliferación genética	Grado histológico	Mutaciones P53	Pronóstico
Basal	10–20%	RE-, RP-, HER2-	+	Alta	Alto	Alto	Malo
Sobreexpresión HER2	10–15%	RE-, RP-, HER2+	+/-	Alta	Alto	Alto	Malo
Mama normal	5–10%	RE-/+, HER2-	-	Baja	Bajo	Bajo	Intermedio
Luminal A	50–60%	RE+, RP+, HER2-	-	Baja	Bajo	Bajo	Excelente
Luminal B	10–20%	RE+/-, RP+/-, HER2+/-	-	Alta	Intermedio/Alto	Intermedio	Intermedio
Bajo en claudina	12–14%	RE-/+, HER2-	+	Alta	Alto	Alto	Malo

Fuente: Entendimiento del papel del HER2 en el cáncer de mama (7).

1.2.Signos y síntomas

El síntoma más común y recurrente en el cáncer de mama es el surgimiento de una masa o abultamiento nuevo, en su mayoría no dolorosa y rígida, aunque también puede ser blando e hipersensible incluso doloroso (8).

Otros síntomas incluyen:

- Inflamación del seno, que puede ser parcial o total, incluso sin la presencia de un bulto palpable.
- Aparición de hoyuelos o hundimientos en la piel, que pueden darle una apariencia similar a la cáscara de naranja.
- Dolor o sensibilidad en el seno o en la zona del pezón.
- Retracción o hundimiento del pezón, que puede dirigirse hacia el interior.
- Cambios en la piel del pezón, como enrojecimiento, resequedad, descamación o engrosamiento.
- Secreción anormal del pezón, distinta a la leche materna.
- Inflamación de los ganglios linfáticos en las axilas o alrededor de la clavícula, lo que puede indicar una posible propagación del cáncer antes de que el tumor original sea detectable al tacto (8).

1.3.Diagnóstico

El diagnóstico de cáncer de mama comienza con estudios a través de imágenes como: estudios radiológicos, RMN, ecografía, tomografía de emisión de protones (PET), radioinmunoconjugados, y pruebas de laboratorio con el fin de encontrar anomalías en el tejido mamario. Sin embargo, para la confirmación definitiva se requiere una biopsia que permita analizar las células bajo el microscopio e identificar si son cancerosas, así como determinar el tipo histológico, grado tumoral y la presencia de receptores hormonales (estrógeno, progesterona) o del marcador HER2, información esencial para definir el tratamiento. Una vez confirmado el diagnóstico, se evalúa la extensión del cáncer mediante la determinación del estadio (9).

1.4.Tratamiento

El tratamiento va a depender del subtipo de cáncer del paciente (positivo para receptores hormonales, positivo para HER2 o triple negativo) determinan la elección del tratamiento, que puede incluir quimioterapia adyuvante o neoadyuvante, hormonoterapia y fármacos dirigidos a HER2. Generalmente los tratamientos consisten en:

- Cirugía: El tipo de tratamiento más utilizado para diversos tipos de cáncer. En el cual se extrae una masa de células cancerígenas (tumor) y algo de los tejidos circundantes (10).
- Radioterapia: Usa partículas radiactivas las cuales dañan principalmente a las células cancerígenas a comparación de las células normales. Así evitando que estas crezcan y se dividan, lo que lleva a la muerte celular. Los dos principales tipos de radioterapia son: Radioterapia Interna (Se aplican a través de partículas radiactivas que se colocan dentro o cerca del tumor, un líquido o pastilla, o por vía endovenosa) y Radioterapia Externa (Se dirigen los rayos X o partículas al tumor desde afuera del cuerpo) (10).
- Quimioterapia: Consiste en el uso de medicamentos citotóxicos con la finalidad de eliminar las células cancerígenas. Los medicamentos se pueden administrar vía oral o endovenosa. Se pueden administrar distintos tipos de medicamentos al mismo tiempo o uno después del otro dependiendo el mecanismo farmacológico de cada uno (10).
- Hormonoterapia: Se utiliza para tratar cánceres alimentados hormonalmente. Esta terapia utiliza medicamentos diseñados para detener o bloquear las hormonas naturales del cuerpo, así frenando el crecimiento de las células cancerígenas (10).
- Inmunoterapia: Esta terapia utiliza sustancias producidas por el cuerpo o en un laboratorio para ayudar al sistema inmunitario a combatir el cáncer. De igual manera estos medicamentos están diseñados para ser específicos a ciertas partes de una célula cancerígena. Algunos contienen toxinas o sustancias radiactivas unidas a ellos y se administra a través de la vía endovenosa (10).

1.5.Muerte celular

La muerte celular es un fenómeno fundamental para los organismos multicelulares, pues permite eliminar células que han resultado dañadas, que ya no son necesarias o que podrían afectar la homeostasis de los tejidos. Permite la conformación de tejidos durante el desarrollo como el mantenimiento de la homeostasis después del nacimiento mediante la eliminación de células obsoletas o deterioradas(11).

Aunque tradicionalmente se ha considerado la muerte celular como un evento pasivo o consecuencia de daño irreversible, la investigación reciente resalta que muchas muertes celulares están reguladas activamente a través de múltiples rutas moleculares, como:

- a) **Apoptosis (muerte celular programada clásica):** Proceso regulado genéticamente, con cambios morfológicos característicos (como contracción celular, fragmentación del núcleo) y activación de caspasas (11).
- b) **Necrosis:** Formas de muerte celular que implican pérdida de integridad de la membrana, liberación del contenido celular y respuesta inflamatoria. En el artículo se menciona que la muerte celular regulada incluye rutas más allá de la apoptosis tradicional (11).
- c) **Otras vías reguladas:** Rutas emergentes como la autofagia ligada a la muerte celular, la ferroptosis, entre otras, que amplían el concepto clásico de muerte celular programada. Aunque el nivel de detalle varía, el artículo sugiere que la red de muerte celular es más compleja de lo que se pensaba (11).

Para que una célula decida su propia eliminación, se involucran varios mecanismos moleculares reguladores, incluyendo señales de daño o estrés, integridad mitocondrial, activación de proteasas de muerte (caspasas) y rutas de señalización de receptores de muerte.

Algunos de los aspectos clave son:

- a) Señales iniciadoras: factores internos (por ejemplo, daño al ADN, estrés mitocondrial) o externos (por ejemplo, ligandos de muerte) que

desencadenan la vía de muerte (11).

- b) Integridad mitocondrial y permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP): Cuando se rebasan ciertos umbrales de estrés, las mitocondrias liberan factores pro-muerte al citosol, lo que impulsa la activación de caspasas (11).
- c) Caspasas iniciadoras y ejecutoras: Las caspasas son proteasas que, una vez activadas, degradan proteínas celulares clave y permiten la fragmentación nuclear, la formación de cuerpos apoptóticos y el reconocimiento por fagocitos (11).
- d) Proteínas reguladoras tipo Bcl-2: La familia Bcl-2 regula el equilibrio entre supervivencia y muerte; los miembros pro-apoptóticos (como Bax, Bak) promueven MOMP, mientras que los anti-apoptóticos (como Bcl-2, Bcl-xL) inhiben ese paso (11).
- e) Interacción entre vías: Las distintas rutas de muerte celular no actúan de forma totalmente independiente, sino que existe entrecruzamiento y regulación cruzada entre apoptosis, necroptosis y otros mecanismos (11).

1.6. Líneas Celulares

a. MCF-7

La línea celular MCF-7 es un adenocarcinoma mamario humano derivado de una paciente femenina de 69 años con cáncer de mama metastásico. Presenta morfología epitelial adherente y se utiliza ampliamente como modelo para el estudio del cáncer de mama dependiente de hormonas, ya que expresa receptores de estrógeno (ER+).

Por su estabilidad y características hormonodependientes, MCF-7 es una de las líneas más utilizadas en investigaciones sobre biología tumoral, mecanismos de proliferación, apoptosis, regulación hormonal y ensayos de fármacos antineoplásicos (8).

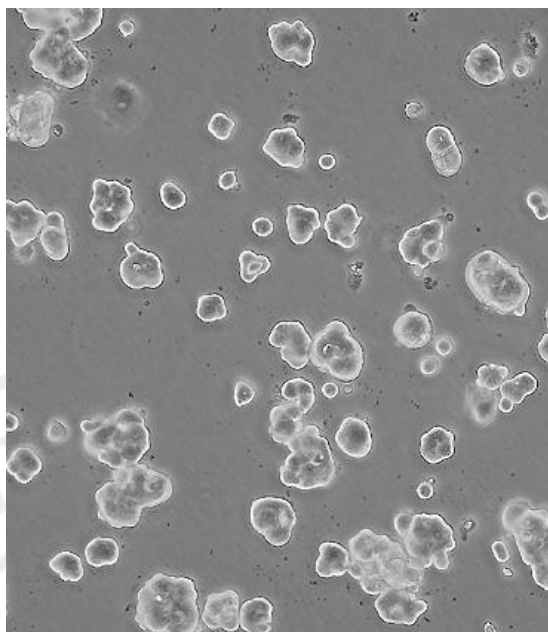


Figura 1. Línea celular MCF-7(8).

b. MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 es una línea de carcinoma adenocarcinómico de mama humana, establecida a partir de la glándula mamaria de una mujer de 40 años con un tumor metastásico. Es de tipo epitelial adherente y se utiliza ampliamente como material de referencia para desarrollo de ensayos, calibración y validación de métodos analíticos bajo acreditación ISO/IEC 17025, debido a sus características reproducibles y bien documentadas (9).

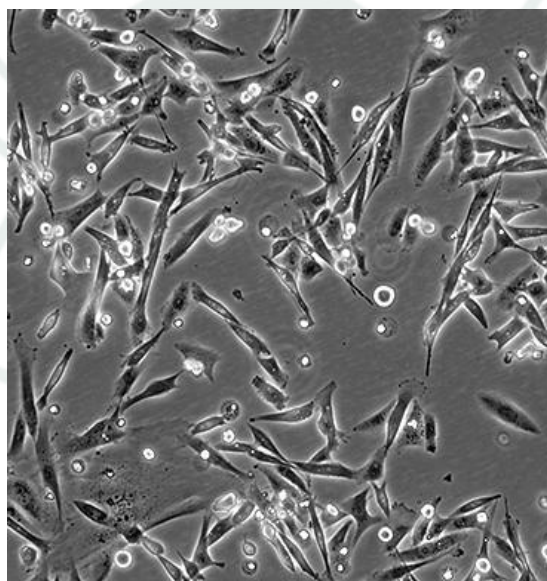


Figura 2. Línea celular MDA-MB-231(9).

2. Tara

La Tara ha sido utilizada desde la época prehispánica y en la actualidad ha llegado a alcanzar su mayor desarrollo. En el Perú, su nombre científico es “*Caesalpinia Spinosa*” crece en diferentes partes del mundo como Asia, África y América del Sur. También es conocida como “taya” (Perú) vainillo, campeche, guarango (Ecuador) Divi divi, cuica (Colombia) palo (Brasil) (14).

La Tara es una especie originaria del Perú, crece en los bosques de zonas áridas y semiáridas de lomas costeras y de valles interandinos. Se distribuye en casi toda la costa desde Piura hasta Tacna y en unos cuantos departamentos de la sierra entre ellos esta: Cajamarca, Cusco, Ayacucho, Ancash, Huánuco, Apurímac.

La Tara crece entre los 500 y 3200m de altitud, se acrecienta más en áreas con lluvias moderadas y temperaturas de 12 a 24°C, se hallan en cantidad mayor cuando cerca de cuencas de agua, y prefiere suelos arenosos, livianos, suelto y mejor si este contiene materia orgánica, frágil y no crece en lugares con frío intenso, ni demasiada humedad ambiental(14,15).

2.1. Clasificación taxonómica

—	Reino:	Plantae
—	División:	Magnoliophyta
—	Clase:	Equisetopsida
—	Subclase:	Magnoliidae
—	Orden:	Fabales
—	Familia:	Fabaceae
—	Género:	Tara
—	Nombre:	Tara spinosa (Molina) Britton & Rose = <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze

La Tara es considerada una especie importante por ser fijador de nitrógeno para conservación y mejoramiento en suelos pobres.

Es bien apreciada por sus diversos usos en medicina, forraje de animales, mejora de suelos, y en la fabricación de tintes, por otro lado, de sus vainas secas se obtiene taninos para la curtiembre de cueros y de las semillas para extraer goma como aditivo de los alimentos goma obtenida de las semillas tiene uso en la industria cosmética y alimentaria (16).

Se caracteriza por ser un árbol pequeño de sombra y ornamental llegando alcanzar de 4 a 8 metros de altura y puede alcanzar hasta 12 m bajo buenas condiciones de suelo y agua (16).

Sus hojas son compuestas, alternas en espiral, carecen de estípulas, cáliz irregular, corola con pétalos amarillos a rojizos.

Las flores son de color amarillo rojizo, dispuestas en racimos de 8 a 15cm de largo tiene un cáliz tubular, anteras rojizas, pistilo curvado verdoso, los estambres son de color amarillo irregular de longitud, los pétalos son aproximadamente el doble que los estambres (16).

Los frutos son legumbres de color verde cuando están inmaduras, rosado conforme van madurando, su forma es aplanada y con curvas de 7 a 10cm de largo y 2cm de ancho aproximadamente conteniendo hasta 10 semillas de color café negruzcas cuando maduran (16).

Sus semillas son ovaladas y muy pequeñas de color marrón oscuro con un diámetro aproximado de 0,75 cm.

La inflorescencia con grupos apeaderos de 15 a unos 20 cm de amplitud de flores situadas en la mitad distal, flores unisexuales, cigomorfos, cáliz anormal provisto de un sépalo muy extenso de aproximadamente 1 cm, con varios apéndices en el borde, cóncavo, corola con pétalos amarillentos libres, dispuestos en racimos de 8 a 20 cm (16).

2.2 Actividad Antioxidante

Caesalpinia spinosa posee una marcada actividad antioxidante, atribuida principalmente a su alto contenido de compuestos fenólicos, como taninos hidrolizables (ácido gálico y tánico) y flavonoides. Estos metabolitos actúan mediante la donación de átomos de hidrógeno y la captación directa de especies reactivas de oxígeno (ROS), como los radicales DPPH y ABTS, mostrando una capacidad comparable a antioxidantes de referencia como el Trolox. Estudios fitoquímicos demuestran que los extractos hidroalcohólicos de sus vainas presentan la mayor concentración de estos compuestos y, por tanto, la mayor actividad. En el contexto del cáncer, esta propiedad es de doble importancia: mientras puede ofrecer un efecto citoprotector en células sanas, en el microambiente tumoral muchos polifenoles pueden actuar como pro-oxidantes, generando estrés oxidativo selectivo

que induce daño y muerte en células cancerosas, cuya homeostasis redox ya se encuentra comprometida (17,18).

2.3 Actividad Antimicrobiana

Caesalpinia spinosa exhibe una significativa actividad antimicrobiana, documentada frente a bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (incluidas cepas resistentes), Gram-negativas como *Escherichia coli*, y hongos como *Candida albicans*. Esta acción se debe a la presencia de taninos y saponinas, que interactúan y desestabilizan las membranas celulares microbianas, inhiben enzimas esenciales y quelan iones metálicos.

Los valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) reportados para extractos eficaces suelen oscilar entre 0.1 y 2.0 mg/mL. Esta capacidad biocida es relevante para la investigación en oncología, ya que sugiere un mecanismo de acción basado en la interacción con membranas biológicas. Dicho mecanismo podría ser análogo a una acción desestabilizadora sobre la membrana mitocondrial de las células cancerosas, lo que promovería la liberación de citocromo c y desencadenaría la apoptosis. Además, un agente con actividad dual citotóxica y antimicrobiana sería de interés para pacientes oncológicos inmunosuprimidos (19–23).

2.4 Metabolitos secundarios

En la Tara se encuentran metabolitos antioxidantes, como fenoles, taninos, heterósidos y flavonoides y esto depende de la altitud y radiación del lugar donde crece (15). Vainas: Tiene taninos hidrolizables (galotaninos) en un 40% a 60%, esto depende de las condiciones ecológicas, la hidrólisis de estos taninos lleva a la separación del ácido gálico, también, se ha hallado la presencia de galato de etilo y cuatro galatos de ácido químico, correspondientes a los ésteres metílicos de los ácidos 4,5-diOgaloilquínico y 3,4,5-tri-O-galoilquínico y (3,4) -di-Ogaloilquínico. Y 3,4,5-triogaloilquínico. También se halla 2,8% de proteínas, un 73% de carbohidratos, 60 a 70% de taninos, aparte que en los granos se encuentra un 19% de proteína, 4% de taninos (15). Hojas: Se hallan glicósidos, gomas, mucílagos, taninos (en un 12.7% en la forma de taninos gálicos), antraquinonas, esteroides y flavonoides. En la semilla se encuentra la goma o hidrocoloide galactomanánico con alto contenido de proteínas ((15,16)

Los frutos de Tara tienen un 40% y un 60% de taninos hidrolizables con ácido gálico, ácido tánico que inhiben el crecimiento de tumores, el ácido gálico posee actividad

antioxidante, antialérgica, antiinflamatoria, antimutagénicas (16).

a) Ácido gálico

El ácido gálico es un compuesto fenólico clasificado como un ácido hidroxibenzoico, su nombre es; ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico ($C_7H_6O_5$), con un peso molecular de 170.12 g/mol. Se caracteriza por su estructura que incluye un anillo bencénico con tres grupos hidroxilo en posiciones vecinas (grupo pirogalol) y un grupo carboxilo, lo que le confiere una alta reactividad y su potente capacidad antioxidante. Físicamente, se presenta como un sólido cristalino blanco-amarillento, soluble en agua y solventes polares, con un punto de fusión alrededor de los 250°C.

Las propiedades biológicas del ácido gálico son extensas y han sido ampliamente investigadas. Su actividad más destacada es la antioxidante, gracias a la capacidad de sus grupos fenólicos para donar electrones y neutralizar radicales libres (como DPPH y anión superóxido) y quelar metales pro-oxidantes, reduciendo así el estrés oxidativo celular. Adicionalmente, exhibe una notable actividad antiinflamatoria al inhibir la expresión de enzimas como la COX-2 y la producción de citoquinas como el TNF- α . También posee efectos antimicrobianos contra bacterias y hongos, desestabilizando sus membranas celulares, y ha demostrado en estudios preclínicos una actividad proapoptótica y anticancerígena en líneas celulares de cáncer de pulmón, próstata y mama, mediante mecanismos como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la desestabilización mitocondrial (24,25).

Los frutos de la Tara son una fuente industrialmente relevante de taninos hidrolizables. Los principales metabolitos secundarios que se encuentran en la Tara son, precisamente, los galotaninos, que constituyen hasta el 45-60% del peso de la vaina. La hidrólisis de estos taninos complejos produce ácido gálico como metabolito fundamental. Además, bajo condiciones controladas, el ácido gálico puede ser transformado en ácido pirogálico (o pirogalol) mediante un proceso de descarboxilación. Cabe destacar que las semillas de Tara también son valiosas, ya que contienen un alto porcentaje de una goma polisacárida conocida como galactomanano, ampliamente utilizada como espesante y estabilizante (goma de Tara) en la industria alimentaria y cosmética. Por lo tanto, la Tara no solo es una fuente crucial de ácido gálico y sus precursores taninos, sino también de otros metabolitos de alto valor comercial, representando un recurso natural de gran interés

biotecnológico y económico (26,27).

b) Ácido Tánico

El ácido tánico es un polifenol complejo clasificado como un tanino hidrolizable, y constituye uno de los metabolitos secundarios más abundantes y característicos de *Caesalpinia spinosa* (Tara). Este compuesto se concentra principalmente en las vainas de la planta, donde puede representar un alto porcentaje de su peso seco, lo que justifica el uso industrial de la Tara como fuente comercial de taninos. Químicamente, el ácido tánico de la Tara es una molécula de glucosa esterificada con múltiples unidades de ácido gálico, lo que le confiere una elevada capacidad para formar complejos estables con proteínas, polisacáridos y iones metálicos(28).

Actividad Biológica

Desde el punto de vista biológico, el ácido tánico es el principal responsable de las propiedades astringentes, antioxidantes y antimicrobianas ampliamente reportadas para los extractos de Tara. Su potente actividad antioxidante se basa en su capacidad para donar electrones y neutralizar una amplia gama de especies reactivas de oxígeno. En el contexto específico de la investigación anticancerígena, el ácido tánico ha demostrado, en estudios preclínicos con otras fuentes vegetales, poseer actividad antiproliferativa, pro-apoptótica y antiangiogénica en diversos modelos de cáncer. Los mecanismos propuestos incluyen la inhibición de enzimas clave para la supervivencia celular, la inducción de estrés oxidativo intracelular y la modulación de vías de señalización pro-inflamatorias como NF- κ B (29,30).



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de ejecución:

Cede principal de la Universidad Católica de Santa María, Laboratorio H-401.

2. Materiales:

2.1.1. Material biológico (Cepas microbianas, líneas celulares, organismos):

Línea celular MCF-7

Línea celular MDA-MB-231

2.1.2. Reactivos químicos

- MTT, Sigma Aldrich ®
- Medio DMEM, Sigma Aldrich ®
- Suero Bovino Fetal, Sigma Aldrich ®
- Tripsina, Sigma Aldrich ®
- DPPH, Sigma Aldrich ®
- Trolox, Sigma Aldrich ®
- Carbonato de Sodio, Sigma Aldrich ®
- Ácido Sulfúrico 95 -97%, J Baker
- Ácido Gálico, Merck ®
- Folin-Ciocalteu, Merck ®
- Ácido tánico, Merck ®
- 1,10 fenantrolina, Merck ®
- Cloruro férrico hexahidratado, Merck ®
- EDTA, Merck ®
- Buffer acetato
- Nitrato de sodio, Merck ®
- Cloruro de Aluminio, Merck ®
- Hidróxido de sodio, Merck ®
- Quercetina - HPLC gradient, Sigma Aldrich ®

2.1.3. Materiales de laboratorio

- Pipetas graduadas
- Micropipeta – 5 – 25 μL
- Micropipeta 100 – 1000 μL
- Tips de micropipeta
- Placas de 96 pozos
- Beakers 100 mL, Pyrex[®]
- Beakers 50 mL, Pyrex[®]
- Probetas
- Perras de decantación
- Tubos Eppendorf 2 mL
- Tubos Falcon
- Placas de Silicagel 60 F₂₅₄
- Cubeta cromatográfica
- Fiolas 5 mL
- Fiolas 10 mL

2.1.4. Aparatos y equipos

- Cabina de Flujo Laminar
- Incubadora CO₂
- Lector de placas
- Lámpara UV
- Vortex

2.1.5. Software

- Excel

3. Métodos

3.1.Recolección y estabilización de Tara *Caesalpinia spinosa* Tara.

Las muestras de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) fueron recolectadas en el distrito de Sabandía (-16.46213, -71.48786), posteriormente, en el laboratorio se seleccionaron las muestras en mejor estado (sanas) y libres de plagas. Las muestras fueran secadas a temperatura ambiente, en un lugar despejado y sin luz solar para su posterior uso en la elaboración de los extractos.

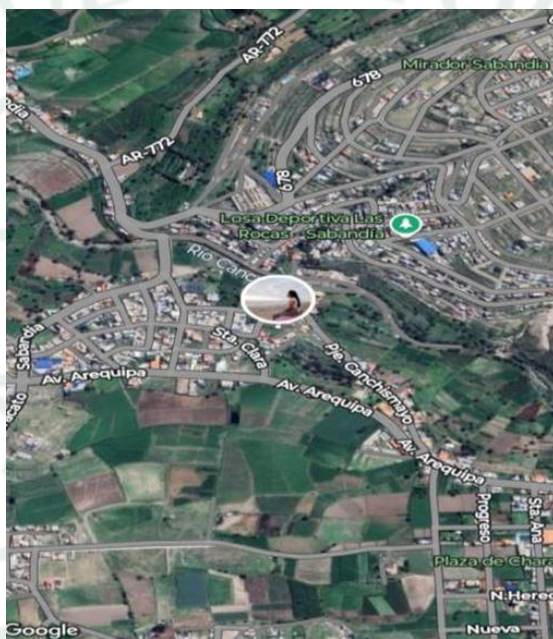


Figura 3. Ubicación geográfica de la recolección

3.1.1. Extracción por percolación.

Para realizar este método se hizo uso de una pera de decantación, un recipiente de vidrio en forma de cono estrecho con abertura en ambos extremos. Se pesó 50 g de hojas, vainas y semillas de Tara previamente trituradas dentro de un recipiente limpio para luego ser humedecido con el disolvente (etanol), esta mezcla se mantuvo en reposo durante un período de 24 horas. Transcurrido el tiempo, se abrió la parte inferior de la pera para dejar que el líquido gotee lentamente de modo que la extracción se llevará a cabo por la fuerza de la gravedad (1 gota por segundo) hasta obtener el volumen requerido de 50 ml para cada muestra.

3.2. Marcha fitoquímica

a. Identificación de flavonoides totales por el método de AlCl_3

El fundamento de este método se basa en la capacidad de los flavonoides de formar complejos estables de coordinación con el ion aluminio (Al^{3+}). La reacción transcurre en varias etapas: inicialmente, en medio básico y en presencia de nitrito de sodio (NaNO_2), se produce la nitrosación de los flavonoides, lo que genera un intermedio de color amarillo pálido. Posteriormente, la adición de cloruro de aluminio (AlCl_3) permite la quelación del ion Al^{3+} con los grupos carbonilo e hidroxilo de la estructura flavonoide, formando un complejo ácido flavono-alumínico de color amarillo-naranja o rosa intenso, dependiendo de la estructura específica del flavonoide. Finalmente, la adición de hidróxido de sodio (NaOH) alcaliniza el medio, lo que estabiliza el complejo e intensifica su coloración. La formación de este complejo coloreado es cuantitativamente proporcional a la concentración de flavonoides presentes en la muestra, permitiendo su determinación indirecta mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. Cabe destacar que la sensibilidad del método varía según la estructura del flavonoide, siendo más sensible para las flavonas y flavonoles, y menos para las flavanonas, debido a las diferencias en la disponibilidad de los sitios de coordinación necesarios para la formación del complejo (31).

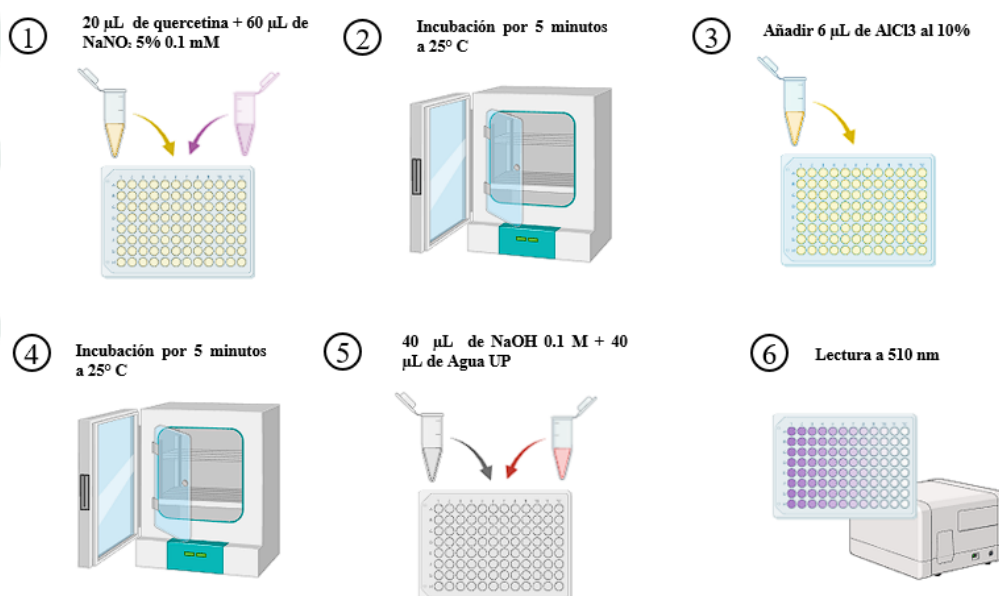


Figura 4. Ensayo de Flavonoides

Se procedió a la preparación de la mezcla de reacción combinando 60 μL de NaNO_2 al 5% (p/v), 40 μL de agua ultrapura y 20 μL del compuesto de prueba en cada pocillo como se muestra en la Figura 4. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 25°C para permitir el desarrollo de la reacción inicial. Transcurrido este tiempo, se agregaron 6 μL de solución de AlCl_3 al 10% (p/v) para facilitar la formación de complejos con los flavonoides, seguido de una segunda incubación de 5 minutos a 25°C . Posteriormente, se neutralizó la reacción con 40 μL de NaOH 1 M y se ajustó el volumen con 40 μL de agua ultrapura. La curva de calibración se realizó por triplicado, posterior a ello se realizó el ensayo con las muestras. Finalmente, se determinó la absorbancia a 510 nm empleando un espectrofotómetro de microplacas, utilizando como referencia un blanco reactivo preparado bajo las mismas condiciones (32,33).

b. Identificación de taninos por el método de la fenantrolina

El método de la fenantrolina ofrece una alternativa colorimétrica accesible y práctica, especialmente útil para taninos condensados (proantocianidinas).

El fundamento se basa en dos reacciones consecutivas. Primero, los taninos condensados se hidrolizan con ácido clorhídrico concentrado, rompiendo su estructura y liberando antocianidinas. Luego, estas antocianidinas reaccionan con la fenantrolina en presencia de iones férricos (Fe^{3+}). El Fe^{3+} actúa como oxidante, y al reducirse a Fe^{2+} forma con la fenantrolina un complejo estable de color rojo-naranja intenso, conocido como "ferroína". Este complejo presenta un máximo de absorción alrededor de 540 nm, permitiendo su cuantificación espectrofotométrica (34,35).

El procedimiento inicia con la extracción de los taninos de la muestra usando solventes como etanol acuoso o acetona. Una alícuota del extracto se somete a hidrólisis ácida caliente. Tras enfriar, se añaden secuencialmente las soluciones de fenantrolina y cloruro férrico. Después de un tiempo de desarrollo del color (10-15 minutos), se mide la absorbancia. Se realizará el ensayo por triplicado, la concentración de las muestras se determinará tomando como referencia la curva de calibración del estándar.

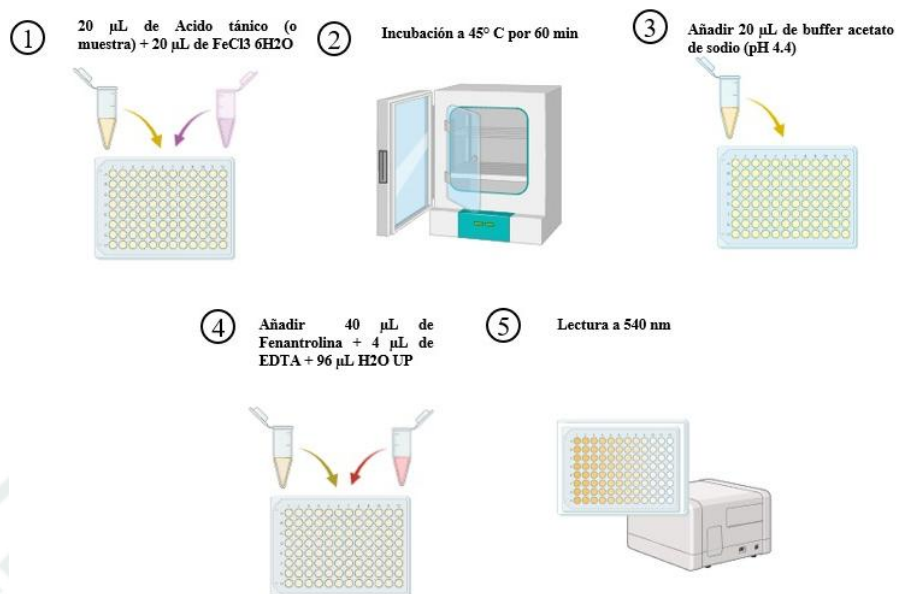


Figura 5. Ensayo de Taninos

Para determinar la presencia de taninos es necesario someter los extractos de las hojas, vainas y semillas de Tara a pruebas cualitativas:

En cada pocillo de la microplaca de 96 pozos se cargaron 20 µL de la muestra o del estándar. A cada uno se le añadieron 20 µL de una solución de cloruro férrico hexahidratado (0.01 mol/L). Posteriormente, la microplaca se incubó a 45 °C durante 1 hora para completar la reacción. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron secuencialmente los siguientes reactivos a cada pocillo: 20 µL de buffer de acetato de sodio (pH 4.4), 40 µL de solución de 1,10-fenantrolina (0.05 mol/L), 4 µL de solución de EDTA (0.05 mol/L) como se muestra en la Figura 5.

Una vez que la solución se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron 96 µL de agua ultrapura a cada pocillo para homogeneizar y ajustar el volumen final. Inmediatamente después, se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro para microplacas. Todas las mediciones se realizaron por comparación con un blanco preparado bajo las mismas condiciones.

c. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Su principio se basa en una reacción redox en la que los grupos hidroxilo fenólicos reducen los complejos de ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico presentes en el reactivo de Folin-Ciocalteu, generando un producto de color azul con absorbancia

máxima a 765 nm. Esta reacción se lleva a cabo en medio alcalino, proporcionado generalmente por carbonato de sodio, que promueve la desprotonación de los fenoles y facilita la transferencia de electrones. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en la muestra, permitiendo su cuantificación mediante comparación con una curva de calibración construida con un estándar de referencia, como el ácido gálico, y expresando los resultados en equivalentes de este compuesto (EGA) (36).

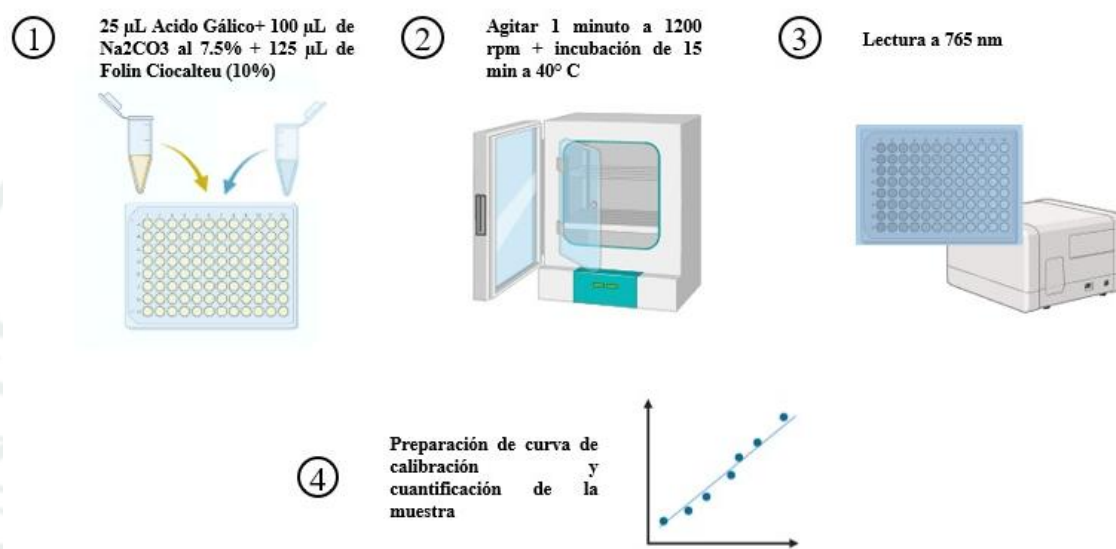


Figura 6. Ensayo de Folin - Ciocalteu

La determinación del contenido de compuestos fenólicos totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Para ello, en cada pozo se añadieron 25 µL de cada estándar de ácido gálico o de la muestra problema. A continuación, se añadieron 100 µL de carbonato de sodio al 7.5 % y, posteriormente, 125 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Para la corrección de los valores analíticos, se prepararon blancos de reactivo utilizando 25 µL de etanol en lugar de la muestra o el estándar, a los que se añadieron los mismos volúmenes de carbonato de sodio y reactivo de Folin-Ciocalteu.

Inmediatamente después de la adición de los reactivos, las mezclas se agitaron minuciosamente para garantizar una solubilidad total. Esta homogenización se llevó a cabo en el equipo lector de microplacas, utilizando la función de agitación (Shake) a 1200 rpm durante un minuto. Seguido a ello, las muestras se incubaron durante 15 minutos a 40 °C, manteniéndolas protegidas de la luz durante este período. Finalmente, la absorbancia de cada una se leyó a una longitud de onda de 765 nm en

el lector de microplacas, dicho procesamiento se ve esquematizado en la Figura 6. Se realizó un triplicado para dicha prueba, para posteriormente evaluar la muestra y poder cuantificarla.

d. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH

El ensayo con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) es un método ampliamente utilizado para determinar la actividad antioxidante en muestras de diversa naturaleza. El fundamento de esta técnica se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de donar átomos de hidrógeno o electrones para estabilizar el radical libre DPPH⁺. Este radical presenta una característica coloración violeta intensa y muestra una absorbancia máxima a 517 nm en espectrofotometría UV-Vis.

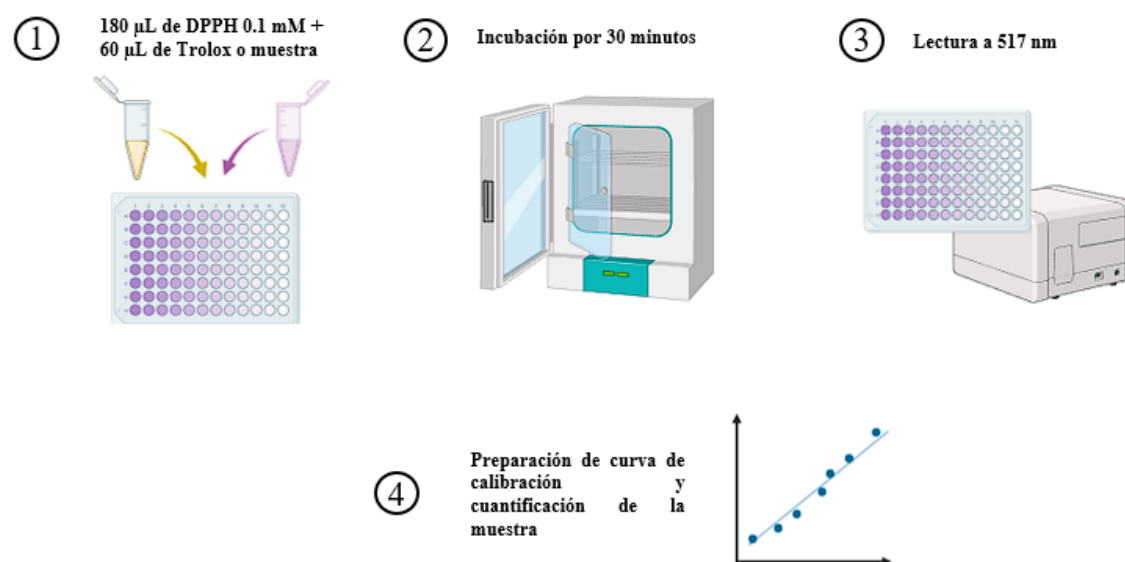


Figura 7. Ensayo de DPPH

Cuando las moléculas antioxidantes presentes en una muestra entran en contacto con el DPPH⁺, se produce una reacción de reducción en la que el radical libre es convertido a su forma estable (DPPH-H), resultando en una decoloración proporcional de la solución. Esta disminución en la intensidad del color, cuantificada mediante la reducción en la absorbancia, es directamente proporcional a la concentración y eficiencia de los compuestos antioxidantes presentes.

Para la cuantificación específica de esta capacidad antioxidante, se emplea Trolox como estándar de referencia, construyéndose una curva de calibración con concentraciones conocidas de este compuesto. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox (ET), permitiendo la estandarización y comparación de la actividad antioxidante entre diferentes muestras y estudios. La ventaja principal de este método radica en su rapidez, simplicidad y reproducibilidad, aunque es importante considerar que principalmente detecta antioxidantes capaces de transferir hidrógenos en medios orgánicos e hidroalcohólicos (37,38).

La evaluación de la actividad antioxidante del extracto será llevada a cabo en microplacas y en cada pocillo se adicionarán 180 μ L de DPPH (0,1 mM) y 60 μ L del estándar Trolox y del extracto (10 mg/mL); después de 30 minutos, se deberá cuantificar la absorbancia a 517 nm utilizando un lector de microplacas, los ensayos se realizaron por triplicado.

Fraccionamiento básico: (cuantificación ácido gálico)

El extracto etanólico de las muestras será fraccionado con acetato de etilo mediante una hidrólisis básica, con esta fracción se espera obtener un precipitado el cual será utilizado para la cuantificación de ácido gálico y para la evaluación de la capacidad citotóxica.

e. Identificación y Cuantificación de ácido gálico por TLC

La cromatografía en capa fina, conocida como TLC, es un método muy empleado para separar e identificar de forma inicial los componentes de mezclas complejas. Su principio se basa en cómo los distintos compuestos se reparten entre una superficie fija que los retiene y un líquido que se desplaza por capilaridad, arrastrándolos a diferentes velocidades (39,40).

Estos analitos se detectan e identifican según su distancia de migración relativa a través de la fase estacionaria y su reacción de color a reactivos cromogénicos, de derivatización por pulverización o su capacidad de absorber luz ultravioleta.

Las placas de sílica para TLC se pueden tratar con reactivos específicos, ya sea antes o después de la separación, para modificar las propiedades de los analitos adsorbidos en la capa cromatográfica y producir derivados (41).

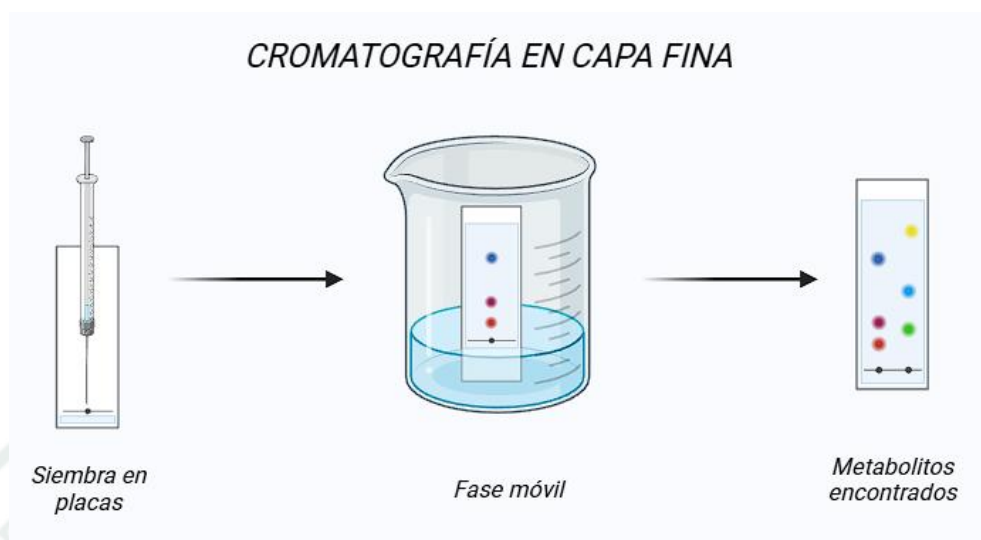


Figura 8. Principio de cromatografía en Capa Fina (TLC)

La Figura 8 esquematiza el principio fundamental de TLC, en este sistema, la fase estacionaria consiste en una placa recubierta con un material adsorbente (como sílica gel), donde se aplica la muestra inicialmente como una mancha puntual. La fase móvil (solvente o mezcla de solventes) asciende por capilaridad a través de la fase estacionaria dentro de una cámara cromatográfica saturada.

Con el transcurso del tiempo, los diferentes componentes de la mezcla (representados como Compuesto A, B y C) migran a distancias variables desde el origen, dependiendo de su polaridad relativa y su afinidad diferencial por ambas fases. La separación se evidencia por la formación de manchas discretas a lo largo del trayecto del solvente. La posición final de cada compuesto se cuantifica mediante el factor de retención (R_f), calculado como la relación entre la distancia recorrida por el analito y la distancia alcanzada por el frente del solvente.

Este proceso demuestra visualmente la capacidad de la TLC para separar mezclas complejas de manera rápida y eficiente, sirviendo como un método analítico preliminar esencial.

Para la identificación del ácido gálico en las muestras, se empleó la técnica de cromatografía en capa fina, y unas placas de sílica gel (TLC Sílica gel 60 F₂₅₄) para los sembrados correspondientes.

Preparación de placas

Se trazó una línea base a 1 cm del borde inferior, marcando puntos separados para la aplicación del estándar de ácido gálico (1000 mg/mL en metanol) y los extractos de Tara. Se aplicaron volúmenes de siembra de 8 μ L del estándar y 8 μ L de las muestras utilizando capilares previamente elaborados y rotulados a un volumen de 8 μ L.

La fase móvil se preparó mezclando Cloroformo, Acetato de Etilo y Ácido Acético en proporción 5:5:1 (v/v/v), la cual se vertió en una cámara cromatográfica previamente saturada. Tras 2 minutos de saturación, se introdujo la placa en la cámara evitando el contacto directo de las manchas con la fase móvil, se detuvo la corrida cuando el frente del solvente alcanzó aproximadamente 1 cm del borde superior de la placa. La placa se retiró, se marcó el frente del solvente y se secó.

Para la visualización de los compuestos, primero se examinó la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm y 365 nm para observar quenching o fluorescencia característica. La identificación del ácido gálico se estableció mediante la comparación directa entre los extractos y el estándar de referencia, considerando dos criterios fundamentales: la coincidencia en el factor de retención (R_f), calculado como la distancia recorrida por la mancha dividida entre la distancia recorrida por el frente del solvente, y la similitud en las características de revelado (42).

3.3.Determinación de la actividad citotóxica por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) –2,5-difeniltetrazolio).

El ensayo MTT ([bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) es un método colorimétrico muy utilizado para la evaluación de la viabilidad celular y citotoxicidad. Este método se basa en la capacidad de las células vivas de reducir el compuesto a un producto insoluble como el formazán en la mitocondria por enzimas intracelulares (43,44).

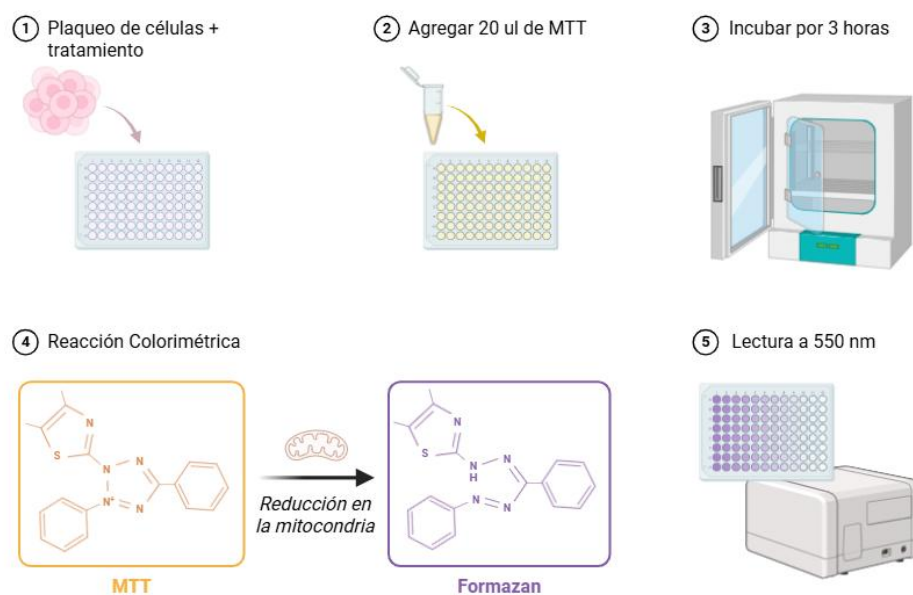


Figura 9. Fundamento del Ensayo MTT

Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 fueron cultivadas en medio DMEM con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibiótico a 37°C y 5% de CO₂. Luego de una confluencia apropiada, se realizó el subcultivo de células en placas de 96 pozos (3x10⁴ células/ml) por 24h. Para el ensayo de viabilidad, se realizó el tratamiento de las células con diferentes concentraciones del extracto de *Caesalpinia spinosa* (semillas, vainas y hojas) por 24 horas para hallar el IC₅₀ utilizando el ensayo de MTT (45,46).

Para el ensayo de MTT, a cada pozo se le adicionó 20µL de MTT y se incubó en una incubadora CO₂ por 3h. Las placas fueron centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, enseguida se eliminó el sobrenadante y se adicionó 150-200µl/pozo de DMSO para la lectura espectrofotométrica a 550 nm (45,46).



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Preparación de extractos

Una vez preparados los extractos etanólicos a las condiciones establecidas, se procedió a calcular el porcentaje de rendimiento para cada extracto.

Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de los extractos

Tipo de muestra	Peso Muestra(g)	Peso de Beacker Vacío(g)	Peso de Beacker con Extracto Seco (g)	% Rendimiento
Semillas	50.060	61.120	93.220	64.120
Hojas	50.070	97.320	107.030	19.390
Vainas	50.810	68.510	73.710	10.230

La tabla 2 muestra los rendimientos de extracción y los resultados de los análisis fitoquímicos realizados en los extractos obtenidos a partir de hojas, semillas y vainas. Los datos obtenidos demuestran diferencias significativas en la eficiencia de extracción entre las diferentes partes de la planta. El mayor rendimiento de extracción corresponde a las semillas (64.12%), seguido de las hojas (19.39%) y las vainas (10.23%).

2. Marcha fitoquímica de *Caesalpinia spinosa* (Tara)

Resultados de la cuantificación de Flavonoides totales por el método de AlCl_3

Se construyó una curva de calibración utilizando Quercetina como estándar, en un rango de concentraciones entre 6.25 a 400 mg/L. Los valores de absorbancia se midieron por triplicado para cada concentración, y en la Tabla 3 se presentan los promedios obtenidos.

Tabla 3. Datos de la curva de calibración de Flavonoides

Concentración mg/L	ABS 1	ABS2	ABS3	Promedio $\pm$ Desv
400	0.177	0.170	0.173	0.173 ± 0.003
200	0.118	0.119	0.118	0.118 ± 0.000
100	0.083	0.081	0.082	0.082 ± 0.000
50	0.068	0.063	0.065	0.065 ± 0.002
25	0.058	0.055	0.056	0.056 ± 0.001
12.5	0.045	0.061	0.053	0.053 ± 0.008
6.25	0.045	0.057	0.051	0.051 ± 0.005

Con los datos obtenidos, se procedió a realizar la figura 10 para determinar el contenido de flavonoides totales.

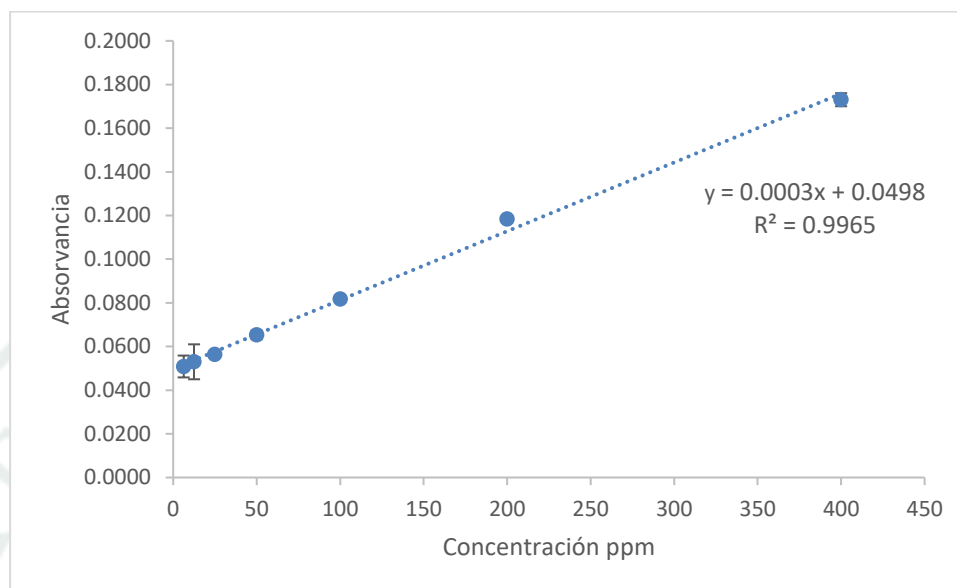


Figura 10. Gráfica de la curva de calibración de Flavonoides

Se construyó la curva de calibración utilizando estándar de Quercetina en un rango de concentración de 6.25 a 400 mg/L (ppm). El análisis de regresión lineal mostró una excelente correlación entre la absorbancia y la concentración, de acuerdo con la ecuación de la recta, con un R^2 de 0.9965 se refleja la buena correlación entre los datos.

Con los datos de la curva se interpolaron los resultados de las muestras evaluadas por triplicado expresadas en la tabla 4.

Tabla 4. Datos del ensayo Flavonoides en muestras de Tara.

	Tipo de muestra		
	Vainas	Hoja	Semillas
ABS1	0.166	0.108	0.134
ABS2	0.157	0.099	0.131
ABS3	0.154	0.099	0.131
Promedio ± Desv	0.159 ± 0.005	0.102 ± 0.004	0.132 ± 0.001
Concentración	18200	174	2740

Debido a que se evaluaron tres tipos de muestras diferentes (vainas, hojas y semillas), bajo las mismas condiciones, es normal evidenciar diferencias significativas con valores de extremo a extremo. En ciertas muestras se evidenciaron valores extremadamente altos, por lo cual, fue necesario verificar estos resultados mediante diluciones seriadas con el fin de descartar posibles efectos de saturación en la medición espectrofotométrica, las muestras de vainas y semillas fueron diluidas en proporciones 1:50 y 1:10 v/v respectivamente, antes de su medición.

Resultado de la cuantificación de Taninos por el método de Fenantrolina

Se estableció una curva de calibración utilizando estándares de Ácido Tánico en un rango de concentración de 6.25 a 400 mg/L. Los valores de absorbancia se midieron por triplicado para cada punto de la curva, y los promedios obtenidos se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos de la curva de calibración de Taninos

Concentración	ABS1	ABS2	ABS3	Promedio ± Desv
400	1.416	1.627	1.647	1.564 ± 0.128
200	0.922	0.973	0.948	0.948 ± 0.025
100	0.495	0.529	0.523	0.515 ± 0.018
50	0.274	0.292	0.307	0.291 ± 0.016
25	0.185	0.180	0.191	0.185 ± 0.005
12.5	0.136	0.144	0.130	0.137 ± 0.07
6.25	0.113	0.118	0.128	0.120 ± 0.007

Los resultados demuestran una relación dependiente de la concentración, donde los valores de absorbancia aumentan progresivamente con mayores concentraciones de estándar. Se observa una respuesta lineal consistente en todo el rango de concentraciones evaluado.

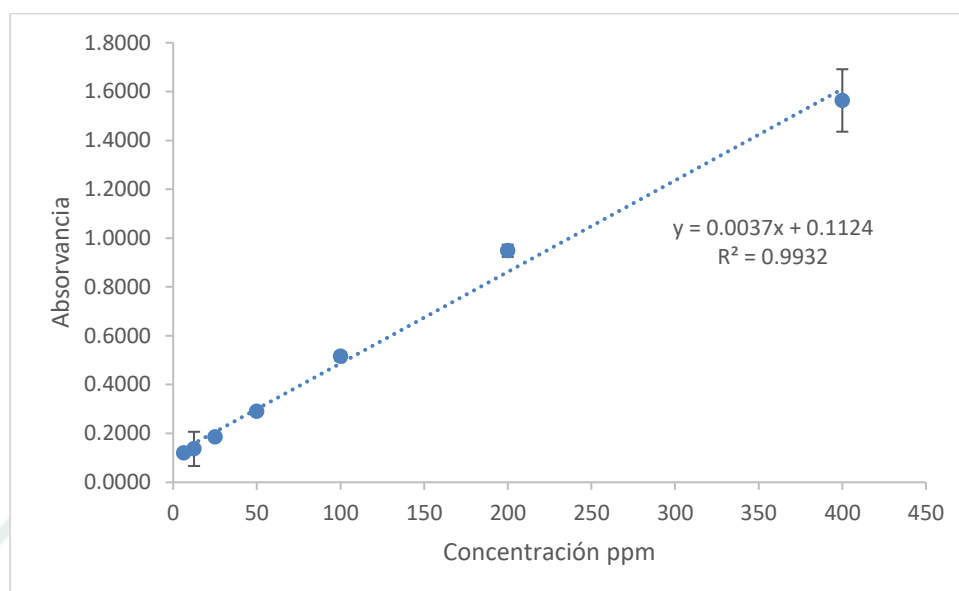


Figura 11. Gráfica de la curva de calibración de Taninos

El análisis de regresión lineal mostró una excelente correlación entre los valores de absorbancia y la concentración, de acuerdo con la ecuación de la recta y se ve reflejado en el R^2 de 0.9932 el cual se encuentra muy cercano a la unidad.

Tabla 6. Datos del ensayo de Taninos en muestras de Tara

	Tipo de muestra		
	Vaina	Semilla	Hoja
ABS1	0.475	0.421	0.673
ABS2	0.435	0.391	0.645
ABS3	0.40	0.391	0.641
Promedio ± Desv	0.450 ± 0.018	0.401 ± 0.014	0.653 ± 0.014
Concentración	456.22	390	730.54

Al evaluar tres tipos de muestra distintos (vainas, semillas y hojas) en mismas condiciones, se observó una marcada diferencia entre los valores extremos de absorbancia. Algunas muestras presentaron lecturas tan altas que hicieron necesario aplicar diluciones seriadas, con el objetivo de evitar posibles errores por saturación de la señal espectrofotométrica. En todos los casos, se optó por una dilución 1:5 (v/v) antes de la medición. Cabe señalar que; las concentraciones reportadas en la tabla ya presentan el respectivo factor de dilución.

Resultados de la cuantificación de Fenoles Totales por el método de Folin

Se estableció una curva de calibración utilizando estándares de ácido gálico en un rango de concentración de 6.25 a 400 mg/L. Los valores de absorbancia se midieron por triplicado para cada punto de la curva, con ello se obtuvieron diferentes promedios, los cuales se presentan a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7. Datos de la curva de calibración de Compuestos Fenólicos

Concentración	ABS1	ABS2	ABS3	Promedio $\pm$ Desv
400	1.880	1.768	1.846	1.831 $\pm$ 0.057
200	0.923	0.913	0.964	0.933 $\pm$ 0.027
100	0.612	0.395	0.400	0.469 $\pm$ 0.124
50	0.172	0.186	0.178	0.179 $\pm$ 0.007
25	0.230	0.116	0.121	0.156 $\pm$ 0.064
12.5	0.083	0.084	0.085	0.084 $\pm$ 0.001
6.25	0.071	0.073	0.073	0.073 $\pm$ 0.001

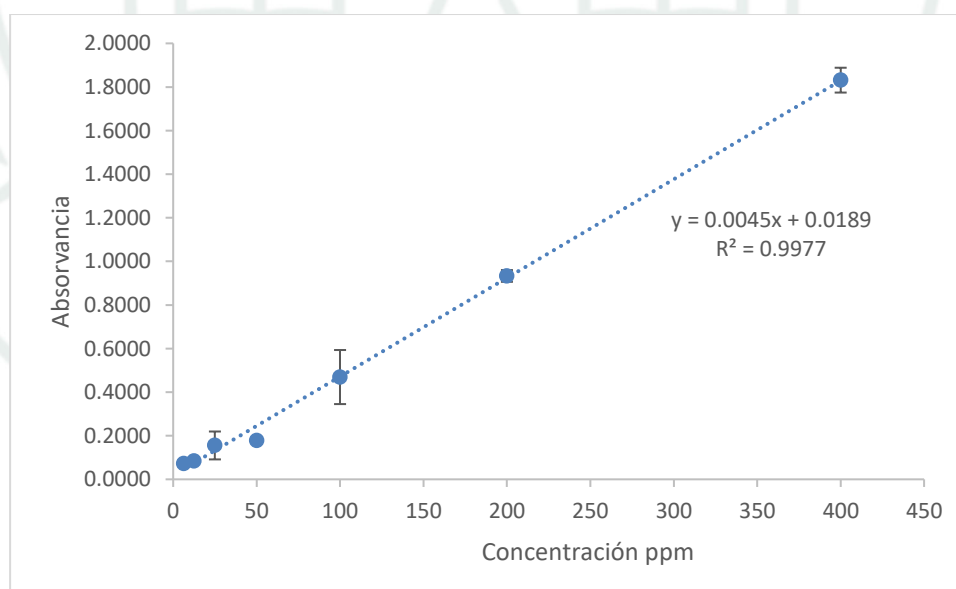


Figura 12. Gráfica de la curva de calibración de Compuestos Fenólicos

La curva de calibración para el método de Folin se construyó con concentraciones conocidas de ácido gálico con valores de 6.25 a 400 mg/L. Se observa una tendencia general creciente de la absorbancia con la concentración, adicionalmente, se obtuvo un R^2 de 0.9977 lo cual es bueno e indica una buena correlación entre los datos.

Con la curva preparada se procedió a medir los extractos de las muestras de las vainas, semillas y hojas.

Tabla 8. Datos del ensayo de Compuestos Fenólicos en muestras de Tara

	Tipo de muestra		
	Vaina	Semilla	Hoja
ABS1	0.479	0.417	0.203
ABS2	0.466	0.413	0.193
ABS3	0.468	0.415	0.195
Promedio + Desv	0.471 ± 0.006	0.415 ± 0.002	0.197 ± 0.004
Concentración	1004.667	880.222	395.778

En la tabla presentada podemos apreciar que, tanto las vainas como las semillas son fuentes muy ricas en compuestos fenólicos, las muestras de vaina y semilla presentaron valores de absorbancia extremadamente altos que se encontraban fuera del rango lineal de la curva de calibración, por lo cual fue necesario verificar estos resultados mediante diluciones seriadas con el fin de descartar posibles efectos de saturación en la medición espectrofotométrica. En consecuencia, todas las muestras fueron diluidas en proporción 1:10 (v/v) antes de su medición, asegurando que las lecturas se encontraran dentro del intervalo lineal del método. Finalmente, las concentraciones finales reportadas en la tabla ya incluyen el factor de dilución correspondiente.

Resultados de la capacidad antioxidante por el método de DPPH

Tabla 9. Datos de la curva de calibración de DPPH

Concentración	ABS1	ABS2	ABS3	Promedio $\pm$ Desv
10	0.784	0.776	0.776	0.7788 ± 0.004
20	0.773	0.740	0.740	0.7509 ± 0.019
40	0.635	0.624	0.602	0.6201 ± 0.017
60	0.536	0.530	0.508	0.5246 ± 0.015
80	0.439	0.435	0.451	0.4417 ± 0.009
90	0.357	0.355	0.356	0.3558 ± 0.001

La tabla 9 muestra las concentraciones usadas para la elaboración de la curva de calibración, además se aprecia la desviación estándar la cual es menor a la unidad, indicando una baja dispersión entre los datos.

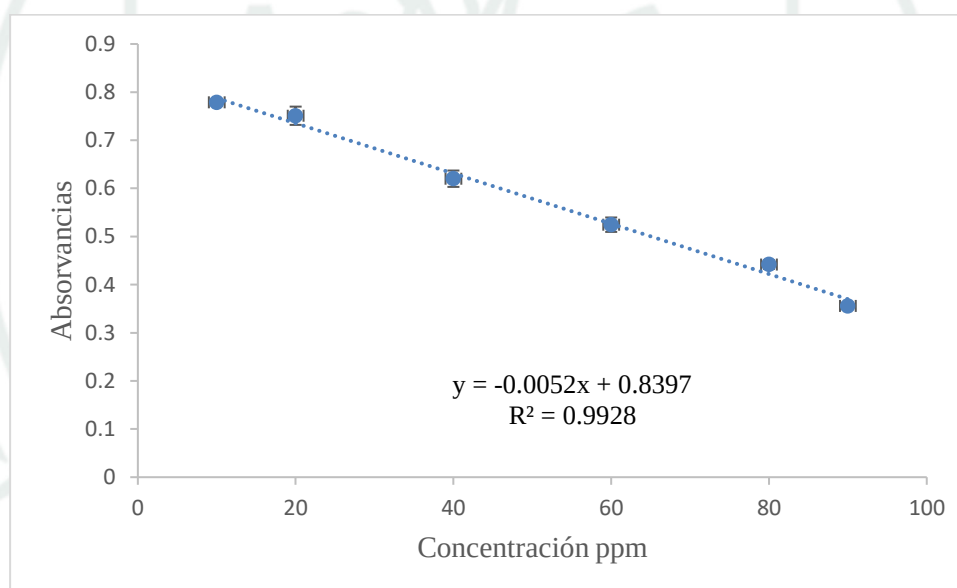


Figura 13. Gráfica de la curva de calibración de DPPH

La curva de calibración se construyó con concentraciones conocidas de Trolox (entre 10 y 90 $\mu\text{g/mL}$). Se observa que, a mayor concentración de Trolox, menor es la absorbancia, lo cual es esperable: a mayor poder antioxidante, más radicales DPPH se reducen y menor es el color violeta.

En la figura 13, la curva muestra una tendencia decreciente y lineal en el rango evaluado, lo que permite interpolar las muestras con buena confiabilidad, además se obtuvo un R^2 de 0.9928, el cual indica una buena correlación entre los datos.

Tabla 10. Datos de ensayo de DPPH en muestras de Tara

	Tipo de muestra		
	Vaina	Semilla	Hoja
ABS1	0.619	0.775	0.566
ABS2	0.750	0.770	0.632
ABS3	0.804	0.762	0.676
Promedio + Desv	0.724 ± 0.095	0.769 ± 0.012	0.625 ± 0.055
Concentración	22.25	135.9	41.28

Podemos apreciar que la semilla es la que posee la mayor concentración de antioxidantes capaces de reducir el DPPH, expresada en equivalentes de Trolox, para poder realizar la evaluación por espectrofotometría, se realizó una dilución 1:10 v/v a las semillas para evitar saturación del equipo. Pese a que las hojas suelen ser ricas en metabolitos antioxidantes, en este caso fueron superadas por las semillas, adicionalmente, las vainas muestran la actividad más baja de las tres, sin embargo, su capacidad antioxidante sigue siendo elevada.

3. Cuantificación de ácido gálico en los extractos de *Caesalpinia spinosa* (Tara)

Después de haber realizado una hidrólisis básica, se obtuvo un extracto fraccionado, el cual fue disuelto en metanol al 1% para el sembrado en las placas de sílica y su posterior lectura. Se hizo uso del estándar de ácido gálico como control positivo, con el cual se monitorearon las muestras.

En la figura 14 observamos una placa de TLC con las siembras respectivas, a los extremos se aprecian 2 controles positivos de ácido gálico, el segundo punto corresponde a las semillas de Tara, el tercero a las vainas y el cuarto a las hojas.

Haciendo una evaluación visual bajo el revelador a los 254 nm, apreciamos que, de todas las siembras, solo el segundo sembrado presentó un punto a la misma altura que los controles de ácido gálico, además se puede apreciar que tiene cierta intensidad de color, lo cual es buen referente, e indica que nuestra muestra de semillas posee una alta concentración de ácido gálico. Teniendo este revelado como referencia, se procedió a la evaluación de las placas por el software ImageJ.

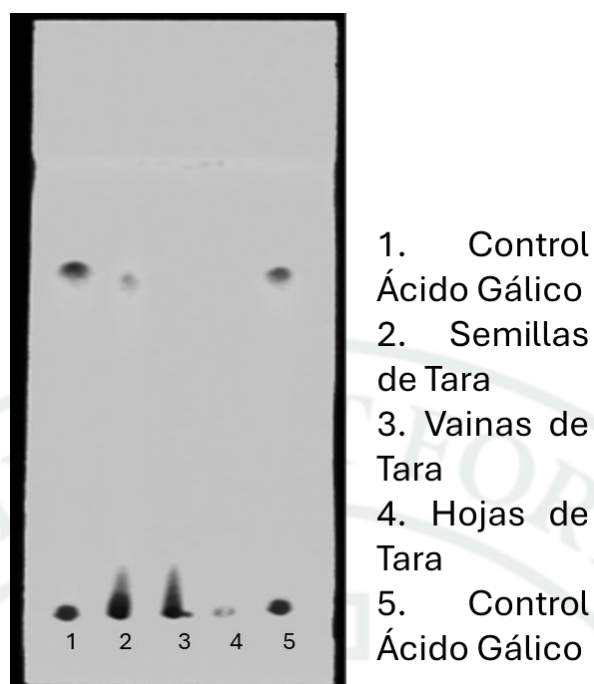


Figura 14. Placa procesada por ImageJ

La figura 14 muestra la imagen procesada por ImageJ, en la cual se realizó la cuantificación de ácido gálico. Se tomaron en cuenta los resultados positivos del revelado y se expresaron en la siguiente tabla:

Tabla 11. Cuantificación de ácido gálico por Image J

	Concentración (ppm)	Siembras	Áreas
A. Gálico	1000	8 μ L	29260.617
Semillas	390.133	8 μ L	11415.543

Para poder obtener datos cuantitativos, se empleó el software ImageJ para realizar un análisis densitométrico. La elección de esta herramienta se fundamentó en su capacidad para convertir la intensidad óptica de las manchas en valores numéricos de intensidad integrada, lo que permite una comparación objetiva y reproducible entre las muestras. Se midió la intensidad de cada mancha donde, el extracto resultó tener una concentración de 390.133 ppm de ácido gálico.

4. Determinación de actividad citotóxica del extracto con mayor contenido de ácido gálico de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

Tabla 12. Datos de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Semilla)

Concentración (µg)	ABS1	ABS2	ABS3	Promedio ± Desv	% de viabilidad
0.001	0.510	0.510	0.510	0.510 ± 0.000	100.000
1.953125	0.480	0.485	0.475	0.480 ± 0.004	94.060
3.90625	0.256	0.254	0.256	0.255 ± 0.001	50.030
7.8125	0.180	0.175	0.185	0.180 ± 0.004	35.270
15.625	0.120	0.125	0.115	0.120 ± 0.004	23.510
31.25	0.080	0.085	0.075	0.080 ± 0.004	15.760
62.5	0.060	0.058	0.062	0.060 ± 0.002	11.750
125	0.050	0.052	0.048	0.050 ± 0.002	9.790
250	0.045	0.044	0.046	0.045 ± 0.001	8.830

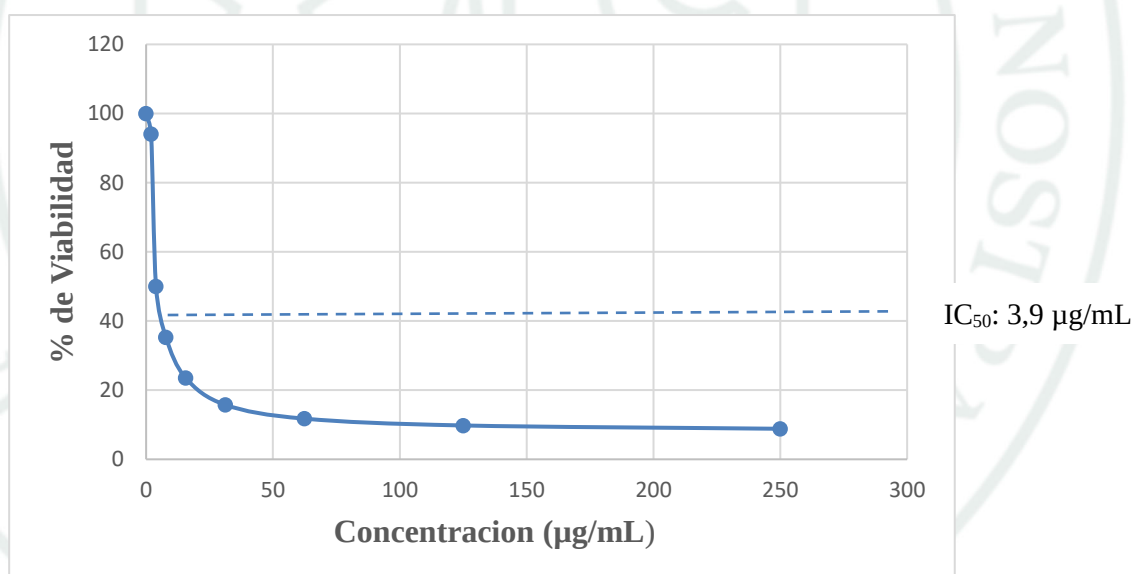


Figura 15. Gráfica de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Semilla)

En la Tabla 12 y Figura 15, se observa que el tratamiento de la semilla de *Caesalpinia spinosa* (Tara), tuvo un efecto citotóxico, ya que la viabilidad se redujo en concentraciones mayores. Esto indica que el resultado del IC₅₀ es de 3.9 µg/mL, que es la concentración necesaria para reducir en un 50 % la viabilidad celular en la línea celular MCF-7.

Tabla 13. Datos de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Vaina)

Concentración (µg)	ABS1	ABS2	ABS3	Promedio ± Desv	% de viabilidad
0.001	0.510	0.510	0.510	0.5103 ± 0.000	100.000
1.953125	0.254	0.276	0.398	0.3094 ± 0.078	60.638
3.90625	0.272	0.229	0.339	0.2802 ± 0.055	54.915
7.8125	0.242	0.280	0.277	0.2664 ± 0.022	52.198
15.625	0.259	0.248	0.401	0.3024 ± 0.085	59.266
31.25	0.274	0.248	0.391	0.3044 ± 0.076	59.651
62.5	0.289	0.263	0.338	0.2966 ± 0.038	58.123
125	0.210	0.231	0.181	0.2074 ± 0.025	40.649
250	0.566	0.583	0.678	0.6088 ± 0.060	119.302
500	1.022	1.061	1.163	1.0818 ± 0.073	211.986
1000	1.504	1.659	1.648	1.6033 ± 0.087	314.181

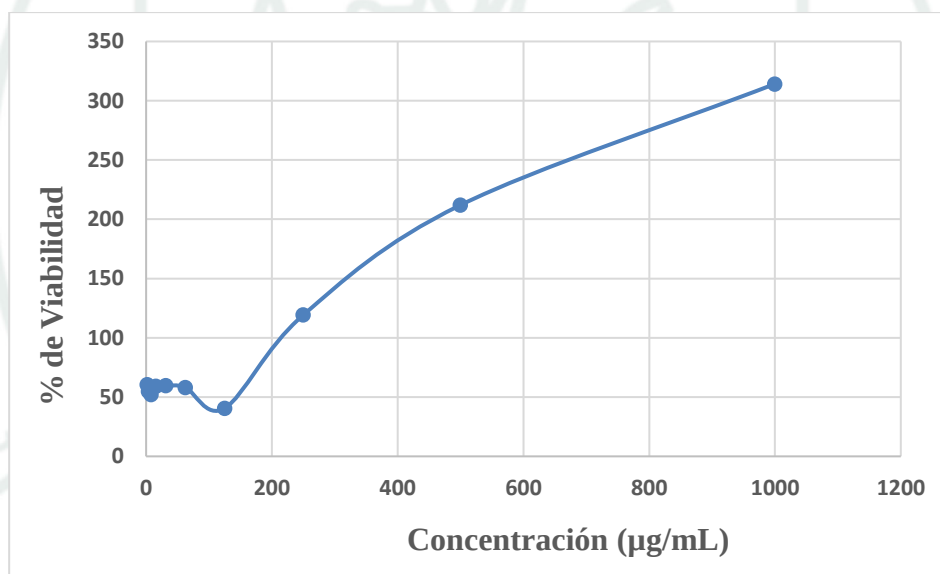


Figura 16. Gráfica de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Vaina)

En la Tabla 13 y Figura 16, se observa que el tratamiento de la Vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara), no presentó un efecto citotóxico significativo, ya que la viabilidad se mantuvo constante. Sin embargo, en concentraciones altas, produjo un incremento significativo en las absorbancias con respecto al control, indicando que el compuesto no alcanzó una concentración inhibitoria media (IC_{50}) en las condiciones evaluadas y por el contrario estaría produciendo proliferación en la línea celular MCF-7.

Tabla 14. Datos de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Hoja)

Concentración (µg)	ABS1	ABS-2	ABS3	Promedio ± Desv	% de viabilidad
0.001	0.510	0.510	0.510	0.510 ± 0.000	100.000
1.953125	0.372	0.371	0.362	0.368 ± 0.006	72.180
3.90625	0.353	0.314	0.283	0.317 ± 0.035	62.035
7.8125	0.362	0.329	0.283	0.324 ± 0.040	63.577
15.625	0.333	0.301	0.276	0.303 ± 0.029	59.364
31.25	0.339	0.261	0.302	0.301 ± 0.039	58.939
62.5	0.393	0.377	0.369	0.380 ± 0.012	74.401
125	0.369	0.376	0.397	0.381 ± 0.014	74.610
250	0.470	0.474	0.347	0.430 ± 0.072	84.290
500	0.652	0.624	0.507	0.594 ± 0.077	116.474
1000	0.810	0.780	0.633	0.741 ± 0.095	145.196
2000	1.179	1.170	1.132	1.160 ± 0.025	227.370

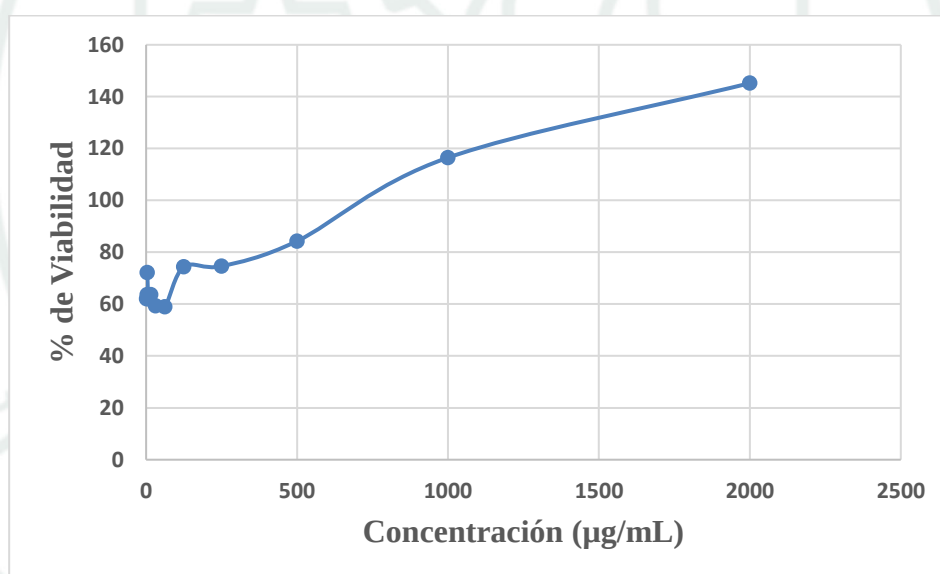


Figura 17. Gráfica de la curva Dosis Respuesta de MCF-7 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Hoja)

En la Tabla 14 y Figura 17, se muestra que en el ensayo de viabilidad por MTT, el extracto de hoja de *Caesalpinia spinosa* evaluado no mostró efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células tratadas en el rango de concentraciones analizado. Por el contrario, se observó un incremento en la absorbancia respecto al control, lo que sugiere una mayor proliferación celular inducida por el extracto.

Dado que no se alcanzó una reducción del 50 % en la viabilidad celular, no fue posible determinar un valor de IC₅₀. Estos resultados indican que el compuesto no ejerce un efecto citotóxico bajo las condiciones experimentales empleadas. Sin embargo, podría favorecer la proliferación celular, evidenciando un posible efecto promotor del crecimiento tumoral en la línea celular MCF-7.

Tabla 15. Datos de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Semilla)

Concentración (µg)	ABS1	ABS2	ABS3	Promedio ± Desv	% de viabilidad
0.001	0.358	0.358	0.358	0.358 ± 0.371	100.000
1.95313	0.191	0.162	0.178	0.177 ± 0.014	49.364
3.90625	0.152	0.157	0.154	0.154 ± 0.003	43.054
7.8125	0.155	0.149	0.153	0.152 ± 0.003	42.514
15.625	0.152	0.134	0.139	0.142 ± 0.009	39.525
31.25	0.147	0.112	0.144	0.134 ± 0.020	37.514
62.5	0.127	0.122	0.133	0.127 ± 0.005	35.587
125	0.139	0.096	0.103	0.113 ± 0.023	31.461
250	0.108	0.126	0.090	0.108 ± 0.018	30.061

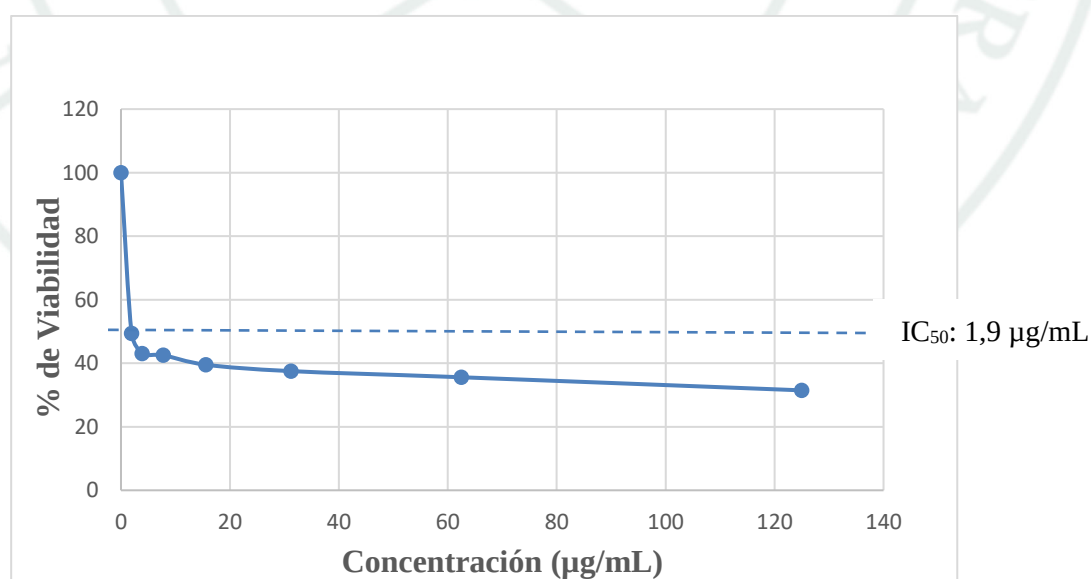


Figura 18. Gráfica de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Semilla)

En la Tabla 15 y Figura 18, se evidencia que después del ensayo de viabilidad MTT, con el extracto de Semilla de *Caesalpinia spinosa*, se obtuvo una reducción de viabilidad significativa, obteniéndose un resultado de 1.9 µg/mL, lo que indica que es la concentración necesaria para reducir en un 50 % la viabilidad celular respecto al control.

Tabla 16. Datos de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Vaina)

Concentración (µg)	ABS1	ABS2	ABS3	Promedio ± Desv	% de viabilidad
0.001	0.358	0.358	0.358	0.358 ± 0.000	100.000
1.95313	0.160	0.182	0.194	0.179 ± 0.017	49.953
3.90625	0.169	0.171	0.185	0.175 ± 0.009	48.864
7.8125	0.149	0.177	0.190	0.172 ± 0.021	48.063
15.625	0.142	0.150	0.159	0.150 ± 0.009	41.965
31.25	0.144	0.153	0.172	0.157 ± 0.015	43.734
62.5	0.171	0.161	0.229	0.187 ± 0.037	52.207
125	0.152	0.098	0.194	0.148 ± 0.048	41.220
250	0.430	0.422	0.575	0.476 ± 0.086	132.821
500	0.877	0.967	1.069	0.971 ± 0.096	271.182
1000	1.726	1.535	1.837	1.699 ± 0.152	474.702
2000	2.174	1.661	2.130	1.988 ± 0.284	555.372

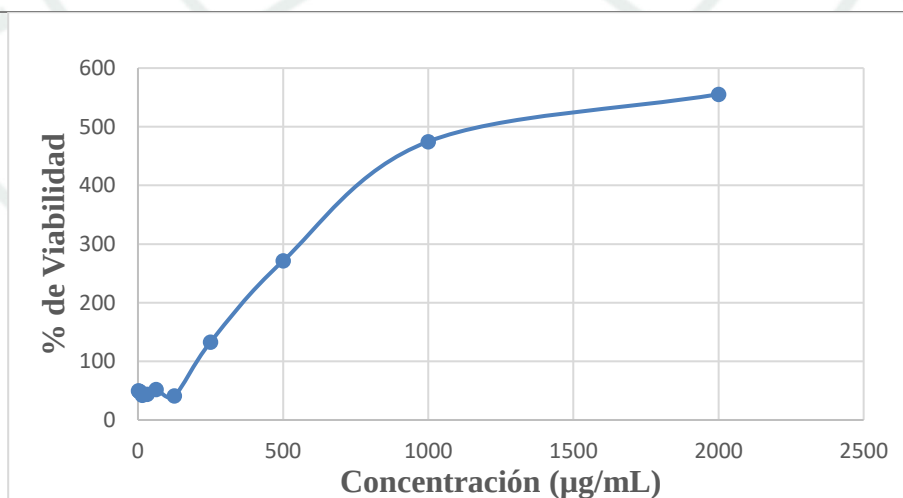


Figura 19. Datos de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Vaina)

En la Tabla 16 y Figura 19, se observa que el tratamiento de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara), no presentó un efecto citotóxico significativo, ya que la viabilidad se redujo ligeramente y se mantuvo constante. Sin embargo, en concentraciones altas, produjo un incremento significativo en las absorbancias con respecto al control, indicando que el compuesto no alcanzó una concentración inhibitoria media (IC₅₀) en las condiciones evaluadas y por el contrario estaría produciendo proliferación en la línea celular MDA-MB-231.

Tabla 17. Datos de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Hoja)

Concentración (µg)	ABS1- B	ABS2- B	ABS3- B	Promedio ± Desv	% de viabilidad
0.001	0.358	0.358	0.358	0.358 ± 0.000	100.000
1.95313	0.154	0.151	0.184	0.163± 0.018	45.559
3.90625	0.165	0.151	0.203	0.173 ± 0.027	48.268
7.8125	0.134	0.146	0.190	0.156 ± 0.030	43.678
15.625	0.140	0.146	0.178	0.155 ± 0.020	43.231
31.25	0.156	0.154	0.209	0.173 ± 0.031	48.296
62.5	0.170	0.174	0.216	0.187 ± 0.026	52.132
125	0.237	0.215	0.259	0.237 ± 0.022	66.201
250	0.267	0.277	0.306	0.283 ± 0.020	79.069
500	0.425	0.438	0.503	0.455 ± 0.042	127.179
1000	0.770	0.774	0.781	0.775 ± 0.005	216.443
2000	1.205	1.283	1.162	1.217 ± 0.061	339.832

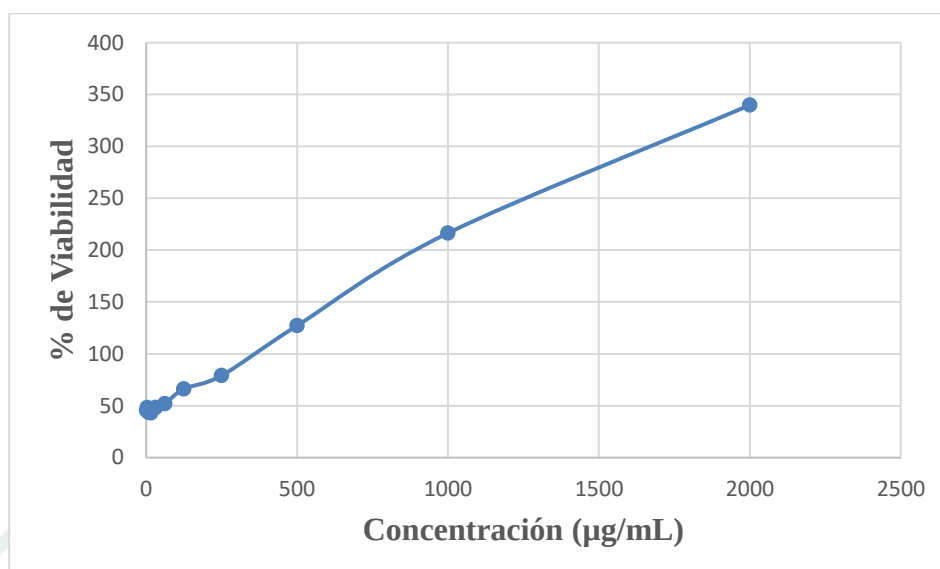


Figura 20. Gráfica de la curva Dosis Respuesta de MDA-MB-231 tratadas con *Caesalpinia spinosa* (Hoja)

En la Tabla 17 y Figura 20, se muestra que en el ensayo de viabilidad celular realizado mediante la técnica de MTT, el extracto de hoja de *Caesalpinia spinosa* no evidenció actividad citotóxica en las concentraciones evaluadas. Por el contrario, en concentraciones altas se registró un aumento en los valores de absorbancia en comparación con el control, lo que refleja una mayor actividad proliferativa de las células tratadas. Debido a que no se alcanzó una disminución del 50 % en la viabilidad celular, no fue posible calcular el valor de IC_{50} . Estos hallazgos sugieren que el compuesto podría estimular la proliferación celular bajo las condiciones experimentales utilizadas, lo que podría asociarse con un efecto promotor del crecimiento tumoral en la línea celular MDA-MB-231.

Los resultados mostraron que el extracto de semilla presentó actividad citotóxica, alcanzando un valor de IC_{50} de 1.9 µg/mL para MDA-MB-231 y 3.9 µg/mL para MCF-7. Este hallazgo sugiere que los componentes activos responsables de la inhibición de la proliferación celular se concentran de forma más eficaz en las semillas de la Tara. Por el contrario, los extractos obtenidos de vaina y hoja no presentaron efecto citotóxico apreciable; las curvas de viabilidad permanecieron constantes e incluso, a concentraciones elevadas, se observó un ligero aumento en la absorbancia, lo que sugiere un posible efecto proliferativo o protector.

La diferencia en la respuesta biológica podría atribuirse a la composición fitoquímica diferencial entre las partes de la planta.

DISCUSIÓN

Los extractos de *Caesalpinia spinosa* mostraron concentraciones notablemente altas de compuestos fenólicos totales. Las vainas registraron el valor más alto (1004.667 mg GAE/g), seguidas por las semillas (880.222 mg GAE/g) y las hojas (395.778 mg GAE/g). Estos valores son significativamente superiores a los reportados para la mayoría de las plantas en estudios comparativos. En una evaluación de 30 extractos vegetales acuosos, las especies con mayor contenido fenólico fueron *Quercus robur* (tronco, 397.03 mg GAE/g), *Pinus maritima* (corteza, 360.76 mg GAE/g) y *Cinnamomum zeylanicum* (canela, corteza, 309.23 mg GAE/g), comparándola con nuestros extractos, el contenido fenólico de la vaina de Tara es aproximadamente 2.5 veces mayor que el del roble (*Quercus robur*) y 3.2 veces mayor que el de la canela, dos recursos vegetales ampliamente reconocidos por su alta concentración de polifenoles (47).

Esta elevada riqueza fenólica posiciona a la Tara en una categoría significativamente alta, comparable o incluso superior a especias conocidas por su potencia antioxidante, como el clavo (*Eugenia caryophyllus*, 212.85 mg GAE/g). La alta concentración sugiere que la Tara, particularmente sus vainas, son una fuente concentrada de moléculas bioactivas como taninos, flavonoides y ácidos fenólicos, los cuales están fuertemente correlacionados con actividades biológicas beneficiosas (47).

Al momento de comparar con los datos de flavonoides totales (TFC) reportados para otras plantas medicinales, la vaina de Tara (18.2 mg/g) muestra un contenido moderado a bueno. Comparándola con el artículo titulado “Análisis fitoquímico, actividad antioxidante de extractos metanólicos de plantas seleccionados y sus capacidades de desintoxicación contra la toxicidad de la AFB1”, la concentración de flavonoides que presenta la *Caesalpinia spinosa* es superior a la de *Centella asiática* (16.73 mg/g) o *Clausena dentata* (15.90 mg/g), pero menor a la de fuentes particularmente ricas como *Aframomum melegueta* (32.48 mg/g) o *Hypoxis hemerocallidea* (25.33 mg/g). Posicionándola en un sitio intermedio, esta posición es significativa si se considera que los flavonoides en la vaina de Tara coexisten con concentraciones masivas de taninos, lo que sugiere un perfil metabólico complejo y diversificado (48).

Los taninos, particularmente los hidrolizables y condensados, son de gran interés para las industrias del curtido, la alimentación (como clarificantes y antioxidantes) y la farmacéutica. Fuentes tradicionales como la corteza de *Quercus robur* (roble) o de *Acacia spp.* suelen presentar contenidos entre 200-600 mg/g de taninos. La hoja de *Caesalpinia spinosa* (730.54 mg/g) supera este rango superior, compitiendo directamente con extractos comerciales de alto rendimiento, como los derivados de la corteza de *Pinus marítima* (pino marítimo), cuyos fenólicos totales un buen indicador de taninos alcanzan 363 mg GAE/g. Además, al comparar con otra leguminosa de uso parecido, la algarroba (*Ceratonia siliqua*), cuyos fenoles totales en la vaina son de sólo 23.58 mg GAE/g la superioridad de la Tara es grande (48).

Se cree que los flavonoides y los fenoles son los componentes fitoquímicos más prometedores y medidos entre los metabolitos secundarios de las plantas. Los grupos hidroxilo en los fenoles y flavonoides son importantes porque proporcionan propiedades redox cruciales para la acción antioxidante (49,50).

Los resultados obtenidos para los extractos de *Caesalpinia spinosa* (Tara) revelan un perfil fitoquímico y antioxidante complejo y diferenciado. En cuanto a la capacidad antioxidante medida mediante el ensayo DPPH, los extractos mostraron una actividad moderada, con valores de concentración efectiva de 22.25 µg/mL (vainas), 41.28 µg/mL (hoja) y 135.9 µg/mL (semilla). Si bien estos valores indican una potencia antioxidante aceptable, resultan considerablemente más altos que los reportados para plantas reconocidas por su fuerte actividad antioxidante en la literatura, especies *Clausena dentata* ($IC_{50} = 10.34$ µg/mL) presentan capacidad de captación del radical DPPH mayor que la vaina de Tara. Incluso en comparación con antioxidantes estándar como el ácido ascórbico ($IC_{50} = 17.06$ µg/mL), la Tara muestra una actividad menor. Sin embargo, supera claramente a extractos como *Pittosporum viridiflorum* ($IC_{50} = 51.53$ µg/mL) (47,48,51).

Esta actividad DPPH moderada contrasta con el contenido elevado de compuestos fenólicos totales (TPC) encontrado en la Tara, particularmente en las vainas (1004.67 mg GAE/g). Este valor supera en 4.8 veces al de *C. dentata* (210.19 mg GAE/g) y en más de 11 veces al de *P. viridiflorum* (88.92 mg GAE/g). Esta aparente discrepancia entre un TPC alto y una actividad antioxidante de DPPH moderada puede explicarse por varios factores. Primero, el ensayo DPPH evalúa la capacidad reductora general de un compuesto frente al

radical estable DPPH•, mediante mecanismos que pueden involucrar la transferencia de un electrón o de un átomo de hidrógeno. La naturaleza lipofílica del radical DPPH• puede limitar la eficiencia de antioxidantes de gran tamaño estructural, como los taninos complejos que predominan en la Tara. Esto explicaría, en parte, la aparente discrepancia entre su elevada capacidad reductora medida por el ensayo de compuestos fenólicos por el método de Folin (TPC) en medio acuoso y su actividad moderada en el ensayo DPPH. La Tara es particularmente rica en taninos, especialmente en sus hojas (730.54 mg/g) y vainas (456.22 mg/g). Los taninos, especialmente los de alto peso molecular como los elagitaninos, pueden tener cinéticas de reacción más lentas con el DPPH o interactuar de manera diferente en comparación con flavonoides monoméricos o ácidos fenólicos simples, que suelen ser más efectivos en este ensayo (51,52).

En segundo lugar, el ensayo de compuestos fenólicos por el método Folin-Ciocalteu (TPC) cuantifica todos los grupos fenólicos reductores, independientemente de su actividad antioxidante específica. Por lo tanto, la Tara podría contener una alta proporción de polifenoles que son excelentes reductores para el reactivo de Folin, pero menos eficientes en la captación directa del radical DPPH (51,52).

Este resultado contrasta con estudios que reportan ácido gálico en vainas, esta discrepancia puede deberse a factores metodológicos: muchos estudios utilizan métodos de extracción agresivos que rompen taninos poliméricos, liberando ácido gálico artificialmente. Nuestro protocolo, aisló metabolitos en su forma nativa, extrayendo el ácido gálico libre disponible. Por tanto, en las semillas el ácido gálico existiría predominantemente en forma libre o biodisponible, mientras que en hojas y vainas estaría enlazado en estructuras poliméricas. Esta distinción es crucial, ya que la biodisponibilidad de un metabolito libre difiere significativamente de la de un polímero (53,54).

La presencia de ácido gálico en las semillas puede explicarse por factores fisiológicos. Las semillas son estructuras de reserva y perpetuación que requieren metabolitos defensivos para protegerse durante la latencia y germinación. El ácido gálico podría acumularse de forma preferencial como reserva de carbono y defensa química (Wink, 2003). Además, podría existir una división biosintética de trabajo: en las semillas, las vías biosintéticas podrían enfocarse hacia la producción de ácido gálico libre, mientras que en hojas y vainas este compuesto se polimerizaría inmediatamente en taninos más complejos que no serían detectados como ácido gálico libre en nuestro método analítico (55).

Estudios previos han demostrado que las semillas de *Caesalpinia spinosa* son particularmente ricas en taninos hidrolizables y galotaninos, compuestos asociados con la inducción de apoptosis, bloqueo del ciclo celular y estrés oxidativo en células cancerosas (Sotillo et al., 2019; Patiño et al., 2012). En cambio, las vainas y hojas contienen flavonoides y compuestos fenólicos simples en menor concentración, lo que podría explicar su ausencia de actividad citotóxica o incluso un efecto antioxidante que, a altas concentraciones, podría favorecer la supervivencia celular.

En concordancia, el estudio de *Castañeda et al.* (2012) (42), describió una fracción purificada de *Caesalpinia spinosa* denominada, enriquecida en galotaninos, que mostró actividad citotóxica selectiva y capacidad de sensibilizar células tumorales a fármacos quimioterapéuticos convencionales. Dichos autores demostraron que productos naturales como los taninos condensados pueden aumentar la eficacia de tratamientos como taxol o doxorubicina al reducir la resistencia tumoral. De forma similar, la fracción exhibió tanto efectos citotóxicos directos como potencial adyuvante en combinación con quimioterápicos, reforzando la importancia de los compuestos fenólicos en la modulación de la respuesta tumoral.

Por otro lado, un estudio reciente publicado en *Scientific Reports* (56), confirmó que los extractos ricos en taninos de *Caesalpinia spinosa*, especialmente los derivados de semilla también poseen actividad antiangiogénica y moduladora del microambiente tumoral, contribuyendo a limitar el crecimiento y la proliferación celular en modelos de cáncer. Estos hallazgos respaldan los resultados obtenidos en este trabajo, donde el extracto de semilla fue el único que mostró un efecto citotóxico claro.

En conjunto, los resultados confirman que la semilla de *Caesalpinia spinosa* representa la fracción con mayor potencial antitumoral, posiblemente por su alta concentración de taninos bioactivos y galotaninos capaces de inducir muerte celular. En cambio, los extractos de vaina y hoja mostraron un perfil inactivo o incluso proliferativo, probablemente asociado a un contenido fitoquímico distinto.

CONCLUSIONES

PRIMERA

Se logró obtener extractos etanólicos a partir de las hojas, vainas y semillas de *Caesalpinia spinosa* (Tara) mediante un proceso de percolación y concentración controlada, obteniendo rendimientos variables según la parte vegetal utilizada. El extracto de semilla presentó el mayor rendimiento con un valor de 64.20 %.

SEGUNDA

La marcha fitoquímica realizada permitió identificar la presencia de metabolitos secundarios característicos de la especie, tales como taninos, flavonoides y compuestos fenólicos, con variaciones en su intensidad entre los diferentes extractos. En particular, el extracto de semilla mostró una mayor riqueza en taninos y polifenoles, compuestos asociados con la actividad biológica y potencial antitumoral reportada en estudios previos.

TERCERA

Se logró semi-cuantificar de manera exitosa ácido gálico del extracto fraccionado de semillas de Tara, obteniéndose una concentración de 390.133 ppm.

CUARTA

Se determinó que el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* de semilla posee actividad citotóxica sobre a las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, con un IC₅₀ de 1.9 y 3.9 µg/mL respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ. Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research*. 2023 Nov 1;21(11):1142–7. doi:10.1158/1541-7786.MCR-23-0411
2. Instituto Nacional del Cancer. ¿Qué es el cáncer?
3. Martín M, Herrero A, Echavarría I. El cáncer de mama. *Arbor*. 2015 Jun 30;191(773):a234. doi:10.3989/arbor.2015.773n3004
4. Fernández JÁ, Ozores PP, López VC, Mosquera AC, López RL. Cáncer de mama. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2021 Mar;13(27):1506–17. doi:10.1016/j.med.2021.03.002
5. Lin YY, Gao HF, Yang X, Zhu T, Zheng X xing, Ji F, et al. Neoadjuvant therapy in triple-negative breast cancer: A systematic review and network meta-analysis. *The Breast*. 2022 Dec;66:126–35. doi:10.1016/j.breast.2022.08.006
6. Gómez-Rázuri K, Abad-Licham M, Astigueta J, Moreno J. Cáncer de mama en el norte del Perú: subtipos moleculares y HER2 low. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2024 May 8;62–8. doi:10.17843/rpmesp.2024.411.13424
7. Entendimiento del papel del HER2 en el cáncer de mama. .
8. American Cancer Society. Signos y síntomas del cáncer de seno.
9. Instituto Nacional del Cancer. Exámenes de detección del cáncer de seno (mama) (PDQ®)–Versión para profesionales de salud.
10. Instituto Nacional del Cancer. Tratamiento del cáncer de mama (PDQ®)–Versión para pacientes Tratamiento del cáncer de mama (PDQ®)–Versión para pacientes.
11. Newton K, Strasser A, Kayagaki N, Dixit VM. Cell death. *Cell*. 2024 Jan;187(2):235–56. doi:10.1016/j.cell.2023.11.044
12. MCF-7 - ATCC.
13. MDA-MB-231 - ATCC.
14. Villena Velásquez JJ, Seminario JF. Origen y domesticación de Tara spinosa (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Lilloa*. 2021 Nov 24;131–59. doi:10.30550/j.lil/2021.58.2/2021.11.14
15. Murga-Orrillo H, Lobo FDA, Santos Silva Amorim R, Fernandes Silva Dionisio L, Nuñez Bustamante E, Chu-Koo FW, et al. Increased Production of Tara (Caesalpinia spinosa) by Edaphoclimatic Variation in the Altitudinal Gradient of the Peruvian Andes. *Agronomy*. 2023 Feb 23;13(3):646. doi:10.3390/agronomy13030646

16. Fimo Alemán BCBP/ PACP/ EMTBC/ PANP/ ECNC– F desde el S/ EMSA. LA TARA (*Caesalpinia spinosa*) EN PERÚ, BOLIVIA Y ECUADOR: Análisis de la Cadena Productiva en la Región. Ecosistemas Forestales Andinos ECOBONA. 2009.
17. López S. A, Oré S. R, Miranda V C, Trabucco J, Orihuela T. D, Linares G. J, et al. Antioxidant capacity of wild populations "tara" (*Caesalpinia spinosa*) of the locations Picoy and Santa Fe (Province of Tarma, Junín department). *Scientia agropecuaria*. 2011 Mar 31;25–9. doi:10.17268/SCI.AGROPECU.2011.01.03
18. Aguilar-Galvez A, Noratto G, Chambi F, Debaste F, Campos D. Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. *Food Chem.* 2014 Aug 1;156:301–4. doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.110 PubMed PMID: 24629972.
19. Huarino Acho M, Ramos Perfecto D. Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre flora salival mixta. *Odontología Sanmarquina*. 2014 May 14;16(1):32. doi:10.15381/OS.V16I1.5374
20. Bussmann RW, Malca-García G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D, et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *J Ethnopharmacol.* 2010 Oct 28;132(1):101–8. doi:10.1016/J.JEP.2010.07.048 PubMed PMID: 20678568.
21. Pareja-Vásquez M, Pardo-Aldave K, Jurado-Teixeira B, Guillen A, Romero-Coasaca AC, Meneses-Rivadeneira L. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" Fabaceae sobre bacterias de la biopelícula bucal. *Diagnóstico.* 2020 Oct 13;59(1):5–11. doi:10.33734/DIAGNOSTICO.V59I1.201
22. Guevara G. JM, Guevara G. JC, Guevara D. JM, Béjar V, Huamán A, Valencia E, et al. Evaluación del cocimiento de diferentes biovariedades de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a oxacilina. *Anales de la Facultad de Medicina.* 2014 Aug 8;75(2). doi:10.15381/ANALES.V75I2.8379
23. Montenegro Chipana A, Ramos Perfecto D. Actividad antibacteriana de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre *Porphyromonas gingivalis*. *Odontología Sanmarquina*. 2016 Aug 22;19(1):7. doi:10.15381/OS.V19I1.12175
24. Bazaka K, Jacob M V., Chrzanowski W, Ostrikov K. Anti-bacterial surfaces: natural agents, mechanisms of action, and plasma surface modification. *RSC Adv.* 2015;5(60):48739–59. doi:10.1039/C4RA17244B

25. Ilie CI, Oprea E, Geana EI, Spoiala A, Buleandra M, Gradisteanu Pircalabioru G, et al. Bee Pollen Extracts: Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Effect on the Growth of Selected Probiotic and Pathogenic Bacteria. *Antioxidants*. 2022 May 12;11(5):959. doi:10.3390/antiox11050959
26. Bhuia MdS, Rahaman MdM, Islam T, Bappi MH, Sikder MdI, Hossain KN, et al. Neurobiological effects of gallic acid: current perspectives. *Chin Med*. 2023 Mar 15;18(1):27. doi:10.1186/s13020-023-00735-7
27. Niloofar Kahkeshani 1 2 FF 3, MF 4, SSA 5, RB 6, RN 7, SM 8 9, ZA 3, RR 6, MHF 3 10, AB. Efectos farmacológicos del ácido gálico en la salud y la enfermedad: una revisión mecanística. 2019.
28. Skowrya M, Falguera V, Gallego G, Peiró S, Almajano MP. Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods in vitro and in model food emulsions. *J Sci Food Agric*. 2014 Mar 30;94(5):911–8. doi:10.1002/JSFA.6335 PubMed PMID: 23929224.
29. Hatami E, B Nagesh PK, Sikander M, Dhasmana A, Chauhan SC, Jaggi M, et al. Tannic Acid Exhibits Antiangiogenesis Activity in Nonsmall-Cell Lung Cancer Cells. *ACS Omega*. 2022 Jul 12;7(27):23939. doi:10.1021/ACSOMEGA.2C02727 PubMed PMID: 35847334.
30. Youness RA, Kamel R, Elkasabgy NA, Shao P, Farag MA. Recent Advances in Tannic Acid (Gallotannin) Anticancer Activities and Drug Delivery Systems for Efficacy Improvement; A Comprehensive Review. *Molecules* 2021, Vol 26, Page 1486. 2021 Mar 9;26(5):1486. doi:10.3390/MOLECULES26051486 PubMed PMID: 33803294.
31. Matić P, Sabljic M, Jakobek L. Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content. *J AOAC Int*. 2017 Nov 1;100(6):1795–803. doi:10.5740/jaoacint.17-0066
32. Matić P, Sabljic M, Jakobek L. Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content. *J AOAC Int*. 2017 Nov 1;100(6):1795–803. doi:10.5740/jaoacint.17-0066
33. Csepregi K, Kocsis M, Hideg É. On the spectrophotometric determination of total phenolic and flavonoid contents. *Acta Biol Hung*. 2013 Dec;64(4):500–9. doi:10.1556/ABiol.64.2013.4.10
34. Crnkic Mirsad, Klepo Lejla. Spectrophotometric Evaluation of Tannin Content in Domestic Beer Samples with Fe(III) and 1,10-Phenanthroline. *Journal of Pharmacy*

- and Pharmacology. 2020 Jan 8;8(1). doi:10.17265/2328-2150/2020.01.002
35. Palacios CE, Nagai A, Torres P, Rodrigues JA, Salatino A. Contents of tannins of cultivars of sorghum cultivated in Brazil, as determined by four quantification methods. Food Chem. 2021 Feb 1;337:127970. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2020.127970 PubMed PMID: 32919270.
 36. Kupina S, Fields C, Roman MC, Brunelle SL. Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13. J AOAC Int. 2018 Sep 1;101(5):1466–72. doi:10.5740/jaoacint.18-0031
 37. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chem. 2009 Apr;113(4):1202–5. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008
 38. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology. 1995;28(1):25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
 39. Silver J. Let Us Teach Proper Thin Layer Chromatography Technique! J Chem Educ. 2020 Dec 8;97(12):4217–9. doi:10.1021/acs.jchemed.0c00437
 40. Paper and Thin Layer Chromatography. Elsevier; 1976. doi:10.1016/C2013-0-11950-2
 41. Darina V, Gegechkori V, Dolzhenko A V., Morton DW, Agatonovic-Kustrin S. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) silica gel plates as a medium for on-surface organic synthesis and biological screening. Sustain Chem Pharm. 2025 Aug;46:102057. doi:10.1016/j.scp.2025.102057
 42. Castañeda DM, Pombo LM, Urueña CP, Hernandez JF, Fiorentino S. A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. BMC Complement Altern Med. 2012 Dec 10;12(1):38. doi:10.1186/1472-6882-12-38
 43. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harb Protoc. 2018 Jun 1;2018(6):pdb.prot095505. doi:10.1101/pdb.prot095505
 44. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. Int J Mol Sci. 2021 Nov 26;22(23):12827. doi:10.3390/ijms222312827
 45. Mendoza-Isaza NA, Andrés Hoyos -Arbeláez J, Alberto Peláez-Jaramillo C. Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales de extractos de tallo de *Stevia rebaudiana* en varios modelos in vitro. Revista EIA [Internet]. 2020 Aug 10

[cited 2024 Dec 18]:1–9. Available from:
<https://revistas.eia.edu.co/index.php/reveia/article/view/1282>
doi:10.24050/reia.v17i34.1282

46. Wang J, Zhu J, Zheng Q, Wang D, Wang H, He Y, et al. In vitro wheat protoplast cytotoxicity of polystyrene nanoplastics. *Science of The Total Environment*. 2023 Jul 15;163560. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2023.163560 PubMed PMID: 37080310.
47. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J Agric Food Chem*. 2009 Mar 11;57(5):1768–74. doi:10.1021/JF803011R
48. Kongolo Kalemba MR, Makhuvele R, Njobeh PB. Phytochemical screening, antioxidant activity of selected methanolic plant extracts and their detoxification capabilities against AFB1 toxicity. *Heliyon*. 2024 Jan 30;10(2):e24435. doi:10.1016/J.HELİYON.2024.E24435
49. Al-Owaisi M, Al-Hadiwi N, Khan SA. GC-MS analysis, determination of total phenolics, flavonoid content and free radical scavenging activities of various crude extracts of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori leaves. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014 Dec 1;4(12):964–70. doi:10.12980/APJTB.4.201414B295
50. Kępińska-Pacelik J, Biel W. Alimentary Risk of Mycotoxins for Humans and Animals. *Toxins* 2021, Vol 13, Page 822. 2021 Nov 21;13(11):822. doi:10.3390/TOXINS13110822 PubMed PMID: 34822606.
51. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem*. 2005 Mar 23;53(6):1841–56. doi:10.1021/JF030723C PubMed PMID: 15769103.
52. Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, et al. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J Agric Food Chem*. 1998;46(5):1887–92. doi:10.1021/JF970975B
53. Céspedes Loayza AL, Muñoz Guillen GDR. Influencia de la Temperatura, Solvente y Tipo de Vaina en la Extracción de Taninos de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) por Percolación y Relación con Su Actividad Antioxidante [Internet]. Universidad Católica de Santa María; 2013 [cited 2025 Dec 17]. Available from: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/3790>
54. Shahidi F, Peng H. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*. 2018 Dec 31;4:11–68. doi:10.31665/JFB.2018.4162

55. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 2003 Sep 1;64(1):3–19. doi:10.1016/S0031-9422(03)00300-5 PubMed PMID: 12946402.
56. Carlosama C, Arévalo C, Jimenez MC, Lasso P, Urueña C, Fiorentino S, et al. Triple negative breast cancer migration is modified by mitochondrial metabolism alteration induced by natural extracts of *C. spinosa* and *P. alliacea*. *Sci Rep*. 2024 Aug 31;14(1):20253. doi:10.1038/s41598-024-70550-z



ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)

CONSTANCIA Nº 001-2025-HUSA

El director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra biológica fue presentada por, YULY MARIBEL YALLERCO SABINA, que viene realizando su proyecto de tesis en la Universidad Católica de Santa María que lleva por título "Evaluación de la actividad citotóxica de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre células de cáncer de mama". La muestra fue traída al Laboratorio del Botánica en estado fresco procedente del distrito de Sabandía provincia de Arequipa, departamento de Arequipa. Fue determinada taxonómicamente en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) mediante la clasificación APG IV y corresponde a la siguiente especie.

Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Genero	<i>Tara</i>
Especie	<i>Tara spinosa</i> (Molina) Britton & Rose = <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze

Se le expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Arequipa, 8 de julio del 2025



Dr. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Reconocido como Centro Depositario con RESOLUCION DE DIRECCION GENERAL N° 147-2016-SERFOR/DGGSPFFS

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado