



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EFECTO ESTROGÉNICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*) EN RATAS (*Rattus norvegicus*)”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**NELSON CAMILO PACA TENE**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2013**

## **DEDICATORIA**

*Al terminar mis estudios universitarios es para mí un honor poder dedicar este trabajo a Dios por ser el quien me guía mi vida y brindarme una familia extraordinaria.*

*A mis padres Carmela y Santiago que con su apoyo constante y el gran esfuerzo han hecho posible alcanzar mis metas propuestas con su gran paciencia y dedicación hacia mí.*

*A todos mis hermanos que me brindaron su apoyo en mis momentos difíciles para así salir adelante.*

## **AGRADECIMIENTO**

*Quiero agradecer a Dios, que siempre en todo momento está conmigo bendiciéndome de muchas maneras.*

*A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por impartirme sus conocimientos, orientación, formación académica y profesional.*

*Al Bqf. Fausto Contero (Director de tesis), Dra. Jenny Moreno (Colaboradora de tesis), por haber apoyado en la coordinación del trabajo con su ayuda incondicional así también compartiendo sus conocimientos, los mismos que me ayudaron para la elaboración de mi trabajo.*

# ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

## FACULTAD DE CIENCIAS

### ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación **“EFECTO ESTROGÉNICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*) EN RATAS (*Rattus norvergicus*)”**, de responsabilidad del señor egresado Nelson Camilo Paca Tene, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizado su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Silvio Álvarez  
DECANO DE LA FACULTAD  
DE CIENCIAS

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Iván Ramos  
DIRECTOR DE ESCUELA

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

BQF. Fausto contero  
DIRECTOR DE TESIS

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

DrA. Jenny Moreno  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tec. Carlos Rodríguez  
DIRECTOR CENTRO  
DE DOCUMENTACIÓN

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

NOTA DE TESIS ESCRITA

\_\_\_\_\_

Yo, Nelson Camilo Paca Tene, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

---

**NELSON CAMILO PACA TENE**

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
>	Mayor
<	Menor
°C	Grados Celcius
<i>Ad Libitum</i>	Libre acceso
Anova	Análisis de varianza
<b>CBG</b>	Globulina fijadora del cortisol
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
F	Coefficiente estadístico de anova
ER	Receptor estrogénico
FSH	Hormona folículo estimulante
G	Gramos
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Kg	Kilogramos
LH	Hormona Luteinizante
ml	Mililitros
mg/Kg	Miligramos por kilogramo
nm	nanogramos
OMS	Organización Mundial de Salud
p	Provavilidad de ocurrencia
pg	Picogramos
pg/ml	picogramos por mililitro
pH	potencial de hidrógeno
ppm	partes por millón
PRL	Prolactina
RG	Grupos
SERM	Moduladores Selectivos de Receptores de Estrógenos
SOP	Síndrome de Ovarios Poliquísticos
SOLCA	Sociedad de lucha contra el cáncer
StAR	Proteína reguladora aguda esteroidogénica

TLC	Cromatografía de capa fina
<b>TEBG</b>	Globulina fijadora de la testosterona
$\alpha$	Nivel de significancia

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURA  
ÍNDICE DE CUADROS  
ÍNDICE DE TABLAS  
ÍNDICE DE GRÁFICOS  
ÍNDICE DE FIGURAS  
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS  
ÍNDICE DE ANEXOS  
INTRODUCCIÓN

<b>1.</b>	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Infertilidad.....	1
1.2	Infertilidad femenina.....	2
1.3	Causas.....	2
1.3.1	Disfunción ovulatoria.....	2
1.3.2	Infertilidad tubàrica.....	3
1.3.3	Endometriosis.....	3
1.3.4	Infertilidad inmunològica.....	3
1.3.5	Infertilidad hormonal.....	3
1.3.6	Infertilidad inexplicable.....	4
1.4	Diagnòstico.....	4
1.5.	Síntomas.....	5
1.6.	Fisiología femenina.....	6
1.6.1	Anatomía y fisiología del ovario.....	7
1.6.1.1	Reguladores de la función ovàrica.....	8
1.6.2	Anatomía y fisiología del útero.....	9
1.6.2.1	Histología uterina y endometrial.....	9
1.6.2.2	Receptores uterinos de estrògenos y de progesterona.....	10
1.7	Sistema hormonal femenino.....	11
1.7.1	Formación de hormonas esteroideas.....	11
1.7.1.1	Estrògenos.....	12

1.7.1.2	Progesterona.....	13
1.7.1.3	Andrógenos.....	13
1.7.2	Funciones de la hormonas ováricas.....	14
1.7.3	Transporte de estrógenos y progesterona en sangre.....	15
1.7.3.1	Función del hígado en la degradación de estrógenos. ....	15
1.7.3.2	Estrógenos sobre el útero y órganos sexuales externos femeninos...	16
1.7.3.3	Efecto de los estrógenos sobre las trompas de Falopio.....	16
1.7.3.4	Efecto de los estrógenos sobre la mamas.....	17
1.7.3.5	Efecto de los estrógenos sobre el esqueleto.....	17
1.7.3.6	Efecto de los estrógenos sobre el depósito de proteínas.....	18
1.7.3.7	Efecto de los estrógenos sobre el metabolismo.....	18
1.8	Drogas vegetales.....	19
1.9	Alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	19
1.9.1	Historia de la alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	19
1.9.2	Nombre científico.....	19
1.9.3	Nombres vulgares.....	20
1.9.4	Familia.....	20
1.9.5	Hábitat y características.....	20
1.9.6	Origen y distribución.....	20
1.9.7	Descripción.....	21
1.9.8	Componentes.....	21
1.9.9	Acciones farmacologías.....	22
1.9.9.1	Aspectos nutricionales.....	22
1.9.9.2	Actividad antianémica-antihemorrágica.....	23
1.9.9.3	Actividad estrogénica.....	23
1.9.9.4	Actividad hipolipemiente.....	24
1.9.9.5	Actividad hipoglucemiante.....	25
1.9.10	Propiedades medicinales.....	25
1.9.11	Dosis.....	26
1.9.12	Contraindicaciones.....	27
1.9.13	Interacciones medicamentosas.....	27
1.10.	Fitoestrògenos.....	27

1.10.1	Estructura química.....	29
1.10.2	Fuentes de isoflavonas.....	30
1.10.3	Metabolismo de isoflavonas.....	31
1.10.4	Acciones farmacológicas y mecanismo de acción.....	32
1.10.5	Isoflavonas y salud.....	33
1.11	Climasoy.....	33
1.11.1	Composición.....	34
1.11.2	Indicaciones.....	34
1.11.3	Contraindicaciones.....	34
1.11.4	Mecanismo de acción.....	34
1.11.5	Dosis.....	35
1.11.6	Vía de administración.....	35
1.12	Animales de experimentación.....	35
1.12.1	<i>Rattus novergicus</i> .....	36
1.12.2	Clasificación y taxonomía.....	36
1.12.3	Descripción de la especie.....	37
1.12.4	Ciclo reproductivo.....	37
1.12.5	Tamaño de la camada.....	37
1.12.6	Hábitos alimenticios.....	37
1.12.7	Vía de administración.....	38
1.12.7.1	Vía oral.....	38
1.12.8	Extracción de sangre en animales de experimentación.....	39
1.12.9	Vías de extracción animales de experimentación.....	40
1.12.9.1	Venas y arteriolas caudales.....	40
1.12.9.2	Vía intracardiaca.....	41
<b>2.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>42</b>
2.1	Lugar de investigación.....	42
2.2	Materiales, equipos y reactivos.....	42
2.2.1	Materiales.....	42
2.2.1.1	Vegetal.....	42
2.2.1.2	Extracto.....	42
2.2.1.3	Material biológico.....	43
2.2.2	Materiales y reactivos para el estudio farmacognósicos.....	44

2.3	Técnicas y métodos.....	45
2.3.1	Análisis físico-químico.....	45
2.3.1.1	Determinación del contenido de humedad.....	45
2.3.1.2	Determinación de cenizas totales.....	46
2.3.1.3	Determinación de cenizas solubles en agua.....	47
2.3.1.4	Determinación de cenizas insolubles en ácido.....	48
2.4	Tamizaje fitoquímico.....	49
2.4.1	Ensayo de Sudan.....	50
2.4.2	Ensayo de Dragendorff.....	50
2.4.3	Ensayo de Mayer.....	50
2.4.4	Ensayo de Wayner.....	51
2.4.5	Ensayo de Baljet .....	51
2.4.6	Ensayo de Borntrager.....	51
2.4.7	Ensayo de Liebermann.Buchard.....	52
2.4.8	Ensayo de catequinas.....	53
2.4.9	Ensayo de resinas.....	53
2.4.10	Ensayo de Fehling.....	53
2.4.11	Ensayo de espuma.....	54
2.4.12	Ensayo de cloruro férrico.....	54
2.4.13	Ensayo de Shinoda.....	54
2.4.14	Ensayo de antocianidinas.....	55
2.5	Obtención de extracto.....	55
2.5.1	Preparación de extracto alcohólico de hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	55
2.5.2	Control de calidad de extracto.....	56
2.5.2.1	Determinación de pH.....	56
2.5.2.2	Determinación de la densidad relativa.....	57
2.5.2.3	Determinación de índice de refracción.....	58
2.5.2.4	Determinación de sólidos totales.....	59
2.5.2.5	Determinación de los requisitos organolépticos.....	60
2.5.3	Cromatografía en capa fina de flavonoides.....	61
2.5.4	Cuantificación de flavonoides totales expresados como Quercetina.....	62

2.5.5	Análisis cromatográfico de beta sitosterol por TLC.....	63
2.6	Efecto estrogénico del extracto alcohólico de hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	64
2.6.1	Proceso experimental.....	65
2.6.2	Análisis estadístico.....	67
2.7	Tratamiento a base del extracto alcohólico de alfalfa.....	68
2.7.1	Materiales, reactivos y equipos.....	69
2.7.2	Vías de extracción para obtener muestras sanguíneas.....	70
2.7.2.1	Obtención de sangre de vena facial.....	70
2.7.2.2	Obtención de sangre intracardiaca.....	70
2.7.3	Determinación del estradiol.....	71
2.7.4	Extracción de órganos del aparato reproductor femenino.....	73
2.7.5	Estudio de toxicidad aguda.....	73
2.7.6	Estudio histopatológico.....	74
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DICUSIÓN</b> .....	<b>75</b>
3.1	Control de calidad De la droga seca de hojas de alfalfa.....	75
3.1.1	Análisis físico-químico.....	75
3.1.1.1	Determinación del contenido de humedad.....	75
3.1.1.2	Determinación de cenizas totales.....	76
3.2	Determinación de parámetros de calidad del extracto alcohólico de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	77
3.2.1	Determinación de pH.....	77
3.2.2	Determinación de la densidad relativa.....	78
3.2.3	Determinación de índice de refracción.....	78
3.2.4	Determinación de sólidos totales.....	79
3.2.5	Determinación de los requisitos organolépticos.....	79
3.3	Tamizaje fitoquímico.....	80
3.4	Estudio cromatográfico en capa fina.....	82
3.5	Cuantificación de flavonoides totales expresados como quecetina....	83
3.6	Estudio cromatográfico de beta sitosterol por TLC.....	85
3.7	Efecto estrogénico.....	86
3.7.1	Efecto estrogénico del extracto de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	86
3.7.1.1	Evaluación del peso inicial y final de los reactivos biológicos en la	

	investigación.....	86
3.7.1.2	Determinación de los niveles de estradiol inicial y final en los animales de experimentación.....	88
3.7.1.3	<b>Análisis estadístico ANOVA</b> .....	90
3.7.2	Pruebas preliminares complementarias sobre el incremento de pesos de los ovarios del grupo control, grupo patrón y grupos experimentales durante la investigación.....	91
3.7.3	Pruebas preliminares complementarias sobre el incremento de pesos de útero del grupo control, grupo patrón y grupos experimentales durante la investigación.....	92
3.7.3	Toxicidad aguda del extracto de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	92
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	93
<b>5.</b>	<b>RECOMEDACIONES</b> .....	95
<b>6.</b>	<b>RESUMEN Y SUMMARY</b> .....	96
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	98
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	106

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Humedad de la droga seca de las hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Facultad de Ciencias. ESPOCH julio 2012.....	76
CUADRO No. 2	Cenizas totales, solubles en agua e insolubles en HCl de la droga seca de las hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ) Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba julio 2012.....	76
CUADRO No. 3	pH del extracto alcohólico de hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Facultad de Ciencias. ESPOCH: Riobamba julio 2012.....	77
CUADRO No. 4	Densidad relativa de las hojas de alcohólico de hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba julio 2012.....	78
CUADRO No. 5	Índice de refracción del extracto alcohólico de hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. julio 2012.....	78
CUADRO No. 6	Sólidos totales del extracto alcohólico de las hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba. julio 2012.....	79
CUADRO No. 7	Requisitos organolépticos del extracto alcohólico de hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba julio 2012.....	79
CUADRO No. 8	Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). En sus extractos etéreo, alcohólico y acuoso. Facultad de ciencias ESPOCH. Riobamba julio 2012...	80
CUADRO No. 9	Cromatografía en capa fina (TLC) de (flavonoides) del extracto alcohólico de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Facultad de Ciencias. ESPOCH. agosto 2012.....	82
CUADRO No. 10	Cuantificación de flavonoides del extracto alcohólico de hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ) Expresados como Quercetina. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	83
CUADRO No. 11	Cromatografía en capa fina (TLC) de ( $\beta$ -sitosterol) del extracto alcohólico de hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	85

CUADRO No. 12	Peso promedio de las ratas en cada grupo experimental antes y después del tratamiento. Bioterio de la Facultad de Ciencias ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	87
CUADRO No. 13	Niveles de estradiol inicial y final en los animales de experimentación en pg/mL. Bioterio de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	88
CUADRO No. 14	Anova comparaciones múltiples de la medición de los niveles de estradiol final durante la investigación del control, patrón, y los grupos experimentales. Bioterio Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	90
CUADRO No. 15	Anova T-student de la medición de los niveles de Estradiol Final durante la investigación del control, patrón, y los grupos experimentales. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	91
CUADRO No. 16	Pesos de los ovarios del grupo control, grupo patrón y grupos experimentales que recibieron el tratamiento del Extracto Hidroalcohólico de Alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	122
CUADRO No. 17	Pesos de útero del grupo control, grupo patrón y grupos experimentales que recibieron el tratamiento del extracto Hidroalcohólico de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Bioterio Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	123

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Concentración de la principales hormonas esteroideas ováricas en la sangre de las mujeres con ciclos ovuladores.....	14
TABLA No. 2	Volumen de administración.....	38
TABLA No. 3	Materiales y Reactivos para el control de calidad Físico-químico y estudio fitoquímico .....	44
TABLA No. 4	Definiciones de los grupos.....	65
TABLA No. 5	Grupos experimentales.....	66
TABLA No. 6	Descripción del proceso experimental.....	67
TABLA No. 7	Materiales y reactivos empleados para comprobar el Efecto Estrogénico (Ensayo Pre-Clínico).....	69
TABLA No. 8	Protocolo de administración.....	69

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Regresión lineal del estándar de Quercetina.....	79
GRÁFICO No. 2	Resultados del peso inicial y peso final durante la investigación a los grupos experimentales. Bioterio de la Facultad de Ciencias ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	82
GRÁFICO No. 3	Evaluación de los niveles de estradiol inicial y final con respecto al tratamiento que recibió cada grupo experimental. Bioterio de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	84
GRÁFICO No. 4	Resultado de la determinación de los pesos de los ovarios del grupo control, grupo patrón y grupos experimentales al final del estudio. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	87
GRÁFICO No. 5	Resultado de la determinación de los pesos de úteros del grupo control, grupo patrón y grupos experimentales que recibieron el tratamiento del extracto alcohólico de las hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba agosto 2012.....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Tipos de fitoestrógenos.....	28
FIGURA No. 2	Comparación entre la estructura de las (equol) y los estrógenos (estradiol) donde se muestra las similitudes entre las dos moléculas .....	29
FIGURA No. 3	Extracción sucesiva del material vegetal para la aplicación de técnicas de Tamizaje Fitoquímico .....	49
FIGURA No. 4	Esquemas de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico.....	49

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	19
FOTOGRAFÍA No. 2	Medicamento comercial (Climasoy).....	33
FOTOGRAFÍA No. 3	<i>Rattus novergicus</i> .....	36
FOTOGRAFÍA No. 4	Recolección secado y molienda de las hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ) .....	106
FOTOGRAFÍA No. 5	Tamizaje fitoquímico del extracto de las hojas de alfalfa...	106
FOTOGRAFÍA No. 6	Cromatografía en capa fina del extracto de las hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	107
FOTOGRAFÍA No. 7	Ambientación de los animales y control de peso de <i>Rattus novergicus</i> .....	107
FOTOGRAFÍA No. 8	Concentración y la administración del extracto concentrado de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	108
FOTOGRAFÍA No. 9	Equipos para la toma de muestra de sangre a <i>Rattus novergicus</i> .....	108
FOTOGRAFÍA No. 10	Diseción de <i>Rattus novergicus</i> .....	109

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Recolección secado y molieda de las hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ). Riobamba. 2012.....	106
ANEXO No. 2	Tamizaje fitoquímico del extracto de las hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	106
ANEXO No. 3	Cromatografía en capa fina del extracto de las hojas de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	107
ANEXO No. 4	Ambietación de animales y control de peso de <i>Rattus novergicus</i> . En el Bioterio de la Facultad de Ciencias. ESPOCH.....	107
ANEXO No. 5	Concentración y administración del extracto de alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> ).....	108
ANEXO No. 6	Equipos para la toma de muestra de sangre a <i>Rattus novergicus</i> .....	109
ANEXO No. 7	Disección de <i>Rattus novergicus</i> .....	110
ANEXO No. 8	Reporte de resultados histopatológicos de hígado, riñón y estomago de ratas inducidas con extracto de alfalfa, emitido por el Dr. Oswaldo Duque (Anatomo-Patòlogo SOLCA-CHIMBORAZO).....	111
ANEXO No. 9	Reportes de la cuantificación de estradiol, grupo control, grupo patrón, dosis baja, dosis media y dosis alta. Riobamba septiembre del 2012.....	112
ANEXO No. 10	Técnica utilizada en la investigación.....	117
ANEXO No. 11	Pruebas preliminares complementarias sobre incremento de pesos en ovarios y útero.....	123

## INTRODUCCIÓN

La herbolaria es la práctica popular que emplea las propiedades curativas específicas de las plantas para tratar enfermedades y su práctica ha evolucionado a lo largo del tiempo. En un proceso que duró miles de años, los hombres fueron incorporando a su acervo cultural una gran cantidad de conocimientos útiles que provenían de la flora a su alrededor. (1)

La organización mundial de la salud (OMS) reconoce a la práctica Herbolaria y le otorga gran importancia en los sistemas públicos de salud, ya que el 80% de la población mundial depende de las plantas para su atención primaria de la salud. Actualmente, los principales laboratorios y consorcios farmacéuticos cuentan con grupos de especialistas multidisciplinarios con líneas de investigación dirigidos a la explotación etnomédica y quimiotaxonomía; es decir, a la clasificación de las características químicas de las plantas con propiedades medicinales (6).

Los productos naturales que se originan en las plantas se sintetizan a través de múltiples rutas metabólicas y se dividen en metabolitos primarios y secundarios, siendo estos últimos los más importantes en lo referente a aplicaciones. Los metabolitos primarios se consideran esenciales y son moléculas nutricionales o estructurales; dentro de este grupo se encuentran los carbohidratos, las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos. A partir de vías laterales a la fotosíntesis, las plantas producen los metabolitos secundarios, los cuales tienen funciones no nutricionales, pero muy importantes para su supervivencia. Son compuestos que les sirven para protegerse de los factores externos, como los flavonoides, taninos, lignanos,

cumarinas, alcaloides, terpenos, saponinas, entre otros. Los metabolitos secundarios son almacenados en varios organelos en las células de la planta, debido a la toxicidad que representa su acumulación. (8) (10)

Como un metabolito secundario las isoflavonas son componentes biológicos naturales existentes en las plantas. Estas sustancias naturales, son consideradas por su estructura como fitoestrógenos; nombre genérico para definir a dichas clases de compuestos que son no esteroides, difenólicos, que poseen una estructura química similar a la que presentan los estrógenos humanos, conjuntamente con los lignanos y cumestanos. (12)

Los fitoestrógenos tienen una importante actividad antioxidante y también acciones similares, aunque considerablemente más débiles, que los estrógenos u hormonas sexuales femeninas. Esta peculiar acción “hormonal” confiere a los fitoestrógenos algunas características muy interesantes en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades, por lo que han sido probablemente los fitoquímicos más estudiados. (20)

En los últimos años ha crecido el interés por los fitoestrógenos y la divulgación de sus propiedades, sobre todo entre las mujeres. Aun así, su relevancia para la nutrición está en proceso de investigación. Resulta difícil diferenciar la verdadera causa de los efectos positivos, dado que la ingestión de estos compuestos también está relacionada con hábitos alimentarios.

Según La Organización Mundial de la salud (OMS), una pareja infértil es aquella que después de 12 meses de tener relaciones sexuales coitales frecuentes, sin ninguna protección, no ha logrado una gestación. (13)

La OMS estima que existen aproximadamente 80 millones de mujeres infértiles en el planeta. Algunos países decidieron declarar a la infertilidad como un asunto de salud pública. Ecuador no está al margen de este problema: aunque no hay estadísticas oficiales,

pero ciertos especialistas creen que de 10 a 15 por ciento de parejas tienen problemas para procrear. (13)

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, estadísticamente las causas de infertilidad o de esterilidad corresponden en una proporción similar a hombres y mujeres. O lo que es lo mismo, la OMS afirma que un 40% de las parejas estériles lo son por problemas de la mujer, y otro 40% por problemas del hombre. El 20% restante corresponde a un causante mixto. A pesar de esta paridad en las cifras, parece que en la actualidad el porcentaje de hombres con este tipo de problemas está creciendo, dado que sus espermatozoides están sufriendo un importante descenso en cuanto a su calidad. (41)

Entre las principales causas del aumento de la infertilidad destacan, por un lado, las sociales, provocadas fundamentalmente por los cambios en el estilo de vida, y, sobre todo, al retraso de la maternidad, motivado en gran parte por la incorporación de la mujer al mundo laboral. Así, a partir de los 35 años, la fertilidad de la mujer empieza a caer y desde los 40, las probabilidades de sufrir un aborto son de entre el 40 y el 45% (13).

Es por esto la importancia de combatir la enfermedad teniendo alternativas con el uso de plantas medicinales como son: la alfalfa, guayusa, linaza, salvia, entre otras, que son especies utilizadas por sus propiedades estrogénicas.

A partir de la publicación del bioensayo de Doisy para la identificación de fitoestrógenos en 1923, varios extractos de plantas fueron reportados con actividad estrogénica. Para 1954, Bradbury y White mencionaron a 53 plantas que poseían suficiente actividad estrogénica en animales (17) y en 1975, ya eran cientos los informes de plantas que registraron dicha actividad. (52)

Muchas investigaciones tempranas sobre los fitoestrógenos fueron realizadas en animales, pero durante la última década ha surgido un gran interés sobre sus efectos en los humanos, pues según la evidencia epidemiológica y algunos trabajos in vitro realizados sugieren que los fitoestrógenos pueden ser protectores contra el desarrollo de algunas enfermedades comunes durante la menopausia. (50)

La primera vez que se descubrió la actividad hormonal de la alfalfa fue en medicina veterinaria. Se observó que los animales que pastaban en campos de alfalfa periódicamente desarrollaban características análogas a los animales tratados con estrógenos sintéticos (GONZÁLEZ, T. VÁZQUEZ, I). Estudios más profundos determinaron la presencia en la alfalfa de una serie de compuestos hormonalmente activos. El más importante grupo de compuestos de este tipo lo constituyen los fitoestrógenos. (30)

Hoy en día, la alfalfa se viene usando para tratar tanto el hipoestrogenismo (escasa secreción de estrógeno) como el hiperestrogenismo (excesiva secreción de estrógeno) debido a su cualidad estabilizadora o alterativa; es decir, su capacidad de mantener el nivel hormonal en un punto ideal. (19)

Con todos los datos que se menciona anteriormente, se busca en el presente trabajo de investigación, determinar el efecto estrogénico del extracto alcohólico de hojas de alfalfa (*Medicago sativa L*) en ratas (*Rattus norvegicus*) mediante el estudio realizado en la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), que permitió comprobar el efecto estrogénico del extracto de alfalfa en 15 ratas de laboratorio, demostrándose que logra incrementar los niveles de estradiol en sangre y gracias a los exámenes histopatológicos se demostró que no tiene efecto tóxico.

## **CAPÍTULO I**

### **1. PARTE TEÓRICA**

#### **1.1. INFERTILIDAD**

La infertilidad es la incapacidad de la pareja de lograr una gestación que lleve al nacimiento de un hijo, después de un año de mantener relaciones sexuales sin métodos de planificación. (13)

Lo que más sorprende de la infertilidad es que en la mayoría de parejas aquejadas de infertilidad, todos los exámenes convencionales que les han practicado han resultado normales. Y que de 20 causas de infertilidad usualmente no se tratan más de una o dos, minimizando cualquier probabilidad de éxito, pues usualmente coexisten varias causas de infertilidad.(47)

La infertilidad es un problema frecuente que consiste en la no concepción después de un año de mantener relaciones sexuales sin ningún medio de planificación. Aproximadamente 20% de las parejas están aquejadas por infertilidad, la cual podría ser curable en más del 90% de los casos si se hiciera un diagnóstico adecuado. Sin embargo la falta de dicho diagnóstico impide lograr el embarazo. (31) (53)

## **1.2. INFERTILIDAD FEMENINA**

Aproximadamente 20% de las parejas tienen dificultad para lograr el embarazo. Y la gran mayoría de las parejas infértiles presenta problemas tanto en el hombre como en la mujer. (41)

Ni la infertilidad ni la esterilidad son enfermedades ni existe una solución mejor que otra. Estos trastornos son únicamente manifestaciones de verdaderas enfermedades o defectos, sin cuyo diagnóstico la posibilidad de embarazo será remota o imposible.

Usualmente los problemas que originan la infertilidad femenina son fáciles de resolver. Afortunadamente rara vez son graves o incurables. Pese a ello muchísimas mujeres son sometidas infructuosamente a procedimientos extremos, costosos y eventualmente peligrosos. El problema radica en no detectar oportuna y correcta de las causas de infertilidad Las causas de infertilidad femenina son múltiples y por tanto no existe un solo tratamiento para curar la infertilidad. El tratamiento depende de la causa. (31)

## **1.3. CAUSAS**

### **1.3.1. DISFUNCIÓN OVULATORIA**

Aunque algunos creen que la endometriosis es la causa más frecuente de infertilidad femenina, ciertas investigaciones indica lo contrario. La disfunción ovulatoria, en la cual la liberación mensual normal de un óvulo de los ovarios de la mujer está afectada, parece ser la causa más importante de infertilidad femenina. Existen varias causas de disfunción ovulatoria, pero la más frecuente es el síndrome de ovarios poliquísticos (SOP). (53)

### **1.3.2. INFERTILIDAD TUBÁRICA**

La infertilidad tubárica es causada por anomalías en las trompas de Falopio, producidas por infecciones tubáricas (enfermedad inflamatoria pélvica) o endometriosis. Muchas veces, la infertilidad tubárica requiere una corrección quirúrgica de las trompas afectadas. (53)

### **1.3.3. ENDOMETRIOSIS**

La endometriosis puede afectar su fertilidad de muchas maneras. Puede causar enfermedad tubárica; puede afectar a los ovarios y a la calidad de los óvulos; y puede aumentar el riesgo de abortos espontáneos. (53)

### **1.3.4. INFERTILIDAD INMUNOLÓGICA**

El hecho que la alteración de la función autoinmune femenina pueda conducir a la infertilidad aún es un tema controvertido. Aunque parezca que una infección no está presente, todavía podría estar latente en el organismo una infección anterior que no fue completamente destruida. Basándose en investigaciones y en otros estudios recientes, se cree que las alteraciones de la autoinmunidad pueden afectar la fertilidad de la mujer, incluso cuando las mismas no requirieran tratamiento médico para otro fin. (53)

### **1.3.5. INFERTILIDAD HORMONAL**

Varias anomalías hormonales, tales como el hipotiroidismo (función tiroidea disminuida), hiperprolactinemia y defectos de la fase lútea (niveles bajos de progesterona), pueden provocar infertilidad. Una mujer que padece hipotiroidismo puede embarazarse pero si el hipotiroidismo es importante, hay altas posibilidades de que la mujer no ovule todos los meses y le llevará un mayor tiempo para lograr el embarazo. (53)

### 1.3.6. INFERTILIDAD INEXPLICABLE

Cuando un médico dice que una paciente tiene infertilidad inexplicable, significa simplemente que el doctor no pudo determinar la causa de la infertilidad de la pareja. Esto se puede deber a que los estudios realizados para detectar la causa sencillamente no fueron suficientes. Las experiencias en infertilidad inexplicable, sugiere que la mayoría son casos no diagnosticados de infertilidad causada por endometriosis o factores inmunológicos. En la mayoría de los casos, con estudios apropiados y exhaustivos, se puede determinar la causa precisa de la infertilidad de la pareja, sin recurrir al vago concepto de “infertilidad inexplicable”. (53)

## 1.4. DIAGNÓSTICOS

El modelo de estudio de infertilidad suele incluir las siguientes pruebas:

### Generales

- **Anamnesis:** Entrevista con la pareja para determinar antecedentes familiares, conocer su vida sexual (frecuencia coital, uso de anticonceptivos, etc.), las características de la menstruación de la mujer, enfermedades anteriores, consumo de drogas y medicamentos, hábitos alimentarios, deportivos y laborales, etc.
- **Exploración física:** Pruebas complementarias para detectar malformaciones, anomalías o enfermedades.

### Específicas para la mujer

- Estudio de la temperatura basal: sirve para comprobar si la menstruación es regular.
- **Análisis hormonales:** Consiste en la búsqueda del nivel plasmático de progesterona los días 22 o 23 del ciclo. También sirve para detectar posibles trastornos endócrinos.

- **Biopsia de endometrio:** análisis de una muestra de tejido para detectar anomalías o enfermedades que impiden la implantación del cigoto.
- **Ecografía transvaginal:** para visualizar malformaciones o anomalías anatómicas (miomas, por ejemplo).
- **Laparoscopia:** observación del abdomen y la pelvis con la introducción de un instrumento óptico, que permite evaluar los órganos genitales internos y determinar la presencia de adherencias y la existencia o no de endometriosis.
- **Histeroscopia:** observación ocular del útero mediante un instrumento llamado histeroscopio. Es útil para el diagnóstico de pólipos endocavitarios y sinequias (adherencias) uterinas.
- **Histerosalpingografía:** radiografía del útero y las trompas con una sustancia de contraste que se inyecta desde el cuello del útero.

**Prueba postcoital o test de Sims-Huhner:** evalúa la interacción de los espermatozoides con el aparato genital femenino. Para ello, se obtiene en el momento ovulatorio y tras 5 a 15 horas de una relación sexual, una muestra del moco cervical que se analiza para determinar sus características físicas y la presencia de espermatozoides. (31) (53)

## 1.5. SÍNTOMAS

Los síntomas más comunes que presenta la mujer con problemas de fertilidad son:

- Ciclos irregulares o ausencia de ciclo
- Coágulos con la menstruación
- Cólicos menstruales
- Cambios importantes en el estado de ánimo antes o durante el período
- Dolor de cintura
- Dolor durante la relación sexual

- Flujos
- Hemorragia menstrual abundante o muy larga
- Hemorragias genitales anormales
- Inflamación abdominal baja

Prácticamente toda mujer que tenga problemas de infertilidad tendrá uno o varios de los síntomas anteriores y aunque los exámenes convencionales para infertilidad no demuestren el problema, hasta no solucionar la causa, no se logrará el embarazo. Por ello muchas mujeres con estos síntomas terminan sometidas a procedimientos infructuosos por lo que su posibilidad de curación será cada vez más reducida. (31) (53)

## **1.6. FISIOLÓGÍA FEMENINA**

Los principales órganos del aparato reproductor femenino humano, los más importantes son los ovarios, las trompas de Falopio, el útero y la vagina. La reproducción comienza con el desarrollo de los óvulos en los ovarios. En la mitad de cada ciclo sexual mensual, se expulsa un único ovulo de un folículo ovárico hacia la cavidad abdominal, junto a los extremos fimbriados de las dos trompas de Falopio. Este óvulo atraviesa una de las trompas de Falopio y llega al útero; si ha sido fecundado por un espermatozoide, se implanta en el útero, donde se desarrolla convirtiéndose en un feto, una placenta y unas membranas fetales, hasta convertirse finalmente en un recién nacido. (14)

Durante la vida fetal, la superficie externa del ovario está revestida por un epitelio germinal, que deriva embriológicamente de manera directa del epitelio de las crestas germinales. Al desarrollarse el feto femenino, del epitelio germinal óvulos primordiales que emigran al interior de la sustancia de la corteza ovárica. Cada óvulo se rodea de una capa de células fusiformes del estroma ovárico (el tejido de sostén del ovario) y hace que adquieran características epitelioideas, son las células de la granulosa. El óvulo rodeado de una única capa de células de la granulosa recibe el nombre de folículo primordial. (17) (18)

### 1.6.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL OVARIO

El ovario es una glándula mixta que por una parte elabora el óvulo, para ser fecundado por el espermatozoide y constituir el nuevo germen, y por otra fabrica productos hormonales que pasan a la sangre y regulan la función sexual femenina en sus diversos aspectos. Es decir, cumple una doble función: generativa y endocrina. (21) (33)

Los ovarios son dos, situados uno en la parte derecha e inferior de la pelvis y el otro en el punto simétrico del lado izquierdo. En la mujer adulta su forma es la de un haba, y sus dimensiones son de 2,5 a 5 cm de largo, 1,5 a 3 cm de ancho, 0,6 a 1,5 cm de espesor, y su peso de 7 a 14 gramos. Su consistencia es resistente y su color grisáceo. En su superficie externa se observan varias abolladuras, las que corresponden a los folículos en diverso grado de evolución; alguna de éstas, de tamaño mayor que las restantes, puede pertenecer a un cuerpo amarillo reciente o de embarazo. (21)

Histológicamente se encuentra formado por:

- La cortical: Recubierta por un epitelio superficial, conocido impropriamente como epitelio germinal, situándose inmediatamente después un estroma denso: la túnica albugínea, seguido de un espacio más laxo donde están las estructuras funcionales, los folículos.
- La medular: Es una continuación del hilio ovárico, por donde transcurren los vasos sanguíneos, que llegan por el ligamento infundíbulo pélvico, está formada por un estroma entre el que pueden distinguirse restos embriológicos mesonéfricos y elementos celulares de aspecto secretor.

El folículo ovárico es una unidad morfológica y funcional; existen en número de 400.000 por ovario, pero en distintos grados de evolución. Comienza por ser una célula grande, que es el futuro óvulo, rodeada por un conjunto de células foliculares; a medida que crece y madura el óvulo, las células foliculares aumentan de número y terminan por dejar en el centro del

folículo un espacio lleno de líquido; en la mujer adulta cada 28 días revienta un folículo y expulsa al óvulo correspondiente, el que penetra en la trompa; el folículo vacío es invadido por sangre, capilares sanguíneos y células, constituyendo el cuerpo amarillo, que es una glándula endocrina. Los folículos que no llegan a transformarse en cuerpos amarillos retrogradan y desaparecen (atresia folicular) y lo mismo sucede con el cuerpo amarillo, salvo en caso de embarazo; entonces persiste unos 5 meses, constituyendo el cuerpo amarillo verdadero. Se calcula que en la vida de una mujer sólo llegan a completar su evolución unos 300 o 400 folículos. (21) (33)

Las trompas son dos tubos musculares, de 12 cm de longitud, por 1 cm de ancho, que se extienden simétricamente desde el útero hasta el ovario correspondiente donde se ensanchan en forma de pabellón. Su interior está lleno de repliegues y mojado por una secreción mucosa que probablemente ayuda al huevo en su nutrición; las células contienen pequeñas prolongaciones (cilios) dotadas de movimiento que facilitan la progresión del huevo hacia el útero. (33)

#### **1.6.1.1. Reguladores de la función ovárica**

La función ovárica se produce, en gran medida, bajo la regulación de las gonadotropinas hipofisarias y la prolactina (PRL). La Prolactina aumenta y mantiene los receptores de LH en el cuerpo lúteo y probablemente también colabora en la ovulación inhibiendo el activador del plasminógeno. (21)

Tanto los estrógenos, como los andrógenos y la progesterona están involucrados en el funcionalismo ovárico. Los Estrógenos actúan en el crecimiento ovárico a nivel general mediante su acción inhibitoria sobre la liberación de gonadotrofinas. A nivel local colaboran a un aumentar el índice de mitosis de la granulosa, quizás a través del aumento del IGF I, a una mayor actividad aromatasas y al incremento de receptores FSH. (33)

## **1.6.2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL ÚTERO**

El útero es un órgano musculoso, hueco, situado en la parte baja de la pelvis, en comunicación, arriba y a los costados con las trompas, y por debajo con la vagina. Tiene forma de pera aplastada de adelante hacia atrás, con su vértice hacia abajo. Las dimensiones exteriores de este órgano, en estado de reposo, son: longitud 7 cm, ancho 4 cm en las mujeres que no tuvieron hijos y 1 cm más en las que tuvieron, y su peso de 50 a 60 gramos; durante el embarazo aumenta extraordinariamente para contener el feto. La fuerte pared muscular se halla revestida en su parte interna, mirando a la cavidad, por una membrana mucosa llamada endometrio, que sufre cambios periódicos en su grosor y constitución durante cada fase de la vida genital de la mujer. (18) (21)

### **1.6.2.1.1. Histología uterina y endometrial**

El útero está compuesto histológicamente por miometrio y endometrio. El miometrio consiste de fibras musculares lisas dentro de un armazón estructural con una rica irrigación sanguínea arterial y venosa soportado por un tejido conectivo denso subyacente. El miometrio normal de la adulta no-embarazada varía de grosor entre 1,5 a 2,5 cm. (18)

El endometrio en la mujer con ciclos menstruales es una estructura que cambia constantemente. Está compuesto de un epitelio simple columnar y ciliado que es soportado por una matriz subyacente de un estroma de tejido conectivo celular, el cual incluye glándulas simples. El endometrio se divide estructuralmente en tres capas: el estrato basal, el estrato esponjoso y el estrato compacto. El estrato basal constituye la capa más profunda, y cambia poco durante el ciclo menstrual quedando intacta durante la menstruación. Esta es la capa que es importante para el histeroscopista durante la ablación endometrial. Si no se destruye completamente, ocurrirá la regeneración endometrial. La segunda y la tercera capa son consideradas colectivamente como el estrato funcional. (14) (17)

Éstas son las capas que responden a los esteroides ováricos y se desprenden en el momento de la menstruación. La capa intermedia, el estrato esponjoso, es descrita como tal debido a la apariencia esponjosa del estroma, versus el estroma del estrato compacto, el cual tiene una apariencia extremadamente densa y compacta. Estas capas son irrigadas por la vasculatura que proviene de las arterias uterinas. Las arterias rectas son cortas y proporcionan la irrigación arterial al estrato basal más estático. Las arterias espirales, al contrario de las arterias rectas, presentan una respuesta esteroidea elevada e irrigan a la rica vasculatura capilar del estrato funcional. (17)

#### **1.6.2.2. Receptores uterinos de estrógeno y de progesterona**

La ciclicidad del endometrio del útero premenopáusico en respuesta a las hormonas circulantes estrógeno y progesterona requiere de la presencia de receptores de hormonas esteroideas en el tejido. Los receptores esteroideos son proteínas intracelulares que captan y enlazan sus respectivas hormonas de manera específica y con una elevada afinidad. Por definición, un receptor estrogénico es una proteína que capta y enlaza con gran afinidad sólo a los estrógenos pertenecientes al grupo de compuestos conocidos como hormonas esteroideas. Una elevada afinidad implica que la avidéz del receptor por la hormona es lo suficientemente grande como para que los cambios en las concentraciones circulantes de las hormonas sean reflejados por la variación en la porción de receptores ocupados por las hormonas. La afinidad de receptor por su hormona es usualmente presentada como una constante de disociación, una concentración molar. La disociación constante es igual a la concentración de la hormona en la cual cualquier población de receptores está ocupada en su mitad. (21)

La distribución de receptores estrogénicos y de progesterona dentro del útero humano no es uniforme. Ha sido reportado que la cantidad de ambos receptores en el miometrio es dos a diez veces menor que en el endometrio. También se ha reportado que existe una distribución desigual de los receptores estrogénicos y de progesterona dentro del endometrio propiamente

dicho. Una disminución pronunciada de ambos receptores, en aproximadamente 10 veces, existe a medida que se transcurre desde las secciones del fondo hasta las secciones cervicales. Este pronunciado gradiente de receptores persiste a lo largo del ciclo menstrual y después de la menopausia. (21)

Existe un patrón cíclico en cuanto a la cantidad de receptores estrogénicos y de progesterona en el útero durante el ciclo menstrual. En los humanos, al igual que en otras especies, el receptor de progesterona es una proteína inducida por el estrógeno. (18)

## **1.7. SISTEMA HORMONAL FEMENINO**

1. Una hormona liberadora hipotalámica, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).
2. Las hormonas adenohipofisarias, hormona folículo folículos estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), ambas secretadas en respuesta a la hormona liberadora GnRH del hipotálamo.
3. Las hormonas ováricas, estrógeno y progesterona, que son secretadas por los ovarios en respuesta a las dos hormonas adenohipofisarias. (33)

### **1.7.1. FORMACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS**

Los esteroides ováricos, al igual que las demás hormonas esteroideas, derivan del colesterol. El ovario puede sintetizar colesterol, pero también utiliza el que obtiene de las lipoproteínas circulantes como sustrato para la síntesis de hormonas esteroideas se cree que todas las células ováricas poseen la dotación enzimática completa necesaria para convertir el colesterol en estradiol; sin embargo, los diferentes tipos celulares del ovario contiene cantidades variables de estas enzimas, por lo que en cada compartimento principal predominan hormonas diferentes. Por ejemplo, el cuerpo lúteo produce fundamentalmente progesterona y 17-hidroprogesterona, mientras que las células de la teca y del estroma convierten el colesterol en los andrógenos androsterona y testosterona. (3) (33).

Los lugares principales de acción de la hormona luteinizante LH y la hormona folículo estimulante FSH. La LH actúan fundamentalmente regulando la primera etapa de la biosíntesis de hormonas esteroideas, es decir, la transformación del colesterol dentro de la mitocondria mediante la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) y su conversión en pregnenolona. La FSH actúa regulando el proceso final, por lo que los andrógenos son aromatizados a estrógenos. Por eso cuando no existe FSH, la hormona LH aumenta el flujo de sustrato y la formación de andrógenos, de progesterona o de ambos, mientras que en ausencia de LH, el efecto de la FSH es sólo menor, por la escasez de sustratos disponibles para la aromatización (33).

#### **1.7.1.1. Estrógenos**

Los estrógenos naturales son esteroides de 18 átomos de carbono con un anillo aromático, un grupo fenólico hidroxilo en posición C-3 y un grupo (estradiol) o cetónico (estrona) en posición C-17. El principal estrógeno secretado por el ovario es el estradiol. La estrona también es secretada en el ovario, aunque su fuente principal es la conversión extraovárica de androstenodiona en los tejidos periféricos. (21)

El estriol (16-hidroxiestradiol), el estrógeno preponderante en la orina, procede de la 16-hidroxilación de la estrona y del estradiol. Los catecolestrogenos se producen por la hidroxilación de los estrógenos en posición C-2 o C-4 y actúan, a veces, como mediadores intracelulares de algunos efectos estrogénicos. Los estrógenos fomentan el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en la mujer y provocan el crecimiento uterino, el engrosamiento de la mucosa vaginal, la disminución de la disminución del moco cervical y el desarrollo del sistema de conductos mamarios. Los estrógenos también alteran los perfiles lipídicos y ejercen efectos vasculares que ayudan a prevenir la enfermedades cardiovasculares. (21)

El mecanismo de acción de estas hormonas en los tejidos efectores es similar al de otras hormonas esteroideas, es decir, comprende la unión a un receptor nuclear esteroides receptor

estrogénico (ER)  $\alpha$  o  $\beta$  y el logro de la transcripción del ARN mensajero, que a su vez aumenta la síntesis de proteínas en el citoplasma celular. Estos receptores tienen sitios específicos de expresión en los tejidos y se unen a diferentes estrógenos con distinta afinidad, confiriéndoles así acciones específicas. (21).

### **1.7.1.2. Progesterona**

La progesterona, el esteroide de 21 átomos de carbono (Fig.2.), es la principal hormona secretada por el cuerpo lúteo y la responsable del efecto gestágeno, es decir de la inducción de la actividad secretora en el endometrio del útero, previamente estimulado por los estrógenos, como para la implantación del huevo fecundado. La progesterona también induce la reacción decidual del endometrio. Otros efectos consisten en la inhibición de las contracciones uterinas, el aumento de la viscosidad del moco cervical, el desarrollo glandular de la mama y el ascenso de la temperatura basal (efecto termogénico). (21).

### **1.7.1.3. Andrógenos**

El ovario sintetiza diversos esteroides de 19 átomos de carbono, como dehidroepiandrosterona, androstenediona, testosterona, fundamentalmente en las células del estroma y de la teca. El principal esteroide de 19 átomos de carbono producido por el ovario es la androstenediona, parte de la cual es secretada hacia el plasma y parte es convertida en estrógenos por las células de la granulosa o en testosterona en el intersticio. La androstenediona también se convierte en testosterona y estrógenos en los tejidos periféricos. Los únicos andrógenos verdaderos que actúan en el receptor androgénico e inducen signos de virilización en la mujer son la testosterona y la dihidrotestosterona. (21).

**TABLA No 1. CONCENTRACIÓN DE LA PRINCIPALES HORMONAS ESTERIODEAS OVÁRICAS EN LA SANGRE DE LAS MUJERES CON CICLOS OVULADORES.**

<b>Esteroides</b>	<b>Unión en plasma</b>	<b>Fase de ciclo menstrual</b>	<b>Concentración plasmática nmol/L (pg/mL)</b>
<b>Estradiol</b>	TeBG y albúmina	Folicular Lútea	0,07-2.6 (0.02-0.7) 0.7 (0.2)
<b>Estrona</b>	Albúmina	Folicular Lútea	0.2-1.1 (0.05-0.3) 0.4 (0.1)
<b>Progesterona</b>	CBG y albúmina	Folicular Lútea	3 (1) 16-80 (5-25)
<b>Androstenodiona</b>	Albúmina	-----	5.6 (1.6)
<b>Testosterona</b>	TeBG y albúmina	-----	1.4 (0.4)

FUENTE: LIPSETT YEN Y otros., FILADELFIA., 1999. (14).

### 1.7.2. FUNCIONES DE LAS HORMONAS OVÁRICAS

Los dos tipos de hormonas sexuales ováricas son los estrógenos y los progestágenos. El estrógeno más importante, con diferencia, es la hormona estradiol, y el progestágeno más importante es, también con diferencia, la progesterona. Los estrógenos promueven principalmente la proliferación y el crecimiento de células específicas del cuerpo que son responsables del desarrollo de la mayoría de los caracteres sexuales secundarios de la mujer. Por otra parte los progestágenos están implicados de forma casi exclusiva en la preparación del útero para la gestación y de las mamas para la lactancia. (14).

**Química de los estrógenos:** en la mujer normal no gestante, sólo los ovarios secretan cantidades importantes de estrógenos, aunque también las cortezas suprarrenales secretan pequeñas cantidades. En el embarazo, grandes cantidades de estrógenos son secretadas también por la placenta. En el plasma sólo hay cantidades significativas de tres estrógenos:  $\beta$ -estradiol, estrona y estriol. El principal estrógeno secretado por los ovarios es el  $\beta$ -estradiol. También se secretan pequeñas cantidades de estrona, pero la mayor parte de ella se forma en los tejidos periféricos a partir de andrógenos secretados por las cortezas suprarrenales y por las células de la teca ovárica. El estriol es un estrógeno débil; es un

producto oxidativo derivado tanto del estradiol como de la estrona, y la conversión tiene lugar principalmente en el hígado.

La potencia estrogénica del  $\beta$ -estradiol, es 12 veces la de la estrona y 80 veces la del estriol. Considerando estas potencias relativas, puede verse que el efecto estrogénico del  $\beta$ -estradiol es habitualmente muchas veces mayor que el de los dos otros estrógenos juntos. Por esta razón, se considera que el estradiol es el estrógeno principal, aunque los efectos estrogénicos de la estrona están lejos de ser despreciables. (14).

**Química de los progestágenos:** el principal progestágeno, es la progesterona. Sin embargo, junto a la progesterona se secretan pequeñas cantidades de otro progestágeno, la 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona, que tiene esencialmente los mismos efectos. Sin embargo, a efectos prácticos, es razonable considerar que la progesterona es el único progestágeno importante. (14).

### **1.7.3. TRANSPORTE DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA EN LA SANGRE**

Tanto los estrógenos como la progesterona son transportados en la sangre ligados principalmente a albúminas y a globulinas específicas transportadoras de estrógenos y de progesterona. La unión entre estas hormonas y las proteínas plasmáticas es lo suficientemente laxa como para que sean rápidamente liberadas a los tejidos durante un periodo de 30 minutos más o menos. (17)

#### **1.7.3.1. Función del hígado en la degradación de los estrógenos**

El hígado conjuga los estrógenos para formar glucoronidos y sulfatos, y aproximadamente la quinta parte de estos productos conjugados es excretada en la bilis, mientras que la mayor parte del resto lo es por la orina. Además, el hígado convierte los potentes estrógenos estradiol y estrona en el estrógeno casi inactivo estriol. Por tanto, la disminución de la

función hepática realmente aumenta la actividad de los estrógenos en el organismo, causando en ocasiones hiperestrogenismo. (17).

### **1.7.3.2. Estrógenos sobre el útero y sobre los órganos sexuales externos femeninos**

Durante la niñez, sólo se secretan infinitas cantidades de estrógenos, pero en la pubertad, la cantidad de estrógenos secretados bajo la influencia de las gonadotropinas hipofisarias aumentan 20 veces o más. En este momento, los órganos sexuales infantiles se convierten en los de una mujer adulta. Los ovarios las trompas de Falopio, el útero y la vagina aumentan varias veces de tamaño. También crecen los genitales externos, con depósito de grasa en el monte de Venus y los labios mayores, y aumento de tamaño de los labios menores. (33)

Además los estrógenos transforman el epitelio vaginal de cubico a estratificado, que se considera más resistente a los traumatismos e infecciones que el epitelio prepuberal. Las infecciones de las niñas, como la vaginitis gonocócica, pueden curarse mediante la administración de estrógenos simplemente debido a que aumentan la resistencia del epitelio vaginal. (14) (33)

Durante unos años tras la pubertad, el tamaño del útero aumenta de dos a tres veces. Más importante que el aumento de tamaño son los cambios que se producen en el endometrio bajo la influencia de los estrógenos, pues los estrógenos una llamativa proliferación del estroma endometrial y un gran aumento del desarrollo de las glándulas endometriales, que serán utilizadas para colaborar en la nutrición del óvulo implantado. (33).

### **1.7.3.3. Efecto de los estrógenos sobre las trompas de Falopio**

Los estrógenos tienen un efecto sobre el revestimiento mucoso de las trompas de Falopio similar al que ejerce en el endometrio uterino; hacen que los tejidos glandulares proliferen y, lo que es especialmente importante, hacen que aumenten el número de células epiteliales

ciliadas que revisten las trompas de Falopio. También se facilita considerablemente la actividad de los cilios, que siempre baten en dirección del útero. Esto ayuda a propulsar hacia el útero el óvulo fecundado. (14) (33).

#### **1.7.3.4. Efecto de los estrógenos sobre la mamas**

Las mamas primordiales de la mujer y del varón son exactamente iguales, y bajo la influencia de las hormonas adecuadas, la mama masculina por lo menos durante los dos primeros decimos de vida puede desarrollarse lo suficiente como para producir leche de la misma manera que la mama femenina.

Los estrógenos provocan: 1) el desarrollo de los tejidos del estroma mamario; 2) el crecimiento de un extenso sistema de conductos, y 3) el depósito de grasa en la mamas. Los lobulillos y los alveolos mamarios sólo se desarrollan en pequeño grado bajo la influencia de los estrógenos solos, pero son la progesterona y la prolactina las que producen el crecimiento y funcionamiento determinantes de estas estructuras. (18).

#### **1.7.3.5. Efecto de los estrógenos sobre el esqueleto**

Los estrógenos producen un aumento de la actividad osteoblástica en los huesos. Por tanto, en la pubertad cuando la mujer entra en sus años reproductores, su crecimiento se hace rápido durante varios años. Sin embargo, los estrógenos ejercen otro poderoso efecto sobre el crecimiento del esqueleto, es decir, dan lugar a la fusión temprana de la epífisis con las diáfisis de los huesos largos. Este efecto es mucho más intenso en la mujer que el efecto correspondiente de la testosterona en el varón. Como consecuencia, el crecimiento de la mujer cesa habitualmente varios años antes que el del varón. El eunuco femenino que carece de producción de estrógenos suele crecer varios centímetros más que la mujer madura normal, debido a que no se produce la fusión temprana de las epífisis. (21) (33)

Tras la menopausia, casi no se secretan los estrógenos por los ovarios. Este déficit de estrógenos determina: 1) una disminución de la actividad osteoblástica de los huesos; 2) una disminución de la matriz ósea, y 3) una disminución del depósito de calcio y fosfato. En algunas mujeres, este efecto es extremadamente grave. Como debilita mucho los huesos y ocasiona fracturas óseas, especialmente de las vértebras, una gran proporción de mujeres posmenopáusicas debe recibir tratamiento profiláctico de sustitución con estrógenos para prevenir los efectos osteoporóticos. (18)

#### **1.7.3.6. Efecto de los estrógenos sobre el depósito de proteínas**

Los estrógenos producen un ligero aumento de las proteínas totales del organismo, lo que se manifiesta por un balance nitrogenado ligeramente positivo cuando se administran estrógenos. Esto es consecuencia, principalmente, del efecto promotor del crecimiento que tienen los estrógenos sobre los órganos sexuales, los huesos y algunos tejidos más del cuerpo. La facilitación del depósito de proteínas que tiene la testosterona es mucho más generalizada y varias veces más potente que la causada por los estrógenos. (14)

#### **1.7.3.7. Efecto de los estrógenos sobre el metabolismo**

Los estrógenos aumentan ligeramente la tasa de metabolismo corporal, pero sólo un tercio de lo que hace la testosterona, la hormona sexual masculina. También provocan el aumento del depósito de grasa en los tejidos subcutáneos. Como consecuencia, la densidad general del cuerpo femenino, tal y como se pone en manifiesto por la flotación en el agua, es considerablemente menor que la del cuerpo masculino, que contiene más proteínas y menos grasa. Además del depósito de grasa en las mamas y en los tejidos subcutáneos, los estrógenos inducen el depósito de grasa en las nalgas y en los muslos, característico de la figura femenina. (14).

## 1.8. DROGAS VEGETALES

La palabra “droga” tiene varias definiciones, según sea el campo en el que se utilice. En el caso de la fitoterapia, se considera que una droga es aquella parte de una planta que produce un efecto biológico sobre el organismo. Definir droga vegetal como “la planta entera o partes de éstas frescas o convenientemente desecadas que pueden utilizarse como materia prima para la elaboración de formas farmacéuticas o para la obtención de extractos utilizables en terapéutica”. (2)

## 1.9. ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

### 1.9.1. HISTORIA DE LA ALFALFA

Como planta forrajera ya era empleada por la antigua cultura árabe como alimento de sus caballos, siendo conocida con la denominación *alfasasat*, de donde derivaría finalmente <<alfalfa>>. El nombre genérico *Medicago* provendría de Medea, una antigua ciudad del norte de África de donde sería oriunda; mientras que *sativa* significa cultivada. Parece ser que de los países árabes llegó a China hace unos 2000 años y a Grecia en el siglo V antes de Cristo. Conocida en el resto de Europa recién en el siglo XVII, recibió el nombre de *lucerna* (que significa luz, luminosidad) en alusión al aspecto brillante y lustroso que tiene sus semillas. (4)

### 1.9.2. NOMBRE CIENTÍFICO: (*Medicago sativa* L.)



FOTOGRAFÍA No 1. ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

### **1.9.3. NOMBRES VULGARES:**

**Español:** alfalfa, mielga”.

**Portugués:** alfalfa, mielga, luzerna

**Inglés:** alfalfa, lucerne

**Otros:** Luzerne (Francés), cedrangola; erba medica, luzerna (Italiano). (19)

**1.9.4. FAMILIA:** Leguminosae (Leguminosas) = Fabaceae (Fabáceas). (19)

### **1.9.5. HÁBITAT Y CARACTERÍSTICAS:**

Planta perenne de la familia de las labiadas de hasta 80 cm. Tallos erectos, cubiertos de una vellosidad blanquecina. Hojas compuestas, trifoliadas con folíolos obovados, dentados en el ápice. Flores de color azul o púrpura con pétalos de hasta 1 cm, agrupadas en racimos de unos 4 cm de longitud sobre pecíolos de inferior longitud al tubo del cáliz. Raíz principal muy larga de unos 2 a 4 m. Fruto en legumbre de 4 a 7 mm de diámetro, sin espinas, en forma de espiral con una vuelta y media hasta tres vueltas y media. Ampliamente cultivadas como planta forrajera y muchas veces naturalizada. Se puede encontrar junto a los caminos, en sembrados, al borde las carreteras y terrenos secos de climas fríos o templados. (49)

### **1.9.6. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN**

Planta nativa de Asia central (Transcaucasia, Armenia, Persia, etc.). Existen tipos silvestres en el Cáucaso y en las regiones montañosas de Afganistán, Irán y regiones adyacentes. Amplísimamente cultivada en todo el mundo como planta forrajera para el ganado. Es la planta forrajera más antigua y valiosa. En América se cultiva desde la llegada de los europeos. En el Perú se cultivan variedades tanto al nivel del mar como en los Andes hasta cerca de 3,700 m s. m. (31) (49)

### 1.9.7. DESCRIPCIÓN

Se trata de una planta forrajera perenne, perteneciente a la familia de las Fabáceas (Leguminosas), caracterizada por presentar un tallo subterráneo, a menudo leñoso y muy ramificado, que puede alcanzar entre 30cm y un metro de alto, formando muchas veces una especie de mata espesa. Las hojas son pinnadas, obovada-oblongas, con tres folíolos dentados de hasta 3 cm de largo, mientras que las flores presentan una tonalidad azul violácea, estando dispuestas en racimos axilares haciendo su aparición desde fines de verano hasta mediados del otoño. El fruto es una pequeña legumbre arrollada similar a un pequeño caracol, con gran cantidad de semillas brillantes en su interior. (31)

### 1.9.8. COMPONENTES

- Flavonas e Isoflavonas (sumidades): tricina, 3-metiltricetina, crisoeriol, genisteína, biochanina A, formononetina, daidzeina y 5' metoxisativano.
- Saponósidos (2-3%): Sus geninas son derivados del oleaneno. Presentes mayoritariamente en las hojas y en menor medida en la raíz.
- Derivados cumarínicos (sumidades): cumestrol, medicagol, sativol, trifoliol, lucernol, dafnoretina.
- Fitoesteroles:  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -espinasterol, estigmasterol, cicloartenol, campesterol.
- Alcaloides (semillas): estaquidrina, homoestaquidrina y trigonelina.
- Otros: alcoholes de alto peso molecular (octacosanol, triacontanol), colina, trimetilamina, betaína, principios amargos, ácidos orgánicos (málico, oxálico, malónico, maleico y quínico), pigmentos (clorofila, xantófila, caroteno, antocianinas), polioles, purinas y piridinas, aminoácidos (valina, lisina, arginina, leucina, isoleucina, triptófano, fenilalanina, metionina y treonina). (19)

La alfalfa posee 5 fitoestrógenos: genisteína, daidzeína, cumestrol, formononetina, y biochanina A. La mayoría de los fitoestrógenos son isoflavonas, mientras que el cumestrol es un

derivado de la cumarina. Aunque todos carecen de una verdadera estructura esteroidea, sí tienen al menos un anillo fenólico y grupos hidroxilo libres en las posiciones 7 y 12. Los principales fitosteroles presentes en la alfalfa son el beta-sitosterol y el estigmasterol. En menor cantidad se encuentra el campesterol y el alfa-espinestrol. (49)

### **1.9.9. ACCIONES FARMACOLÓGICAS**

La alfalfa ha recibido la reconsideración científica debido a sus invalorables aportes nutricionales. Más allá de su reconocida actividad antianémica y anticoagulante, se destaca en la alfalfa su contenido en fitoestrógenos, lo que hace de esta especie un recurso muy importante en el abordaje de cuadros menopáusicos. Para una mejor comprensión se detalla las siguientes acciones:

#### **1.9.9.1. Aspectos Nutricionales**

La alfalfa presenta proporcionalmente casi cuatro veces más cantidad de vitamina C que el propio zumo de limón. En prisioneros alemanes durante la 1ª. Guerra Mundial, se pudo observar el efecto antiescorbútico del jugo de alfalfa (30-60g/día) durante 3 semanas de tratamiento (Luclerc H., 1940). El alto contenido en minerales le proporciona virtudes remineralizantes muy útiles durante la etapa de crecimiento como en la senectud. Entre los fosfolípidos presentes en la alfalfa figuran la lecitina (fosfatidil-colina) y la cefalina (fosfatidiletanolamida). La primera es la componente más importante de la sustancia blanca encefálica, colaborando con la síntesis de acetilcolina y con el aporte de fosforo necesario para el buen funcionamiento del sistema nervioso (Malinow M. et al., 1982). (19)

En cuanto al aporte de proteínas, el mismo es considerado de alta calidad ya que contiene un buen número de aminoácidos esenciales y la mayoría de los no esenciales (Lyon J., 1987). La alfalfa fresca contiene entre 85 y 90% de *trans-caroteno* y alrededor de 10-15% de

isómeros *cis*. Cuando se seca, se produce una isomerización provocando mayores cantidades de *cis-caroteno*, con la cual la actividad de vitamina A puede disminuir hasta un 25%. Para evitar esta pérdida se emplea el jugo fresco (Barceló Coll et al., 1991). Sin embargo, la alta presencia de saponinas puede comportarse como un factor antinutricional en la alimentación de animales vacunos y equinos. Se ha visto que componentes proteicos y enzimáticos de la semilla (termolábiles) inhiben a la vitamina E (Lindner E., 1995; Sen S. et al., 1998). (19)

### **1.9.9.2. Actividad Antianémica – Antihemorrágica**

El alto contenido en sales de hierro de relativa buena absorción la convierte en una importante alternativa nutricional frente a cuadros de anemia. La alfalfa es además una muy buena fuente de clorofila, lo cual es útil también en casos de anemia ya que la fórmula de la clorofila es muy similar al de la hemoglobina, diferenciándose en la presencia de Mg en lugar de Fe. Existe una relación entre la cantidad de clorofila y la vitamina K<sub>1</sub> (una molécula de vitamina K<sub>1</sub> por cada 10 moléculas de clorofila). El aporte de vitamina K<sub>1</sub> constituye una excelente fuente hemostática y antihemorrágica, diferenciándose de la vitamina K<sub>2</sub> originada por las bacterias intestinales. Debe recordarse que la vitamina K es indispensable para la síntesis hepática de determinados factores de la coagulación como el factor II o protrombina, factor VII o proconvertina, factor IX o factor antihemofílico B y factor X o factor Stuart (Molinero I., 1992; Alonso J., 1998).(19)

### **1.9.9.3. Actividad Estrogénica**

Posee actividad fitoestrogénica debido a la presencia entre sus principios activos de *isoflavonas* y *cumestrol*. Las *isoflavonas* y *cumestrol* son las fuentes hormonales de la alfalfa, observándose en animales rumiantes actividad estrogénica importante. La administración de *cumestrol* a gallinas de corta edad demostró incrementar la maduración de las mismas, pero con disminución en la población de huevos (Leung A. & Foster S., 1996).

El tenor en *isoflavonas* de la alfalfa es máximo en primavera y mínima en verano, lo cual resulta importante a la hora de la recolección (Molinero I., 1992). Las *isoflavonas* de la alfalfa ocupan los receptores para el 17 – beta-estradiol, pero la constante de unión es muy inferior a la de los estrógenos de los mamíferos (Drane H. et al., 1980). En estudios in vitro estas *isoflavonas* demostraron efectos proliferativos sobre un modelo de células de cáncer de mama MCF-7, lo cual es suprimido por antagonistas estrogénicos (Boue S. et al., 2003). (19)

En mujeres consumidoras de alfalfa se ha observado un aumento en el desarrollo mamario, mayor incorporación de calcio en los huesos, incremento en la población de leche y un estímulo para la llegada de la menstruación (Quattrucci E., 1987). Un estudio clínico realizado con 30 mujeres portadoras de síntomas neurovegetativos típicos de la menopausia (calores= hotflushes, insomnio, cefalea, palpitaciones, etc.), determinó los beneficios de un extracto elaborado con hojas de *Salvia officinalis* y hojas de *Medicago sativa* administrado por vía oral durante 3 meses de tratamiento. A nivel sanguíneo se pudo observar un incremento en los niveles de respuesta de prolactina y TSH hacia la TRH. En tanto los niveles basales de estradiol, hormonas luteinizante y folículo-estimulante, prolactina y tiroxina no evidenciaron cambios. El preparado se concluye, presenta en efecto antidopaminérgico suave sin efectos adversos de consideración (De Leo V. et al., 1998). (19)

#### **1.9.9.4. Actividad Hipolipemiante**

Estudios en monos indicaron una actividad hipolipemiante de la alfalfa, sobretodo en la reducción del colesterol plasmático, lo cual estaría en relación a la actividad de los saponósidos de la raíz, los que afectarían la absorción y excreción de colesterol al formar complejos insolubles no absorbibles por el intestino. Los ensayos en animales determinaron que aquellos que recibieron extractos de raíz de alfalfa presentaron una significativa reducción en sus niveles de colesterol total LDL y VLDL colesterol, fosfolípidos,

triglicéridos y un incremento de la fracción HDL- colesterol (Malinow M., 1997). En un estudio llevado a cabo en 15 pacientes con hiperlipoproteinemia tipo II, la administración junto a una dieta hipolipemiante de 40 g de extracto de semillas de alfalfa, tres veces al día durante ocho semanas, produjo una reducción de los niveles de colesterol total elevados (Molgaård J. et al., 1987). (19)

#### **1.9.9.5. Actividad Hipoglucemiante**

El alto tenor en manganeso estaría relacionado en parte con la actividad hipoglucemiante de la alfalfa. La administración de 5-10mg de clorhidrato de manganeso en pacientes diabéticos insulino-dependiente demostró en algunos casos reducir los requerimientos de dicha hormona (Rubenstein A. et al., 1942). La administración de raíz de alfalfa (62.5g/k) en la dieta de ratas diabéticas bajo inducción por estreptozotocina, produjo efectos hipoglucemiantes significativos. Por otra parte la administración del extracto acuoso de alfalfa (1mh/ml) demostró estimular el transporte de 2-deoxiglucosa, incrementó la oxidación de glucosa y produjo una mayor producción de glucógeno en músculo abdominal de ratones. El suministro de 0.25-1 mg/ml del extracto acuoso de alfalfa en ratones evidenció una mayor secreción de insulina por parte de células  $\beta$ -pancreáticas, a los 20 minutos de administrado el extracto (Gray A. &Flatt P., 1997). Estudios *in vitro* a partir de un modelo de difusión sobre tracto intestinal de ratas, determinó una disminución en la absorción de glucosa luego del suministro de 50 g/l de extracto acuoso de alfalfa (Galagher A et al., 2003). (19)

#### **1.9.10. PROPIEDADES MEDICINALES**

Uno de los usos más prometedores de la alfalfa es en el tratamiento del balance hormonal. Estudios bioquímicos determinaron la presencia en la alfalfa de una serie de compuestos hormonalmente activos. El más importante grupo de compuestos de este tipo lo constituyen

los fitoestrógenos. La genisteína, con 1% y formonetina, con 0.01% son los principales compuestos hormonales activos. El efecto estabilizador o alterativo de los fitoestrógenos significa que puede ser usado tanto en casos de hipoestrogenismo como de hiperestrogenismo. Esto lo consigue gracias a su habilidad para alterar la respuesta biológica a los estrógenos endógenos. (19)

○ **Otros usos**

Antiartístico, antiaterogénico, antibacterial, anticanceroso, anticolesterolémico, antidiabético, antidopaminérgico, antiescorbútico, antiespasmódico, antihemorrágico, antipirético, antirreumático, antiviral, aperitivo, ayuda a prevenir males del corazón, ayuda a sobrellevar la convalecencia y la debilidad, ayuda a sobrellevar la menopausia, cardiotónico, contra el herpes simple, contra el hiperestrogenismo, contra el hipoestrogenismo, contra el hipotiroidismo secundario, contra la atrofia vaginal de la menopausia, contra las úlceras pépticas, favorece el incremento de la masa muscular, depurativo, diurético, emenagogo, febrífugo, hemostático, incrementa el apetito, inmunoestimulante (en ratones), regula la menstruación, relajante muscular, sialogogo (aumenta la secreción de saliva), alivia el síndrome premenstrual, combate el exceso de prolactina, contra los ovarios poliquísticos, contra problemas urinarios, contra problemas intestinales, contra cánceres del seno y el útero sensibles al estrógeno, contra los cólicos, mejora el intelecto, tónico general, tónico contra la anemia y después de la pérdida de sangre. (2) (31)

### **1.9.11. DOSIS**

Para obtener el efecto deseado, es imprescindible utilizar los preparados de alfalfa que contengan la mayor concentración posible.

**Infusión:** Al 5-10%. Se administra 2 tazas diarias.

**Extracto seco:** Relación 5:1, se prescriben 1-1,5 g diarios repartidos en 2-3 tomas.

**Extracto fluido:** Relación 1:1 en alcohol al 25%, se administran 5-8 ml diarios, repartidos en 2-3 tomas.

**Tinturas:** Relación 1:10. Se administran 50 a 100 gotas, 2-3 veces al día. (19)

### **1.9.12. CONTRAINDICACIONES**

Las semillas y las sumidades de alfalfa no deben ser consumidas por pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) ni durante la lactancia o el embarazo, ya que han demostrado alterar el ciclo menstrual y la llegada de leche a los conductos galactóforos (Farnsworth N., 1975)... El resto de la planta puede ser consumida en dichos casos aunque no se debe superar las dosis máximas establecidas. (49)

### **1.9.13. INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS**

Las saponinas de las hojas y raíz, como componentes proteicos de la semilla de alfalfa pueden interferir con la utilización de la vitamina E por parte del organismo (Lidner E., 1995; Leung A. & Foster S., 1996). Los pacientes que estén recibiendo terapia anticoagulante (warfirina, heparina, etc.) como aquellos que presenten tumores estrógeno-dependientes deberán abstenerse de ingerir cápsulas o infusiones de alfalfa (D'Arcy P., 1993; Griffith W., 1995). La alfalfa en altas dosis puede interferir con tratamientos hipoglucemiantes (Newall C. & Phillipson J., 2000). (19)

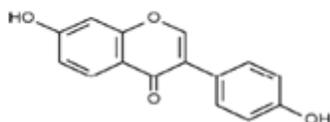
### **1.10. FITOESTRÓGENOS**

Algunos principios activos de los fármacos que se utilizan en la actualidad se obtienen a partir de plantas. Dichos principios activos o metabolitos secundarios se utilizan en forma natural o se modifican para potenciar su actividad biológica. Un grupo de metabolitos que

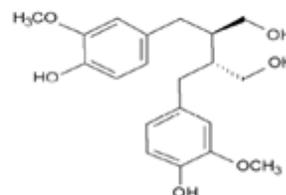
se ha adquirido interés son fitoestrògenos, compuestos que mimetizan o antagonizan la acción de esteroides endógenos en el cuerpo. Existen numerosas caracterizaciones químicas y varios estudios biológicos de estos compuestos, los cuales indican que las posibles aplicaciones médicas son diversas, por ejemplo, en la disminución de la sintomatología de la menopausia y prevención de enfermedades relacionadas con ellas, en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. (5) (9)

Los fitoestrògenos se definen como una serie de compuestos de naturaleza no esteroidea, procedente de distintas especies vegetales y/o de la conversión metabólica de sus precursores, que presentan actividad estrogénica. Existen cuatro clases químicas principales de fitoestrògenos: isoflavonas, lignanos, cumestanos y derivados de resorcinol (Figura N°1.). Son las isoflavonas las que en el momento actual ofrecen un mayor interés en cuanto a su posible utilización en la clínica. (12)

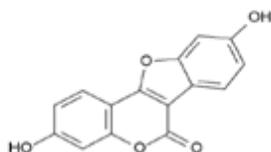
### 1. Isoflavonas



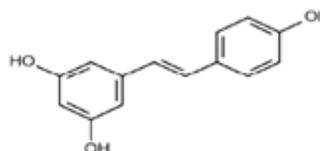
### 2. Lignanos



### 3. Cumestano



### 4. Derivados del resorcinol



**FIGURA No 1. TIPOS DE FITOESTRÒGENOS**

Las isoflavonas son sustancias naturales, son consideradas por su estructura como *fitoestrògenos*; nombre genérico para definir a dichas clases de compuestos que son no

esteroides, difenólicos, que poseen una estructura química similar a la que presentan los estrógenos humanos (16).

### 1.10.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.

Las *isoflavonas* poseen una estrecha similitud en la estructura química con los estrógenos. El anillo fenólico es el elemento clave de la estructura permite ligarse a los receptores estrogénicos. (20)

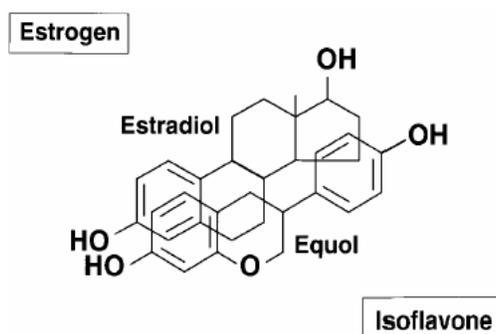


FIGURA No 2. COMPARACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA DE LAS (EQUOL) Y LOS ESTRÓGENOS (ESTRADIOL)

Existen 230 tipos de *isoflavonas*, 3 de ellas: daidzeína, genisteína y gliciteína son las de mayor importancia clínica. Estos compuestos pueden ser de origen vegetal o bien derivados del metabolismo in vivo de precursores presentes en las plantas. En las plantas ayudan a regular el crecimiento y las protegen del estrés y de los efectos dañinos de la radiación ultravioleta. (23)

Poseen una estructura química muy similar a los estrógenos, por ende no nos sorprende que se ligen a los receptores de estrógeno y por esta razón se las considere fitoestrógenos. Sin embargo la acción de éstas en los receptores realizan funciones agonistas y antagonistas, y este parece ser un concepto de difícil comprensión. Lo complicado en esto es que los estrógenos tiene acciones no clásicas con respecto a sus acciones genómicas clásicas, y estos efectos influyen sobre tejidos específicos. Los receptores estrogénicos se han denominado en

$\alpha$  y  $\beta$  para diferenciar su acción en clásica y no-clásica respectivamente. Esta diferenciación es la que permite explicar la acción de las en los distintos tejidos. (23) (24)

Comparadas con el 17 $\beta$ -estradiol, las tiene relativamente poca afinidad para ligarse con el receptor de estrógeno alfa (RE $\alpha$ ) aunque su afinidad con el reciente descubierto receptor de estrógenos (RE $\beta$ ), es levemente menor. Sin embargo, incluso la menor afinidad con el RE $\alpha$ , sugiere que las poseen el potencial de ejercer efectos fisiológicos in vivo, ya que los niveles de *isoflavonas* en suero de las personas que consumen alimentos a fuentes de *isoflavonas* están en el rango micro molar mínimo, es decir aproximadamente 1000 veces mayor que los niveles endógenos de estrógenos (26) (38).

Si bien las *isoflavonas* se consideran fitoestrogenos (estrógenos vegetales) se podrían clasificar con mayor precisión como moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM). A diferencia de los estrógenos, los SERM son selectivos de ciertos tejidos, teniendo así efectos similares al estrógeno en algunos y ningún efecto en otros o bien actuando como antiestrògenicos (39).

Las propiedades tipo SERM de las *isoflavonas* provienen al menos en parte, de su preferencia a ligarse con receptores estrogènicos  $\beta$  (RE  $\beta$ ) y a su mayor habilidad para disparar la actividad de transcripción cuando ligan a RE  $\beta$  y no receptores estrogènicos  $\alpha$  (RE  $\alpha$ ). Sin embargo las *isoflavonas* también tienen efectos no hormonales que probablemente contribuyan a sus efectos fisiológicos (39)

### **1.10.2. FUENTES DE ISOFLAVONAS.**

Las *isoflavonas* son de origen vegetal y son categorizadas como no-nutrientes, al igual que las vitaminas y los minerales y se encuentran exclusivamente en las legumbres, aunque hoy en día también se las encuentra disponibles como suplementos y se utilizan como

fortificadores. La mejor fuente dietética de este no-nutriente bioactivo es la soja y sus productos alimenticios (43) (52)

La genisteína, daidzeína y gliciteína son las familias específicas que se encuentran en la soja en un 60 %, 35 % y 5 % respectivamente del total de las *isoflavonas*. La tasa de las diferentes familias y la proporción de las distintas formas dentro de una familia tienen el efecto en la bioactividad de las *isoflavonas*. La forma agliconada (sin azúcar) es la más activa biológicamente. (43)

Las *isoflavonas*, herramientas del metabolismo secundario de la planta, son los principales compuestos fenólicos del grano de la soja. Aunque presentan en pequeñas cantidades en la planta (0,2 - 0,7 % de la materia seca del grano), participan con importancia en su seno: papel en el mecanismo de defensa, de interacción entre la planta y otros organismos (simbiosis) (44)

Dentro del grano las *isoflavonas* se distribuyen de diferente manera en su interior. Se hallan concentradas en el germen, menos concentradas se encuentran en los cotiledones, pero el aporte total más importante viene de estos, ya que los cotiledones suponen el 90 % del grano, en la testa se encuentran en pequeñas concentraciones. (44) (46)

### **1.10.3. METABOLISMO DE LAS ISOFLAVONAS**

El efecto biológico de las *isoflavonas* depende de su forma química y el metabolismo propio de cada individuo. Las variaciones entre los diferentes sujetos depende de la hidrólisis por las bacterias intestinales, el tránsito intestinal, la edad del sujeto, el grupo étnico al que pertenece, drogas, pH intestinal, la dieta, presencia o no de enfermedades intestinales e inmunidad del huésped. (27)

Después de la ingestión, para la primera etapa del metabolismo de las *isoflavonas* se requiere de la hidrólisis bacteriana en el intestino, paso clave en la actividad biológica y

biodisponibilidad de las mismas y como consecuencia sus efectos fisiológicos como constituyentes de la dieta. En animales libres de gérmenes se ha demostrado que no hay aparición de *isoflavonas* en sangre o bilis. De manera similar, el uso de antibióticos genera la no detección de éstos en el cuerpo u orina. (27)

Las *isoflavonas* absorbidas en el tracto intestinal, tanto en intestino delgado y grueso, cumplen el circuito entero hepático y por lo tanto se transportan al hígado por la vena aorta donde se conjugan predominantemente con ácido glucurónico y en menor medida con ácido sulfúrico. Las *isoflavonas* que se encuentran en la sangre y orina se encuentran básicamente en su forma conjugada. (38) (39)

#### **1.10.4. ACCIONES FARMACOLÓGICAS Y MECANISMO DE ACCIÓN**

Las isoflavonas se unen a los receptores estrogénicos dando lugar a la formación de un complejo lignano-receptor capaz de inducir la actividad transcripcional correspondiente. Sin embargo, su afinidad es notablemente menor que la del estradiol ( $E_2$ ), siendo muy bien baja hacia los receptores alfa ( $1/10^2$ - $10^4$  con respecto a la del  $E_2$ ), y de mayor cuantía hacia los receptores del tipo beta ( $1/3$  de la del  $E_2$ ), lo que en el principio condiciona una mayor acción de las isoflavonas en aquellos receptores beta están presentes en cantidades relevantes, tales como sistema nervioso central, hueso y pared vascular. (16) (38)

Pero también puede actuar por otros mecanismos no mediados por los receptores estrogénicos, entre los que destaca la inhibición de numerosos enzimas, como la tirosinkinasa, aromatasas,  $5\alpha$ -reductasa,  $17\beta$ -hidroxidehidrogenasa, colesterol  $7\beta$ -hidroxilasa y otras, implicados en numerosos procesos (proliferación y diferenciación celular, agregación plaquetaria, actividad osteoclastica, metabolismo esteroídico, metabolismo lipídico, etc.). Además, presentan propiedades antioxidantes, inhiben la agregación plaquetaria, o actúan sobre la síntesis de óxido nítrico, entre otras acciones. (34)

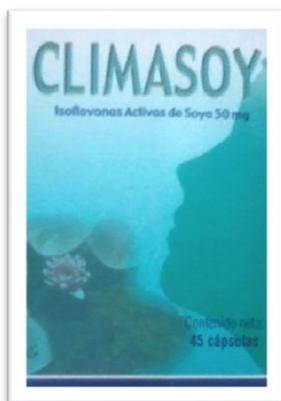
### 1.10.5. ISOFLAVONAS Y SALUD

Cuando hablamos de enfermedad renal, y más precisamente de insuficiencia renal crónica, no podemos dejar de hablar de otras patologías concomitantes como la enfermedad cardiovascular, la hipercolesterolemia, los problemas óseos, diabetes ( a veces como insulina resistencia), entre otro. Algunas como causa y otras como consecuencia, siempre íntimamente ligadas. (46)

Cuando hablamos de *isoflavonas* y sus numerosas funciones biológicas, nos referimos al rol que cumple en algunos tipos de enfermedades crónicas tales como distintos tipos de cáncer, en la menopausia, su intervención en la enfermedad cardiovascular, en la enfermedad renal, en los problemas óseos, en la hipercolesterolemia, su función como antioxidante, en la diabetes, en la composición corporal y hasta en la función cognitiva e inmunitaria. (43)

Las *isoflavonas* pueden ejercer un rol beneficioso en la enfermedad renal crónica, al igual que los estrógenos, pueden ejercer efectos cardioprotectores vía efectos directos sobre los vasos coronarios y otros procesos fisiológicos involucrados en la etiología de las enfermedades coronarias. (46)

### 1.11. CLIMASOY



FOTOGRAFÍA No 2. MEDICAMENTO COMERCIAL (CLIMASOY)

### **1.11.1. COMPOSICIÓN**

Cada cápsula contiene: Isoflavonas de soya concentrado, equivalente a 50 mg de isoflavonas activas. Excipientes: Lactosa, croscarmellosa sódica, dióxido de silicón coloidal y estearato de magnesio. (7)

### **1.11.2. INDICACIONES**

Climasoy es un producto a base de isoflavonas de soya que previene y controla de manera segura los síntomas del climaterio, especialmente los calorones. Prevención de osteoporosis post-menopáusica. (32)

### **1.11.3. CONTRAINDICACIONES**

Hipersensibilidad a los componentes de la fórmula.

### **1.11.4. MECANISMO DE ACCIÓN**

Las Isoflavonas de soya actúan como Moduladores Selectivos Naturales de los Receptores de Estrógenos. Operan con mayor afinidad sobre los receptores Beta, los cuales están ubicados principalmente en el cerebro, el endotelio y los huesos. El beneficio está en que mejoran significativamente los síntomas vasomotores de la etapa de climaterio y son antagonistas de los receptores alfa, los cuales están ubicados predominantemente en mamas y endometrio. El coeficiente de afinidad de las isoflavonas de soya por los receptores estrogénicosreceptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$  es de 5 y 36 respectivamente. Es decir, tienen un coeficiente de afinidad 7 veces mayor por los receptores  $\beta$  que por los receptores  $\alpha$ . Ésta es la razón por la cual son seguros y no incrementan el riesgo de cáncer de mama y endometrio. (37) (51)

Los niveles de isoflavonas en el plasma son dependientes del consumo de alimentos ricos en soya o de la administración de isoflavonas como suplementos. Las concentraciones plasmáticas de isoflavonas en poblaciones asiáticas es de alrededor de 0.5  $\mu\text{mol/L}$  en comparación con la concentración plasmática promedio encontrada en mujeres latinoamericanas con dietas occidentalizadas de 0.02  $\mu\text{mol/L}$ , es decir, una concentración 25 veces menor. Con relación a su concentración plasmática pico, se determinó en un estudio farmacocinético con ingesta de agliconas purificadas, que la misma se alcanzaba de 5 a 6 horas después de su ingestión y que la vida media de eliminación está alrededor de 8 horas. Los estudios de farmacocinética y biodisponibilidad demuestran que se obtienen niveles plasmáticos más altos con una ingesta repetida durante el día, por ejemplo dos veces al día. (32)

#### **1.11.5. DOSIS**

Una o dos cápsulas todos los días.

#### **1.11.6. VIA DE ADMINISTRACIÓN**

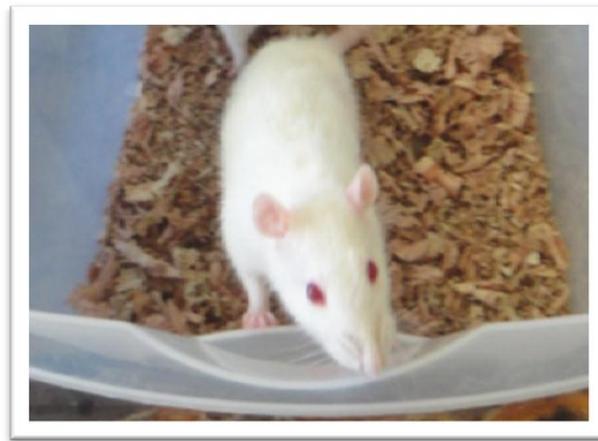
Administración oral.

#### **1.12. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Muchos procedimientos científicos y técnicos tienen como factor común la experimentación de sus procesos con animales. Ratas, monos, conejos, perros, gatos, ratones, cobayos, entre otros, son usados en la investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza; denominándolos como reactivos biológicos. (32)

Los animales de laboratorio son biomodelos experimentales que tiene la cualidad necesaria para dar respuesta al cuestionario de como estudiar las enfermedades que afecta al hombre, a la especie que está estudiando, y a las demás especies productivas y domésticas, y a las ratas y ratones están entre los que responden más uniformemente a estos requerimientos, son de fácil manejo y poseen las características zootécnicas adecuadas. (40)

### *1.12.1. Rattus norvegicus*



**FOTOGRAFÍA No 3. TOMADO DEL BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ESPOCH**

### **1.12.2. CLASIFICACIÓN Y TAXONOMÍA**

**Reino:** Animalia

**Phylum:** Chordata

**Clase:** Mammalia

**Orden:** Rodentia

**Suborden:** Myomorpha

**Familia:** Muridae

**Género:** Rattus

**Especie:** norvegicus

**Nombre binomial:** *Rattus norvegicus*. (29)

### **1.12.3. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE**

La rata noriega presenta un pelaje áspero y grueso con prominentes orejas desnudas y cola prácticamente desnuda, que generalmente es más corta que el cuerpo y cabeza. De color blanco. Las hembras tienen 12 mamas. Poseen cuatro incisivos, dos superiores y dos inferiores, carecen de caninos y premolares anteriores lo que ocasiona que haya una diastemia. Sus incisivos crecen durante toda la vida a partir de la base, que va sustituyendo la porción desgastada por la actividad de cortar y roer materiales duros. La parte exterior del diente es más dura y carece de nervio, salvo en la base (Nowak, 1991). (15)

### **1.12.4. CICLO REPRODUCTIVO**

Puede ser a lo largo de todo el año, aunque se han reportado picos en primavera y otoño; las hembras son poliestricas y pueden tener entre 1 y 12 camadas al año; presentan estro posparto. Las hembras son receptivas por periodos de 20 horas, cada 4 a 6 horas (Nowak, 1991). Tiempo de gestación: de 21 a 26 días (Nowak, 1991). (48)

### **1.12.5. TAMAÑO DE LA CAMADA**

Desde 2 hasta 22 crías; promedio 8 a 9. Las crías nacen ciegas y desnudas, pero pueden ver y están completas cubiertas de pelo a los 15 días, dejando el nido a los 22 días, aproximadamente (Nowak, 1991). Madurez sexual: Entre 2 y 3 meses (Nowak, 1991). (50)

### **1.12.6. HÁBITOS ALIMENTICIOS**

Omnívora, comiendo desde materia vegetal, hasta animal y en particular semillas, granos, nueces, vegetales y frutas, aunque también comen insectos y otros invertebrados. Esta especie come todo, incluyendo papel, cera de abeja, jabón, etc. La comida comúnmente es

llevada para almacenar a sus guaridas. En particular prefiere alimentarse de productos animales, tales como pájaros y huevos, y es excelente cazadora de peces. También se pueden alimentarse de ratones, pollos y crías de cerdo y borregos, atacando en ocasiones animales mayores. La principal limitante es la presencia de agua (Nowak, 1991). (42)

### 1.12.7. VÍA DE ADMINISTRACIÓN

La administración de sustancias en solución es uno de los sistemas más usados, tanto en la investigación de fenómenos fisiológicos como en el tratamiento de enfermedades.

#### 1.12.7.1. Vía oral

La administración de líquidos por vía oral se realiza con una sonda, conectada a una jeringa. Es necesario entibiar el líquido antes de inyectarlo. Con el fin de facilitar el paso de la sonda por la faringe y la probable mordedura de ella es necesario abrir la boca con una pinza de algodón. En caso de que ella entre forzada, o solo 2 o 4 cm, es probable que se haya introducido en la laringe, por ello no inyecte la sustancia y retire la sonda para ensayar de nuevo. El animal se sujeta firmemente por la piel del cuello y espalda asegurándose que la cabeza y el cuello queden extendidos formando una línea con la espalda. (25) (36)

**TABLA No 2. VOLUMEN DE ADMINISTRACIÓN**

	SC	IM	IV	IP	PO
RATÓN	5 UI	5 UI	10 UI	50 UI	50UI
RATA	1-2 ml por sitio	0,1-0,2 ml por sitio	0,5 ml hasta 1% de su peso	5-10 ml	1-2% de su peso

FUENTE: CUADERNO DE APUNTES DE LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA I Y II. BQF TOAPANTA G.2010

### **1.12.8. EXTRACCIÓN DE SANGRE EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Independiente de la técnica a utilizar evitar lo siguiente:

- a. Causar el mínimo desconfort estrés del animal.
- b. Técnica simple y fácilmente aplicable.

Está demostrado que el dolor y estrés alteran las respuestas corporales a los estímulos farmacológicos y quirúrgicos, además de las condiciones éticas.

La recolección de muestras sanguíneas dependerán en general de:

- La especie.
- Volumen necesario.
- Determinación a realizarse.

Muestra sanguínea dependerá de:

- a. Tipo (suero, plasma).
- b. Calidad (hemolisis).
- c. Cantidad (de acuerdo a la volemia).
- d. Frecuencia (estudios prolongados).
- e. Entrenamiento (técnica de extracción).

Si se pretende que el animal sobreviva a la extracción:

- a. Extraer no más del 10% de la volemia total.
- b. Extracción de 5 a 10% de la volemia a intervalos de dos o tres semanal.

▪ **Elegir la técnica de extracción**

El estrés y la anestesia pueden alterar significativamente algunos parámetros hematológicos y bioquímicos. El estrés causado por la manipulación e inmovilización suele ocasionar una elevación del hematocrito y alteraciones en el recuento de células blancas, así como variaciones en las cifras de glucemia y ciertas hormonas. Para evitar el estrés de punciones repetidas se puede dejar una vía heparinizada en un lugar no accesible para el animal. (51)

### **1.12.9. VÍAS DE EXTRACCIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Muchas de las pruebas de laboratorio, requieren de muestras o cantidades determinadas de sangre, ello está determinado por el tipo de prueba en cuestión. Este y otros factores determinan la técnica y método a emplear.

Los sitios más comunes para la extracción de sangre en rata y ratón son:

- Corazón.
- Vena safena.
- Vena femoral.
- Vena yugular.
- Vena en la cola.
- Seno orbital.

#### **1.12.9.1. Venas y arteriolas caudales**

La vena de la cola es la más usada, la vena debe localizarse claramente y la punción debe ser llevada decididamente. Se debe desinfectar la zona antes de la punción. La sangre formada puede retirarse con un tubo capilar o con una micropipeta. Después de haber sacado la

sangre, mantener una presión suave pero firme sobre el lugar durante unos 30 segundos, lo que detendrá rápidamente el sangrado. (36) (51)

En el caso particular de extracción de sangre de la cola, el realizar cortes en la misma es una práctica inaceptable como método de muestreo. Los cortes repetidos de la cola pueden llegar a producir granulomas, lo que da lugar a la formación de una gran masa de tejido en la extremidad de la cola y pierde el animal la capacidad natural para controlar su temperatura corporal y equilibrio. (51)

#### **1.12.9.2. Vía intracardiaca**

Permite obtener grandes volúmenes de sangre, el animal debe estar anestesiado y se recomienda utilizar esta técnica únicamente como procedimiento terminal. Se coloca el ratón bien apoyado sobre el dorso, se ubica la apófisis xifoides y se inserta la aguja perpendicular a la columna vertebral. Con una leve presión digital se localiza el ventrículo; al punzar el corazón se siente el choque cardiaco. La extracción debe ser lenta y la cantidad limitada a menos que se decida la eutanasia del animal. (25) (36)

## **CAPÍTULO II**

### **2. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **2.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN**

La presente investigación se llevó a cabo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Laboratorio de Productos Naturales, Bioterio de la Facultad de Ciencias.

#### **2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **2.2.1. MATERIALES**

###### **2.2.1.1. Vegetal**

La materia prima que se utilizó fueron las hojas de alfalfa (*Medicago sativa L.*) frescas y secas. La materia vegetal de alfalfa (*Medicago sativa L.*), se lo recolectó en el cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo a los niveles de 3400 msnm con una humedad de 74 y temperatura de 18 °C.

###### **2.2.1.2. Extracto**

Para el extracto se utilizó:

1. Alcohol (96%)
2. Hojas de alfalfa (*Medicago sativa L.*) (500gramos)

### **2.2.1.3. Material biológico**

Ratas Wistar albinas de laboratorio Crl: (WI) BR, del Bioterio, de la Escuela de Bioquímica y Farmacia.

#### **a) Taxonomía**

- Reino: Animalia
- Filo: Chordata
- Clase: Mammalia
- Orden: Rodentia
- Familia: Muridae
- Género: Rattus
- Especie: novergicus

#### **b) Descripción**

- Nomenclatura:Crl: (WI) BR.
- Peso promedio:  $170 \pm 5$  g
- Edad: 2.5 – 3.5 meses.
- Sexo: Femenino
- Lugar de Nacimiento: Bioterio de la Escuela de bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

#### **c) Condiciones**

- Humedad relativa:  $55\% \pm 10$
- Temperatura:  $22^{\circ} \text{C} \pm 2$
- Periodos: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

**d) Muestra**

- 15 Ratas para experimentación neta
- 3 Ratas ( Grupo Control)
- 3 Ratas ( Grupo Patrón)
- 3 Ratas (Dosis baja); 3 Ratas (Dosis media); 3 Ratas (Dosis alta)

Con extracto hidroalcohólico de Alfalfa (*Medicago Sativa L.*).

**2.2.2 MATERIALES Y REACTIVOS PARA EL ESTUDIO FARMACOGNOSICO Y CONTROL DE CALIDAD**

**TABLA No 3. MATERIALES Y REACTIVOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD FISICOQUÍMICO Y ESTUDIO FITOQUÍMICO**

<b>MATERIALES</b>	<b>REACTIVOS</b>	<b>EQUIPOS</b>
Vasos de precipitación de 100, 250, 500mL	Agua destilada	Balanza analítica
Pipetas graduadas de 5, 10 mL	Alcohol 96%	Estufa
Pipetas volumétricas de 1, 5mL	Hexano	Mufla
Probetas de 10,50,100,250 mL	Cloroformo	Rotavapor
Balones aforados de 10,25,50,100 mL	Éter etílico	pH-metro
Balones esmerilados de 500 mL	Reactivo de Dragendorff	Espectrofotómetro
Embudos simples, Buchner	Reactivo de Mayer	Refractómetro
Embudos de separación de 100, 250 mL	Reactivo de Baljet	Congelador
Refrigerante	Hidróxido de sodio	Microscopio
Cámara Cromatografía	Hidróxido de potasio	Molino
Placas de Sílice Gel 60F254	Amonio al 5% en agua	Revelador luz U.V
Matraz Erlenmeyer de 125 mL	Anhídrido acético	Desecador
Tubos de ensayo	Ácido sulfúrico concentrado	
Gradilla	Solución de carbonato de sodio	
Papel aluminio	Reactivo de Fehling	
Cápsulas de porcelana	Cloruro Férrico al 5%	
Crisoles de porcelana	Acetato de sodio	
Pipetas Pasteur	Solución al 2% de Ninhidrina	
Capilares de vidrio	Ácido clorhídrico concentrado	
Picnómetro	Magnesio metálico	
Termómetro	Alcohol amílico	
Papel filtro	Reactivo de Sudan III	

FUENTE: PACA, N. 2012

## 2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS

### 2.3.1 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO

#### 2.3.1.1 Determinación del contenido de humedad

##### Método Gravimétrico

Se pesó 2g. ± 0.5 mg de droga cruda y se transfirieron a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105°C hasta masa constante; seguidamente deseca a 105°C durante 3 horas. La cápsula de porcelana se colocó en un desecador donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se pesó; colocando nuevamente en la estufa durante 1h, y se repitió el procedimiento hasta obtener masa constante. El ensayo se realizó por triplicado.

Expresión de resultados:

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M} \times 100$$

Dónde:

H = Porcentaje de Humedad

M = masa de la capsula vacía (g).

M<sub>1</sub> = masa de la cápsula con la muestra de ensayo (g).

M<sub>2</sub> = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g).

100 = factor matemático para los cálculos.

Los resultados se aproximan a las décimas.

### 2.3.1.2 Determinación de cenizas totales

Se determina la masa de no menos de 2.0 g. ni más de 3.0 g. de la porción de ensayo pulverizada y tamizada con una desviación permisible de 0.5 mg en un crisol de porcelana o platino (en dependencia de la sustancia analizada) previamente tarado. Se calienta suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750 °C, si no se señala otra temperatura en la norma específica, durante 2 horas. Se enfría el crisol en un desecador y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5mg por g (masa constante)

Para obtener la masa constante los niveles entre calentamiento y pesada son de 30 min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrogeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco.

Expresión de los resultados:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Dónde:

C = Porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M= masa del crisol vacío (g).

M<sub>1</sub>= masa del crisol con la porción de ensayo (g).

M<sub>2</sub>= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático para los cálculos.

### 2.3.1.3 Determinación de cenizas solubles en agua

A las cenizas totales obtenidas en A, se les añade de 15 a 20ml de agua. El crisol se tapa y se hierve suavemente a la llama del mechero durante 5min. La solución se filtra a través del papel filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza en un mechero y luego se incinera en un horno mufla de 700-750°C, durante 2h. Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante.

Expresión de los resultados:

$$Ca = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M} \times 100$$

Donde

Ca=porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada

M<sub>2</sub>= masa del crisol con las cenizas totales (g).

M<sub>a</sub>= masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M<sub>1</sub>= masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M= masa del crisol vacío.

100= factor matemático

Los valores se aproximan a las décimas.

#### 2.3.1.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

A las cenizas totales obtenidas según la técnica, se le añaden de 2-3mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapa con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviendo durante 10 min. Se lava el vidrio reloj con 5ml de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtra a través de un papel filtro libre de cenizas; se lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico p.a.; al cual se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L, no muestre presencia de cloruros. El filtrado con el residuo se deseca de 100 a 105°C, se transfiere al crisol inicial y se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700-750°C durante 2h (si no se señala otra temperatura en la norma específica). Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante.

Expresión de los resultados:

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

B = porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

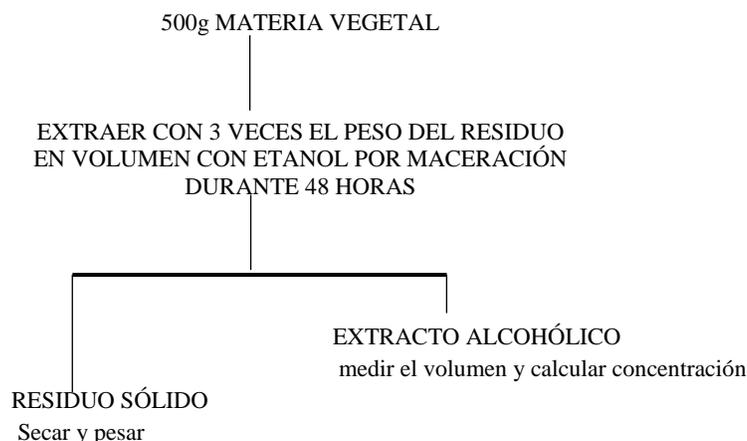
M<sub>2</sub> = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático

Los resultados se aproximan a las décimas.

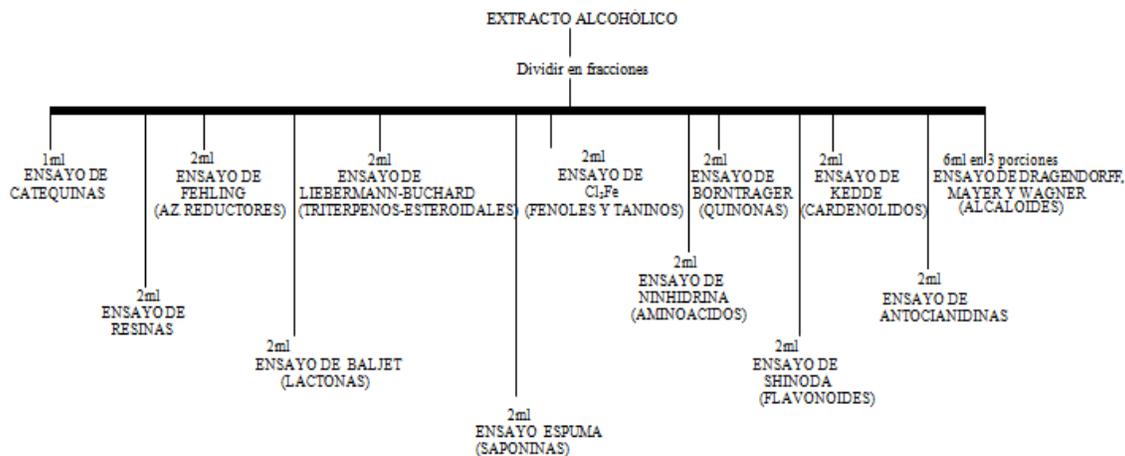
## 2.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

La planta fresca, seca o el residuo de una extracción; es sometida a una extracción sucesiva según el esquema de la figura N°4, el extracto alcohólico, se le mide el volumen obtenido y se le calcula su concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto.



**FIGURA No 4. EXTRACCIÓN SUCESIVA DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

Al extracto alcohólico se procede de la siguiente manera ilustrada en la figura N°5.



**FIGURA No 5. ESQUEMAS DE LAS REACCIONES A REALIZAR EN EL EXTRACTO ALCOHÓLICO**

#### 2.4.1 ENSAYO DE SUDAN

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.

La presencia de compuestos grasos se considera positivo si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del lípido o en las paredes del tubo de ensayo respectivamente.

#### 2.4.2 ENSAYO DE DRAGENDORFF

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, éste debe evaporarse en un baño de agua y el residuo residisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

#### 2.4.3 ENSAYO DE MAYER

Precede de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 a 3 gotas de solución de reactiva de Mayer, si observa opalescencia(+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

Observación: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó

(+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

#### 2.4.4 ENSAYO DE WAGNER

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 a 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

#### 2.4.5 ENSAYO DE BALJET

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.

#### 2.4.6 ENSAYO DE BORNTRAGER

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina(superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja(+++).

#### 2.4.7 ENSAYO DE LIEBERMANN-BUCHARD

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo rediluirse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración.

- 1- Rosado-azul muy rápido
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro. final de la reacción.

A veces el ensayo quede en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

**IMPORTANTE:** para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

La reacción de Liebermann-Burchard se emplea también para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

#### 2.4.8 ENSAYO DE CATEQUINAS

Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.

#### 2.4.9 ENSAYO DE RESINAS

Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.

#### 2.4.10 ENSAYO DE FEHLING

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL de reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

Solución A: se pesan 35g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000mL.

Solución B: Se pesan 150g de tartrato de sodio y potasio y 40g de hidróxido de sodio y se disuelven con agua hasta un volumen total 1000mL.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ella justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

#### 2.4.11 ENSAYO DE ESPUMA

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

#### 2.4.12 ENSAYO DE CLORURO FÉRRICO

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

1. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
2. Desarrollo de una coloración verde-intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
3. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalatánicos.

#### 2.4.13 ENSAYO DE SHINODA

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se

añade de 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se precede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

#### 2.4.14 ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se calientan 2mL del extracto etanólico 10min. con 1 mL de HCL conc. Se deja enfriar y se adiciona 1mL de agua y 2mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílico, es indicativa de un ensayo positivo.

## 2.5. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

### 2.5.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago Sativa L.*)

#### Método por percolación

1. Se pesa 100g de planta y se añade 200ml de alcohol al 40% para humectar el material vegetal el tiempo mínimo de 40 minutos.
2. Se mezcla hasta obtener una solución compacta.
3. Se agita continuamente.
4. Se prepara el percolador y se coloca en el fondo algodón.

5. Se coloca la planta humectada en el percolador.
6. Se añade alcohol al 40% la cantidad necesaria hasta que cubra todo el material vegetal.
7. Se cubre con papel filtro y se tapa el percolador con papel aluminio.
8. Se deja reposar al menos 16 horas.
9. Luego de 24 horas se obtiene del percolador 40 mL del extracto, las cuales se guardan en un frasco ámbar, mientras que se obtiene 200mL del extracto a una velocidad de 30 gotas/min.
10. Se obtiene la cantidad total de 100mL de extracto los mismos que se guardan en un frasco ambar de vidrio.
11. Se guarda en el congelador para estabilizar.

Se procedio a concentrar la el volumen que se calculo para la administracion a las ratas, hasta sequedad a una temperatura de 60°C para asi eliminar el exceso de alcohol que existe en la muestra, luego se recostituyo con suero fisiológico. Se paso a un frasco ámbar para posteriormente proceder con la administración

## 2.5.2. CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS

### 2.5.2.1. Determinación del pH

La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno, pH. El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógenos. Se calculan teóricamente mediante la ecuación:

$$\text{pH} = -\log a [\text{H}^+]$$

$a [\text{H}^+]$  = actividad de los iones hidrógeno.

En la práctica la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea igual o analógico. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo.

Se ajusta el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente determínese el valor del pH de la muestra.

#### **2.5.2.2. Determinación de la densidad relativa.**

Se entiende por relativa a la relación entre masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

Primeramente pésese el picnómetro vacío y seco a 25°C llévese con la porción de ensayo, manténgalo a la temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 15 min y ajústesele el líquido al nivel empleado, si es preciso, una tira de papel para extraer exceso secar exteriormente el picnómetro.

Se pesa cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repite la operación con el agua destilada a 25°C, después de limpiar el picnómetro.

La densidad relativa a 25°C se calcula por la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Dónde:

$M_1$  = peso del picnómetro con la muestra (g)

$M_2$  = peso del picnómetro con la muestra (g)

$M$  = peso del picnómetro vacío (g)

### 2.5.2.3. Determinación del índice de refracción

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Esta relación viene dada por la siguiente ecuación:

$$\eta = \frac{\text{Sen}_i}{\text{Sen}_r}$$

Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente.

Se coloca sobre el prisma de medición una gota de agua destilada. Utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, se ajusta el equipo seleccionado la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termoprisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.

Se hacen tres lecturas y se calcula el promedio de la misma. Dos o más lecturas no deben diferir en más de 0.002.

Si las determinaciones no se efectúan a la temperatura de referencia se emplea la fórmula siguiente:

$$Nd_{25} = Ndt + 0.00044(T - 25)$$

Dónde:

$Nd_{25}$  = índice de refracción a 25°C

$Ndt$  = Valor leído en la escala del aparato a la temperatura.

$T$  = Valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C).

0.00044 = factor de correlación por Grados Celsius.

Los valores se aproximan hasta las milésimas

#### **2.5.2.4. Determinación de Sólidos totales**

La determinación de la variación de la masa, debido a la pérdida o eliminación de sustancias volátiles por acción del calor, mediante un proceso de evaporación de la porción de ensayo y secado del residuo en estufa, hasta masa constante, se le asigna como sólidos totales.

5.0 mL del extracto se llevan a una cápsula previamente tarada a 105°C, se evapora sobre baño de agua hasta que el residuo esté aparentemente seco. Se pasa entonces hacia una estufa y se deja hasta peso constante (aproximadamente 3 horas). Se retira la cápsula de la estufa y se coloca, en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente. Para obtener la masa constante entre una pesada y otra se mantendrá un tiempo de secado de 60 minutos.

Expresión de los resultados:

$$St = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

Dónde:

Pr= masa de la cápsula más el residuo (g).

P= masa de la cápsula vacía (g).

V= volumen de la porción de ensayo.

100= factor matemático para el cálculo.

#### **2.5.2.5. Determinación de los requisitos organolépticos.**

##### **1. Determinación del olor**

Se toma una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.

## 2. Determinación del color

Se toma un tubo de ensayos bien limpio y seco y se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas. Se informa los resultados.

### 2.5.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE FLAVONOIDES

1. Se pesa 1 gmo de droga en polvo con 10mL de metanol por 5 minutos en un baño de agua (60°C).
2. Posteriormente se toma 5ml del extracto metanólico y concentrar hasta obtener 2ml.
3. Se coloca 1mL de agua y 10mL de acetato de etilo, agitar por 10 minutos.
4. A continuación se separa la fase de acetato de etilo y concentrar hasta obtener un volumen de 1mL.
5. Se aplica 10µL del concentrado en una placa cromatografía de sílice gel 60 F<sub>254</sub> con la ayuda de un capilar.
6. Se deja secar después de cada aplicación.
7. Se introduce la placa en la cuba cromatografía, hasta que el solvente recorra las  $\frac{3}{4}$  partes de la placa.
8. Se retira de la cuba secar para luego observar en la lámpara UV 365mn.
9. Finalmente se revela la placa y se deja secar, calentar en la estufa y anotar los Rf.

**Absorbente:** Sílice gel 60 F<sub>254</sub>

**Sistema de solventes:** Tolueno; Acetato de Etilo; ácido acético (35:10:5)

**Revelador:** Sulfato de Serio

Cálculo:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida de la muestra}}{\text{Distancia recorrida del solvente}}$$

#### 2.5.4. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO QUERCETINA

Para la droga seca y producto final:

1. Se pesa 1 gramo de muestra y colocar en un balón esmerilado de 250 mL.
2. Luego se añade 20 mL de etanol al 50% y 8 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.
3. Se refleja por 2 horas en un baño de agua.
4. Se deja enfriar y filtrar a través del filtro Buchner, utilizando papel filtro.
5. Se lava el residuo con 10 mL de etanol al 50% para desecharlo totalmente.
6. El filtrado se evapora con baño de agua hasta la mitad del volumen inicial.
7. Se enfría sobre un baño de agua fría durante 30 minutos.
8. A continuación se filtra, el papel con el residuo se lava con 70 ml de etanol al 96% caliente a 50 °C.
9. Se trasvasa a un balón volumétrico de 100 mL y se afora con etanol al 96% V/V.
10. Posteriormente se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 258 nm.
11. Como patrón se empleó 0.04g de Quercetina, los cuales los cuales se deben disolver con etanol al 96% V/V hasta completar un volumen de 50 mL; de esta solución tomar 1 mL y se afora a 100 mL con etanol al 50% V/V.
12. El blanco consistió en una solución de etanol al 50% V/V con la que encera el espectrofotómetro a la longitud de onda de 258 nm.

Nota: si es necesario diluir la muestra hasta que la absorbancia se encuentre en el rango de 0.300 a 0.800 de absorbancia.

La expresión empleada para el cálculo es:

$$\% \text{concentración} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estandar}} \times \text{Factor de dilución} \times 100$$

Dónde:

X= Contenido de flavonoides totales expresados como quercetina (%)

Am<sub>1</sub>= Absorbancia de la solución muestra (nm)

Am<sub>2</sub>= Absorbancia de la sustancia referencia (nm)

#### 2.5.5. ANLISIS CROMATOGRÁFICO DE BETA SITOSTEROL POR TLC

1. Tomar 5 mL del extracto etanólico y concentrar hasta sequedad.
2. Al concentrado añadir 10 mL de metanol y volver a concentrar.
3. Diluir el estándar  $\beta$ -sitosterol en metanol.
4. Se aplica 10  $\mu$ L del concentrado y del estándar en una placa cromatográfica de Sílice gel 60 F<sub>254</sub> con la ayuda de un capilar.
5. Dejar secar después de cada aplicación.
6. Se introduce la placa en la cuba cromatográfica, hasta que el primer sistema de solvente recorra la mitad de la placa cromatográfica. Luego, la placa fue secada y corrida completamente en el segundo sistema de solvente. Este procedimiento permite una buena separación del  $\beta$ -sitosterol de los otros componentes del extracto.
7. Retirar de la cuba y dejar secar.
8. Revelar la placa y dejar secar (110° C / 10 min); anotar los Rf.

**Adsorbentes:** Silicua gel 60 F<sub>254</sub>. (Merck).

#### **Sistemas de solventes**

A.- Cloroformo: Metanol: Agua; (10:1:0.05).

B.- Cloroformo.

**Revelador:**

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 18% ó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Vainillina.
- Revelador de Liberman Bouchard.

Calculo:

$$Rf = \frac{\text{distanciarecorridadelamuestra}}{\text{distanciarecorridadelsolvente}}$$

**2.6. EFECTO ESTROGÉNICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*)**

➤ **Unidad de observación**

Ratas albinas (*Rattus norvegicus*), inducidas por vía oral a diferentes dosis del extracto hidroalcohólico de Alfalfa (*Medicago sativa L.*).

➤ **Periodo 1: Aclimatación**

- Aislamiento de las ratas Wister albinas 8 días previo a la experimentación.
- Nomenclatura: CrL (Wi)BR
- Peso de las ratas: 150-200g. Tomar el peso todos los días
- Edad: 22días
- Sexo: femenino

➤ **Condiciones ambientales:**

- Humedad relativa: 55±10
- Temperatura: 20 ± 2 °C y fotoperiodo de 12 días de luz y 12 horas de oscuridad.

- Dieta: normocalórica, normoproteica.
- Comida: 3g de pellets/100g peso de la rata; agua *ad libitum*

➤ **Período 2: Protocolo de tratamiento**

**TABLA No 4. DEFINICIONES DE LOS GRUPOS**

<b>GRUPOS</b>	<b>DETALLE DEL TRATAMIENTO</b>
<b>RG<sub>1</sub></b>	Dosis baja (8,93 mg/kg/día) del extracto de Alfalfa
<b>RG<sub>2</sub></b>	Dosis intermedia (17.86 mg/kg/día) del extracto de Alfalfa
<b>RG<sub>3</sub></b>	Dosis alta (35,72 mg/kg/día) del extracto de Alfalfa
<b>RG<sub>4</sub></b>	Vehículo (suero fisiológico)
<b>RG<sub>5</sub></b>	2,3 mg/kg/día de climasoy con actividad estrogénica

FUENTE: PACA, N. 2012

### 2.6.1. PROCESO EXPERIMENTAL

Para el estudio se utilizó ratas hembras con un peso promedio de  $170 \pm 5$ g las cuales fueron sometidas a un aislamiento durante 8 días antes de comenzar el estudio con una comida y agua adecuada, controlando el peso de las mismas. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio.

Transcurrido este tiempo se procedió a la selección de un total de 15 ratas inmaduras al alzar en cinco grupos experimentales (tres animales para cada grupo), para pesar los animales (peso inicial); y luego fueron intervenidos a una primera toma de la muestra de sangre mediante punción de la vena facial en la que se determinó los niveles de estradiol mediante el Equipo Analizador de estradiol; *Analizadores Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170, COBAS e 610 y COBAS e 602*

Posterior a la determinación de estradiol a los 5 grupos de estudio, se inició a la administración de los tratamientos por vía oral en un volumen equivalente a 0.5 mL como se indica en la siguiente representación por un lapso de 15 días:

**TABLA No 5. GRUPOS EXPERIMENTALES**

<b>GRUPOS</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>DETALLES DEL TRATAMIENTO</b>
<b>RG<sub>1</sub></b>	X <sub>1</sub>	Dosis baja (8,93 mg/kg/día) del extracto de Alfalfa ( <i>Medicago sativa L</i> )
<b>RG<sub>2</sub></b>	X <sub>2</sub>	Dosis intermedia (17,86 mg/kg/día) del extracto de Alfalfa ( <i>Medicago sativa L</i> )
<b>RG<sub>3</sub></b>	X <sub>3</sub>	Dosis alta (35,72 mg/kg/día) del extracto de Alfalfa ( <i>Medicago sativa L</i> )
<b>RG<sub>4</sub></b>	X <sub>4</sub>	Vehículo (suero fisiológico)
<b>RG<sub>5</sub></b>	X <sub>5</sub>	6,4 mg/kg/día de Climasoy con actividad estrogénica

FUENTE: PACA, N. 2012

Al final del experimento nuevamente se realizó la pesada de las ratas (peso final) y posteriormente fueron intervenidas por segunda vez la extracción de sangre de la animales de experimentación por punción cardiaca y así poder medir los niveles de estradiol final (Ef) a través del analizador hormonal antes mencionado.

Finalmente los animales fueron sacrificados mediante el método de la eutanasia. Sus ovarios y útero fueron retirados obteniendo así el peso en mg de cada órgano (OV y U) de todos los animales y luego se almacenaron en formol bufferado al 10%. El ciclo estral de las ratas es de cuatro a cinco días, por lo que un tratamiento de quince días sería similar al tiempo de respuesta de los estrógenos endógenos producidos en el animal intacto, por lo que el tiempo de administración abarco un periodo de tres ciclos estrales.

**TABLA No 6. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO EXPERIMENTAL**

GRUPOS	Nivel de Estradiol inicial (pg/mL)	Tratamiento, Administración de solución salina, medicamento, y del extracto (mg/Kg/día)	Evaluar el nivel de Estradiol final (pg/mL)	Evaluar el peso de los Órganos femeninos al final del experimento (mg)	
				Ovarios	Útero
RG1	Eo	X1	Ef	O	U
RG2	Eo	X2	Ef	O	U
RG3	Eo	X3	Ef	O	U
RG4	Eo	X4	Ef	O	U
RG5	Eo	X5	Ef	O	U

FUENTE: PACA, N. 2012

Dónde:

**R**= Para asignar al azar o aleatoriamente

**G**= para determinar el grupo de sujetos los cuales corresponden a ratas Wister con un peso entre  $170 \pm 5g$ , que han sido puestos en aislamiento por un tiempo de 8 días para su aclimatación, con un alimento y agua adecuada.

**Eo**=Determinación de los niveles de estradiol inicial.

**X**= Tratamiento administrado por vía oral a través de intubación orogástrica

**Ef**=Determinación de los niveles de estradiol final.

**O**= Medición del peso del útero de los animales de experimentación.

**U**= Medición del peso de los ovarios de los animales de experimentación.

## 2.6.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se procedió a trabajar con un diseño experimental de series cronológicas múltiples ya que se trabaja con: un grupo control, un grupo como patrón y tres grupos problema, es decir que

para cinco tratamientos propuestos se obtuvieron un total de quince variantes; para la verificación de los resultados obtenidos entre los grupos experimentales y controles se utilizó ANOVA ya que nos permite determinar un factor con datos agrupados y así permitir con ello evaluar la existencia de heterogeneidad de los grupos con respecto al efecto (estrogénico), consecutivamente se efectuó la prueba de comparación múltiple a un intervalo de confianza del 99% empleando la prueba de Tuckey HSD, ya que esta prueba nos permitió evaluar que grupos son similares y diferentes con respecto a los tratamientos que se lo realizó.

La hipótesis nula de la prueba ANOVA de un factor es:

Ho: Las dosis del extracto Hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa L.*) no presenta actividad estrogénica en ratas (*Rattus novergicus*).

H1: Al menos una dosis del extracto Hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa L.*) presenta una significativa actividad estrogénica en ratas (*Rattus novergicus*).

Esta prueba se basa en la comparación de las sumas de cuadrados medias, debidas a la variabilidad entre grupos y la debida a la variabilidad intra grupos. Ambas sumas son estimaciones independientes de la variabilidad global, de manera que, si el cociente entre la primera y la segunda es grande, se tendrá mayor probabilidad de rechazar la hipótesis nula. Este cociente sigue una distribución F con r-1 y n-1 grados de libertad.

## **2.7. TRATAMIENTO A BASE DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*)**

Se realizó un tratamiento con el extracto hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa L.*) a tres concentraciones diferentes se evaluó el nivel de estradiol antes y después del tratamiento; así como el peso mg al final del tratamiento.

### 2.7.1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

**TABLA No 7. MATERIALES Y REACTIVOS EMPLEADOS PARA COMPROBAR EL EFECTO ESTROGÉNICO (ensayo pre-clínico)**

MATERIALES	REACTIVOS	EQUIPOS
Algodón, Toallas de mano, vasos precipitación	Alcohol antiséptico, agua destilada,	Analizador de estradiol; Analizadores Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170, COBAS e 610 y COBAS e 602
Mandil, guantes y mascarilla	Éter etílico,	Equipo de disección
Jeringas de 1 y 3 mL	Suero fisiológico	Balanza BOECO Germany
Lancetas y Capilares	<i>Rattus norvegicus</i>	
Cánulas orogástricas, Cámara de anestesia	Climasoy 50mg de isoflavonas activas (FARMA, S.A-Venezuela)	
Vaselina, lápiz graso	Extracto hidroalcohólico alfalfa ( <i>Medicago sativa L.</i> )	
Envases ambar	Gel desinfectante	
Fundas plásticas, tabla para la disección	KIT reactivos para el análisis hormonal	

FUENTE: PACA, N. 2012

### Procedimiento

Administrar por vía oral, en la mañana una vez al día las dosis respectivas haciendo uso de cánulas orogástricas de acuerdo al siguiente protocolo de administración:

**TABLA No 8. PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN**

RG1 “Grupo Control”	X1	Vehículo NaCl 0.9%
RG2 “Grupo Patrón”	X2	Climasoy (3,64mg/Kg)
RG3 “Grupo Problema I”	X3	Dosis baja (9mg/Kg/día ) del extracto H.G
RG4 “Grupo Problema II”	X4	Dosis media(18mg/Kg/día) del extracto H.G
RG5 “Grupo Problema III”	X5	Dosis alta (36mg/Kg/día) del extracto H.G

FUENTE: PACA, N. 2012

## 2.7.2. VÍAS DE EXTRACCIÓN PARA OBTENER MUESTRAS SANGUÍNEAS

### 2.7.2.1. Obtención de sangre de la vena facial

#### **Materiales**

- Material biológico (*Rattus norvegicus*).
- Capilares.
- Algodón.
- Alcohol antiséptico.
- Lanceta.
- Gradilla.
- Lápiz graso.
- Marcador indeleble.
- Mandil, mascarilla, guantes.

### 2.7.2.2. Obtención de sangre intracardiaca

#### **Materiales**

- Material biológico (*Rattus norvegicus*).
- Jeringuilla.
- Torundas
- Alcohol antiséptico.
- Tubos para recoger muestras sanguíneas.

## **Procedimiento**

La punción cardiaca siempre deberá llevarse a cabo bajo anestesia general y se recomienda utilizar esta técnica únicamente como procedimiento terminal. Se coloca a la rata bien apoyada sobre el dorso, se ubica la apófisis xifoides, desinfectar la zona con alcohol antiséptico (no en abundancia) y se inserta la aguja perpendicular a la columna vertebral. Con una leve presión digital se localiza el ventrículo; al punzar el corazón se siente el choque cardiaco. La extracción debe ser lenta y dependerá del peso de la rata. Las medidas de la aguja son de 20 a 25 G.

### 2.7.3. DETERMINACIÓN DEL ESTRADIOL

#### **Equipos y reactivos**

- Equipo Analizador de estradiol; Analizadores Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170, COBAS e 610 y COBAS e 602.
- Estándar de Calibración.
- Kit de reactivos para el análisis hormonal.

#### **MÉTODO**

El test Elecsys Estradiol II se basa en un principio de test competitivo empleando un anticuerpo policlonal específicamente dirigido contra el  $17\beta$ -estradiol. El estradiol endógeno, liberado de la muestra por la mesterolona compete con el derivado añadido del estradiol marcado con el quelato de rutenio [Quelato tris (2-2'-bipiridina) rutenio (II) (Rubpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>]; por los sitios de fijación del anticuerpo biotinilado. Principio de competición con una duración total de 18 minutos.

Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración de 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

### **Obtención y preparación de las muestras**

- Suero recogido en tubos estándar de muestra o tubos conteniendo gel de separación.
- Plasma con heparina (litio, sodio, amonio), EDTA tripotásico, citrato sódico y fluoruro sódico/oxalato potásico.
- Criterio: recuperación dentro de 90-110% del valor sérico o bien de 0,9 -0,11 + intersección dentro de  $< \pm 2$  veces de sensibilidad analítica (LID) + coeficiente de correlación  $> 0,95$ .
- Estabilidad: 2 días a 2-8 °C, 6 meses a -20 °C. Congelar solo una vez.
- Centrifugue las muestras que contengan precipitado antes de efectuar la prueba.
- No emplee muestras inactivadas por el calor. No utilice muestras ni controles estabilizados con ácido.
- Se debe garantizar una temperatura de 20-30 °C para la medición de muestras de pacientes, calibradores y controles.
- Debido a posibles efectos de evaporación, determinar las muestras controles y calibradores dentro de un lapso de 2 horas.

#### **2.7.4. EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO**

Sacrificar a la rata por medio de la eutanasia y con la ayuda del equipo de disección proceder al aislamiento de los órganos femeninos de la rata.

Extraer cuidadosamente los ovarios y útero sin romperlos; observar su morfología macroscópica y pesar. Colocar a los animales y todos los materiales en una bolsa de bioseguridad, cerrar y desechar adecuadamente.

#### **2.7.5. ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA**

##### **Materiales y reactivos**

- Material biológico *Rattus norvegicus*.
- Extracto reconstituido en suero fisiológico.
- Cánulas orogástricas.
- Jeringa de 1 y 3 mL.
- Balanza.
- Suero fisiológico.

##### **Procedimiento**

A cada grupo de ratas (3 por grupo) se les administro por vía oral el extracto de Alfalfa (*Medicago sativa L.*) a las dosis determinadas en el estudio de actividad estrogénica, esto se realiza diariamente durante 14 días y se evaluara, estado físico, masa corporal y características organolépticas del animal.

Extraer cuidadosamente el hígado, riñón y estomago sin romperlos; observar su morfología macroscópica. Colocar los órganos en un recipiente estéril con formol bufferado al 10% con

su respectiva rotulación. Poner los animales y todos los materiales en una bolsa de bioseguridad, cerrar y desechar con cuidado.

#### 2.7.6. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Para verificar los efectos toxicológicos que puede presentar como resultado adverso sobre los órganos farmacocinéticas más importantes; Hígado, Riñón, Estomago; mediante la administración de las dosis estudiadas. Se realizó el análisis histopatológico de los sujetos de cada grupo, cuyo trabajo fue realizado gracias a la colaboración del Dr. Oswaldo Duque (Patólogo Solca-Riobamba) y al Dr. Javier Robles (BQF Solca-Riobamba).

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA SECA DE LAS HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*)

Antes de la utilización de la droga vegetal en las diferentes aplicaciones, se recomienda el control de calidad de la droga cruda que en este caso se trata de las hojas de alfalfa (*Medicago sativa L.*)

Para este análisis la materia vegetal (partes aéreas) se recolectó en la provincia de Chimborazo, cantón Riobamba. Se tomó en cuenta el estado físico y color, descartando aquellas partes deterioradas. Una vez preparada las mismas se lavó con abundante agua para luego desinfectarlo con hipoclorito al 0,5%. La materia prima es parte de una bebida común en los hogares, preparada a manera de un licuado al que se atribuye sus propiedades medicinales beneficiosas.

##### 3.1.1. ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO

##### 3.1.1.1. Determinación del contenido de humedad

En la droga cruda y seca de las hojas de alfalfa (*Medicago sativa L.*), mediante el método gravimétrico se obtuvieron los siguientes resultados.

**CUADRO No 1. HUMEDAD DE LA DROGA SECA DE LAS HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*). FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JULIO 2012.**

	<b>% HUMEDAD</b>	<b>LÍMITE DE HUMEDAD</b>
<b>Planta seca</b>	<b>10.58%</b>	<b>Hasta 14%</b>

FUENTE: PACA, N. 2012

Los resultados expresados en el cuadro 1 indican que el contenido de humedad de las hojas de alfalfa (*Medicago sativa L.*) es de 10.58% en planta seca. La humedad en la planta es alta siendo comparada con el valor máximo (14%), es por eso que la planta se debe utilizar rápidamente ya que al contener mayor contenido de agua se podría hidrolizar los principios activos presentes y contribuir al crecimiento bacteriano, tal como expresa Del Pozo (1983).

### 3.1.1.2. Determinación de cenizas totales

La determinación de cenizas es un indicativo de la calidad de la droga si el valor es mayor a 12 la droga deberá ser rechazada ya que es probable, que tenga demasiada contaminación con tierra, sílice o en su defecto metales pesados, por esta razón se aplicó los tres métodos cenizas; cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

En la droga seca de las hojas de Alfalfa (*Medicago sativa L.*) se utilizó el método gravimétrico de la determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en HCl se obtuvieron los siguientes resultados.

**CUADRO No 2. CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN HCl DE LA DROGA SECA DE LAS HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*). FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JULIO 2012.**

	<b>% C.T</b>	<b>% C. sol en agua</b>	<b>% C. INS. HCl</b>	<b>LÍMITES DE ACEPTABILIDAD SEGÚN LA USP</b>
<b>Planta seca</b>	9,27%	6,11%	3,11%	C.T 12% C. sol. en agua 7% C. INS. HCl 5%

FUENTE: PACA, N. 2012

El resultado expresado en el cuadro No 2 de las hojas de Alfalfa (*Medicago sativa L.*), indica en contenido de cenizas totales (%C.T) es de 9,27% por lo cual se acepta estos porcentajes ya que están dentro de los límites según la USP (12%); mientras que las de las cenizas solubles en agua fue de 6,11% y de insolubles en ácido clorhídrico (C. INS. HCl) es de 3,11%, también son aceptados ya que según la USP se encuentran dentro de los valores límites de (7% y5%) respectivamente.

Estos análisis en condiciones rigurosas, es constante y nos permite descubrir falsificaciones por otras drogas, tierras u otros minerales. Además esta determinación es primordial ya que la materia mineral puede ser responsable de alguna acción farmacológica no deseada. Si en la determinación ha sido elevado el contenido de cenizas puede ser indicador que en la recolección existió contaminación de material mineral (Milliken et al., 1992).

### **3.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCHÓLICO DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*).**

#### **3.2.1. DETERMINACIÓN DEL pH**

**CUADRO No 3. pH DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*). FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JULIO 2012**

<hr/> <hr/>	
<b>EXTRACTO A 18° C</b>	
<hr/> <hr/>	
<b>pH</b>	<b>5.86</b>
<small>FUENTE: PACA, N. 2012</small>	

El pH expresa la concentración de iones hidronio [ $H_3O^+$ ] presentes en determinadas sustancias. En el extracto alcohólico de hojas de alfalfa (*Medicago sativa L.*) el pH es de 5.86 lo que representa un pH ligeramente ácido. En estudios realizados (Vanaclocha, B.,

2003), sobre alfalfa el pH se ha encontrado entre 5.5 - 6.0, lo que indica que se encuentra dentro del rango referencial.

### 3.2.2. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

**CUADRO No 4. DENSIDAD RELATIVA DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*). FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JULIO 2012**

EXTRACTO	
$\delta$	0.9398

FUENTE: PACA, N. 2012

El resultado expuesto en el cuadro No 4 indica que el extracto alcohólico de hojas de alfalfa (*Medicago sativa L.*) es menos denso que el agua por ser valor menor a 1. Esto se debe a que en su composición se encuentran compuestos grasos son los responsables de que el extracto sea menos denso que el agua.

### 3.2.3. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.

**CUADRO No 5. ÍNDICE DE REFRACCIÓN DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*). FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JULIO 2012.**

EXTRACTO	
I. Refrac	1,3373

En el cuadro No 5, se observa el valor que el estudio del extracto fluido de alfalfa (*Medicago sativa L.*) es de 1.3373, esto se debe a que la alfalfa contiene una apreciable cantidad de azúcares; lo que ocasiona el desvío del haz de luz que pasa oblicuamente en comparación con el agua.

### 3.2.4. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES

**CUADRO No 6. SÓLIDOS TOTALES DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.). FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JULIO 2012.**

EXTRACTO	
S.T.	9.10%

Los resultados expuestos en el cuadro No 6 miden el total de residuos sólidos filtrables (sales y residuos orgánicos). Si su valor es alto el extracto por lo general es de mal agrado al paladar y pueden inducir una reacción fisiológica adversa en el consumidor, según estudios realizador por González. P., 1987.

### 3.2.5. DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS

**CUADRO No 7. REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.). FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JULIO 2012.**

PARÁMETRO	EXTRACTO
Aspecto	Líquido
Color	Verde oscuro
Olor	Herbal
Sabor	Agridulce

FUENTE: PACA, N. 2012

Los resultados que se observan en el cuadro No 7 son los características organolépticas del extracto alcohólico de las hojas de alfalfa (*Medicago sativa* L.), siendo líquidos en su aspecto, de color verde oscuro, sabor agridulce y olor Herbal.

### 3.3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Mediante el tamizaje fitoquímico se practica los siguientes ensayos químicos para la identificación de: alcaloides, flavonoides, resinas, azúcares reductores, taninos, cumarinas, catequinas, compuestos grasos, aminoácidos; etc., como se puede ver en el siguiente cuadro de resultados.

**CUADRO No 8. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.). EN SUS EXTRACTOS ETÉREO, ALCOHÓLICO Y ACUOSO. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA JULIO DEL 2012**

ENSAYO	METABOLITOS SECUNDARIOS	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Ensayo de Sudan III	Compuestos grasos	(+)		
Ensayo de Wagner	Alcaloides	(-)	(++)	(+)
Ensayo de Dragendorff		(-)	(++)	(+)
Ensayo de Baljet	Cumarinas	(+)	(+)	(-)
Ensayo de Lieberman-Buchard	Triterpenos		(+)	
Ensayo de Catequinas	Catequinas		(+)	
Ensayo de Resinas	Resinas		(-)	(-)
Ensayo de espuma	Saponina		(-)	
Ensayo de Feheling	Azúcares Reductores		(+)	(+)
Ensayo de Shinoda	Flavonoides		(++)	(++)
Ensayo de Cloruro férrico	Compuestos fenólicos y/o taninos		(++)	(+)
Ensayo de Borntrager	Quinonas		(+)	
Ensayo de Antocianidinas	Flavonoides		(++)	(+)

+++ ALTA EVIDENCIA      ++ EVIDENCIA  
+ BAJA EVIDENCIA      - NEGATIVO

En el cuadro No 8 se procedió a la identificación preliminar de los metabolitos secundarios en los diferentes tipos de solventes de polaridad creciente (éter etílico, metanol y agua destilada).

Siguiendo el esquema del cribado fitoquímico realizado por triplicado discutimos la presencia de los siguientes metabolitos:

- ❖ La identificación de flavonoides fue positiva dando una coloración naranja y roja en los extractos alcohólico y acuoso respectivamente. Esto concuerda con los estudios realizados por Alonso, donde se identifican las flavonas e isoflavonas.
- ❖ La presencia de antocianidina fue positiva dando una coloración roja a marrón en la fase amfílica del extracto etanólico. Esto concuerda con los estudios realizados por Kvist. A., (1984) en donde se identificó a la antocianidina.
- ❖ La identificación de alcaloides fue positiva en el extracto alcohólico y acuoso considerando la presencia de turbidez y precipitación. Según los estudios realizados por Rice. G., (1999) en donde se identificaron a los alcaloides, concuerda con nuestro estudio.
- ❖ Los triterpenos y/o esteroides fue positiva en el extracto alcohólico dando una coloración rosado-azul y verde intensa respectivamente. De acuerdo a Fuente. G (1988), concuerda con los estudios sobre triterpenos y/o esteroides.
- ❖ La presencia de catequinas fue positiva dando un color verde carmelita a la luz UV. La identificación de las lactonas fue positiva dando un precipitado rojo y los fenoles - taninos dan color rojo-vino en el extracto etanólico. Al comparar con los estudios de Rodriguez. R., (2001) sobre las catequinas concuerdan con nuestro estudio.

Estos resultados son coincidentes con los de otros estudios de la familia de las Fabaceae, especies de *Bauhinia kalbreyeri* (GUPTA et al., 2005). En esta investigación se detectaron los siguientes compuestos comunes a las fabáceas: flavonoides, antocianidina, alcaloides, catequinas, triterpenos y/o esteroides, y compuestos grasos.

Luego de realizar la identificación preliminar y según la literatura revisada, es muy interesante destacar que los metabolitos secundarios representativos de la alfalfa (*Medicago sativa L.*) con potencial farmacológico son los esteroides y los compuestos fenólicos entre ellos los flavonoides, cuya actividad fitoestrogénica los hacen comparables a una hormona femenina exógena que cumple la misma función del estrógeno endógeno ya que la concentración mínima o ausencia de esta hormona puede estar provocada por múltiples factores internos y externos que influyen directamente sobre el conjunto de fenómenos de autorregulación, que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno del organismo, alterándola, y desencadenado en patologías como la infertilidad y la osteoporosis. En evidencia a estos sucesos se atribuyó la actividad estrogénica a este grupo complejo de flavonoides y esteroides. Comparación que se lo hace con la investigación desarrollada por artículo de ELSEVIER, Fitoterapia 73 (2002) 472-478.

### 3.4. ESTUDIO CROMATOGRÁFICO EN CAPA FINA

**CUADRO No 9. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (FLAVONOIDES) DEL EXTRACTOALCOHÓLICO DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*). FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO 2012.**

PLACA	COLOR	Rf	COMPUESTOS IDENTIFICADOS
	<b>Quercetina</b>	0,27	Amarillo verdoso
	<b>Ácido caféico</b>	0,30	Café
		0,38	
		0,41	
	<b>3-hidroxi flavona</b>	0,80	Amarillo oscuro
		0,87	
		0,88	
		0,90	
	<b>Flavona</b>	0,92	

FUENTE: HILDEBERT WAGNER.SABINE BLADTS.1996

**Fase estacionaria:** Sílice Gel 60 F<sub>254</sub>

**Fase móvil:** Tolueno, Acetato de Etilo: Ácido Acético; (36:12:5)

**Revelador:** Sulfato de cerio

De acuerdo al cuadro N°9 de la cromatografía en capa fina para flavonoides se encontraron varios compuestos de tipo flavonoides. El primer compuesto que se logró evidenciar pertenece a la Quercetina con un R<sub>f</sub> de 0,27. El siguiente compuesto probablemente pertenece a la 3-hidroxifavona con un R<sub>f</sub> de 0,80, a un R<sub>f</sub> de 0,92 probablemente pertenece a una flavona. Por último a un R<sub>f</sub> de 0,30 probablemente pertenece al ácido cafeico.

En la cromatografía de capa fina los metabolitos descritos anteriormente, previamente calculados los R<sub>f</sub>, estos metabolitos han sido comparados con la cromatografía en capa fina para flavonoides donde son citados con sus respectivos R<sub>f</sub> (WAGNER.H, BLADTS.1996)

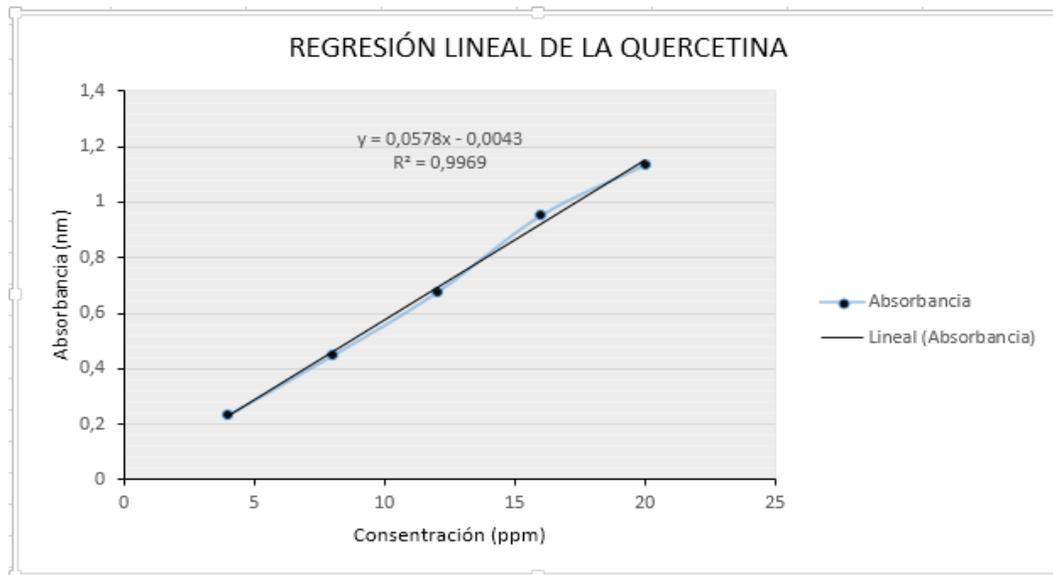
### 3.5. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO QUERCETINA.

**CUADRO No 10. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*) EXPRESADOS COMO QUERCETINA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

Absorbancia muestra	Longitud de onda (nm)
<b>0.492</b>	<b>258</b>

CURVA DE CALIBRACIÓN (QUERCETINA)	
Concentración,(ppm)	Absorbancia
<b>4</b>	0,233
<b>8</b>	0,448
<b>12</b>	0,675
<b>16</b>	0,953
<b>20</b>	1,136



**GRAFICA No 1. REGRESIÓN LINEAL DEL ESTÁNDAR DE QUECETINA**

**Cálculos:**

$$A = -4,30 \times 10^{-3} + 0,057775C$$

$$C = 9.0 \frac{\mu g}{mL}$$

$$\%Concentración = \frac{9.0 \mu g Querc}{1 mL} \times \frac{25 mL}{3 mL} \times \frac{100 mL}{1 g Muestra} \times \frac{1 mg}{1000 \mu g} \times \frac{1 g}{1000 mg} \times 100$$

$$\%Concentración = 0,75\%$$

De acuerdo al cuadro N° 10 de cuantificación de flavonoide totales expresados como Quercetina; el 0,75% es el porcentaje de flavonoides totales como Quercetina. Por lo tanto que en un gramo de alfalfa se encuentra un 0,75% de flavonoides. Dicho análisis se lo realizó con una quercetina al (100%) como estándar. La familia de las Fabaceae, especies de *Bauhinia kalbreyeri*, señala la presencia de flavonoides en un porcentaje no superior al 2 % citada en GUPTA et al., (2005).

### 3.6. ESTUDIO CROMATOGRÁFICO DE BETA SITOSTEROL POR TLC

CUADRO No 11. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA ( $\beta$ -SITOSTEROL) DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*). FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO. 2012.

PLACA	ALFALFA	ESTANDAR	
	<b>COLOR</b>	Morado-violáceo	Morado-violáceo
	<b>Rf</b>	0.78	0.78
	<b>COMPUESTO</b>	Beta-sitosterol	Beta-sitosterol

FUENTE: CLINICA Y CIENCIA, Determinación Cuantitativa de  $\beta$ -Sitosterol presente en Vegetales; 2004, vol.02, n°2.

**Fase Estacionaria:** Sílice Gel 60 F<sub>254</sub>

**Fase Móvil (A):** Cloroformo, Metanol, Agua; (10:1:0,05);

**Fase Móvil (B):** Cloroformo.

**Reveladores:**

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 18% ó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Vainillina.
- Revelador de Liberman Bouchard.

Como se nota en la cuadro No 11, se puede apreciar la presencia de  $\beta$ -sitosterol a un Rf de 0,78 con una color de morado-violáceo, medio igualmente con el estándar de  $\beta$ -sitosterol que igualmente se encuentra en un rango de Rf de 0.78.

El  $\beta$ -sitosterol se logró separar gracia a la utilización de dos sistemas de fase móvil, el primero fue un sistema de corrido fue polar por ende van a quedar retenidos todos los compuesto polares y el segundo sistema es apolar por ende los compuestos apolares van a ser separados en este sistema y por lo tanto permite identificar al  $\beta$ -sitosterol. Comparación que se lo hace con la investigación desarrollada en la familia de las Fabáceae especie *Medicago* por MANCHENO. J., (2008).

### **3.7. EFECTO ESTROGÉNICO**

#### **3.7.1 EFECTO ESTROGÉNICO DEL EXTRACTO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*) EN *Rattus novergicus***

##### **3.7.1.1 Evaluación del peso inicial y final de los reactivos biológicos en la investigación**

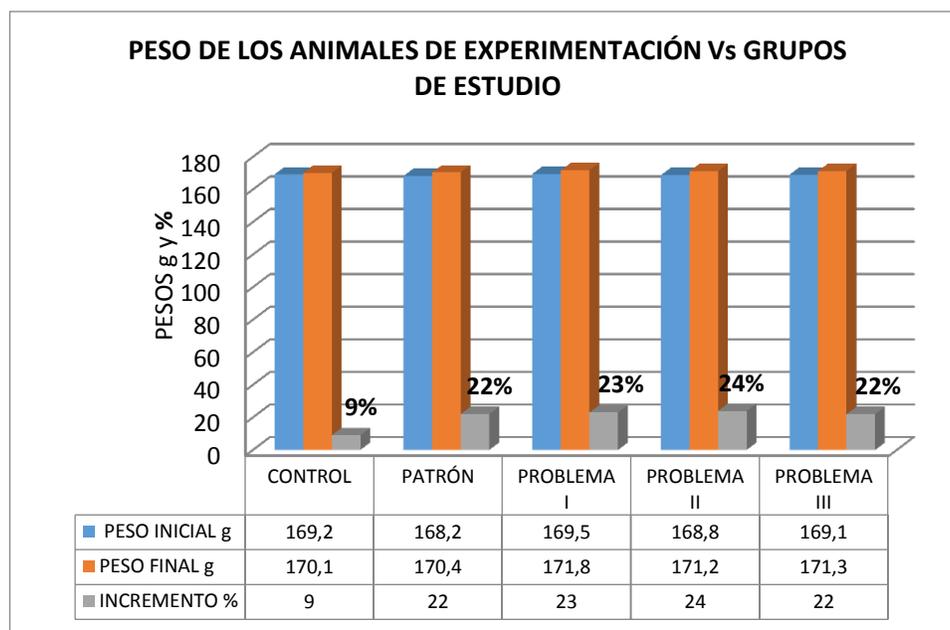
Al extracto hidroalcohólico se le evaporó el etanol para evitar gastritis de las ratas y se les administró en dosis de: dosis baja (8,93mg/Kg), dosis media (17,86mg/Kg) y dosis alta (35,72mg/Kg). Tratamiento que se lo realizó por 15 días.

El peso se evaluó al inicio de la investigación y transcurrido los 15 días se volvió a pesarles para conocer de qué manera variaron los pesos con respecto al extracto administrado; viéndose un incremento en los pesos determinados.

**CUADRO No 12. PESO PROMEDIO DE LAS RATAS EN CADA GRUPO EXPERIMENTAL ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

GRUPOS	$\bar{X}$ PESO (g) ANTES	$\bar{X}$ PESO (g) DESPUES	INCREMENTO (g)	INCREMENTO %
CONTROL	169,2	170.1	0.9	9
PATRÓN	168,2	170.4	2.2	22
PROBLEMA I	169,5	171,8	2.3	23
PROBLEMA II	168,8	171.2	2.4	24
PROBLEMA III	169,1	171.3	2.2	22
<b>Promedio</b>	$\Sigma_{PA} = 169,0$			

FUENTE: PACA, N. 2012



**GRAFICA No 2. RESULTADOS DEL PESO INICIAL Y PESO FINAL DURANTE LA INVESTIGACION A LOS GRUPOS EXPERIMENTALES. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

Los resultados en el cuadro No 12, demuestran lo siguiente:

El promedio de los pesos iniciales de los animales de experimentación se encuentra en un rango de 169g. Se comprueba que existe una variación de 2g al final del experimento.

Se comprobó que los pesos finales de los grupos experimentales (patrón, dosis baja, dosis media y dosis alta) no incrementan, tanto al administrar al patrón (Medicamento Comercial), dosis baja (8,93mg/Kg), dosis media (17,86 mg/Kg) y dosis alta (35,72mg/Kg), en un tiempo de 15 días.

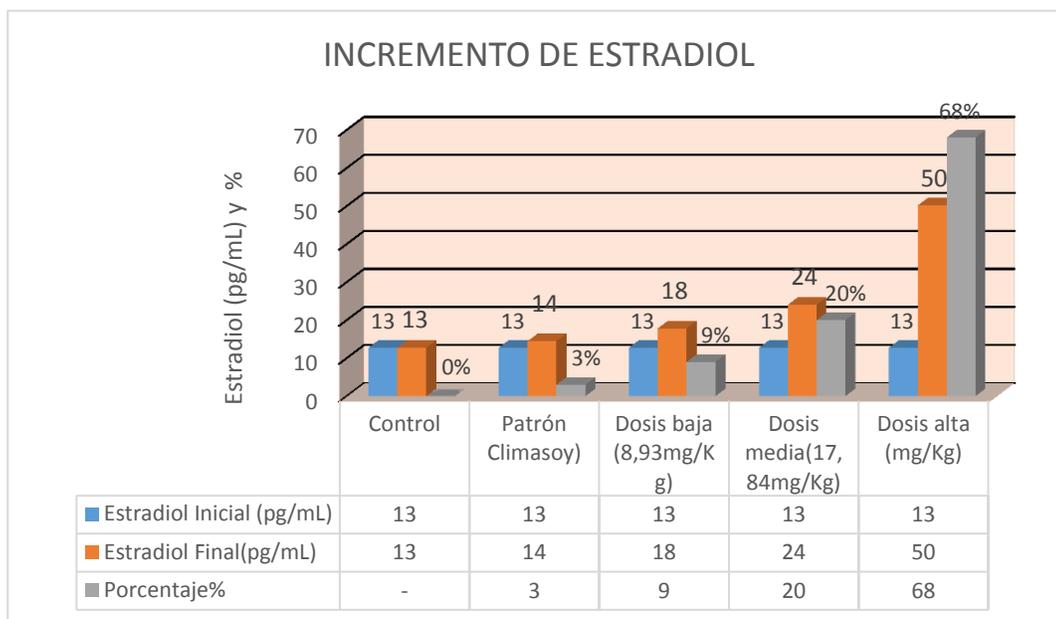
Se complementa esta conclusión con la gráfica No 2, ya que se observa que los pesos finales de los animales no son diferentes con respecto a los pesos iniciales.

### 3.7.1.2 Determinación de los niveles de estradiol inicial y final en los animales de experimentación

**CUADRO No 13. NIVELES DE ESTRADIOL INICIAL Y FINAL EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN pg/dL BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO 2012**

<b>GRUPOS EXPERIMENTALES</b>	<b>ESTRADIOL INICIAL (pg/mL)</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>ESTRADIOL FINAL (pg/mL)</b>	<b>Incremento (pg/mL)</b>	<b>Incremento (%)</b>
<b>CONTROL</b>	12,70±0.017	NaCl 0,9%	12,71±0.018	0,01	0,0
<b>PATRÓN</b>	12,70±0.017	Climasoy 3,64 mg/Kg/día	14,44±0.1276	1,74	3
<b>DOSIS BAJA</b>	12,71±0.018	8.93 mg/Kg/día E.A	17.80±0.1573	5.09	9
<b>DOSIS MEDIA</b>	12,69±0.01	17.86 mg/Kg/día E.A	24.00±0.2121	11.31	20
<b>DOSIS ALTA</b>	12,71±0.018	36,72mg/Kg/día E.A	50.15±0.4432	37.44	68

FUENTE: PACA, N. 2012



**GRÁFICA No 3. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL INICIAL Y FINAL CON RESPECTO AL TRATAMIENTO QUE RECIBIÒ CADA GRUPO EXPERIMENTAL. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012.**

En el cuadro No 13, se presenta los niveles de estradiol inicial y final de los grupos experimentales, dando los siguientes resultados:

En el grupo control los niveles de estradiol, no cambiò se mantiene en un mismo nivel que es de  $12,70 \pm 0.018 \text{ pg/dL}$ , ya que no se administrò ninguna sustancia.

En el grupo patròn (administrado con medicamento comercial) los resultados expuestos en el cuadro No 13, señala que los valores de estradiol incrementan a  $14.44 \pm 0.1274 \text{ pg/dL}$ , en porcentaje de 3% al final del estudio.

Con respecto a los diferentes tratamientos de dosis del extracto hidroalcohòlico de alfalfa que se observa en el gráfico No 3 se indica que: la dosis baja del extracto hidroalcohòlico de alfalfa (*Medicago sativa L*) tienen un acción efectiva en un porcentaje de 9% de estradiol

frente al grupo control. Al observar los resultados del grupo del extracto hidroalcohólico de alfalfa de la dosis media se incrementó a  $17.80 \pm 0.1573$  pg/dL, en un porcentaje de 20% frente al grupo control. Los niveles de estradiol final en los animales de experimentación del grupo de dosis alta del extracto hidroalcohólico de alfalfa presenta un incremento a  $50.15 \pm 0.4432$  pg/dL en un 68% frente al grupo control. De acuerdo al artículo P.B. Telefo et al. 2002 existe una similitud de los datos finales obtenidos anteriormente de los niveles de estradiol final.

### 3.7.1.3. Análisis estadístico ANOVA

- **Análisis estadístico ANOVA comparaciones múltiples para la determinación de estradiol final a los diferentes grupos experimentales.**

**CUADRO No 14. ANOVA COMPARACIONES MÚLTIPLES DE LA MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL FINAL DURANTE LA INVESTIGACIÓN DEL CONTROL, PATRÓN, Y LOS GRUPOS EXPERIMENTALES. BIOTERIO FACULTAD DE CIENCIAS. RIOBAMBA. AGOSTO 2012**

<b>GRUPOS</b>	<b>N</b>	<b>Grupos media</b>	<b>Homogéneos</b>
<b>CONTROL</b>	<b>3</b>	<b>12.7000</b>	<b>X</b>
<b>PATRÓN (Climasoy)</b>	<b>3</b>	<b>14.4400</b>	<b>X</b>
<b>PROBLEMA I (8.93mg/mL)</b>	<b>3</b>	<b>17.8033</b>	<b>X</b>
<b>PROBLEMA II (17.86mg/mL)</b>	<b>3</b>	<b>24.0033</b>	<b>X</b>
<b>PROBLEMA III (35,72mg/mL)</b>	<b>3</b>	<b>50.1500</b>	<b>X</b>

FUENTE: PACA, N. 2012

En el cuadro No 14, comparaciones múltiples Tuckey HSD al 99.00% se ve claramente que los datos no son homogéneos es decir que tanto el grupo patrón y los grupos experimentales son diferentes frente al grupo control, esto también se complementa con el porcentaje de medias del grupo patrón y los grupos de experimentación ya que igualmente son diferentes.

Se concluye que al administrar el extracto hidroalcohólico de alfalfa a diferentes dosis estos provocan un incremento significativo frente a los grupos patrón y control.

➤ **Análisis estadístico T-student para la determinación de Estradiol final a los diferentes grupos experimentales**

**CUADRO No 15. ANOVA T-student DE LA MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL FINAL DURANTE LA INVESTIGACIÓN DEL CONTROL, PATRON, Y LOS GRUPOS EXPERIMENTALES. FACULTAD DE CIENCIAS RIOBAMBA. AGOSTO 2012.**

	Suma de Cuadrados	de G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
<b>Entre Grupos</b>	2823.4248	4	705.8562	6228142.8529	0.0006E-28
<b>Dentro Grupos</b>	0.0011	10	0.0001		
<b>Total (corr.)</b>	2823.4259	14			

FUENTE: PACA, N. 2012

El análisis de ANOVA en el cuadro No 15, tiene como fin analizar las medias; es así que el p-valor es de 0,0006E-28 y nuestro F-critico es de 6228142.8529, valor que es menor que 0.05 por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis H1 “las medias son diferentes”, por lo tanto se concluye que al administrar el extracto de alfalfa a los animales de experimentación presentan un incremento significativo de estradiol.

**3.7.2 PRUEBAS PRELIMINARES COMPLEMENTARIAS SOBRE EL INCREMENTO DE PESOS DE LOS OVARIOS DEL GRUPO CONTROL, GRUPO PATRÓN Y GRUPOS EXPERIMENTALES DURANTE LA INVESTIGACIÓN**

Se realizó las pruebas preliminares de la medición de los pesos de los ovarios del reactivo biológico (ratas) en el cual se nos permitió observar que los pesos del grupo Patrón y los grupos experimentales aumentan significativamente frente al grupo control.

El grupo Patrón presenta un porcentaje de 25% al final del tratamiento con el medicamento comercial, la dosis baja con un porcentaje de 22%, dosis media en un porcentaje de 25% y el grupo de dosis alta en un porcentaje de 28% frente al del grupo control. Por lo que se puede decir que de acuerdo a las pruebas preliminares complementarias, los grupos que presenta un incremento significativo fue dosis alta, dosis media y dosis baja administrada con el extracto hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa* L.). (Ver anexo 11)

### **3.7.3 PRUEBAS PRELIMINARES COMPLEMENTARIAS SOBRE EL INCREMENTO DE PESOS DE ÚTERO DEL GRUPO CONTROL, GRUPO PATRÓN Y GRUPOS EXPERIMENTALES DURANTE LA INVESTIGACIÓN**

Se realizó las pruebas preliminares de la medición de los pesos del útero del reactivo biológico (ratas) en el cual se nos permitió observar que los pesos del grupo Patrón y los grupos experimentales aumentan significativamente frente al grupo control.

El grupo Patrón presenta un porcentaje de 13% al final del tratamiento con el medicamento comercial, la dosis baja con un porcentaje de 14%, dosis media en un porcentaje de 44% y el grupo de dosis alta en un porcentaje de 44% frente al del grupo control. Por lo que se puede decir que de acuerdo a las pruebas preliminares complementarias, los grupos que presenta un incremento significativo fue dosis alta, dosis media y dosis baja administrada con el extracto hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa* L.).(Ver anexo 11)

### **3.8 TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE ALFALFA (*Medicago Sativa* L.)**

El estudio de toxicidad aguda, no reportó ningún deceso de los grupos de experimentación sometidos a las dosis administradas por vía orogastrica (8,93; 17,86 y 35.72 mg/Kg/día). Así como su comportamiento fue normal a lo largo de la fase de estudio además como se puede observar en el gráfico N°5, la variación de peso de los grupos de estudio no presentó diferencia estadísticamente significativa al 99% de confianza entre los grupos en tratamiento. Además se evaluó la organotoxicidad a nivel histológico de los órganos farmacocinéticas más representativos (Estómago, Hígado, Riñón), resultando negativo para daño histológico a las dosis administradas, resultado emitido por el Dr. Oswaldo Duque (Patólogo SOLCA-RIOBMABA). Con estos estudios realizados resulta ser segura y eficaz nuestra planta a las dosis establecidas. (Ver anexo 9)

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES

1. Los resultados de pH, cenizas totales ,cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en HCl que se obtuvo del control de calidad de la materia prima demuestran que están dentro de los límites establecidos respecto a la USP. (Ver cuadros 1,2,3,4,5,6,7,8,).
2. El tamizaje fitoquímico de la hojas de alfalfa ha demostrado baja evidencia de catequinas, resinas y saponinas. La presencia de metabolitos secundarios representativos con potencial farmacológico son los flavonoides, compuestos fenólicos, esteroides, ya que son estos los compuestos quienes definen la actividad estrogénica utilizada para nuestro estudio. (Ver cuadro No 8.).
3. Se determinó que en las hojas de alfalfa (*Medicago sativa L*) se encontraron un 0.76% de flavonoides expresados como quercetina.( Ver cuadro No 10.)
4. En la administración de las tres dosis de extracto hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa L*) produce un incremento poco significativo de peso con respecto al grupo control.(Ver cuadro No 11.)
5. Las tres dosis preparadas a partir del extracto hidroalcohólico de hojas de alfalfa (*Medicago sativa L.*); Dosis baja(8,93 mg/Kg), Dosis media (17,86 mg/Kg), Dosis alta (35,72mg/Kg) producen un incremento de los niveles de estradiol al finalizar el estudio según los resultados expresados en el cuadro No 12.
  - A un nivel de significancia estadística del 99% y un posterior analisis de comparacion multiples (Prueba de Tuckey SHD), con los resultados de los niveles de

estradiol obtenidos a los 15 días después de los respectivos tratamientos, indicados, existen tres grupos estadísticamente diferentes frente al grupo control; por tal razón se dice que el extracto hidroalcohólico de alfalfa administrada a diferentes dosis como son dosis baja, dosis media y dosis alta poseen efecto estrogénico.

6. Los grupos experimentales que recibieron el extracto alcohólico, fueron sometidos al estudio de Toxicidad aguda durante 14 días, gracias a este estudio se determinó que a las dosis analizadas por vía oral (8,93mg/kg, 17,86mg/Kg, 35,72mg/Kg), el EHA de alfalfa (*Medicago sativa L.*), no resultó ser tóxico, confirmándolo posteriormente con el estudio histopatológico donde los órganos farmacocinéticos involucrados (Hígado, riñón, Estómago) no presentaron daño en la parénquima (resultado emitido por el Dr. Oswaldo Duque patólogo SOLCA-Riobamba), con lo cual se concluye que el extracto administrado es seguro.

## CAPÍTULO V

### 4. RECOMENDACIONES

1. Realizar nuevos estudio fitoquimicos para conocer los componentes presedentes en las hojas de alfalfa e investigar nuevas propiedades farmacologicas.
2. Minimizar en lo posible el daño al reactivo biológico utilizado ya que su temperamento depende durante las pruebas clinicas y la investigación en general para la recolección de datos.
3. Realizar nuevas investigaciones y profundizarvel estudio utilizando los componentes que contienen las hojas de alfalfa de una manera pura y en otris efecos para poder tratar otras enfermedades.
4. Se estudie los efectos secundarios de la toma de alfalfa (*Mediacgo sativa L.*) en poblaciòn y su correspondencia con lo observado en los tratamientos hormonales para la menopausia e infertilidad.
5. Estudiar el efecto anticonseptivo a grandes dosis.

## CAPÍTULO VI

### 6. RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo determinar el efecto estrogénico de las hojas de alfalfa (*Medicago sativa L*) en ratas (*Rattus norvegicus*) mediante el método científico analítico determinando los niveles de estradiol, para la cual se realizó la toma de la sangre a las ratas de laboratorio al inicio y al final del experimento, como también la medición de los pesos de los ovarios y úteros del material biológico. Se utilizó 15 ratas divididas en 5 grupos denominados: Control (vehículo), Patrón (medicamento comercial “climasoy”), Grupos Dosis Baja (8.93 mg/Kg de peso), Dosis Media (17.84 mg/Kg de peso) y Dosis Alta (35.72mg/Kg de peso), investigación desarrollada en el Bioterio, de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Para el análisis de datos obtenidos se utilizó el test ANOVA de un factor con datos agrupados y la prueba de Tuckey a un intervalo de confianza del 99%.

Después de haber aplicado el tratamiento del extracto de hojas de alfalfa, el nivel de estradiol final fue de: **Control:** 12.17 pg/mL; **Patrón:** 14.44 pg/mL; **dosis baja:** 17.80pg/mL; **dosis media:** 24 pg/mL; y **dosis alta:** 50.15 pg/mL. También se pudo determinar los pesos de los ovarios del **Grupo Control:** 163 mg; **Patrón:** 251 mg; **dosis baja:** 243 mg; **dosis media:**252 mg; y **dosis alta:** 265mg, como también los pesos del Útero del **Grupo control:** 333 mg; **Patrón:**435 mg; **dosis baja:** 560 mg; **dosis media:** 446mg; y **dosis alta:** 678 mg.

Concluyo de esta manera que la administración del extracto hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa L*) producen un efecto estrogénico, tanto al evaluar los niveles de estradiol inicial y final, como al medir los pesos de los ovarios, úteros del material biológico. Se recomienda que apartir de esta investigación, se realicen futuros estudios sobre la alfalfa (*Medicago sativa L.*) que contribuyan a mejorar el estilo de vida de la mujer infertilidad.

## SUMMARY

The present research sets like its objective to determine the estrogenic effect of the alfalfa leaves (*Medicago sativa L*) in rats (*Rattus norvegicus*) by means of the analytical scientific method determining the levels of estradiol, for which samples of blood from laboratory rats were taken at the beginning and at the end of the experiment, as well as the measurement of the weights of the ovaries and uteri of the biological samples. It was used 15 rats divided in 5 denominated groups: Control (vehicle), Patrón (commercial medicine "Climasoy"), low Dose Groups (8.93 mg/Kg of weight), Average Dose (17.84 mg/Kg of weight) and High Dose (35.72mg/Kg of weight), investigation developed in the Bioterio of the Sciences Faculty al Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. For the analysis of collected data it was used test ANOVA of one factor with grouped data and the Tucey test at a confidence interval of 99%.

Once applied the treatment of the extract of alfalfa leaves, the final level of estradiol was of: Control: 12.71 pg/mL; Patrón: 14.44 pg/mL; Low Dose: 17.80pg/mL; Average Dose: 24 pg/mL;and Hihg Dose: 50.15 pg/mL.Also it was possible to be determined the weights of the ovaries of: Control Group: 163 mg; Patrón: 251 mg; Low Dose: 243 mg; Average Dose: 252 mg; And High Dose: 265mg, like also the weights of the uterus of: Control Group: 333 mg; Patrón:435 mg; Low Dose: 560 mg; Average Dose: 446mg; and high Dose: 678 mg.

It was concluded this way that the administration of the hydroalcoholic extract of the alfalfa produces a estrogenic effect when evaluating the initial and final levels of estradiol, like when measuring the weights of the ovaries and uteri of the biological samples.

It is recommended, based on this investigation, to carry out future studies on the alfalfa components, that contribute to contribute to improve the life style of infertile women.

## CAPÍTULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍAS

1. **ALBORNOZ, A.**, Productos Naturales., 2va ed., Caracas-Venezuela., Editorial Universitaria., 1980., pp.15-50
2. **ARIAS, H., y Otros.**, Plantas Medicinales., 8va ed., México DF-México., Editorial Biblioteca Práctica., 1976., pp. 15-23
3. **BRANN, W., y Otros.**, Diversidades emergentes en el mecanismo de acción de la hormona esteroide., 17va ed., Barcelona-España., Editorial Andaluza., 1995., pp. 113-133
4. **BRIJ KOTHARI.**, Plantas Medicinales del campo., 2va. ed., Quito-Ecuador., Editorial Abya-yala., 1993., pp. 208-219
5. **CASSIDY, A., y Otros.**, Orígenes, metabolismo e importante potencial para la salud humana de isoflavonas., 3va ed., Londres- Inglaterra., Editorial London Smith Gordon., 1994., pp.92-102
6. **CLAUS, E., y Otros.**, Farmacognosia., 12va ed., Caracas-Venezuela., Editorial Tyler.,1970., pp.60-65
7. **DOMINGUEZ, X.**, Métodos de investigación fotoquímica., 9va ed., México DF-México., Editorial Limusa., 1992., pp.936- 940.

8. **DUNCAN, A.**, Fitoestrógenos en la salud., 2va ed., Washington -USA., Editorial Trillas., 2003., pp. 253-260
9. **FREIRE, H.**, Química General., 2va ed., Quito – Ecuador., Editorial Smith., 1995., pp. 20-46
10. **IGLESIAS, G.**, Medicinas de los Quichuas de Napo., 2va ed., Quito-Ecuador., Editorial Abya-yala., 1993., pp.27-30
11. **GESCHER, A., y Otros.**, Supresión del desarrollo del tumor por sustancias derivadas de los mecanismos de la dieta y las implicaciones clínicas., 19va ed., Washington-USA., Editorial Universitaria., 1998., pp.1-12
12. **GONZÁLEZ, J.**, Esterilidad e Infertilidad en Ginecología., 4va. ed., Barcelona-España., Editorial Salvat., 1986., pp.136-148
13. **GUYTON, H.**, Tratado de Fisiología Médica., 10 va ed., México DF-México., Editorial Mc Graw Hill Interamericana., 2001., pp.1117-1133
14. **HALVERSON, M.**, Guía para Cuidados y Uso de Animales de Experimentación., 18va ed., Buenos Aires-Argentina., Editorial Universitaria., 2005., pp. 85-100
15. **HARLANS, J.**, La soja en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas., 3va ed., California-USA., 2001., pp. 89-95
16. **HARRISON, D.**, Principios de Medicina Interna., 15va ed., Madrid-España., Editorial Mc Graw Hill Interamericana., 2005., pp.345-362

17. **HARRISON.,** Principios de Anatomía Femenina., 15 va ed., México DF - México., Editorial Mc Graw Hill Interamericana., 2002., pp.2519-2536
18. **JORGE ALONSO.,** Tratados de Fitofármacos y Nutraceuticos.; 20va ed., Rosario-Argentina., Editorial Corpus., 2004., pp.120-124
19. **KENNETH D., y Otros.,** Las isoflavonas dietéticas y relevancia para la salud humana., 30va ed., California-USA., Editorial Wiley., 1999., pp. 758-767.
20. **MARRISON, K.,** Anatomía y Fisiología., 2va ed., México DF-México., Editorial McGraw-Hill., 2003., pp.2519-2536
21. **REMINGTON, N.,** Isofalvonas y salud; Traducido del Inglés por Mario Arnoldo y Barcelona de Guerrero., 24va ed., Buenos Aries-Argentina., Editorial Panamericana Lucia., 2003., pp.1893-1895
22. **SETCHELL .D.,** Los fitoestrógenos: Bioquímica, Fisiología, y las implicaciones para la salud de las isoflavonas de soja., 6va ed., Boston-USA., Editorial Wiley., 1998., pp.1333-1346
23. **TREASE, E.,** Farmacología., 13va ed., Washington D.C-USA., Editorial McGraw-Hill., 1991., pp.98-120
24. **TETSUKA, M y Otros.,** Isoflavonas y los receptores de estrógenos en el tejido reproductivo femenino., 8va ed., California-USA., 1997., pp. 150-152.

25. **CÁCERES, H.**, “El efecto del fitoestrógeno de la soya (Isoflavonas) sobre el endometrio de las ratas”, Título de Médico cirujano. Facultad de Medicina, Escuela de Química y Farmacia., Nueva Guatemala-Guatemala., **Tesis**, 2003 pp. 30-40
  
26. **CARRILLO PAULINA.**, “Comprobación del efecto hipoglucemiante del zumo del fruto de Noni (*Morinda citrifolia*) en ratas (*Rattus novergicus*) con Hiperglucemia inducida”. Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba-Ecuador., **Tesis.**, 2011., pp.50-55
  
27. **LEÓN JACQUELINE.** “Efecto Hipoglucemiante del Extracto de las Hojas de Frutipan (*Artocarpus altilis*), en Ratas (*Rattus novergicus*) con Hiperglicemia Inducida”, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior politécnica de Chimborazo, Riobamba-Ecuador. **Tesis**, 2012., pp.40-49
  
28. **PIÑEIRO, V.**, “Alimentación de conejos con Morera (*Morus alba*) o Cayena (*Hisbicus rosa-sinensis*) y su efecto sobre el crecimiento y la morfología del tracto reproductor.” Título de Máster., Facultad de Ciencias Química y Farmacia. Escuela de Estudios de Posgrados., Nueva Guatemala–Guatemala., **Tesis.**, 2007., pp. 15-22

## **BIBLIOGRAFÍA INTERNET**

**29. APARICIO, B.** Vistazo Vida Moderna

[http://www.fecolsog.org/file/revista/Revista\\_Vol54No4\\_Diciembre\\_2003/v54n4a0.pdf](http://www.fecolsog.org/file/revista/Revista_Vol54No4_Diciembre_2003/v54n4a0.pdf)  
2012/09/20

**30. ALFALFA** *Medicago sativa L.*

<http://www.illinoiswildflowers.info/weeds/plants/alfalfa.pdf>  
2012/08/26

**31. CLIMASOY**

[http://www.edifarm.com.ec/edifarm\\_quickmed/pdf/productos/CLIMASOY-201207.pdf](http://www.edifarm.com.ec/edifarm_quickmed/pdf/productos/CLIMASOY-201207.pdf)  
[2012/07/18](http://www.edifarm.com.ec/edifarm_quickmed/pdf/productos/CLIMASOY-201207.pdf)

**32. CONCEPTOS DE ANATOMÍA Y FISILOGIA SEXUAL FEMENINA**

<http://www.gratislibros.com.ar/textos/anatomia-y-fisiologia-funcion-sexual-femenina-ovario-concepto-anatomia.pdf>  
2012/09/10

**33. EL ESTRÓGENO NATURAL DE LA PLANTA**

<http://www.articles3k.com/es/190/152451/El-estrogeno-natural-de-la-planta-proporciona-un-equilibrio-natural-de-la-hormona.pdf>  
2012/10/22

**34. ESTROGENOTERAPIA**

<http://www.climaterio.cl/files/EstrogenoterapiaDrArteaga.pdf>  
2012/10/23

**35. EXTRACCIÓN DE SANGRE EN LOS MAMIFEROS Y AVES DE LABORATORIO**

<http://www.secal.es/ficheros/ficheros/refinamiento%20extraccion%20sangre.pdf>

2012/10/01

**36. FITOMEDICAMENTOS.**

<http://fitomedicamentos.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=356.pdf>

2010/10/12

**37. FITOESTROGENOS**

<http://www.mafre.com/salud/es/sinformativo/fitoestrógenos.pdf>

2012/10/19

**38. FITOESTRÓGENOS. COMPUESTOS CON NOMBRE DE MUJER**

<http://revista.consumer.es/web/es/20080501/alimentación/7.pdf>

2012/10/30

**39. GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO**

[http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962\\_INS68.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962_INS68.pdf)

201209/01

**40. INFERTILIDAD**

<http://www.mapfre.com/salud/es/cinformativo/infertilidad.shtml>

2012/08/08

**41. LEYVA, E., y otros. Animales de experimentación**

<http://www.profesorenlinea.cl/fauna/Ratas.Laboratorio.pdf>

2012/07/12

42. **MACROESTETICA**

<http://www.macroestetica.com/articulos/fitoestrogenos-eficacia-y-seguridad/.pdf>  
2012/08/05

43. **MANIPULACIÓN, SUJECCIÓN, SEXADO, IDENTIFICACIÓN.**

<http://www.csic.edu.uy/cursos/2003-11-uso-manejo-animales-lab/practico.pdf>  
2011/11/12

44. **MESSINA, MARK.** La soja y las isoflavonas

<http://www.ades.edu./cursos/2009-12-la-soja-y-las-isoflavonas/articulos.ar.pdf>  
2012/07/20

45. **PICHARDO, C.** Procedimientos Experimentales.

<http://www.upo.es/laboratoriodeciencias/descargas/.pdf>  
2011/11/24

46. **ROBBERS, J.** Aspectos técnicos de la reproducción

<http://derecho.udea.edu.co/descargas/Flia2/aspectosTecReproduccion.pdf>  
2012/09/01

47. **STEINBERG, L.** Artículo de Fitoestrógenos

<http://telesalud.ucaldas.edu.co/rmc/articulos/v2e4a5.pdf>  
2012/09/20

48. **TECNICAS DE INOCULACIÓN EN RATAS**

<http://es.scrib.com/doc/3288391/tecnicas-de-inoculacion-y-sangre-de-animales.pdf>  
2012/01/07

49. **TERAPIA NATURAL PARA TRATAR LA MENOPAUSIA**

<http://www.nia.nih.gov/healthinformation/publications/spanish/menopause-sp.pdf>  
2012/09/25

50. **TÓXICOS NATURALES DE LOS ALIMENTOS**

<http://www.analizacalidad.com/toxicos.pdf>

2012/10/16

51. **TYLER, V.** Causas de la infertilidad femenina

<http://www.infertilidad.com/las-siete-causas-de-la-infertilidad-femenina.pdf>

2012/08/20

## CAPÍTULO VIII

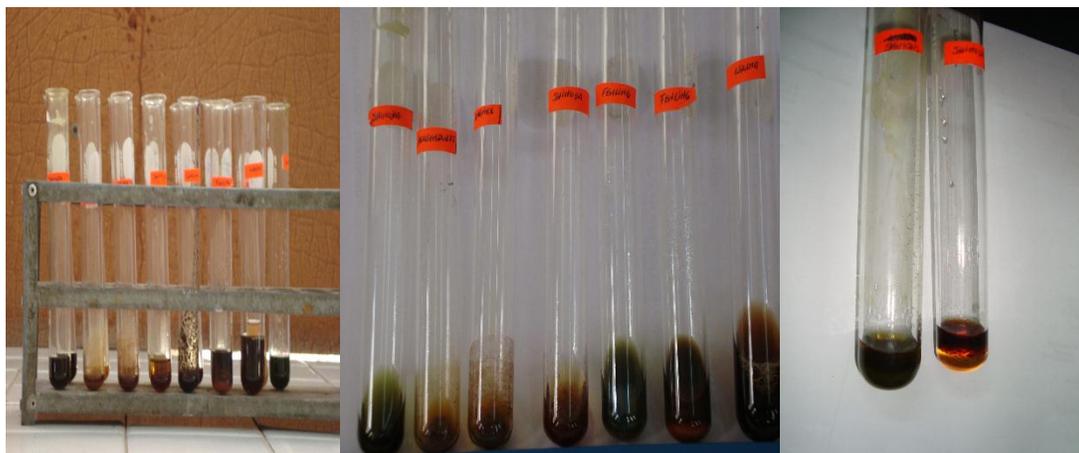
### 9. ANEXOS

**ANEXO 1. RECOLECCIÓN SECADO Y MOLIEDA DE LAS HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.). CRIMBORAZO.**



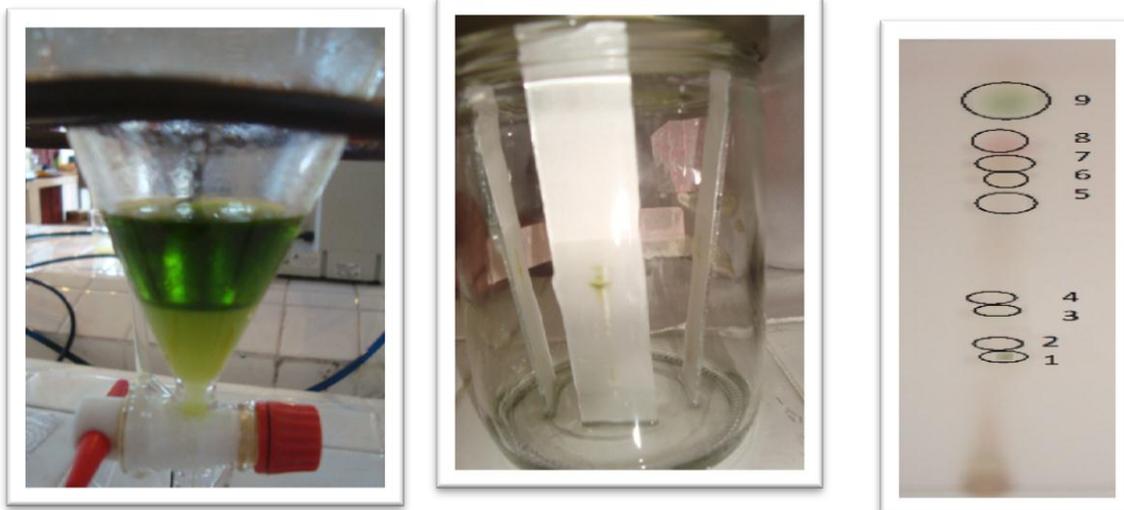
**FOTOGRAFIA No 4. RECOLECCIÓN SECADO Y MOLIEDA DE LAS HOJAS DE ALFALFA.**

**ANEXO 2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.)**



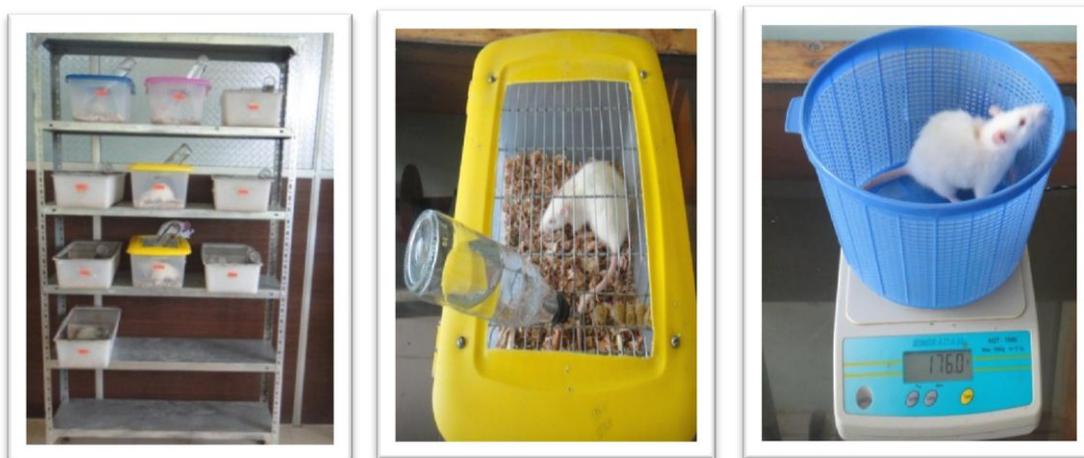
**FOTOGRAFIA No 5. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE ALFALFA**

**ANEXO 3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*).**



**FOTOGRAFIA No 6. CROMATOGRAFIA EN CAPAFINA DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa L.*)**

**ANEXO 4. AMBIENTACIÓN DE ANIMALES Y CONTROL DE PESO DE *rattus novergicus*. EN EL BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS – ESPOCH.**



**FOTOGRAFIA No 7. AMBIENTACIÓN DE LOS ANIMALES Y CONTROL DE PESO DE *rattus novergicus***

**ANEXO 5. CONCENTRACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE ALFALFA (*Medicago sativa* L).**



**FOTOGRAFIA No 8. CONCENTRACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO CONCENTRADO DE ALFALFA.**

**ANEXO 6. EQUIPOS PARA LA TOMA DE MUESTRA DE SANGRE A *rattus novergicus*.**



**FOTOGRAFIA No 9. EQUIPOS PARA LA TOMA DE MUESTRA DE SANGRE a *rattus novergicus***

**ANEXO No 7. DISECCIÓN DE *rattus novergicus*.**



**FOTOGRAFIA No 10. DISECCIÓN DE RATTUS NOVERGICUS**

**ANEXO 8. REPORTE DE RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DE HÍGADO, RIÑÓN Y ESTOMAGO DE RATAS INDUCIDAS CON EXTRACTO DE GUAYUSA, EMITIDO POR EL DR. OSWALDO DUQUE (ANATOMO-PATOLOGO SOLCA-CHIMBORAZO).**

	<b>MUESTRA</b>	<b>EXAMEN MACROSCÓPICO</b>	<b>EXAMEN MICROSCÓPICO</b>
<b>DOSIS BAJA</b>	N <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> / <sub>12</sub> HÍGADO	Color: rojo-pardo Largo: 3.9 cm Ancho: 4.1 cm Profundidad: 1.2 cm Peso: 6,32 g	Lobulillos conservados; hepatocitos de tamaño y estructura normal; sinusoides de calibre normal; espacios porta con vasos normales.
	N <sub>2</sub> CR <sub>2</sub> / <sub>12</sub> RIÑÓN	Color: rojizo Largo: 1,5 cm Ancho: 1 cm Profundidad: 0,5 cm Peso: 0,71 g	Nefronas de distribución normal; glomérulos con vascularidad y membrana normal; túbulos de calibre normal y luz permeable.
	N <sub>2</sub> CE <sub>2</sub> / <sub>12</sub> ESTÓMAGO	Color: rojo-oscuro Largo: 2.3 cm Ancho: 1.9 cm Profundidad: 0,5 cm Peso: 1,10 g	Mucosa gástrica con glándulas conservadas, lamina atrofiada estructura normal, capa muscular conservada y cerosa integra.
<b>DOSIS ALTA</b>	A <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> / <sub>12</sub> HÍGADO	Color: rojo-pardo Largo: 3.9 cm Ancho: 4.0 cm Profundidad: 1.2 cm Peso: 6,32 g	Lobulillos conservados; hepatocitos de tamaño y estructura normal; sinusoides de calibre normal; espacios porta con vasos normales.
	A <sub>2</sub> CR <sub>2</sub> / <sub>12</sub> RIÑÓN	Color: rojizo Largo: 1,5 cm Ancho: 1 cm Profundidad: 0,5 cm Peso: 0,74 g	Nefronas de distribución normal; glomérulos con vascularidad y membrana normal; túbulos de calibre normal y luz permeable.
	A <sub>2</sub> CE <sub>2</sub> / <sub>12</sub> ESTÓMAGO	Color: rojo-oscuro Largo: 2.3 cm Ancho: 1.9 cm Profundidad: 0.5 cm Peso: 1,11 g	Mucosa gástrica con glándulas conservadas, lamina atrofiada estructura normal, capa muscular conservada y cerosa integra.

Dr. Oswaldo Duque  
**ANATOMOPATÓLOGO**

**ANEXO 9. REPORTES DE LA CUANTIFICACIÓN DE ESTRADIOL, GRUPO CONTROL, GRUPO PATRÓN, DOSIS BAJA, DOSIS MEDIA Y DOSIS ALTA. RIOBAMBA SEPTIEMBRE DEL 2012.**



**PAZMIÑO  
NARVÁEZ**  
Laboratorio Clínico de Especialidades



09078017

**Dra. Diana Pazmiño Narváez**  
MD - Patóloga Clínica  
Directora de Laboratorios



Página 1 de 1 **SGS**

Nombre : CONTROL CONTROL  
Documento : 09078017-12  
Medico : NO APLICA  
Entidad : LAB. RIOBAMBA AFILIADOS

Codigo : 09078017  
Edad/Sexo : 3 M / F  
Fecha Ingreso : 2012-09-07 09:22:49  
Fecha Impresión : 2012-09-10 17:22:59.

ANALISIS	RESULTADOS	INTERVALOS BIOLÓGICOS
<b>HORMONAS</b>		
ESTRADIOL	<b>12.70</b> pg/mL	
		Niños 1 a 10 años: < 5.0 a 20.0 Niñas 1 a 10 años: 6.0 a 27.0 Hombres: 7.63 a 59.5
		<b>MUJERES</b>
		Prepuberal: 0.0 a 36.0 Fase Follicular: 12.5 a 195.0 Fase Ovulatoria: 66.1 a 498.0 Fase Lútea: 40.0 a 261.0 Postmenopausia: < 5.0 a 54.7
		<b>EMBARAZO</b>
		1er. trimes.: 215 a 4584 2do. trimes.: 801 a 5763 3er. trimes.: 1810 a 13890
Técnica: ECLIA		
Validado por: LCDA. NANCY GUEVARA		



Dra. Diana Pazmiño Narváez  
MD - Patóloga Clínica  
Directora de Laboratorios



Nombre : PATRON PATRON  
Documento : 09078016-12  
Medico : NO APLICA  
Entidad : LAB. RIOBAMBA AFILIADOS

Codigo : 09078016  
Edad/Sexo : 3 M / F  
Fecha Ingreso : 2012-09-07 09:20:28  
Fecha Impresión : 2012-09-10 17:22:33.

ANALISIS	RESULTADOS	INTERVALOS BIOLÓGICOS
<b>HORMONAS</b>		
ESTRADIOL	14.44 pg/mL	
		Niños 1 a 10 años: < 5.0 a 20.0
		Niñas 1 a 10 años: 6.0 a 27.0
		Hombres 7.63 a 59.5
		<b>MUJERES</b>
		Prepuberal: 0.0 a 36.0
		Fase Folicular: 12.5 a 195.0
		Fase Ovulatoria: 66.1 a 498.0
		Fase Lútea: 40.0 a 261.0
		Posmenopausia: < 5.0 a 54.7
		<b>EMBARAZO</b>
		1er. trimes. 215 a 4584
		2do. trimes. 801 a 5763
		3er. trimes. 1810 a 13890

Técnica: ECLIA

Validado por: LCDA. NANCY GUEVARA



Dra. Diana Pazmiño Narváez  
MD - Patóloga Clínica  
Directora de Laboratorios



Página 1 de 1

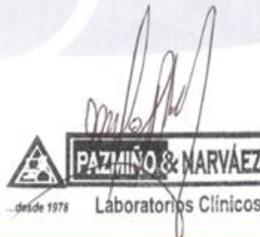
Nombre : EP - NX1 EP -NX : 1  
Documento : 09188052-  
Medico : NO APLICA  
Entidad : LAB. RIOBAMBA AFILIADOS

Codigo : 09188052  
Edad/Sexo : 3 M / F  
Fecha Ingreso : 2012-09-18 17:50:20  
Fecha Impresión : 2012-09-19 17:16:37.

ANALISIS	RESULTADOS	INTERVALOS BIOLÓGICOS
<b>HORMONAS</b>		
ESTRADIOL	17.88 pg/mL	Niños 1 a 10 años: < 5.0 a 20.0 Niñas 1 a 10 años: 6.0 a 27.0 Hombres: 7.63 a 59.5 <b>MUJERES</b> Prepuberat: 0.0 a 36.0 Fase Folicular: 12.5 a 195.0 Fase Ovulatoria: 66.1 a 498.0 Fase Lútea: 40.0 a 261.0 Posmenopausia: < 5.0 a 54.7 <b>EMBARAZO</b> 1er. trimes.: 215 a 4584 2do. trimes.: 801 a 5763 3er. trimes.: 1810 a 13890
PROGESTERONA	7.64 ng/mL	Sangre de cordón: 345 a 755 1 a 4 meses: 0.25 a 17.0 6 a 12 meses: 0.0 a 2.0 1 a 9 años: 0.0 a 1.3 Hombres: 0.0 a 1.4 <b>MUJERES:</b> Prepuberat: 0.0 a 36.0 Fase folicular: 0.0 a 1.6 Fase Ovulatoria: 0.8 a 3.0 Fase Lútea: 1.1 a 27.0 Posmenopausia: 0.0 a 1.4 Anticonceptivos: 0.34 a 1.0 <b>EMBARAZO:</b> 1er. Trimestre: 7.20 a 43.0 2do. Trimestre: 21.0 a 108 3er. Trimestre: 53.0 a 293

Técnica: ECLIA

Validado por: DRA. SOFIA VELASCO





Dra. Diana Pazmiño Narváez  
MD - Patóloga Clínica  
Directora de Laboratorios



Página 1 de 1

Nombre : NX2 NX2  
Documento : 09078015-12  
Medico : NO APLICA  
Entidad : LAB. RIOBAMBA AFILIADOS

Codigo : 09078015  
Edad/Sexo : 3 M / F  
Fecha Ingreso : 2012-09-07 09:18:28  
Fecha Impresión : 2012-09-10 17:22:04.

ANALISIS	RESULTADOS	INTERVALOS BIOLÓGICOS
<b>HORMONAS</b>		
ESTRADIOL	24.0 pg/mL	
		Niños 1 a 10 años: < 5.0 a 20.0
		Niñas 1 a 10 años: 6.0 a 27.0
		Hombres 7.63 a 59.5
		MUJERES
		Prepuberat: 0.0 a 36.0
		Fase Follicular: 12.5 a 195.0
		Fase Ovulatoria: 66.1 a 498.0
		Fase Lútea: 40.0 a 261.0
		Posmenopausia: < 5.0 a 54.7
		EMBARAZO
		1er. trimes. 215 a 4584
		2do. trimes. 801 a 5763
		3er. trimes. 1810 a 13890

Técnica: ECLIA

Validado por: LCDA. NANCY GUEVARA



Laboratorio Clínico de Especialidades



09188052

Dra. Diana Pazmiño Narváez

MD - Patóloga Clínica  
Directora de Laboratorios



Página 1 de 1

Nombre : EP - NX4 EP -NX4  
Documento : 09188052-12  
Medico : NO APLICA  
Entidad : LAB. RIOBAMBA AFILIADOS

Codigo : 09188052  
Edad/Sexo : 3 M / F  
Fecha Ingreso : 2012-09-18 17:50:20  
Fecha Impresión : 2012-09-19 17:16:37.

ANALISIS

RESULTADOS

INTERVALOS BIOLÓGICOS

HORMONAS

ESTRADIOL

50.15 pg/mL

Niños 1 a 10 años:	< 5.0	a	20.0
Niñas 1 a 10 años:	6.0	a	27.0
Hombres	7.63	a	59.5
MUJERES			
Prepuberal:	0.0	a	36.0
Fase Folicular:	12.5	a	195.0
Fase Ovulatoria:	66.1	a	498.0
Fase Lútea:	40.0	a	261.0
Posmenopausia:	< 5.0	a	54.7
EMBARAZO			
1er. trimes.	215	a	4584
2do. trimes.	801	a	5763
3er. trimes.	1810	a	13890

PROGESTERONA

7.64 ng/mL

Sangre de cordón :	345	a	755
1 a 4 meses:	0.25	a	17.0
6 a 12 meses:	0.0	a	2.0
1 a 9 años:	0.0	a	1.3
Hombres:	0.0	a	1.4
MUJERES:			
Prepuberal:	0.0	a	36.0
Fase folicular:	0.0	a	1.6
Fase Ovulatoria:	0.8	a	3.0
Fase Lútea:	1.1	a	27.0
Posmenopausia:	0.0	a	1.4
Anticonceptivos:	0.34	a	1.0
EMBARAZO:			
1er. Trimestre:	7.20	a	43.0
2do. Trimestre:	21.0	a	108
3er. Trimestre:	53.0	a	293

Técnica: ECLIA

Validado por: DRA. SOFIA VELASCO



...desde 1978



Laboratorios Clínicos

MATRIZ: Av. Gran Colombia N14-165 y Hnos. Pazmiño esq. frente a la Maternidad Isidro Ayora \* Telefax: (02) 2569-911 / (02) 2541-891 / (02) 2500-775 - Quito - ATENCIÓN LAS 24 HORAS LOS 365 DÍAS DEL AÑO

SUCURSAL 1: Edificio "FORTUNE PLAZA" torre Alemania, Alemania y Eloy Alfaro esq. planta baja Ofi. 103 Teléfono: (02)3 825-222 - Quito

SUCURSAL 2: Edificio "SOLMEDIC" torre Médica, Alemania y Eloy Alfaro planta baja - Quito

SUCURSAL 3: Edificio "LIVENZA MEDICAL CENTER" Vozandes N39-34 y Juan Diguja, planta baja ofi. 106 Telf.: (02)3 319-089 - Quito

CUMBAYÁ: Clínica La Primavera • Telfs.: (02) 2893-040 ext. 115 - Quito

RIOBAMBA: Pichincha 21-48 entre Guayaquil y 10 de Agosto • Telefax: (03) 2964-120 / Telf.: (03) 2965-491

WEB: www.pazminonarvaez.com / www.labpaznar.org / E-MAIL: labpaznar@andinanet.net / info@pazminonarvaez.com

## ANEXO 10. TÉCNICA UTILIZADA EN LA INVESTIGACIÓN

ELSEVIER

FITOTERÁPIA

www.elsevier.com/locate/litote

Fitoterapia 73 (2002) 472-478

Estrogenicidad y el efecto sobre el metabolismo hepático del extracto acuoso de la mezcla de hoja de *Aloe buettneri*, *Dicliptera verticillata*, *Hibiscus macranthus* y *Justicia insularis*

P.B. Telefoa, RE Moundipab, F.M. Tchouanguiep

Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Yaundé I, Apartado Box 812, Yaundé, Camerún

Recibido el 25 de Enero de 2001; aceptado en su forma revisada 28 de junio 2002

### Resumen

El extracto acuoso de las mezclas de hojas de *Aloe buettneri*, *Dicliptera verticillata*, *Hibiscus macranthus* y *Justicia insularis* administrar por vía oral a ratas hembras inmaduras, a dosis de 13, 49 y 94 mg / kg por día durante 15 días indujo un aumento significativo en el ovario y úteros peso, así como suero y estradiol en el ovario. Por otra parte, una disminución significativa en el hígado de aminopirina N-desmetilasa actividad se observó en los animales tratados.

© 2002 Elsevier Science BV Todos los derechos reservados.

### 1. Introducción

*Aloe buettneri* (Liliaceae), *Dicliptera verticillata* (Acanthaceae), *Hibiscus macranthus* (Malvaceae) y *Justicia insularis* (Acanthaceae) son plantas herbáceas de amplia distribución en la zona tropical de América del Norte. Se informó de que sean ricos en antraquinona derivados (*A. buettneri*) y alcaloides (*D. verticillata*, *J. insularis*). En la provincia occidental de Camerún, el extracto acuoso de las mezclas de sus hojas es usada por tradipracticitioners para el tratamiento de la dismenorrea y algunos casos de infertilidad en las mujeres.

Un estudio clínico preliminar llevada a cabo en seis pacientes que sufren de infertilidad y cuyos niveles de FSH, LH y estradiol eran bajas antes de que el tratamiento mostró que 2 meses de consumo diario del extracto, se tradujo en la normalización de estos valores hormonales. Con el fin de confirmar esta información preliminar, el objetivo de este trabajo

es investigar la actividad estrogénica del extracto de la planta de ratas inmaduras. Además, algunos parámetros de metabolismo de los fármacos se midieron también en vista de una evaluación preliminar de su toxicidad hepática.

## 2. Experimental

### 2.1. Material vegetal

Las hojas frescas de *A. buettneri*, *verticillata* D., *macranthus* H. y *J. insularis* se recogieron en agosto de 1994 en Batoufam pueblo, provincia occidental de Camerún, y se identificaron en el Herbario Nacional (IRAD, Camerún), respectivamente, en virtud de espécimen número 52232, 20387, 41881 y 34997.

### 2.2. Preparación de extractos

Los extractos de plantas (PE) se preparó a partir de una mezcla de hojas frescas de *A. buettneri*, *verticillata* D., *macranthus* H. y *J. insularis*. La mezcla (composición mostrada en la Tabla 1), se lavó y se secó a 50 ° C en una estufa ventilada durante 48 h. La mezcla seca se molió y, o bien 3,6 g, 14,4 o 28,8 del polvo se utilizó para preparar los extractos por infusión, usando 1 l de agua destilada caliente durante 30 minutos, como se describe por el tradipracticitioner. Después de la filtración y liofilización de los extractos diferentes, se obtuvieron 1,3, 4,9 y 9,4 g de productos correspondientes a un rendimiento de extracción de aproximadamente 4% a partir de originales hojas frescas. La concentración calculada de los extractos fue de 1,3 mg / ml (extracto 1), 4,9 mg / ml (extracto 2) y 9,4 mg / ml (extracto 3).

Las plantas medicinales utilizadas en la preparación del extracto

Tabla 1.....

Species	Family	Part of the plant used	Fresh weight used (g)
<i>Aloe buettneri</i>	Liliaceae	Leaves	28
<i>Dicliptera verticillata</i>	Acanthaceae	Leaves	12
<i>Hibiscus macranthus</i>	Malvaceae	Stem and leaves	20
<i>Justicia insularis</i>	Acanthaceae	Leaves	40
<b>Total fresh weight (g)</b>			<b>100</b>
<b>Total dry weight (g)</b>			<b>10.75</b>

### 2.3. Animales

Inmaduros ratas hembras albinas Wistar de 22 días de edad y pesando 30-35 g. Ellos fueron obtenidos de la casa de animales del departamento de Bioquímica (Universidad de Yaundé I,

Camerún) con sede en condiciones estándar de cría de la luz (ciclo de 12 h) y temperatura ( $26 \pm 2$  ° C), y se alimenta del agua de una dieta estándar de laboratorio y del grifo ad libitum.

#### **2.4. Protocolo de tratamiento**

Un total de 20 ratas irnmature se dividieron en cuatro grupos experimentales de cinco animales cada uno. Ellos se trataron diariamente durante 15 días por intubación gástrica o bien con agua destilada (grupo control) o varias concentraciones de los extractos de plantas en un volumen de 10 ml / kg. Por lo tanto, corresponde a dosis de 13 mg / kg para el primer extracto (grupo PE []), 49 mg / kg para el segundo extracto (grupo PEJ) y 94 mg / kg para el tercer extracto (grupo PE3). Al final del período experimental, los animales se sacrificaron por decapitación. Sus ovarios, útero y los hígados fueron retirados, borrado, se pesaron y se almacenaron a  $-20$  ° C. La sangre se recogió también de cada rata. El suero se preparó y se almacena bajo la misma condición que los órganos para análisis bioquímico.

#### **2.5.Preparación del ovario y sobrenadantes de hígado, y el análisis bioquímico**

Los ovarios de cada animal se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón TS (0,25 M de sacarosa, 1 carnero EDTA y 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) a  $0-4$  ° C usando un homogeneizador Potter. El homogenado se centrifugó a 6000 Xg a  $4$  ° C (Beckman modelo J2-21) durante 15 min, y se recogió el sobrenadante. Las concentraciones de suero de estradiol en el ovario y se determinaron utilizando el Kit de 3H-RIA, como se describe por la Organización Mundial de la Salud manual técnico. Cada hígado se homogeneizó en 20 volúmenes de tampón Tris (Tris-HCl 50 mM, KCl 150 mM, pH 7,4). El homogeneizado 20% se centrifugó a  $4$  ° C (modelo Beckman J2-21) durante 20 minutos y el conseguidas sobrenadante se utilizó para la determinación de aminopirina N-demefhylase actividad.

#### **2.6.El análisis estadístico**

Los diferentes datos obtenidos fueron analizados utilizando un solo sentido el análisis de varianza (ANOVA). El estudiante de r-test fue utilizado para la comparación entre los medios cada vez que la prueba de ANOVA fue significativa.

### 3. Resultados

#### 3.1. Pesos de ovario y uterino

Los pesos ováricos y uterinos de ratas inmaduras tratadas durante 15 días con diferentes dosis de extracto de la planta se muestran en las figuras. 1 y 2, respectivamente. Una parte significativa

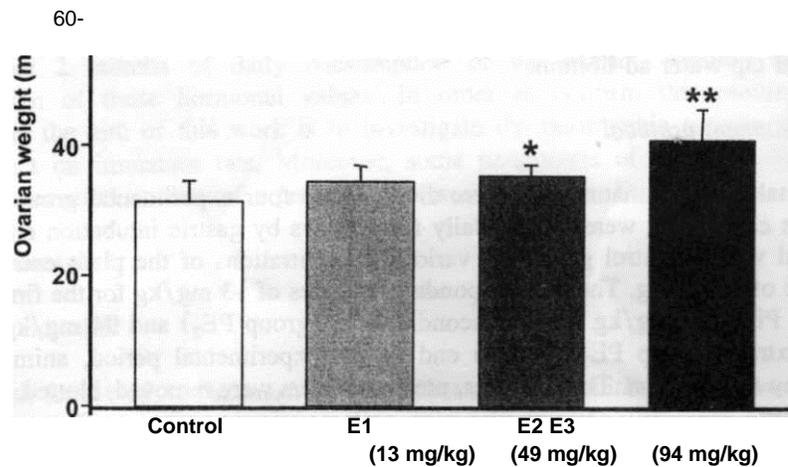


Fig. 1. Effect of oral administration of PE on ovarian weight (mg) of immature rats treated for 15 days.  $n = 5$  \* $P < 0.05$ , \*\* $f < 0.01$  (Student's f-test). PE = aqueous extract of the leaf mixtures of *A. buettneri*, *D. verticillata*, *H. macranthus* and *I. insularis*.

Fig. 1. Efecto de la administración oral de PE en peso ovárico (mg) de ratas inmaduras tratadas durante 15 días.  $n = 5$  \* $P < 0,05$ , \*\* $f < 0,01$  (estudiante F-test). PE = extracto acuoso de las mezclas de hojas de *A. buettneri*, *verticillata* D., *macranthus* H. y *I. insularis*. Aumento de aproximadamente el 29% y 170, respectivamente, sólo se observaron después del tratamiento con 94 mg / kg por día.

#### 3.2. El suero y el estradiol en el ovario

Un ligero aumento (5-22%) de los niveles séricos de estradiol en todos los animales tratados se observó al final del periodo experimental. Por el contrario, un aumento significativo de los niveles de ovario de estradiol se observó. En este caso, la variación está en el rango de 36-315% (Tabla 2)

#### 3,3. Actividad de la aminopirina-N-demetilasa

Una disminución significativa de 25,4% y 32,8% en la actividad de aminopirina N-desmetilasa se observó al final del tratamiento con las dosis de 49 y 94 mg / kg (fig. 3).

### 4. Discusión y conclusiones

Un aumento significativo en el peso de los órganos de reproducción de los animales tratados

con 94 mg / kg por día durante 15 días de extracto acuoso de una mezcla de *A. buettneri*, *verticillata* D., *macranthus* H. y hojas *J. insularis* se observó.

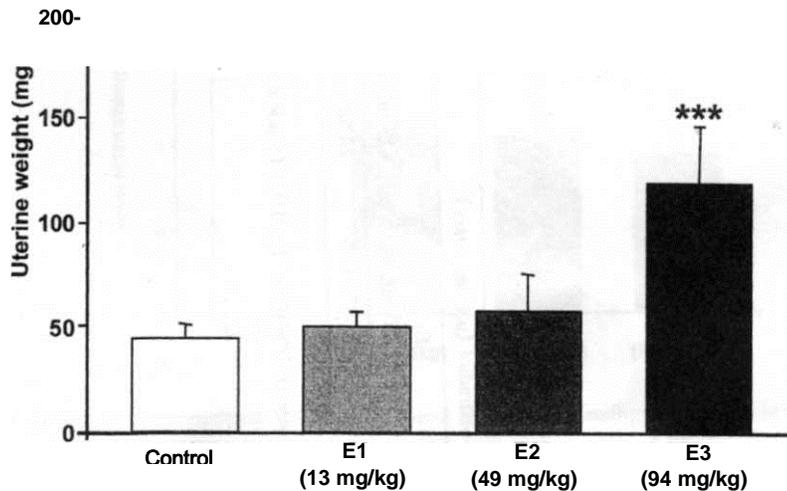


Fig. 2. Effect of oral administration of PE on uterine weight (mg) of immature rats treated for 15 days. n = 5, \*\*\* $P < 0.001$  (Student's *t*-test). PE = aqueous extract of the leaf mixtures of *A. buettneri*, *D. verticillata*, *H. macranthus* and *J. insularis*.

En particular aumentos de 29 y 170% en el ovario y el peso del útero, respectivamente, se observaron. Inyección única o múltiple de estradiol o de compuestos estrogénicos para ratas inmaduras se han reportado para iniciar un complejo conjunto de respuestas bioquímicas acumulativas en el plazo de 1 a 2 días en el crecimiento uterino. El aumento significativo en el peso del útero de los animales tratados tanto, puede resultar del efecto de algunos compuestos estrogénicos presentes en el extracto de plantas en el nivel del útero.

Esta observación se confirma por el resultado en el suero y estradiol en el ovario, el nivel de que se incrementó en todos los animales tratados. Si bien el aumento de suero estradiol representaron aproximadamente 15, que de estradiol en el ovario representaron aproximadamente 300%. Una reducción significativa y dependiente de la dosis en la aminopirina JV-desmetilasa actividad probablemente indica una reducción del metabolismo del citocromo P-450 dependiente.

En conclusión, el efecto inductivo del extracto estudiado observado durante este experimento puede explicar su estrogénicidad y la utilización exitosa de los tradipracti de tioners de nuestra área en el tratamiento de algunos casos de infertilidad en las mujeres. El trabajo futuro en el extracto se incluyen los estudios in vitro en células de ovario de ratas

para dilucidar su mecanismo de acción y otras pruebas toxicológicas para determinar su naturaleza inofensiva.

Tabla 2. El suero ( pg/mL) y ovario (  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ovary) los niveles de estradiol después de 15 días de administración de varias dosis del extracto acuoso de plantas a las ratas hembras de 22-día.

Serum oestradiol (pg/mL)			
Control	E1 (13mg/Kg)	E2 (49mg/Kg)	E3 (94mg/Kg)
12,56 $\pm$ 1,11	13,24 $\pm$ 0,80	15,35 $\pm$ 2,09	14,33 $\pm$ 1,02

Ovarian oestradiol (pg/mL ovary)			
Control	E1 (13mg/Kg)	E2 (49mg/Kg)	E3 (94mg/Kg)
6,88 $\pm$ 1,75	9,38 $\pm$ 1,75	28,58 $\pm$ 3,87	23,87 $\pm$ 4,83

Values are mean  $\pm$  S.D

Values stadistically different from that of the control group of the same duration of treatment at:  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$  (Students t-test).

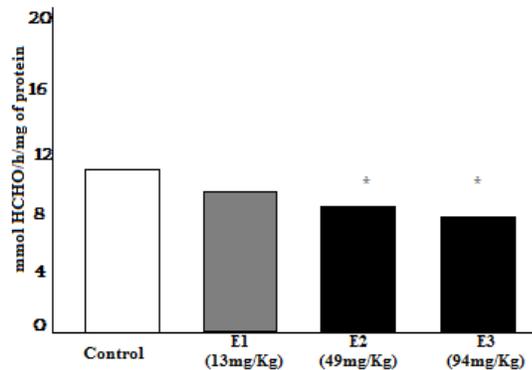
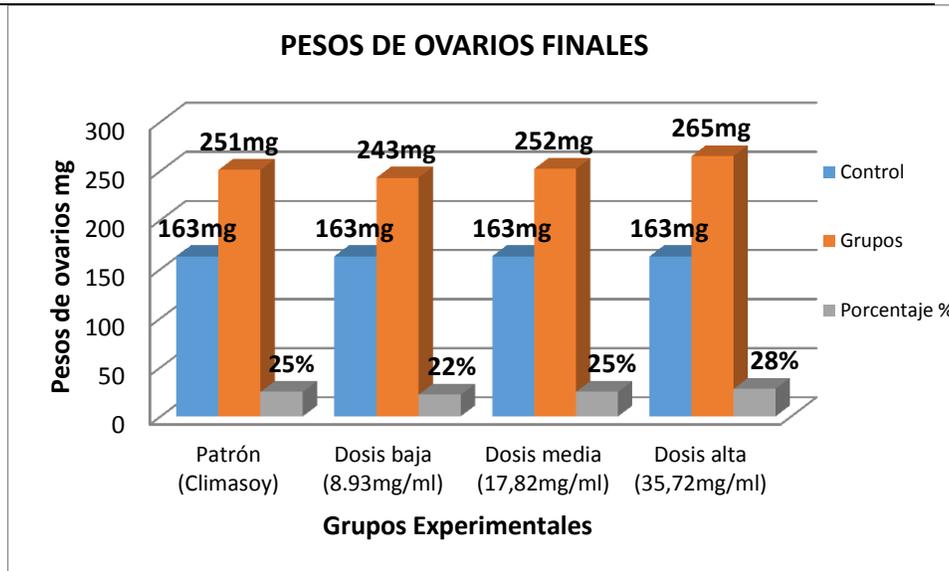


Fig 3. Actividad de aminopirina JV-desmetilasa (HCHO nmol / h por miligramo de proteína) en el sobrenadante OOOXg 10 hígado de ratas inmaduras tratadas durante 15 días con diversas dosis de PE. \*  $P < 0,05$  (t de Student-test). PE = extracto acuoso de las mezclas de hojas de A. buettneri, verticillata D., macranthus H. y J. insularis.

**ANEXO 11. PRUEBAS PRELIMINARES COMPLEMENTARIAS SOBRE INCREMENTO DE PESOS EN OVARIOS Y ÚTERO**

**CUADRO No 16. PESOS DE LOS OVARIOS DEL GRUPO CONTROL, GRUPO PATRÓN Y GRUPOS EXPERIMENTALES QUE RECIBIERON EL TRATAMIENTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.). FACULTAD DE CIENCIAS RIOBAMBA. AGOSTO 2012.**

<b>PESOS DE LOS OVARIOS mg</b>				
<b>Muestras</b>	<b>Patrón (Climasoy)</b>	<b>Dosis baja (8.93mg/ml)</b>	<b>Dosis media (17,82mg/ml)</b>	<b>Dosis alta (35,72mg/ml)</b>
<b>Grupos</b>	251mg	243mg	252mg	265mg
<b>Control</b>	163mg	163mg	163mg	163mg
<b>Porcentaje %</b>	25	22	25	28

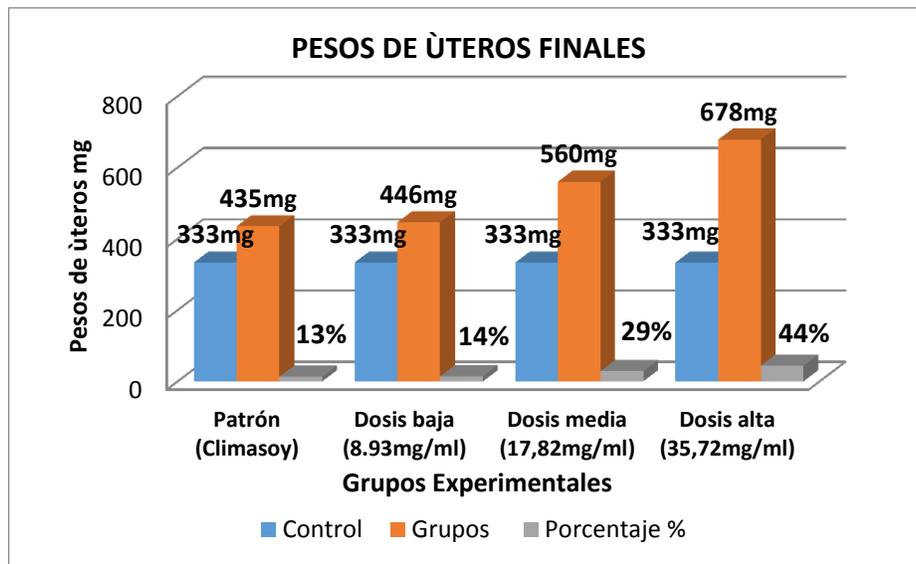


**Gráfica No 4. RESULTADO DE LA DETERMINACIÓN DE LOS PESOS DE LOS OVARIOS DEL GRUPO CONTROL, GRUPO PATRÓN Y GRUPOS EXPERIMENTALES AL FINAL DEL ESTUDIO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. AGOSTO 2012.**

**CUADRO No 17. PESOS DE ÚTERO DEL GRUPO CONTROL, GRUPO PATRÓN Y GRUPOS EXPERIMENTALES QUE RECIBIERON EL TRATAMIENTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE ALFALFA (*Medicago sativa l.*). BIOTERIO FACULTAD DE CIENCIAS CIENCIASAGOSTO 2012.**

<b>PESOS DE ÚTEROS mg</b>				
<b>Muestras</b>	<b>Patrón (Climasoy 3,64mg/Kg)</b>	<b>Dosis baja (8,93mg/Kg)</b>	<b>Dosis media (17,86mg/Kg)</b>	<b>Dosis alta (35,72mg/Kg)</b>
<b>Útero(mg)</b>	435	446	560	678
<b>Control</b>	333	333	333	333
<b>Porcentaje (%)</b>	13	14	29	44

FUENTE: PACA, N. 2012



**GRÁFICA No 5. RESULTADO DE LA DETERMINACIÓN DE LOS PESOS DE ÚTEROS DEL GRUPO CONTROL, GRUPO PATRÓN Y GRUPOS EXPERIMENTALES QUE RECIBIERON EL TRATAMIENTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE ALFALFA (*Medicago sativa l.*). AGOSTO 2012.**