



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EFECTO ESTROGÉNICO DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes) EN RATAS (*Rattus norvegicus*)”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR**

**MILTON RAMIRO TUQUINGA USCA**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2013**

## **DEDICATORIA**

*Dedico a Dios por su amor espiritual.*

*A mis padres Florentino Tuquinga y María Rosario Usca por su apoyo incondicional, durante el transcurso de mi vida.*

*A mis hermanos, familiares, amigos por su apoyo*

*A mi flaca en la distancia por haber sido parte de mi carrera.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por su aporte científico y humanístico que conllevó a mi formación académica la misma que me ha permitido desempeñarme de la mejor manera en el campo laboral.*

*Al BQF Fausto Contero por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis. Gracias por el apoyo brindado en el desarrollo de esta investigación.*

*A la Dra. Susana Abdo Miembro del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.*

*Al Dr. Oswaldo Duque por su colaboración en el desarrollo de esta investigación.*

*A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación*

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo investigación: “EFECTO ESTROGÉNICO DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa Loes*) EN RATAS (*Rattus norvegicus*)”, de responsabilidad del señor egresado Milton Ramiro Tuquina Usca, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Álvarez <b>DECANO FACULTAD DE CIENCIAS</b>	_____	_____
Dr. Iván Ramos <b>DIRECTOR DE LA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA</b>	_____	_____
BQF. Fausto Contero <b>DIRECTOR DE TESIS</b>	_____	_____
Dra. Susana Abdo <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	_____	_____
Dr. Oswaldo Duque <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	_____	_____
Tlgo. Carlos Rodríguez <b>DIRECTOR DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN</b>	_____	_____
<b>NOTA DE TESIS ESCRITA</b>	_____	

Yo, Milton Ramiro Tuquina Usca, 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

---

MILTON RAMIRO TUQUINGA USCA

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
C	Carbono
F	Coefficiente estadístico de Anova
TLC	Cromatografía de capa fina
kDa	Dalton
E2	17 $\beta$ -estradiol
EHG	Extracto Hidroalcohólico de guayusa
TeBG	Globulina fijadora de la Testosterona
CBG	Globulina fijadora del Cortisol
°C	Grados Celcius
G	Gramo
RG	Grupos
FSH	Hormona folículoestimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
LH	Hormona Luteinizante
IGF I	Inhibición sobre la liberación de gonadotrofinas
Kg	Kilogramos
<i>Ad libitum</i>	Libre acceso
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad
UV	Luz ultravioleta
>	Mayor
MCIAS	Medicamento comercial isoflavonas activas de soya
<	Menor
$\mu$ L	Microlitro
mL	Mililitros
mg/Kg	Miligramo por kilogramo
SERMs	Moduladores Selectivos de Receptores de Estrógenos
nm	Nanogramos
$\alpha$	Nivel de significancia
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millon
p/v	Peso por volumen
pg	Picogramos
pg/mL	Picogramos por mililitro

%	Porcentaje
SC	Por vía subcutánea
IM	Por vía intramuscular
IV	Por vía intravenosa
IP	Por vía peritoneal
PO	Por vía oral
pH	Potencial de hidrogeno
PRL	Prolactina
p	Provabilidad de ocurrencia
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica
ER	Receptor estrogénico
ER $\alpha$	Receptor estrogénico alfa
ER $\beta$	Receptor estrogénico beta
RIPs	Receptor Interacting Proteins
SOLCA	Sociedad de Lucha contra el Cancer

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS  
ÍNDICE DE CUADROS  
ÍNDICE DE TABLAS  
ÍNDICE DE GRÁFICOS  
ÍNDICE DE FIGURAS  
ÍNDICE DE ANEXOS  
INTRODUCCIÓN

<b>1.</b>	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Infertilidad.....	1
1.1.1	Definición.....	1
1.1.2	Infertilidad femenina.....	1
1.1.3.	Causas de infertilidad femenina.....	2
1.1.3.1.	Anovulación.....	2
1.1.3.2.	Endometriosis.....	3
1.1.3.3.	Alteración del moco cervical.....	4
1.1.3.4.	Hiperprolactinemia.....	4
1.1.3.5.	Infertilidad uterina.....	4
1.1.3.6.	Infertilidad tubárica.....	5
1.1.3.7.	Trastornos endocrinos.....	5
1.1.3.8.	Infertilidad hormonal.....	5
1.1.3.9.	Pérdida recurrente del embarazo como causa de infertilidad.....	5
1.1.3.10.	Otras causas.....	6
1.1.4.	Síntomas.....	6
1.1.5.	Diagnóstico.....	7
1.1.6.	Tratamiento.....	7
1.2.	Fisiología femenina.....	8
1.2.1.	Anatomía y fisiología del ovario.....	8
1.2.1.1.	Reguladores de la función ovárica.....	10
1.2.2.	Anatomía y fisiología del útero.....	10
1.2.2.1.	Histología uterina y endometrial.....	11
1.2.2.2.	Receptores uterinos de estrógeno y de progesterona.....	12

1.3.	Receptores de estrógenos.....	13
1.3.1.	Efectos del receptor de estrógeno.....	13
1.3.2.	Moduladores selectivos de los receptores estrógenicos (SERMs)....	15
1.4.	Sistema hormonal femenino.....	15
1.4.1.	Formación de hormonas esteroideas.....	16
1.4.1.1.	Estrógenos.....	17
1.4.1.2.	Progesterona.....	18
1.4.1.3.	Andrógenos.....	19
1.4.2.	Funciones de las hormonas ováricas: estradiol y progesterona.....	20
1.4.3.	Transporte de estrógenos y progesterona en la sangre.....	21
1.4.4.	Función del hígado en la degradación de los estrógenos.....	21
1.4.5.	Funciones de los estrógenos.....	21
1.4.5.1.	Efecto de los estrógenos sobre los órganos sexuales femeninos.....	21
1.4.5.2.	Efecto de los estrógenos sobre las trompas de Falopio.....	22
1.4.5.3.	Efecto de los estrógenos sobre la mamas.....	23
1.4.5.4.	Efecto de los estrógenos sobre el esqueleto.....	23
1.4.5.5.	Efecto de los estrógenos sobre el depósito de proteínas.....	24
1.4.5.6.	Efecto de los estrógenos sobre el metabolismo y sobre el depósito de grasa.....	24
1.4.5.7.	Efecto de los estrógenos sobre la distribución del pelo.....	24
1.4.5.8.	Efecto de los estrógenos sobre la piel.....	25
1.4.5.9.	Efecto de los estrógenos sobre el equilibrio electrolítico.....	25
1.5.	Guayusa ( <i>Ilex guayusa loes</i> ).....	25
1.5.1.	Origen y distribución geográfica.....	25
1.5.2.	Datos taxonómicos.....	26
1.5.3.	Descripción.....	26
1.5.4.	Composición de la guayusa.....	27
1.5.5.	Propiedades y usos de la guayusa.....	27
1.5.6.	Indicaciones.....	29
1.5.7.	Contraindicaciones y precauciones.....	30
1.5.8.	Interacción con fármacos.....	30
1.5.9.	Toxicidad.....	30
1.5.10.	Usos comerciales de la guayusa.....	30

1.6.	Flavonoides.....	31
1.6.1.	Quercetina.....	32
1.6.2.	Galangina.....	33
1.6.3.	Naringenina.....	33
1.6.4.	Distribución y estado natural.....	34
1.6.5.	Propiedades físicas.....	35
1.6.6.	Metabolismo.....	35
1.6.7.	Extracción y aislamiento.....	36
1.7.	Fitoestrógenos.....	37
1.7.1.	Definición.....	37
1.7.2.	Estructura de los principales fitoestrógenos.....	37
1.7.3.	Mecanismo de acción.....	38
1.8.	Isoflavonas.....	39
1.8.1.	Absorción y metabolismo.....	41
1.8.2.	Efectos adversos.....	42
1.8.3.	Beta sitosterol.....	42
1.8.4.	Ononin.....	43
1.9.	Climasoy.....	43
1.9.1.	Composición.....	43
1.9.2.	Mecanismo de acción.....	43
1.9.3.	Indicaciones.....	44
1.9.4.	Contraindicaciones.....	44
1.9.5.	Dosis.....	44
1.9.6.	Vía de administración.....	45
1.10.	Ratas de laboratorio.....	45
1.10.1.	Taxonomía.....	45
1.10.2.	Descripción.....	45
1.10.3.	Condiciones.....	47
1.10.4.	Manipulación de las ratas.....	47
1.10.5.	Vía de administración.....	47
1.10.5.1.	Vía oral.....	48
1.10.6.	Técnicas para la extracción de sangre en animales de experimentación.....	48

1.10.7.	Vías de extracción en animales de experimentación.....	49
1.10.7.1.	Venas y arterias caudales.....	50
1.10.7.2.	Vía intracardiaca.....	50
2.	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	51
2.1.	Lugar de investigación.....	51
2.2.	Materiales, equipos y reactivos.....	51
2.2.1.	Material biológico.....	51
2.2.2.	Materia prima.....	53
2.2.3.	Materiales y reactivos para el estudio farmacognóstico y control de calidad.....	53
2.3.	Manejo específico del experimento.....	54
2.3.1.	Actividad estrogénica del extracto de guayusa ( <i>Ilex guayusa l</i> ).....	54
2.3.1.1.	Unidades de observación.....	54
2.3.1.2.	Grupos de estudio.....	54
2.3.1.3.	Criterios de inclusión.....	54
2.3.1.4.	Diseño experimental.....	55
2.3.1.5.	Protocolo experimental.....	55
2.3.2.	Estudio de toxicidad.....	58
2.3.3.	Análisis estadístico.....	58
2.3.4.	Investigación fitoquímica.....	59
2.4.	Métodos y técnicas.....	59
2.4.1.	Preparación de extracto hidroalcohólico de guayusa ( <i>Ilex guayusa</i> ).....	59
2.4.2.	Control de calidad de guayusa ( <i>Ilex guayusa l</i> ).....	60
2.4.2.1.	Análisis físico-químico.....	60
2.4.2.2.	Determinación cualitativa de metabolitos secundarios.....	63
2.4.2.2.1	Ensayo para identificación de alcaloides.....	63
2.4.2.2.2.	Ensayo para identificación de triterpenos y/o esteroides.....	64
2.4.2.2.3.	Ensayo para identificación de quinonas.....	65
2.4.2.2.4.	Ensayo para identificación de compuestos lactónicos (cumarinas)...	65
2.4.2.2.5.	Ensayo para identificación de compuestos grasos.....	66
2.4.2.2.6.	Ensayo para identificación de catequinas.....	66
2.4.2.2.7.	Ensayo para la identificación de resinas.....	66
2.4.2.2.8.	Ensayo para identificación de saponinas.....	66

2.4.2.2.9.	Ensayo para identificación de compuestos fenólicos y/o taninos.....	67
2.4.2.2.10.	Ensayo para identificación de aminoácidos.....	67
2.4.2.2.11.	Ensayo para identificación de flavonoides.....	68
2.4.2.2.12.	Ensayo para identificación de azúcares reductores.....	68
2.4.2.2.13.	Ensayo para identificación de mucílagos.....	69
2.4.2.2.14.	Ensayo para identificación de principios amargos y astringentes....	69
2.4.3.	Control de calidad del extracto.....	69
2.4.3.1.	Determinación de los requisitos organolépticos.....	69
2.4.3.2.	Determinación del pH.....	69
2.4.3.3.	Determinación de la densidad relativa.....	70
2.4.3.4.	Determinación del índice de refracción.....	71
2.4.3.5.	Determinación de sólidos totales.....	72
2.4.4.	Análisis cromatográfico de flavonoides por TLC.....	73
2.4.5.	Análisis cromatográfico de Triterpenos por TLC.....	73
2.4.6.	Análisis cromatográfico de $\beta$ -sitosterol por TLC.....	74
2.4.7.	Cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina..	75
2.5.	Tratamiento a base de extracto hidroalcohólico ( <i>Ilex guayusa l</i> ).....	77
2.5.1.	Materiales, reactivos y equipos.....	77
2.5.2.	Vías de extracción para obtener muestras sanguíneas.....	78
2.5.2.1.	Obtención de sangre de la vena facial.....	78
2.5.2.2.	Obtención de sangre intracardiaca.....	79
2.5.3.	Determinación del estradiol.....	79
2.5.4.	Extracción de órganos femenino.....	82
2.5.5.	Estudio histopatológico.....	82
<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>110</b>
<b>5</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>112</b>
	<b>SUMARY.....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>125</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Técnica histológica tinción Hematoxilina-Eosina.....	83
CUADRO No. 2	Humedad de la droga seca y triturada de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ). Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	84
CUADRO No. 3	Cenizas totales de la droga seca y triturada de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ). Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	85
CUADRO No. 4	Cenizas solubles en agua de la droga seca y triturada de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ). Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	85
CUADRO No. 5	Cenizas insolubles en ácido clorhídrico de la droga seca y triturada de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ). Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	86
CUADRO No. 6	Características organolépticas del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ). Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	86
CUADRO No. 7	Parámetros físicos de calidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ). Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	87
CUADRO No. 8	Identificación cualitativa de los metabolitos secundarios en las hojas secas y trituradas de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ), Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	88
CUADRO No. 9	Rf para metabolitos flavonoídes de la muestra de hojas de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ) en cromatografía de capa fina. Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	90
CUADRO No. 10	Rf para triterpenos de la muestra de hojas de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ) en cromatografía de capa fina. Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	91
CUADRO No. 11	Rf para el ( $\beta$ -sitosterol) de la muestra de hojas de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ) en comparación con el estándar de ( $\beta$ -sitosterol). Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	93
CUADRO No. 12	Absorbancias de quercetina a distintas concentraciones. Laboratorio de Análisis Instrumental. Facultad de Ciencias EPOCH. Riobamba Agosto del 2012.....	94

CUADRO No. 13	Cuantificación de flavonoides de las hojas de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ) a una longitud de onda de 258 nm. Laboratorio de Análisis Instrumental. Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto del 2012.....	95
CUADRO No. 14	Peso promedio de las ratas de cada grupo experimental antes y después del tratamiento. Bioterio de la Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto del 2012.....	96
CUADRO No. 15	Cuantificación de estradiol inicial antes del tratamiento. Bioterio de la Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto 2012.....	97
CUADRO No. 16	Cuantificación de estradiol final, de los grupos bajo tratamiento Bioterio de la Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto 2012.....	98
CUADRO No. 17	Anova de un factor del estradiol Final (pg/mL). Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto del 2012.....	99
CUADRO No. 18	Comparaciones múltiples Tukey HSD al 99.00% de confianza del estradiol final (pg/ml) entre los grupos bajo tratamiento. Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto del 2012.....	99
CUADRO No. 19	Peso de los ovarios bajo tratamiento. Bioterio de la Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto 2012.....	102
CUADRO No. 20	Anova de un factor del peso de los ovarios en (mg). Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto del 2012.....	102
CUADRO No. 21	Comparaciones múltiples Tukey HSD al 99.00% de confianza del peso del ovario (mg) entre los grupos bajo tratamiento. Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto del 2012.....	103
CUADRO No. 22	Comparación entre los pesos del ovario del grupo control frente al grupo patrón y grupos experimentales que recibieron el tratamiento del extracto hidroalcohólico de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ). Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto 2012.....	103
CUADRO No. 23	Peso del útero bajo tratamiento. Bioterio de la Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto 2012.....	106
CUADRO No. 24	Anova de un factor del peso del útero (mg). Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto 2012.....	106
CUADRO No. 25	Comparaciones múltiples Tukey HSD al 99.00% de confianza del peso del útero en mg entre los grupos bajo tratamiento.....	107
CUADRO No. 26	Comparación entre los pesos del útero del grupo control frente al grupo patrón y grupos experimentales que recibieron el tratamiento del extracto hidroalcohólico de guayusa ( <i>Ilex guayusa L</i> ). Facultad de Ciencias Espoch. Riobamba Agosto 2012.....	107

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Concentración de las principales hormonas esteroideas ováricas en la sangre de las mujeres con ciclos ovuladores.....	19
TABLA No. 2	Taxonomía de la <i>Rattus novergicus</i> .....	45
TABLA No. 3	Descripción anatómica de la <i>Rattus novergicus</i> .....	46
TABLA No. 4	Datos fisiológicos de la <i>Rattus novergicus</i> .....	46
TABLA No. 5	Datos relacionados con la reproducción de la <i>Rattus novergicus</i> .	46
TABLA No. 6	Condiciones macro ambientales.....	47
TABLA No. 7	Volumen a administrar en la rata.....	48
TABLA No. 8	Taxonomía de los animales de experimentación empleados en el estudio farmacológico.....	52
TABLA No. 9	Descripción anatómica.....	52
TABLA No. 10	Condiciones de mantenimiento para la crianza.....	52
TABLA No. 11	Materiales y reactivos para el control de calidad fisicoquímico y estudio fitoquímico.....	53
TABLA No. 12	Grupos de estudio.....	54
TABLA No. 13	Descripción del proceso experimental.....	57
TABLA No. 14	Materiales y reactivos empleados para comprobar el efecto estrogénico (ensayo pre-clínico <i>in vivo</i> ).....	77

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO No. 1	Curva de Absorbancia Vs Concentración de Quercetina para la cuantificación de flavonoídes. Laboratorio de Análisis Instrumental. Facultad de Ciencias Epoch. Riobamba Agosto del 2012.....	94
GRAFICO No. 2	Comparación entre el peso inicial y peso final durante la investigación a los grupos experimentales. Bioterio de la Facultad Ciencias Epoch. Riobamba Agosto del 2012.....	96
GRAFICO No. 3	Comparación del nivel de estradiol sérico inicial y final entre los grupos experimentales, tratados con medicamento MCIAS y extracto de <i>Ilex guayusa L.</i> Facultad de Ciencias Epoch. Riobamba Agosto del 2012.....	100
GRAFICO No. 4	Gráfica del peso de los ovarios tratados con diferentes dosis de extracto de <i>Ilex guayusa L.</i> Facultad de Ciencias Epoch. Riobamba Agosto 2012.....	104
GRAFICO No. 5	Gráfica del peso del útero tratados con diferentes dosis de extracto <i>Ilex guayusa L.</i> Facultad de Ciencias Epoch. Riobamba Agosto 2012.....	108

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Efecto genómico del receptor de estrógeno.....	14
FIGURA No. 2	Vía principal de la síntesis de las hormonas esteroideas en el ovario.....	18
FIGURA No. 3	Estructura química de la Quercetina en la estructura básica de los Flavonoídes.....	31
FIGURA No. 4	Estructura química de la Galangina.....	33
FIGURA No. 5	Estructura química de la Naringenina.....	33
FIGURA No. 6	Reacción de la Quercetina dentro del organismo humano.....	36
FIGURA No. 7	Estructura química de la Daidzeina.....	37
FIGURA No. 8	Estructura química del Enterodiol.....	37
FIGURA No. 9	Estructura química del Coumestrol.....	37
FIGURA No.10	Receptores estrogénicos en el cuerpo humano.....	39
FIGURA No.11	Comparación entre la estructura de las (equol) y los estrógenos (estradiol) donde se muestra las similitudes entre las dos moléculas.....	40
FIGURA No.12	Analogía entre estrógenos e isoflavonas.....	40
FIGURA No,13	Estructura química del $\beta$ -sitosterol.....	42
FIGURA No.14	Estructura química del Ononin.....	43

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Hojas de guayusa.....	25
FOTOGRAFÍA No. 2	<i>Rattus novergicus</i> .....	45
FOTOGRAFÍA No. 3	Material vegetal <i>Ilex guayusa</i> Loes.....	141
FOTOGRAFÍA No. 4	Control de calidad de la <i>Ilex guayusa</i> L.....	141
FOTOGRAFÍA No. 5	Obtención del extracto Hidroalcohólico de <i>Ilex guayusa</i> L.....	141
FOTOGRAFÍA No. 6	Tamizaje Fitoquímico de la <i>Ilex guayusa</i> L.....	142
FOTOGRAFÍA No. 7	Cromatografía en capa fina de la <i>Ilex guayusa</i> L.....	142
FOTOGRAFÍA No. 8	Ambientación de la <i>Rattus novergicus</i> , en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Epoch.....	142
FOTOGRAFÍA No. 9	Administración del extracto de <i>Ilex guayusa</i> L.....	143
FOTOGRAFÍA No. 10	Toma de muestras sanguíneas de la <i>Rattus novergicus</i> .....	143
FOTOGRAFÍA No. 11	Disección de la <i>Rattus novergicus</i> .....	143

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Técnica utilizada en la investigación.....	125
ANEXO No. 2	Técnica para la cuantificación de estradiol.....	131
ANEXO No. 3	Reportes de la cuantificación de estradiol, Grupo Control, Grupo Patrón, Dosis baja, Dosis Media y Dosis Alta. Riobamba Septiembre del 2012.....	135
ANEXO No. 4	Reporte de resultados Histopatológicos de Hígado, Riñón y Estómago de ratas inducidas con extracto Hidroalcohólico de <i>Ilex guayusa L</i> , emitido por el Dr. Oswaldo Duque (Anatomo-Patólogo SOLCA-Chimborazo). Riobamba, Septiembre del 2012.....	140
ANEXO No. 5	Fotografías.....	141

## INTRODUCCIÓN

La infertilidad suele suponer una “crisis vital” para las personas que la padecen y sus parejas. Los especialistas en infertilidad y ginecología han puesto de manifiesto que los problemas femeninos han aumentado en los últimos años. De hecho, los desequilibrios hormonales y su influencia en los estrógenos tienen mucho que ver con este último. El desequilibrio de estrógenos puede afectar en enfermedades tan comunes como endometriosis, enfermedad fibroquística, fibromas uterinos, histerectomía, terapia de reemplazo hormonal inadecuada y cáncer de mama conforme avanza la edad hasta la menopausia. (60) (74)

Las anormalidades mencionadas suelen tener que ver con un síndrome conocido como dominancia estrogénica. Esta anomalía afecta a las dos hormonas femeninas principales, conocidas como los estrógenos y la progesterona. Una se contrapone a la otra y se complementa y mientras que los primeros favorecen la proliferación celular la otra la controla. Las anomalías aparecen en la desconexión de ambos. (74)

Si bien, el estrógeno es una hormona natural que se encuentra tanto en hombres como en mujeres. Mantener el estrógeno en un nivel saludable es importante para ambos sexos, pero las mujeres necesitan más estrógeno para las funciones corporales normales, así como para concebir hijos. Durante la menopausia, los niveles de estrógeno en las mujeres disminuyen significativamente. (73)

Entre las principales causas del aumento de infertilidad destacan, por un lado, las sociales, provocadas fundamentalmente por los cambios del estilo de vida y sobre todo, al retraso de 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%. (9)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen en el mundo aproximadamente 80 millones de parejas con problemas de infertilidad o dificultades para concebir un hijo, es decir, que 15 de cada cien parejas no logran la fertilidad o no pueden llevar a cabo un embarazo a término. (71) (74)

Es así que el aumento de la prevalencia de la infertilidad en la población y la necesidad de disminuir los efectos que esta produce ha sido el estímulo del investigador para el descubrimiento de alternativas para disminuir en medida significativa los efectos perjudiciales de esta patología, mediante el tratamiento natural de la *Ilex guayusa L* que ofrece propiedades medicinales beneficiosas para la salud.

Tradicionalmente a la guayusa (*Ilex guayusa L*) se le ha asignado propiedades fecundantes, tratando el desequilibrio hormonal en la mujer causante de la infertilidad. Preparada de la misma forma que el té, con un sabor muy agradable, se dice que la infusión de las hojas cura el escalofrío y las infecciones venéreas. Las hojas se preconizan como antidiabético. También es ampliamente utilizada para estimular la fecundidad en las mujeres estériles. (4)

Dentro de su composición química los fitoestrógenos presentes en la Guayusa, son sustancias que estructural y funcionalmente son similares al 17- $\beta$  estradiol o que producen efectos estrogénicos. Por esta razón los fitoestrógenos tienen una importante actividad que los estrógenos u hormonas sexuales femeninas. Esta peculiar acción “hormonal” confiere a los fitoestrógenos algunas características muy interesantes en la prevención y tratamiento del desequilibrio hormonal y otras enfermedades. (3) (4)

El método general se basó en la valoración biológica de las diferentes concentraciones de *Ilex guayusa L*, para apreciar el efecto estrogénico frente al medicamento comercial usada

como patrón estrogénico, empleando ratas Wistar Cri: (WI) BR, como reactivo biológico. La técnica usada es la descrita en el protocolo ELSEVIER “Estrogenicidad”. (Ver Anexo No. 1)

El ensayo se llevó a cabo en el Bioterio y en las instalaciones del Laboratorio del Área de Farmacia de la Escuela de Bioquímica y Farmacia perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

Siendo nuestro principal objetivo comprobar el efecto estrogénico de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa loes*) en ratas, mediante un previo control de calidad del extracto y la evaluación de la actividad estrogénica sobre el órgano reproductor femenino de ratas y estrógeno sérico, asegurando el uso del extracto mediante la prueba de toxicidad aguda. Por lo tanto este resultado que será obtenido de la investigación experimental corroborara definitivamente la cualidad farmacodinámica atribuida a la planta por los pobladores de la región oriental del Ecuador. De esta manera a posterior se podrá obtener un fitofármaco, a base de guayusa cien por ciento natural, que lograra mantener el equilibrio hormonal en la mujer, llevando así una vida saludable.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. INFERTILIDAD

##### 1.1.1. DEFINICIÓN

La infertilidad es la incapacidad de completar un embarazo después de un tiempo razonable de relaciones sexuales sin medidas anticonceptivas. Este término presupone la existencia de una anatomía adecuada y una fisiología alterada con posibilidad de embarazo, el cual finalmente no llega a término. (11) (70)

##### 1.1.2. INFERTILIDAD FEMENINA

La reproducción humana requiere de varios elementos que deben funcionar adecuadamente, los órganos reproductivos deben estar en buenas condiciones y las hormonas que regulan a este sistema deben funcionar apropiadamente. (9) (71)

El sistema reproductivo femenino es una estructura delicada que puede verse afectada muy fácilmente por cambios pequeños en el organismo. La herencia, nutrición, edad y el medio ambiente afectan la manera en la que el cuerpo se prepara para lograr un embarazo. Mantener un óptimo estado de salud es indispensable para lograr el embarazo. (9) (78)

Por lo tanto para que se produzca un embarazo hay varias cosas que tiene que suceder:

- Se tiene que producir un óvulo en el ovario de la mujer.

- El óvulo se tiene que soltarse cada mes dentro de la trompa de Falopio (ovulación).
- El espermatozoide del hombre tiene que fertilizar el óvulo dentro de la trompa de Falopio.
- El óvulo fertilizado se mueve por una de las trompas de Falopio y se adhiere al endometrio del útero. (74)

Si algunos de estos acontecimientos no ocurre o sufre alguna perturbación, el resultado será la infertilidad.

Los problemas de fertilidad, si bien no comprometen la integridad física del individuo ni amenazan su vida, sí tienen profundas implicaciones en la salud física y psíquica del individuo, produciendo frustración y, en algunos casos, debilitan la personalidad. (74)

La fecundidad mensual máxima de una pareja de menos de 30 años no es superior al 30%. El índice de embarazos en parejas normales que inician relaciones sexuales sin ningún tipo de protección, según diferentes datos estadísticos, es el siguiente: en el primer mes: 25%, En los primeros seis meses: 63%, en los primeros nueve meses: 75%, en el primer año: 80%, en los primeros dieciocho meses: 90%. (74)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen en el mundo aproximadamente ochenta millones de parejas con problemas de fertilidad o dificultades para concebir un hijo, es decir, unas quince de cada cien parejas no logran la fertilidad o no pueden llevar a cabo un embarazo a término. (71) (74)

### 1.1.3. CAUSAS DE LA INFERTILIDAD FEMENINA

#### 1.1.3.1. Anovulación

La anovulación es una alteración que afecta al desarrollo y a la ruptura del folículo, lo que implica que el ovocito no es liberado del mencionado folículo.

Dado que el proceso que culmina en la ovulación se inicia en el cerebro, en el hipotálamo, es muy común que el estrés logre alterar su curso. Y aunque en algunos casos la anovulación puede estar acompañada de amenorrea (ausencia de menstruación) es probable que aun cuando no se haya producido la ovulación si haya menstruación. Es por eso que en muchos casos, al no haber síntomas evidentes, la mujer no percibirá la ausencia de la ovulación. (8)

Es normal la ausencia de ovulación de forma esporádica, pero se hablará de causa de infertilidad cuando la anovulación se produce de forma crónica, es decir, repetidamente a lo largo del tiempo. (63)

La anovulación puede tener diferentes causas:

- Estilo de vida: desajustes hormonales que pueden producirse por estrés, exceso de peso, un peso demasiado bajo o exceso de actividad física.
- Hipogonadismo: el nivel de la gonadotropina (hormona que estimula los ovarios para formar los óvulos) es bajo. Este déficit impide que los óvulos maduren normalmente. El hipogonadismo puede ser congénito o deberse a una lesión de la hipófisis.
- Síndrome de ovario poliquístico: se caracteriza por la producción excesiva de la hormona LH, que altera el ciclo ovulatorio y por la aparición de numerosos quistes en los ovarios. (9) (74) (78)

### **1.1.3.2. Endometriosis**

Consiste en un crecimiento anormal del tejido endometrial, presente en diversos órganos tales como útero, ovarios, vejiga. La infertilidad asociada a la endometriosis es debida a alteraciones anatómicas, ovulatorias y de la fase lútea.

Los mecanismos propuestos para justificar la infertilidad en pacientes con endometriosis incluyen las siguientes alteraciones:

- Disfunción ovárica.

- Disfunción tubárica.
- Disfunción espermática.
- Defectos en la fertilización y formación del embrión.
- Alteraciones endometriales.
- Fallo temprano del embarazo. (38) (74)

#### **1.1.3.3. Alteración del Moco Cervical**

El moco cervical actúa como vehículo que permite la llegada del espermatozoides al óvulo. Está compuesto por agua, electrolitos y proteínas, composición que sufre cambios cualitativos a lo largo del ciclo. Así, en el momento de la ovulación dicho moco debe ser claro y filante, de modo que permita el movimiento y la supervivencia de los espermatozoides. La presencia en el moco de anticuerpos antiespermáticos y de otros agentes patógenos conduce a una menor motilidad espermática, constituyendo, por tanto, una posible causa de infertilidad. (8) (71) (74)

#### **1.1.3.4. Hiperprolactinemia**

Esta alteración consiste en la existencia de un nivel de prolactina en sangre superior al normal. Su origen puede ser debido a estrés, fármacos (antihipertensivos, antidepresivos, neurolépticos), ejercicio excesivo, cirugía, relaciones sexuales, elevada ingesta proteica, etc. La hiperprolactinemia altera el ciclo menstrual y la ovulación, generando a la vez, infertilidad y galactorrea. (8)

#### **1.1.3.5. Infertilidad Uterina**

Hay un amplio espectro de anomalías uterinas, ya sea congénita o adquirida, asociadas con la presencia de infertilidad o abortos recurrentes. Entre los ejemplos se incluyen alteraciones congénitas, exposición intrauterina a medicamentos, miomas submucosos, pólipos. Si bien efectivamente hay una asociación de ese tipo, estas afecciones también pueden darse en

forma simultánea con la evolución del embarazo, lo que hace más difícil establecer una relación causa/efecto. (8) (38) (74)

#### **1.1.3.6. Infertilidad Tubárica**

La infertilidad tubárica es causada por anomalías en las trompas de Falopio, producidas por infecciones tubéricas (enfermedad inflamatoria pélvica) o endometriosis. Muchas veces, la infertilidad tubárica requiere una corrección quirúrgica de las trompas afectadas. (38)

#### **1.1.3.7. Trastornos Endocrinos**

Es una insuficiente secreción de progesterona por el cuerpo lúteo; la citada progesterona es necesaria para acondicionar el revestimiento endometrial del útero, de modo que éste permita la recepción y el desarrollo del óvulo fecundado. (10) (11) (74)

#### **1.1.3.8. Infertilidad Hormonal**

Varias anomalías hormonales, tales como el hipotiroidismo (función tiroidea disminuida), hiperprolactinemia y defectos de la fase lútea (niveles bajos de estrógenos y progesterona), pueden provocar infertilidad. (9) (72)

#### **1.1.3.9. Pérdida Recurrente del Embarazo como causa de Infertilidad**

Existen varias causas posibles de pérdida recurrente del embarazo, pero aproximadamente el 85% de todos los abortos espontáneos están causados por anomalías cromosómicas. Y más de dos abortos es causa de infertilidad. (38) (74)

#### **1.1.3.10. Otras causas**

- La edad (reducción en la cantidad o calidad de los óvulos).

- Enfermedades transmitidas sexualmente (por ejemplo, clamidia y gonorrea).
- Condiciones médicas tales como la anemia falciforme, el VIH o el SIDA y enfermedades renales.
- Fumar, beber alcohol o usar drogas (cocaína y marihuana).
- Medicamentos tales como las píldoras antidepresivas, tranquilizantes, bloqueadoras del canal de calcio, narcóticas y medicamentos anticancerosos.
- El haberse expuesto a la radiación, al plomo, a vapores tóxicos y pesticidas. (78)

#### 1.1.4. SÍNTOMAS

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

- Ciclos irregulares o ausencia de ciclo.
- Coágulos en la menstruación.
- Cólicos menstruales.
- Cambios importantes en el estado de ánimo antes o durante el periodo.
- Dolor de cintura.
- Dolor durante la relación sexual.
- Flujos.
- Hemorragia menstrual abundante o muy larga.
- Hemorragias genitales anormales.
- Inflamación abdominal baja.
- Manchado café al pasar el período.
- Menstruación olorosa.
- Nauseas, vómito o mareo cuando va a llegar el período. (8) (37)

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. (7) (71)

#### 1.1.5. DIAGNÓSTICO

Normalmente se comienza por obtener su historial médico referente a su ciclo menstrual, enfermedades pasadas, enfermedades transmitidas sexualmente y cirugías, uso de drogas o la exposición a agentes tóxicos. (37)

Si esta información no es suficiente para diagnosticar la causa de la infertilidad, el médico le hará un examen pélvico para asegurarse de que su sistema reproductivo (la vagina, el útero y los ovarios) es normal y le hará exámenes de sangre para medir sus niveles hormonales. (60) (62)

#### 1.1.6. TRATAMIENTO

El tratamiento de la infertilidad depende de la causa, de cuánto tiempo ha tenido el problema, y de su edad. Se divide en dos categorías principales; una consiste en lograr la fertilidad por medio de medicamentos o cirugía y la otra en utilizar tecnología de reproducción asistida. (38) (73)

## 1.2. FISIOLÓGÍA FEMENINA

Los principales órganos del aparato reproductor femenino humano 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 óvulo 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. (9) (57)

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 germinan 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 epitelioides, son las células de la granulosa. El óvulo rodeado de una única capa de células de la granulosa recibe el nombre de folículo primordial. El propio óvulo en esta fase es todavía inmaduro, requiere dos divisiones celulares más para alcanzar la madurez y se denomina ovocito primario. (9) (11) (57)

### 1.2.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA 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. (11) (57)

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. (57)

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. No hay folículos. (11)

El examen microscópico del ovario lo muestra constituido por un tejido de sostén, vasos y nervios, y repartidas al azar miríadas de folículos.

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 ó 400 folículos. (9) (11) (57)

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 (cilias) dotadas de movimiento que facilitan la progresión del huevo hacia el útero. (9) (10)

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

La función ovárica se produce, en gran medida, bajo la regulación de las gonadotrofinas hipofisarias y la prolactina.

La Prolactina (PRL) aumenta y mantiene los receptores de LH en el cuerpo lúteo y probablemente también colabora en la ovulación inhibiendo el activador del plasminógeno.

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 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. (2) (11) (57)

Los IGF son polipéptidos implicados en el crecimiento del tejido mesenquimal en el cuerpo y el crecimiento folicular. (57)

### **1.2.2. 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. (11)

### **1.2.2.1. 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. (2) (11)

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. Estas 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.

(2) (9) (10)

### **1.2.2.2. 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. (9)

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.

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. (9)

### **1.3. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS**

Los estrógenos son hormonas que influyen el crecimiento, diferenciación y función de los órganos del sistema reproductor como la mama, útero y ovarios, pero que también tienen un efecto en tejidos no-reproductores como en los sistemas cardiovasculares óseos y nerviosos. (30)

El receptor de estrógeno (RE) es una proteína perteneciente a la “súper familia de receptores nucleares”, la cual incluye también otros receptores de hormonas esteroideas, el receptor de la vitamina D, retinoides, hormona tiroidea y algunos receptores huérfanos. El receptor de estrógeno fue identificado hace aproximadamente 40 años, en 1962 Jensen y otros. Describieron la presencia de sitios de unión de estrógeno en diferentes tejidos de ratas; cuatro años más tarde, Toft y Gorski aislaron por primera vez receptores de estrógeno del útero de ratas.

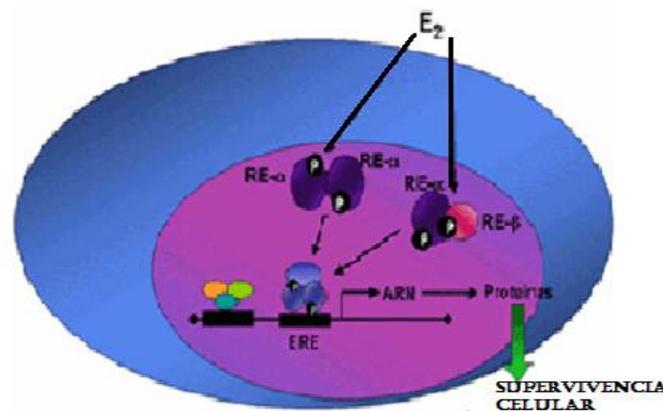
Ambos grupos desarrollaron distintos modelos para explicar como el estradiol lleva a cabo su acción a nivel del núcleo al unirse a un receptor específico, el receptor de estrógeno. Hasta hace pocos años se pensaba que todos los efectos debidos a estrógenos eran mediados por un solo RE, sin embargo, en 1996 fue descubierto un nuevo receptor que comparte gran homología con el RE conocido y se decidió denominarlos entonces RE-b o  $\beta$  al recientemente descubierto y RE-a o  $\alpha$  al previamente conocido. (30) (46)

#### **1.3.1. EFECTOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO**

La teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas establece que el receptor esteroideo, es activado al unir el ligando, en este caso el estradiol 17- $\beta$  (E2), y actúa como un factor

transcripcional al unirse al ADN estimulando la transcripción de ciertos genes, de ahí el nombre de receptores nucleares, ya que ejercen su acción a nivel del núcleo. Este modo de acción de los esteroides ha sido denominado “genómico” ya que requiere la activación del receptor al unir su hormona específica después de haber atravesado la membrana, la homo o heterodimerización (dos RE-a o un RE-a se heterodimeriza con un RE-b) del complejo hormonareceptor y el reconocimiento de una secuencia específica en el ADN o elemento de respuesta a estrógeno (ERE). (20) (40)

La transcripción estimulada por el RE es finamente regulada dependiendo del tejido donde ocurre, este control tan específico parece depender de la composición del complejo de iniciación de la transcripción. Un grupo de factores transcripcionales basales interactúa con el complejo hormona-receptor para formar un complejo de preiniciación al cual se le van a unir una serie de proteínas co-reguladoras llamadas: proteínas de interacción con receptores o RIPs (Receptor Interacting Proteins). Estos co-reguladores pueden activar (co-activadoras) o reprimir (co-represoras) la transcripción. Este proceso, donde se induce la síntesis de ARN que resulta en la producción final de nuevas proteínas, requiere usualmente de por lo menos 1-2 horas después de iniciado el tratamiento con la hormona (Figura No 1). (20) (46)



FUENTE: BEATO M, 1996.

**FIGURA No 1. EFECTO GENÓMICO DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO.**

Activación del RE-a o RE-b al unir el ligando 17β-estradiol (E2) por fosforilación, y unión al ERE y activación de la transcripción con la consecuente estimulación de la síntesis de genes que promuevan la supervivencia celular. (20)

### 1.3.2. MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES ESTRÓGENICOS (SERMs)

Son agentes que se unen al receptor estrogénico donde simulan la actividad de los estrógenos en ciertos tejidos, mientras inhiben su acción en otros. Algunos elementos de esta nueva clase de fármacos se han utilizado clínicamente durante décadas y recientemente se demostró su especificidad tisular. La mayor parte son compuestos no esteroides con estructura terciaria, que les permite interactuar con el receptor estrogénico para poder equiparar los efectos del estrógeno sobre algunos tejidos, mientras manifiestan efectos antiestrogénicos sobre otros. Por ejemplo, el tamoxifeno es un tratamiento efectivo contra el cáncer de mama hormonodependiente y puede prevenirlo en mujeres con alto riesgo para este padecimiento. El raloxifeno fue aprobado para la prevención y tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica, pero también es útil para prevenir el cáncer de mama. Con el propósito de mejorar su eficacia y reducir la toxicidad se están desarrollando otros SERMs.

(47)

### 1.4. SISTEMA HORMONAL FEMENINO

El sistema hormonal femenino consta de tres jerarquías de hormonas.

1. Una hormona liberadora hipotalámica, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).
2. Las hormonas adenohipofisarias, hormona foliculostimulante (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. (9)

Para comprender el funcionamiento del aparato reproductor femenino tenemos que partir de la secreción de hormonas en el hipotálamo y la hipófisis. La hormona hipotalámica que estimula a la hipófisis es la misma que en el hombre la GnRH que controla la producción de

la FSH y la LH en la hipófisis, estas hormonas son vertidas desde la hipófisis a la corriente sanguínea alcanzando los órganos diana donde ejercen sus acciones. Al comienzo del ciclo femenino el aumento de FSH en la sangre estimula en el ovario el crecimiento de varios folículos de los que tan solo uno llegara a ovular en ese momento el endometrio presenta un mínimo espesor, por otro lado la misma hormona estimula la secreción de estrógenos en el folículo ovárico. Los estrógenos producidos en el ovario estimulan la proliferación en el endometrio, mientras tanto en ese mismo momento los estrógenos produce en la hipófisis una descarga rápida de LH, esta subida de niveles de LH determina que entre 14 y 20 horas después se libere el óvulo.

La acción hormonal se encarga de sincronizar varios acontecimientos, el endometrio proliferativo se comienza a transformar en endometrio secretor preparándose para la anidación del embrión, la secreción del moco cervical alcanza su máximo nivel de cantidad y fluidez coincidiendo con la ovulación, inmediatamente después de la ovulación comienza la fase luteinica conforme el óvulo desciende lentamente por las trompas de Falopio se forma el cuerpo lúteo o amarillo que segrega progesterona y estrógenos. Si el óvulo no es fecundado el cuerpo lúteo regresa y disminuye los niveles de progesterona y estrógenos el endometrio se descama y aparece la menstruación. (10)

#### 1.4.1. FORMACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS

Los esteroides ováricos, al igual que las demás hormonas esteroideas, derivan del colesterol ver (Figura No. 2). El ovario puede sintetizar colesterol de novo, 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 contienen 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 androstenodiona y

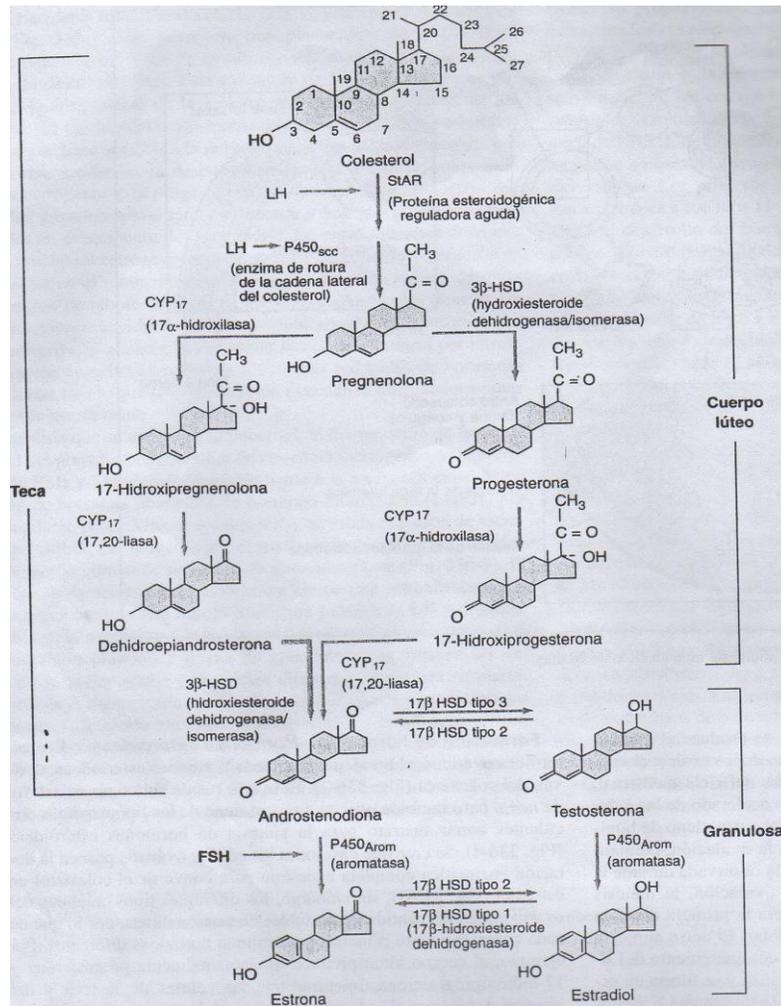
testosterona. Las células de la granulosa poseen gran actividad de aromatasas, una enzima responsable de la síntesis de estrógenos; estas células utilizan como sustrato los andrógenos sintetizados por ellas mismas y por las células adyacentes de la teca. (2) (11)

La hormona luteinizante 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 esteroideogénica (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 solo menor, por la escasez de sustratos disponibles para la aromatización. (2) (11)

#### **1.4.1.1. 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. 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 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. 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 esteroide 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. (11)



FUENTE: CARR T, 1998.

**FIGURA No 2. VIA PRINCIPAL DE LA SINTESIS DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS EN EL OVARIO.**

### 1.4.1.2. Progesterona

La progesterona, el esteroide de 21 átomos de carbono ver (Figura No 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). (11)

### 1.4.1.3. 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 ver (Figura No 2), 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 androgenico e inducen signos de virilizacion en la mujer son la testosterona y la dihidrotestosterona. (10) (11)

**TABLA No 1. CONCENTRACIÓN DE LA PRINCIPALES HORMONAS ESTERIODEAS OVARICAS 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 (ng/mL)</b>
Estradiol	TeBG y albúmina	Folicular Lútea	0,07-2.6 (0.02-0.7) 0.7 (0.2)
Estrona	Albúmina	Folicular Lútea	0.2-1.1 (0.05-0.3) 0.4 (0.1)
Progesterona	CBG y albúmina	Folicular Lútea	3 (1) 16-80 (5-25)
Androstenodiona	Albúmina	-----	5.6 (1.6)
Testosterona	TeBG y albúmina	-----	1.4 (0.4)

FUENTE: SAUNDERS, 1999.

#### 1.4.2. FUNCIONES DE LAS HORMONAS OVÁRICAS: ESTRADIOL Y PROGESTERONA

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. (11)

**Química de los estrógenos:** en la mujer normal no gestante, solo 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 solo 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. (9)

**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. (9)

#### 1.4.3. TRANSPORTE DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA EN LA SANGRE

Tanto los estrógenos como la progesterona son transportados en la sangre ligados principalmente a albuminas 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. (9)

#### 1.4.4. DESTINO DE LOS ESTRÓGENOS; 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. (9)

#### 1.4.5. FUNCIONES DE LOS ESTROGENOS: sus efectos sobre los caracteres sexuales femeninos primarios y secundarios

La principal función de los estrógenos es causar la proliferación celular y el crecimiento de los tejidos de los órganos sexuales y de otros tejidos relacionados con la producción. (9)

##### **1.4.5.1. Efecto de los estrógenos sobre el útero y sobre los órganos sexuales externos femeninos**

**NIÑOS.** Durante la niñez, solo 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.

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.

Durante unos años tras la pubertad, el tamaño del útero aumenta de dos a tres veces. Mas importante que el aumento de tamaño son los cambios que se producen en el endometrio bajo la influencia de los estrógenos, pues los estrógenos producen 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. (7) (9)

#### **1.4.5.2. 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 batan en dirección al útero. Esto ayuda a propulsar hacia el útero el óvulo fecundado. (7) (9) (11)

### **1.4.5.3. 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 solo 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. (9)

### **1.4.5.4. 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. (9)

- **Osteoporosis de los huesos causada por el déficit de estrógenos en edades avanzadas**

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 vertebrae, una gran proporción de mujeres posmenopáusicas debe recibir tratamiento profiláctico de sustitución con estrógenos para prevenir los efectos osteoporóticos. (9)

#### **1.4.5.5. 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. (9) (11)

#### **1.4.5.6. Efecto de los estrógenos sobre el metabolismo y sobre el depósito de grasa**

Los estrógenos aumentan ligeramente la tasa de metabolismo corporal, pero solo un tercio de lo que hace la testosterona, la hormona sexual masculina. También provocan el aumento del depósito de grasa en los tejidos subcutáneos. 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. (9) (11)

#### **1.4.5.7. Efecto de los estrógenos sobre la distribución del pelo**

Los estrógenos no afectan mucho a la distribución del pelo. Sin embargo, tras la pubertad, si que se desarrolla pelo en la región del pubis y en las axilas. Los principales responsables de ello son los andrógenos, que se forman en cantidades mayores en las glándulas suprarrenales de las mujeres tras la pubertad. (9) (11)

#### **1.4.5.8. Efecto de los estrógenos sobre la piel**

Los estrógenos dan a la piel una textura blanda y habitualmente tersa, pero sin embargo, la piel es más gruesa que en las niñas o en las mujeres castradas. Además, los estrógenos aumentan la vascularización de la piel, lo que con frecuencia se asocia con un aumento de la temperatura cutánea y con mayor hemorragia tras los cortes, en comparación con el varón. (9) (11)

#### **1.4.5.9. Efecto de los estrógenos sobre el equilibrio electrolítico**

Se ha señalado la similitud química entre las hormonas estrogénicas y las hormonas cortico suprarrenales. Los estrógenos, como la aldosterona y otras hormonas de la corteza suprarrenal, provocan retención de sodio y agua por los túbulos renales. (9) (11)

### **1.5. GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes)**



FUENTE: TUQUINGA M, 2012.  
**FOTOGRAFÍA No 1. HOJAS DE GUAYUSA**

#### **1.5.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

El género *Ilex* está presente en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano e incluso en Oceanía, se calcula que posee más de 500 especies. El subgénero *Euilex* es el más extenso, puesto que incluye varias especies en el neotrópico distribuidas en Colombia, Ecuador, Brasil, Uruguay, Paraguay y el norte de Argentina. (12)

En el Ecuador, de acuerdo a los registros del Herbario de Loja, la guayusa está presente en las provincias de Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (cantón del Puyo); sin embargo también registran individuos en las provincias de Pichincha y Tungurahua. La distribución de la especie se ubica a 1500 msnm. (31)

#### 1.5.2. DATOS TAXONÓMICOS

**Reino:** *Plantae*

**División:** *Magnoliopsida*

**Clase:** *Magnoliophyta*

**Orden:** *Aquifoliales*

**Familia:** *Aquifoliaceae*

**Género:** *Ilex*

**Especie:** *I. guayusa*

**Nombre binomial:** *I. guayusa* L (4)

**Nombre común:** Guayusa reconocida en la mayoría de las localidades de Ecuador. (4)

#### 1.5.3. DESCRIPCIÓN

Es un árbol perenne nativo de la región amazónica, donde es silvestre, pero también está presente en ciertos lugares subtropicales de la región andina en estado cultivado. En general, los individuos de esta especie alcanzan un tamaño promedio de hasta 10 m de altura, tienen una copa irregular y presentan un follaje denso. En la localidad de San Luis ubicada cerca de Sevilla Don Bosco (provincia de Morona Santiago), se ha reportado la existencia de un bosque natural de árboles de guayusa con individuos que alcanzan una altura de 20 m y tienen un diámetro aproximado de 80 a 90 cm. (6) (31)

El tronco tiene un fuste a menudo bifurcado a la altura del pecho, corteza blanca y textura lisa. Las ramas son extendidas y flexibles. Las hojas son coriáceas, verde-oliváceas, enteras,

oblongo-elípticas, simples, alternas, coriáceas, dentadas, glabras o subglabras en el haz y envés, ápice acuminado, base aguda 15-21 cm de largo, 5-7.5 cm de ancho, pecíolo corto de 1cm de largo. El fruto es una baya globosa de casi 1 cm de ancho y verde. La flor posee una corola blanco verdosa con pétalos obtusos, estambres en igual número que los pétalos, anteras oblongas, ovario sésil subgloboso y usualmente con 4-6 cavidades. (5) (6)

#### 1.5.4. COMPOSICIÓN DE LA GUAYUSA

Los fitoconstituyentes presentes en la guayusa, resultado del análisis fitoquímico realizado por el laboratorio del Gobierno Regional de Cajamarca se logro evidenciar la presencia de : cafeína, derivados del ácido clorogénico, taninos derivados del catecol, esteroides, quinonas, saponinas, aceites esenciales, triterpenos, lactonas, flavonoides, teobromina y en menor cantidad teofilina, piridoxina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido ascórbico, colina, ácido isobutírico y tisanas. (6) (13) (54) (67)

#### 1.5.5. PROPIEDADES Y USOS DE LA GUAYUSA

De los cuatro géneros de la familia Aquifoliceae, el género *Ilex* es el de mayor importancia económica, ya que un gran número de especies se emplean como plantas ornamentales y medicinales. Las especies que se destacan como fuente de varias preparaciones ricas en cafeína y teobromina son *Ilex vomitoria* (yaupon), *Ilex praguayensis* (yerba mate) e *Ilex guayusa* Loes (guayusa). (28)

Preparada de la misma forma que el té, con un sabor agradable, se dice que la infusión de “guayusa” cura el escalofrío y la infección venérea. También es ampliamente utilizada para vencer la esterilidad en las mujeres, aún pensando que la condición ha existido por años. (39)

En 1957 el botánico inglés Richard Spruce hizo algunas observaciones de interés sobre la costumbre de limpiar el estomago diariamente (debido a que la guayusa es usada entre los indios como emético).

En la cosmovisión indígena el ritual tiene un significado de purificación, inducción de “pequeños sueños” para adivinar si la explicación de caza será exitosa y también se consume como bebida de “buen presagio”. Es así que en los rituales es consumida en concentraciones altas para soñar y poder ver en el futuro, destacándose que el empleo tradicional de la guayusa entre las nacionalidades indígenas de la amazonia es muy antiguo. Además las propiedades estimulantes o tónicas, diaforéticas y diuréticas. Se asume que la guayusa puede contener en su composición química como lo *hacen Ilex paraguariensis o Ilex vomitoria* un alcaloide similar a la cafeína con un efecto estimulante. (3) (15)

Los indios del Putumayo alto, Amagues y Paraguajes. Así como también como los blancos de Sibundoy a Mocoa, desde hace mucho tiempo han utilizado las hojas de guayusa después de ser desecadas, preparándolas en decocción o en infusión, para tomar la bebida por las mañanas como estimulante nervioso y muscular. Además, actúa como digestivo y expectorante, por lo que las hojas de esta planta se emplean para curar afecciones catarrales y gripales. Las hojas se preconizan como antidiabéticas. (3) (44)

Un boletín del instituto Botánico de la Universidad Central de Quito. Ecuador; 1943 (citada por GARCIA-BARRIGA) se afirma lo siguiente sobre *Ilex guayusa L.*: “entre los pobladores de la región oriental existe la creencia que esta planta levanta la fuerza y tiene un decisivo poder fecundante, o matricial. Las infusiones de Guayusa, usadas en forma de tisana, causan una baja inmediata del índice glicémico y glucosúrico de los diabéticos. (3) (4)

Bustos, ha verificado las pruebas cuantitativas en la sangre de un paciente, tratándolo durante 20 días con infusiones de Guayusa. El resultado no puede ser más exitoso; mientras el índice glicémico se mantenía en 22% antes del tratamiento, bajo la cifra al 1.01% después de 20 días de tomar las tisanas de Guayusa. (3) (4)

Es probable que las hojas contengan un fermento similar a la saintalina, que es derivado de la guanidina, el cual tiene propiedades similares a las de la hormona pancreática, la insulina. Respecto al poder matricial del que habla el Padre Velazco, es importante recordar que la

insuficiencia, endocrínica del páncreas provoca perturbaciones del desarrollo de las características sexuales secundarias y terciarias, que en endocrinología se conoce con el nombre de infantilismo insulogénico. Estos trastornos se curan administrando insulina. (4)  
(5)

El doctor Andrade por lo pronto encuentra que la Guayusa contiene 2.3% de cafeína, cantidad ésta superior a la que tiene el café y el té. Este resultado corroborara definitivamente la cualidad farmacodinámica atribuida a la planta por los pobladores de la región oriental. Ellos expresan que el agua de Guayusa levanta las fuerzas, lo que equivale en términos médicos a que es un gran tónico y estimulante, cualidad que está relacionada científicamente con el alto contenido de cafeína.

Podemos considerar a las hojas de Guayusa como un valioso medio terapéutico para los tratamientos no insulínicos de la diabetes, y como un tónico de gran valor. La Guayusa, fuera de ser medicinal, podría entrar en el grupo de las plantas estimulantes como el café, té, mate, etc. (4)

En el Ecuador la especie oficial *Ilex guayusa* es usada extensamente por todo el país y esta de venta en la mayoría de los mercados en forma de hojas secas. La Guayusa *Ilex guayusa* L, se afirma que tiene propiedades fecundantes. También se le usa como estimulante, tónico, estomático, digestivo y emético. Ayuda a la digestión y se afirma que hace una limpieza del estomago y los intestinos. (3) (18)

Estos hechos de uso ancestral de la guayusa demuestran que se deben intensificar los estudios farmacéuticos, porque indican diferentes empleos de esta planta en la etnomedicina y que requieren ser más profundizados con pruebas fotoquímica. (3)

#### 1.5.6. INDICACIONES

- Infusión, decocción.

- Posología.: por vía oral en Infusión preparando una cucharada de las hojas en 1 a 2 tazas de agua y beber de 2 a 3 tazas por día. (3) (69)

#### 1.5.7. CONTRAINDICACIONES Y PRECAUCIONES

Durante el embarazo deben tener en cuenta las contraindicaciones reportadas para el consumo de cafeína. (3) (68)

#### 1.5.8. INTERACCIÓN CON FÁRMACOS

Pueden presentarse las interacciones propias de la cafeína y, en general, de los derivados de las xantinas. (68)

#### 1.5.9. TOXICIDAD

La administración de la infusión o la decocción no presenta signos de toxicidad aguda a dosis altas. La administración del extracto etanólico en pruebas multidimensionales de screening a dosis de 1000, 500, 250 y 125mg/Kg, no ocasionó letalidad. La administración de la infusión a dosis repetidas presenta un comportamiento seguro en estudio con animales. (3) (61)

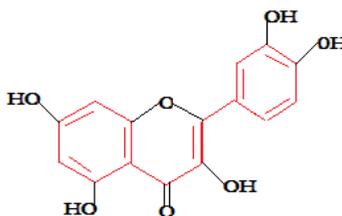
#### 1.5.10. USOS COMERCIALES DE LA GUAYUSA

El uso del género *Ilex* es muy difundido en Sudamérica y algunas especies están presentes por tradición como parte de las bebidas locales. La infusión de *Ilex guayusa* Loes. Se puede considerar como el “mate ecuatoriano”, porque es muy consumida en la región oriental amazónica, donde se la sirve caliente en copas con el desayuno y, sorprendentemente, a pesar de su alto contenido de cafeína también se acostumbra a tomarla en la noche.

En algunas cafeterías de la ciudad de Macas (Amazonía ecuatoriana) se sirve la “guayusa con hueso”, esto es una mezcla de infusión de guayusa y un macerado alcohólico localmente conocido como “chuchuhuaso” que se obtiene de la especie *Maytenus krukovii*. (17)

## 1.6. FLAVONOIDES

Tienen una estructura química muy definida como se muestra en la (Figura No 3). Son moléculas que tienen dos anillos bencénicos o aromáticos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, y se le denominan simplemente como compuestos C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>.



FUENTE: BRUNETON J, 2001.

**FIGURA No 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA QUERCETINA. NÓTESE EN COLOR ROJO LA ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS FLAVONOIDES.**

La Figura No 3, muestra la estructura química de uno de los flavonoides más común: La quercetina.

La mayoría de flavonoides poseen nombres triviales con la terminación INA u OL. Estos nombres les han sido asignados por los investigadores que los han ido descubriendo uno a uno en la naturaleza. La acetina se identificó por primera vez en una planta del género *Acacia* y se clasifica como una flavona. La quercetina es un flavonol identificado inicialmente en una planta del género *Quercus*. La naringenina es una flavanona aislada inicialmente en la naranja. El eriodictiol es una flavanona y se aisló inicialmente en una planta del género *Eriodictyon*. Sin embargo, esta clase de nombres no es muy útil cuando se requiere información sistemática de estas sustancias, por lo cual los químicos han convenido llamarlos con nombres que representen su estructura química. (1)

Así por ejemplo la acacetina corresponde a la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona; la quercetina al 5, 7,3',4'- tetrahidroxiflavonol; la naringenina a la 5, 7,4'-trihidroxiflavanona, etc.

Sin embargo dentro de las plantas los estudios han demostrado que estas sustancias se encuentran la mayoría de las veces, ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico + una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina como GLICOSIDOS, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se les denomina AGLICONAS FLAVONOIDES. (1)

Por ejemplo la acacetina, eriodictiol, quercetina, naringenina, etc, son AGLICONAS FLAVONOIDES. Un ejemplo de GLICÓSIDO es la vitexina que corresponde al 8-C- $\beta$ -Dglucopiranosido de apigenina. Como puede intuirse, la nomenclatura de los glicósidos es más compleja que la de las agliconas. (1)

#### 1.6.1. QUERCETINA

Es comúnmente conocido como un flavonol, flavonoides que dan color a las plantas.

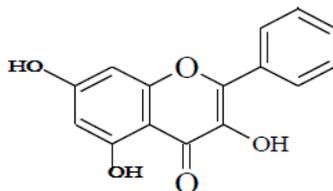
La quercetina ha mostrado efectos antiinflamatorios. La inflamación es mediada parcialmente por la liberación de histamina. La quercetina puede estabilizar las membranas de las células que liberan la histamina, reduciendo su liberación. También afectan la síntesis de leucotrienos. La quercetina también inhibe la enzima que convierte glucosa en sorbitol, un compuesto que está relacionado con las complicaciones diabéticas, incluyendo las cataratas. Varios compuestos químicamente relacionados con la quercetina han mostrado que inhiben la formación de cataratas en animales diabéticos. La quercetina también mejora la secreción de insulina y protege las células pancreáticas del daño por radicales libres. También existen estudios que demuestran su acción benéfica en el tratamiento de tumores en próstata. (1) (79)

Además de las alergias y la artritis anteriormente mencionadas, la quercetina se cree que ha sido utilizado con eficacia en el tratamiento de la gota, la degeneración muscular y la

enfermedad cardíaca, y también puede ayudar a prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), responsable de transportar el colesterol a donde se necesita para reparar los vasos sanguíneos principales. Cuando estas lipoproteínas se oxidan por los radicales libres a continuación, el colesterol asociado a ellos tiende a ser excesivamente depositado en las arterias que está destinado a ser la reparación, y conducir a la aterosclerosis. (79)

También debido a sus propiedades fitoestrógenicas, la quercetina puede utilizarse para enlazar a los sitios en las células cancerosas que son receptivos al estrógeno y así evitar su crecimiento. Muchos tipos de células cancerosas necesitan estrógeno para su crecimiento y proliferación, y los fitoestrógenos imitan el efecto de esta hormona. (1) (79)

#### 1.6.2. GALANGINA

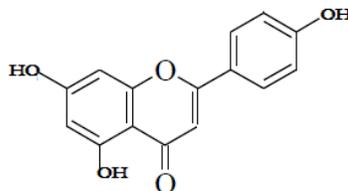


FUENTE: BRUNETON J, 2001.

**FIGURA No 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA GALANGINA**

Es un flavonol, tiene un gran potencial para tratar el carcinoma hepatocelular. Además la galangina podría inhibir la actividad methoxyresorufin O- desmetilasa de CYP1A2, CYP1A1 y P- phenolsulfotransferase. (1) (66)

#### 1.6.3. NARINGENINA



FUENTE: BRUNETON J, 2001.

**FIGURA No 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA NARINGENINA**

La naringenina es una flavona que podría prevenir aumentos en el nivel de colesterol y cambios en la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de glucosa relacionados con el síndrome metabólico. (1) (76)

La naringenina demostró tener los siguientes efectos:

- Incrementa la oxidación de ácidos grasos.
- Evita la lipogénesis tanto en hígado como músculo al reducir la hiperinsulinemia del ayuno.
- Reduce la síntesis hepática de colesterol y éster del colesterol.
- Reduce el nivel de ácidos grasos tanto de síntesis endógena como derivada del VLDL evitando así la acumulación de triglicéridos en músculo.
- Mejoró en general, la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa. (1) (76)

#### 1.6.4. DISTRIBUCIÓN Y ESTADO NATURAL

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas; y se les encuentra en forma libre como agliconas flavonoide y como glicósidos (la mayoría de las veces), como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros. Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos. De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes de hallar. Las antocianinas por su parte se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul. Muy pocas veces se encuentran varias clases de flavonoides en un mismo tejido vegetal. (1)

#### 1.6.5. PROPIEDADES FISICAS

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado su forma (libre, glicósido ó sulfato). Las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema conjugado son compuestos sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanonoles debido al carbono quiral C-2 presentan el fenómeno de la rotación óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos. (1)

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo. (1)

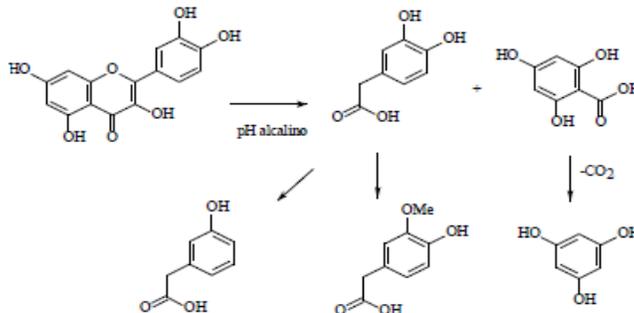
Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que hace años se utilizó para su elucidación estructural.

Los glicósidos flavonoides son sólidos amorfos que se funden con descomposición, mientras que las correspondientes agliconas son sólidos cristalinos. (1)

#### 1.6.6. METABOLISMO

La mayoría de flavonoides son degradados en condiciones alcalinas fuertes rompiéndose el anillo C. Por esta razón resultan no tóxicos para el hombre y los mamíferos, pues son

degradados en las condiciones alcalinas a nivel del intestino. Por ejemplo la quercetina es degradada según el siguiente esquema: (79)



FUENTE: BRUNETON J, 2001.

**FIGURA No 6. REACCIÓN DE LA QUERCETINA DENTRO DEL ORGANISMO HUMANO**

#### 1.6.7. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO

Los flavonoides en general se extraen de muestras secas y molidas. La muestra se desengrasa inicialmente con éter de petróleo ó n-hexano, y el marco se extrae con etanol puro o del 70%. Este último es recomendado para garantizar la extracción de los más polares. El extracto obtenido se evapora con calentamiento no superior a los 50°C y se le hacen particiones sucesivas con éter etílico, acetato de etilo y n-butanol. Los flavonoides apolares quedan en la fase etérea, los medianamente polares en la fase acetato de etilo y los más polares en n-butanol. Cada una de estas tres fracciones se puede analizar por cromatografía en capa fina (CCF) y HPLC en fase reversa.

Para el análisis por CCF de las agliconas se pueden utilizar mezclas n-hexano/acetato de etilo y cloroformo/acetato de etilo en diferentes proporciones, por ejemplo la mezcla cloroformo/acetato de etilo 60:40 utilizada por Wagner y col. para el análisis de drogas vegetales. Para el análisis de glicósidos flavonoides Wagner y col. utilizan una mezcla acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético/agua 100:11:11:27. (1)

## 1.7. FITOESTRÓGENOS

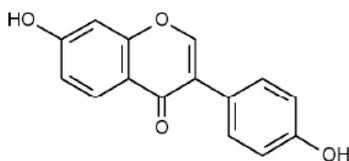
### 1.7.1. DEFINICIÓN

Los fitoestrógenos son compuestos de plantas que estructuralmente y funcionalmente son similares al 17- $\beta$  estradiol y se unen a los receptores de este. (21) (22) (35)

Más de 300 plantas poseen actividad estrogénica. Los principales fitoestrógenos son las isoflavonas (genisteina, daidzeina, biochanina A), los lignanos (enterodiol y enterolactona) y los coumestanos (coumestrol). (21) (35) (65)

### 1.7.2. ESTRUCTURA DE LOS PRINCIPALES FITOESTROGENOS

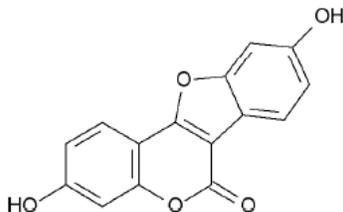
#### 1.- Isoflavonas



FUENTE: BRUNETON J, 2001.

FIGURA No 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA DAIDZEINA.

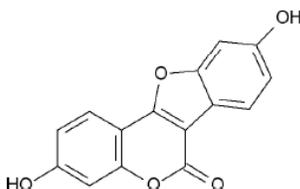
#### 2.- Lignanos



FUENTE: BRUNETON J, 2001.

FIGURA No 8. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ENTERODIOL.

#### 3.- Cumestano



FUENTE: BRUNETON J, 2001.

FIGURA No 9. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL COUMESTROL.

Las isoflavonas se encuentran en la soya, lentejas, garbanzos y otras legumbres. Los lignanos son componentes de la pared celular de las plantas de muchas frutas y cereales como la semilla de lino. Los coumestanos se encuentran en el trébol rojo y en semillas de girasol entre otros. (42)

Estudios epidemiológicos han sugerido que una dieta con alto contenido de fitoestrógenos puede estar asociada con baja incidencia de cáncer de mama, de endometrio, de próstata y colorrectal, lo que parece ser resultado de este tipo de alimentación, toda vez que investigaciones básicas han demostrado un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de líneas celulares de cánceres humanos y de modelos animales. (21) (24) (45)

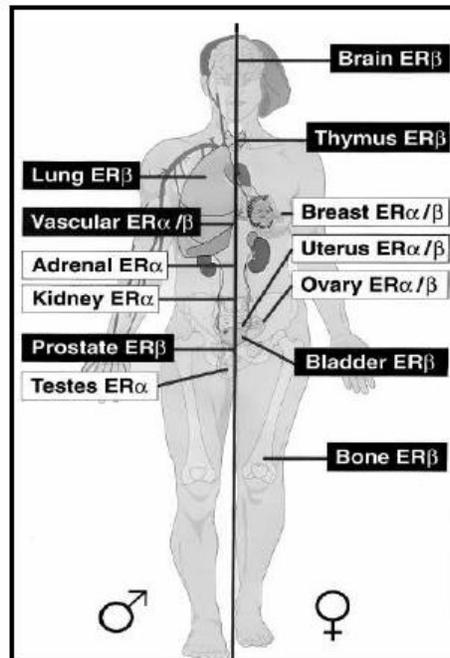
### 1.7.3. MECANISMO DE ACCIÓN

Los estrógenos (E) ejercen su efecto a través de dos tipos de receptores  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  que tienen diferente distribución en los tejidos, de manera que el  $\beta$  es más ubicuo que el  $\alpha$ . El primero se expresa en tejidos no reproductivos como hueso, cerebro, hipófisis, tracto urinario, aparato vascular y próstata y tejidos reproductivos como ovario y testículo. El  $ER\alpha$  en útero, hígado, mama y riñón. Ambos receptores se expresan en ovario, cerebro, hueso, sistema cardiovascular y mamas. (24) (25) (26)

El  $ER\alpha$ , clonado de células MCF-7 procedentes de un tumor de mama humano, es una proteína que contiene 595 aminoácidos y un peso molecular de 66 kDa. Está codificado por un gen localizado en el cromosoma 6. El  $ER\beta$ , fue clonado a partir de células de próstata de rata por Kuiper en el año 1996 y un peso molecular de 53 kDa. (21) (24) (26)

El gen que expresa el  $ER\beta$  humano se localiza en el cromosoma 14, expresándose en una amplia variedad de tejidos, incluyendo los cardiovasculares, los riñones, los pulmones, el cerebro y el sistema nervioso central. (21) (25) (26)

Diagrama ilustrativo simplificado de la distribución anatómica de la descripción de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ .



FUENTE: SETCHELL KD, 1984.

**FIGURA No 10. RECEPTORES DE ESTROGENOS EN EL CUERPO HUMANO**

Las isoflavonas son potentes agonistas  $ER\beta$  y débil  $\alpha$  lo que permite clasificarla como bloqueadoras o moduladoras naturales selectivas del receptor estrogénico (SERMs *selective estrogen receptor modulators*) por estas razones, las isoflavonas realizan su acción sobre hueso, cerebro, sistema cardiovascular y ovario, lo que explica su utilidad para: 1) mejorar los síntomas vasomotores; 2)prevenir la osteoporosis; 3)aparentemente, reducir el riesgo de cáncer de mama; 4) inducir patrón lipídico antiaterogénico (disminución del colesterol total, LDL y triglicéridos y ligero aumento del HDL). (24) (25) (33)

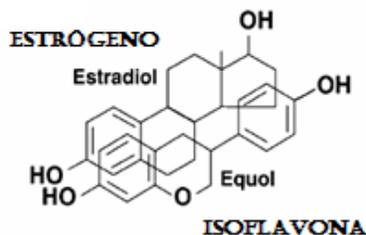
## 1.8. ISOFLAVONAS

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 fitoestrógenos, 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. (49) (36) (42)

Las isoflavonas son las que en el momento actual ofrecen un mayor interés en cuanto a su posible utilización en la clínica.

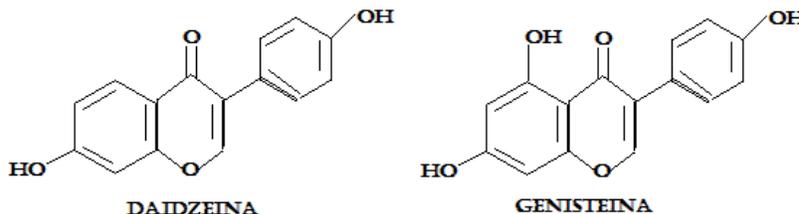
Estos tienen una estructura similar al estradiol lo cual permite que compartan propiedades funcionales con los estrógenos endógenos. El anillo fenólico es el elemento clave de la estructura permite ligarse a los receptores estrogénicos. (36) (40) (49)



FUENTE: PRICE KR, 1985.

**FIGURA No 11. COMPARACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA DEL (EQUOL) Y EL ESTRÓGENO (ESTRADIOL) DONDE SE MUESTRA LAS SIMILITUDES ENTRE LAS DOS MOLÉCULAS.**

Se trata de compuestos que contienen uno o varios grupos hidroxilos unidos a un anillo aromático.



FUENTE: PRICE KR, 1985.

**FIGURA No 12. ANALOGÍA ENTRE ESTRÓGENOS E ISOFLAVONAS.**

### 1.8.1. ABSORCIÓN Y METABOLISMO

Al ingerir las isoflavonas de la soya, son hidrolizadas por glucocidasas, las cuales liberan a las agliconas, daidzeina, genistein y glicitein. Estos pueden ser absorbidos o metabolizados a metabolitos específicos: daidzein es formado de formononetina y es metabolizado a equol y a O-desmethyllangolensina (O-DMA) y genestein es formado de biocanina A y metabolizado a p-etilfenol. La cantidad de estos metabolitos es variable entre cada individuo, y está influenciado por el componente de la dieta y la flora intestinal. Se ha observado que una dieta alta en carbohidratos, la cual aumenta la fermentación intestinal, resulta en una extensa biotransformación de fitoestrógenos a sus metabolitos específicos, los cuales aumentan la formación de equol. Los fitoestrógenos son absorbidos a lo largo de todo el intestino delgado por medio de una difusión pasiva no-ionica. (34) (44) (49)

Al igual que los estrógenos endógenos, las isoflavonas al ser absorbidas entran a la circulación entero hepática. El primer paso es la conjugación de las isoflavonas al ácido glucorónico, reacción catalizada por la isoenzima glucoroniltransferasa. No se sabe con certeza si esto ocurre exclusivamente en el hígado o en el intestino. Las isoflavonas se encuentran unidas mayormente en el plasma en la forma de conjugados glucorónicos, y de menor manera como sulfatos. (43)

La mayoría de los estrógenos están unidos a proteínas séricas como albúmina y globulina de unión de hormonas sexuales, solo el 5% está circulando libre. Se ha observado en algunos estudios que el fitoestrógeno tiene menor afinidad con las proteínas séricas de unión a comparación con el estradiol, lo cual hace que una mayor porción esté disponible a ocupar el receptor estrogénico. (19) (56)

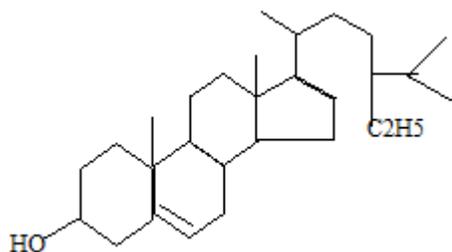
La vida media de las isoflavonas daidzen y genistein se ha calculado en humanos con un promedio 7.9 horas, el pico de concentración máxima después de la ingesta ocurre entre 6 y 8 horas. Se han alcanzado concentraciones plasmáticas de 50-800 ng/mL de daidzen, genistein y equol, en adultos que ingieren más de 50 mg de isoflavonas al día. (19)

La eliminación de las isoflavonas del cuerpo es por vía urinaria. En la orina las isoflavonas se encuentran en forma de conjugados glucorónicos. En algunos estudios en animales y humanos han demostrado que la depuración urinaria de isoflavonas es más del 50% de la dosis ingerida y una mínima por vía oral. (30) (32)

### 1.8.2. EFECTOS ADVERSOS

Según estudios se considera que con las dosis que se manejan para el abordaje de la menopausia (40 mg a 50 mg), de isoflavonas no se han registrado efectos perjudiciales. (32)

### 1.8.3. BETA SITOSTEROL

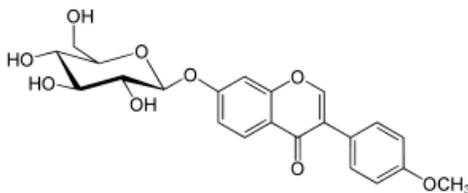


FUENTE: BRUNETON J, 2001.

**FIGURA No 13. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL  $\beta$ -SITOSTEROL.**

Es un compuesto químico que pertenece al grupo de los fitosteroles (esteroides), que se encuentran de forma natural en las plantas. Su estructura química es muy similar a la del colesterol. Está ampliamente distribuido en el mundo vegetal donde cumplen la función de mantener la estructura y el funcionamiento de las membranas celulares. Se encuentra en niveles altos en el salvado de arroz, el germen de trigo, soja, el cáchuate y sus derivados, son fuentes de esteroides de origen vegetal. (58)

#### 1.8.4. ONONIN



FUENTE: <http://www.astragalusextract.net/ononin.html> , 2012.

**FIGURA No 14. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ONONIN**

El ononin es la 7-O-glucosido de formononetina.

Es un compuesto que pertenece al grupo de las isoflavonas. Se encuentra en una serie de plantas y hierbas como la soja y de *Glycyrrhiza uralensis*. (77)

### 1.9. CLIMASOY

#### 1.9.1. COMPOSICIÓN

Cada cápsula contiene: Isoflavonas de soja concentrado, equivalente a 50 mg de isoflavonas activas. Excipientes: Lactosa, croscarmellosa sódica, dióxido de silicón coloidal y estearato de magnesio. (59)

#### 1.9.2. MECANISMO DE ACCIÓN

Las Isoflavonas de soja 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 soja por los receptores estrogénicos receptores 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  $\alpha$ . Esta es la

razón por la cual son seguros y no incrementan el riesgo de cáncer de mama y endometrio. (59)

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 occidental izadas 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. Un exceso en la ingestión de isoflavonas conduce a una disminución en su absorción. (59)

### 1.9.3. 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. (59)

### 1.9.4. CONTRAINDICACIONES

Hipersensibilidad a los componentes de la fórmula. (59)

### 1.9.5. DOSIS

Una o dos cápsulas todos los días. (59)

### 1.9.6. VIA DE ADMINISTRACIÓN

Administración oral. (59)

## 1.10. RATAS DE LABORATORIO



FUENTE: TUQUINGA M. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH, 2012  
**FOTOGRAFÍA No 2. *Rattus norvegicus*.**

### 1.10.1. TAXONOMÍA

**TABLA No 2. TAXONOMÍA DE LA *Rattus norvegicus*.**

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Mammalia
Orden:	Rodentia
Suborden:	Myomorpha
Familia:	Múridae
Género:	Rattus
Especie.	Novergicus

FUENTE: <http://www.profesorenlinea.cl/fauna/RatasLaboratorio.htm>, 2011.

### 1.10.2. DESCRIPCIÓN

Nomenclatura: Crl: (WI) BR

**TABLA No 3. DESCRIPCIÓN ANATÓMICA DE LA *Rattus norvegicus***

<b>CAVIDAD TORÁCICA</b>	<b>CAVIDAD ABDOMINAL SUPERIOR</b>	<b>CAVIDAD ABDOMINAL INFERIOR</b>
Tráquea	Hígado	Conductos deferentes
Esófago	Estómago	Vejiga
Pulmones	Intestino delgado	Aparato reproductor
Corazón	Intestino grueso	
Diafragma	Bazo	
	Ciego	
	Páncreas y riñones	

FUENTE: <http://www.profesorenlinea.cl/fauna/RatasLaboratorio.htm>, 2011.

**TABLA No 4. DATOS FISIOLÓGICOS DE LA *Rattus norvegicus*.**

<b>DATOS FISIOLÓGICOS</b>	
Temperatura corporal:	35.9-37.5°C
Frecuencia cardíaca	250-600 por minuto
Frecuencia respiratoria	66-144 por minuto
Peso macho adulto	300-500 g
Peso hembra adulta	200-400 g
Peso recién nacido	5 g
Consumo de agua	10-12 mL por cada 100 g de peso corporal al día
Consumo de alimento	5-6 g por cada 100 g de peso corporal al día
Heces	Masa dura y alargada de color marrón oscuro con extremos redondeados
Orina	Transparente y amarilla.

FUENTE: TOAPANTA G, 2011.

**TABLA No 5. DATOS RELACIONADOS CON LA PREPRODUCCIÓN DE LA *Rattus norvegicus*.**

<b>DATOS RELACIONADOS CON LA REPRODUCCIÓN</b>	
Madurez sexual	65-110 días de edad
Ciclo estral	4-5 días; esto posparto
Gestación	20-22 días
Tamaño de la camada	7-11 días, de 8 a 9 crías
Canibalismo	Usualmente la rata no canibaliza a sus crías, a menos que estén enfermas
Destete	21 días

FUENTE: TOAPANTA G, 2011

### 1.10.3. CONDICIONES

**TABLA No 6. CONDICIONES MACROAMBIENTALES**

Humedad relativa:	55% $\pm$ 10
Ventilación	Suministrar oxígeno suficiente
Ruido	Evitar los generadores de sonido
Temperatura:	22 °C $\pm$ 2
Periodos luz- oscuridad:	50% cada uno

FUENTE: TOAPANTA G, 2011

### 1.10.4. MANIPULACIÓN DE LAS RATAS

- 1) Tomar al animal por la cola, teniendo cuidado que no escalen su propia cola y lo muerda. Apoyar la palma de la mano sobre la espalda del animal, colocar el dedo índice y medio a ambos lados de la mandíbula, de forma que la cabeza de la rata quede entre dichos dedos impidiendo su movimiento. Con la otra mano tome la parte superior del cuerpo. Así puede levantarla sujetándola firmemente.
- 2) Tomar la rata apoyando la mano alrededor del tórax, quedando una de las patas entre sus dedos índice y medio y la otra sobre su dedo pulgar (con el dedo índice realice una presión leve sobre la mandíbula de la rata, para prevenir mordeduras). Con otra mano, tome la parte superior del cuerpo y levántela, sujetándola firmemente.
- 3) Tomar el animal por la piel del cuello con los dedos pulgar e índice por detrás de la orejas y con los otros dedos de su mano sujetar la piel de todo el lomo de la rata. Levántela, sujetando firmemente. (80)

### 1.10.5. 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. (53) (86)

### 1.10.5.1. 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 halla 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. (80) (81)

**TABLA No 7. VOLUMEN A ADMINISTRAR**

	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: VINUEZA D, 2011.

### 1.10.6. TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN DE SANGRE EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Independiente de la técnica a utilizar evitar lo siguiente:

- a. Causar el mínimo estrés al 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. (75)

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 semanas.

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. (8) (29)

#### 1.10.7. 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.

#### **1.10.7.1. Venas y arterias 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.

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. (50) (64)

#### **1.10.7.2. 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. (50) (64) (81)

## CAPITULO II

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La investigación ha sido llevada a cabo en el Bioterio, Laboratorio de Farmacología, Laboratorio de Fitoquímica y Laboratorio de Análisis Instrumental perteneciente a la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH y SOLCA – Riobamba.

Parroquia: Lizarzaburu

Cantón: Riobamba

Provincia: Chimborazo

#### 2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

##### 2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- **Población:** En la experimentación se usaron ratas Wistar albinas (*Rattus norvegicus*) de laboratorio Crl: (WI) BR, a continuación expongo las características del reactivo biológico de la colonia del Bioterio, de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, de donde se tomaron las muestras para la investigación.

- **TAXONOMÍA**

**TABLA No 8. TAXONOMÍA DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EMPLEADOS EN EL ESTUDIO FARMACOLÓGICO.**

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Mammalia
Orden:	Rodentia
Suborden:	Myomorpha
Familia:	Múridae
Género:	Rattus
Especie.	Novergicus

- **DESCRIPCIÓN**

**TABLA No 9. DESCRIPCIÓN ANATÓMICA**

Nomenclatura:	Cr1: (WI) BR
Edad	2.5 -3.5 meses
Sexo	Hembra
Peso promedio	170 ± 5g
Lugar de nacimiento	Bioterio Esc. BQF-ESPOCH

- **CONDICIONES**

**TABLA No 10. CONDICIONES DE MANTENIMIENTO PARA LA CRIANZA**

Humedad relativa:	55% ±10
Temperatura:	22 °C±2
Periodos luz-oscuridad:	50% cada uno

- **MUESTRA**

- 15 Ratas (experimentales neta)
- 3 Ratas ( Grupo blanco)
- 3 Ratas ( Grupo patrón)
- 3 Ratas (Dosis baja); 3 Ratas (Dosis media); 3 Ratas (Dosis alta).

Con extracto hidroalcohólico Guayusa (*Ilex guayusa Loes*).

### 2.2.2. MATERIA PRIMA

El material vegetal de Guayusa (*Ilex guayusa L.*), se recolectó en Febrero del 2011 en el cantón Puyo perteneciente a la Provincia del Pastaza.

### 2.2.3. MATERIALES Y REACTIVOS PARA EL ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y CONTROL DE CALIDAD

**TABLA No 11. 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 50, 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	Eter etílico	pH-metro
Balones esmerilados de 500 mL	Reactivo de Dragendorff	Espectrofotómetro
Embudos simples	Reactivo de Mayer	Refractómetro
Embudos de separación de 100, 250 mL	Reactivo de Baljet	Congelador
Embudo Buchner	Hidróxido de sodio	Microscopio
Trípode, varilla de agitación	Hidróxido de potasio	Molino
Espátula, tubos de ensayo, gradilla	Amonio al 5% en agua	Revelador luz U.V
Papel aluminio	Anhídrido acético	Desecador
Cápsulas y crisoles de porcelana	Acido sulfúrico concentrado	
Pipetas Pasteur	Solución de carbonato de sodio	
Capilares de vidrio	Reactivo de Fehling	
Picnómetro, termómetro.	Cloruro Férrico al 5%	
Papel filtro, vidrio reloj	Acetato de sodio	
Pinzas para tubos	Solución al 2% de ninhidrina en agua	
Cámara Cromatográfica	Acido clorhídrico concentrado	
Placas de Silice Gel 60F254	Magnesio metálico	
Refrigerante, mangueras, piceta	Alcohol amílico	
Revelador	Reactivo de Sudan III	
Matraz Erlenmeyer de 125 mL	Metanol	

FUENTE: TUQUINGA M, 2012.

## 2.3. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

### 2.3.1. ACTIVIDAD ESTROGÉNICA DEL EXTRACTO DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L).

La comprobación del efecto estrogénico se desarrollara en base la técnica hecha por la Universidad de Camerún. (Ver Anexo No. 1)

#### 2.3.1.1. Unidades de observación

Ratas albinas (*Rattus nivergicus*), inducidas por vía oral a diferentes dosis del extracto hidroalcohólico de *Ilex guayusa* L.

#### 2.3.1.2. Grupos de estudio

TABLA No 12. GRUPOS DE ESTUDIO

GRUPOS	TRATAMIENTO	DETALLE DEL TRATAMIENTO
CONTROL	X1	Solución salina NaCl 0.9%
PATRÓN	X2	MCIAS (3,64mg/Kg)
D <sub>1</sub>	X3	Dosis baja (8,93mg/Kg/día ) del extracto H.G
D <sub>2</sub>	X4	Dosis media (17,86mg/Kg/día) del extracto H.G
D <sub>3</sub>	X5	Dosis alta (35,72mg/Kg/día) del extracto H.G

FUENTE: TUQUINGA M, 2012.

#### 2.3.1.3. Criterios de inclusión

- Ratas (*Rattus novergicus*) sanos.
- Sexo femenino.
- En intervalos de 2,5-3,5 meses.
- Pesos corporales entre  $170 \pm 5g$ .

#### **2.3.1.4. Diseño experimental**

En el experimento se trabajó con tres ratas por tratamiento y cinco por bloque experimental, es decir; que para tres tratamientos propuestos se obtuvieron un total de quince variantes por lote experimental.

#### **2.3.1.5. Protocolo Experimental**

- **Preparación de extractos**

El extracto hidroalcohólico se obtuvo en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH tras corroborar su composición por el análisis cualitativo y cuantitativo por espectrofotometría. El extracto fue evaporado hasta sequedad luego reconstituido con suero fisiológico; para administrar a tres dosis diferentes; dosis baja (8,93mg/Kg), dosis media (17,86mg/Kg), dosis alta (35,72mg/Kg) en forma de disolución.

- **Preparación del Patrón**

Se disolvió en suero fisiológico la cantidad necesaria de MCIAS para administrar una dosis de 3,64 mg/ Kg.

Tanto los extractos como el patrón se prepararon diariamente, 1 a 2 horas antes de la administración. Las diferentes dosis de guayusa se preparó en función de los sólidos totales.

- **Proceso experimental**

Para el estudio se utilizó ratas hembras albinas cuyo peso corporal oscilaba entre  $170 \pm 5$ g. Los animales se colocaron en jaulas y se adaptaron durante ocho días a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en  $25 \pm 2$  °C, la humedad entre  $55\% \pm 10$  y la

iluminación en ciclos circadianos de doce horas luz, doce horas oscuridad. El alimento que se le administro fue de una dieta estándar y agua *ad libitum*.

Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio.

Posterior al periodo de cuarentena, un total de 15 ratas inmaduras fueron distribuidas al azar en cinco grupos experimentales (3 animales/cada grupo), cantidad que se encuentra dentro de lo recomendado para este ensayo.

Se pesaron los animales (peso inicial); y todos fueron intervenidos a una extracción sanguínea por punción de la vena facial en la que se evaluó el nivel de estradiol mediante el Equipo Analizador de estradiol; *Analizadores Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170, COBAS e 610 y COBAS e 602*.

Posterior a la evaluación del estradiol inicial de todos los animales pertenecientes a los 5 grupos de estudio se dio inicio al tratamiento el cual se extendió por 15 días.

El tratamiento se realizó de la siguiente forma:

- Grupo 1 (“Control”): Tratado únicamente con vehículo (suero fisiológico).
- Grupo 2 (“Patrón”): Tratado con el fármaco patrón MCIAS.
- Grupo 3 (“Problema I”): Tratado con la dosis D<sub>1</sub> 8,93mg/Kg/día de extracto de Guayusa.
- Grupo 4 (“Problema II”): Tratado con la dosis D<sub>2</sub> 17,86 mg/Kg/día de extracto de Guayusa.
- Grupo (“Problema III”): Tratado con la dosis D<sub>3</sub> 35,72 mg/Kg/día de extracto de Guayusa.

Los productos se administraron por vía oral, en volúmenes equivalentes a 0,5mL.

Al final del periodo experimental se pesó a todas la ratas de experimentación (peso final) y fueron intervenidos por segunda vez a una extracción sanguínea por punción cardiaca y se evaluó el estradiol final ( $E_f$  en el diseño experimenta) a través del analizador hormonal antes mencionado.

Luego 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 en el diseño experimental) 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 13. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO EXPERIMENTAL**

Grupos de trabajo	Evaluar el Nivel de Estradiol inicial (pg/mL)	Tratamiento, Administración de vehículo, 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	OV	U
RG2	Eo	X2	Ef	OV	U
RG3	Eo	X3	Ef	OV	U
RG4	Eo	X4	Ef	OV	U
RG5	Eo	X5	Ef	OV	U

FUENTE: TUQUINGA M, 2012.

**Donde:**

R= asignación al azar o aleatorio.

G= determina el grupo de sujetos que corresponde a ratas albinos con un peso de  $170 \pm 5g$ , ambientadas en el área de cuarentena durante ocho días de adaptación con libre acceso de alimento y agua.

Eo = determinación del estradiol inicial.

X = tratamiento, administrado por vía oral por intubación gástrica.

Ef = determinación del estradiol final.

OV = obtención de los pesos del ovario al terminar el tratamiento.

U = obtención de los pesos del útero al terminar el tratamiento.

### 2.3.2. ESTUDIO DE TOXICIDAD

Se realizó el estudio de toxicidad aguda, para lo cual se administró por vía oral a los individuos las dosis antes mencionadas cada día (durante 15 días) y se evaluó su comportamiento, estado físico general (características organolépticas, peso del animal). Durante estos 15 días el animal estuvo provisto de alimento y agua ad libitum. Finalizado los 15 días de estudio se procedió a realizar la necropsia de los órganos farmacocinéticos más importantes de cada tratamiento, entre ellos: hígado, riñón, estómago. A los cuales se realizó el estudio histopatológico para investigar daño a nivel tisular.

### 2.3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó el análisis de la varianza (o Anova: Analysis of Variance), que permite comparar dos o más medias. Para ello se trabajó con un diseño de series cronológica múltiples compuesto de: 1) un grupo control, 2) un grupo patrón y 3) tres grupos problema. Las diferencias entre los grupos experimentales y controles fueron determinados mediante ANOVA un factor con datos agrupados, permitiendo con ello, evaluar la existencia de heterogeneidad de los grupos con respecto al factor respuesta (estradiol) y posteriormente se realizó la prueba de comparación múltiples a un nivel de confianza del 99% empleando la prueba de Tuckey HSD, lo que permitió evaluar que grupos son similares y diferentes respecto a los tratamientos.

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

Ho: Las dosis del extracto H.G (*Ilex guayusa* L) no presenta actividad estrogénica en ratas (*Rattus norvegicus*).

H1: Al menos una dosis del extracto H.G (*Ilex guayusa* Loes) presenta una significativa actividad estrogénica en ratas (*Rattus norvegicus*).

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.

La hipótesis nula de igualdad de medias se rechaza en el caso en el que p valor  $<0.05$ , en caso contrario no hay evidencia suficiente para poder rechazarla.

En el caso de que rechace la hipótesis nula de igualdad de medias se puede determinar mediante comparaciones múltiples a posterior, de que grupo o grupos proviene esas diferencias.

#### 2.3.4. INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA

Se ejecutó el tamizaje fitoquímico con el objetivo de buscar grupos de metabolitos secundarios permisibles con interés farmacológico.

### 2.4. METODOS Y TÉCNICAS

#### 2.4.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE GUAYUSA *Ilex guayusa L*

Las técnicas de extracción de metabolitos de una planta son varias y se aplican de acuerdo a las características de cada especie. Es así que tenemos la maceración, lixiviación o percolación, digestión, destilación y extracción continua.

La percolación se desarrolla en tres fases:

- a) Humectación: La droga seca y molida 100g obtenida exclusivamente de las hojas fue embebida en una cantidad al 96% p/v de solución hidroalcohólica (200mL) y mezclada suavemente para obtener una masa vegetal homogénea que se dejó descansar durante una hora.
- b) Maceración: Se prepara el percolador y se coloca en el fondo algodón. La muestra humectada fue percolada, prensada suavemente para obtener una masa homogénea y se le agrego una cantidad de solvente suficiente para cubrirla hasta superar un nivel de 3-4cm se cubre con papel filtro y se lo envuelve con papel aluminio, luego permaneció en maceración durante 24 horas.
- c) Percolación: La muestra sometida a percolación pasa por un proceso lento, este consiste en un constante flujo de solvente a través de la droga que baja goteando y se enriquece más de principio activo, porque reemplaza desde arriba al solvente fresco que se vuelve a extraer y optimiza el proceso cada vez que lo hace. El solvente baja a 30 gotas/minuto; en general se separan los primeros 85 mL de solvente por cada 100 g de droga (primera fracción), la percolación sigue y separa otra cantidad de liquido (segunda fracción) que se concentra a un volumen igual o inferior a 15mL, se agrega a la primera fracción para llegar al volumen de 100 mL por 100g de solvente (relación peso D/volumen E= 1/1). El extracto que se obtiene se deja descansar 3-4 días a 4 °C para decantar la clorofila, separar y filtrar.

#### 2.4.2. CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA SECA DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L)

##### 2.4.2.1. Análisis físico-químico

#### **DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD**

### **Método Gravimétrico**

Se pesó 2 g de droga cruda con desviación permisible de 0.5 mg y se transfieren a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105 °C por un lapso de 2 a 3 horas. Se enfrió en el desecador a temperatura ambiente y se peso.

Expresión de resultados:

$$\text{Hg} = (M_2 - M_1) / (M_2 - M) \times 100$$

#### **FÓRMULA No 1.**

Hg = pérdida en peso por desecación (%)

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

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

M = masa de la cápsula vacía

100 = factor matemático

### **DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES**

Se colocó la cápsula con la muestra seca resultado de la determinación del contenido de humedad, en un mechero y en la sorbona, para calcinar hasta ausencia de humos. Luego se transfirió la cápsula a la mufla y se incineró a 500-550 °C durante 2 horas, hasta obtener cenizas libres de residuo carbonoso. Se enfría el crisol en una desecadora y se pesó. Si el residuo presenta trazas de carbón, se les añade unas gotas de solución de peróxido de hidrogeno concentrado, acido 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.

Expresión de resultados:

$$C = (M_2 - M) / (M_1 - M) \times 100$$

#### **FÓRMULA No 2.**

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)

$M_2$  = masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

### **DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA**

A las cenizas totales obtenidas en A, se le añade de 15 a 20 mL de agua. El crisol se tapo y se puso a hervir suavemente directo a la llama del quemador durante 5 min. La solución se filtro a través del papel libre de cenizas. El papel con el residuo se transfirió al crisol inicial, se carbonizo en un mechero y luego se incinero en un horno mufla a 500-550 °C, durante 2 h. Posteriormente se enfrió en una desecadora hasta temperatura ambiente y se peso.

Expresión de resultados.

$$Ca = (M_2 - Ma) / (M_1 - M) \times 100$$

**FÓRMULA No 3.**

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada

$M_2$  = masa del crisol con las cenizas totales (g)

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

$M_1$  = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacio

100 = factor matemático

### **CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO**

A las cenizas totales se le añaden de 2-3 mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapó con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviente durante 10 min. Se lava el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtró a través de un papel filtro libre de cenizas; se lavo el residuo con agua caliente hasta que muestre negativo la prueba de  $AgNO_3$  0.1 mol /L, presencia de cloruros. El papel con el residuo se transfirió a la capsula inicial, se carbonizo en un quemador y luego de incineró en un horno mufla 500 a 550 °C, durante 2 h. Posteriormente se enfría en un desecador hasta temperatura ambiente y se peso.

Expresión de resultados:

$$B = (M_1 - M_2) / (M_1 - M) \times 100$$

**FÓRMULA No 4.**

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

M = masa del crisol tarado (g)

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

M<sub>2</sub> = masa de la cápsula con la muestra después de la incineración (g)

100 = factor matemático.

#### **2.4.2.2. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios**

El proceso fitoquímico tiene como objetivo general la determinación cualitativa de los principales grupos químicos presentes en el material vegetal, siendo estos los responsables de la actividad farmacológica.

##### **2.4.2.2.1. Ensayo para identificación de alcaloides**

#### **PRUEBA DE DRAGENDORFF**

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse 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).

Para el ensayo a la solución acuosa ácida se le añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff, y se observa:

- a) Opalescencia: (+)
- b) Turbidez definida: (++)
- c) Precipitado: (+++)

### **PRUEBA DE MAYER**

Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa:

- a) Opalescencia: (+)
- b) Turbidez definida: (++)
- c) Precipitado coposo: (+++)

Observaciones: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los dos casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

### **PRUEBA DE WAGNER**

Se parte de la solución ácida, añadir 2 ó 3 gotas del reactivo Wagner y se reportan los resultados de igual forma que la reacción anterior.

#### **2.4.2.2.2. Ensayo para identificación de Triterpenos y/o Esteroides**

### **PRUEBA DE LIEBERMANN-BURCHARD**

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

Si la alícuota no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse 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 queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces se puede observar 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 esta 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 triterpenos, las primeras conducen coloración azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variarse por interferencias producidas por carotenos, xantofilas, y esteroides saturados que pueden estar presentes.

#### **2.4.2.2.3. Ensayo para identificación de Quinonas**

##### **PRUEBA DE BORNTRAGER**

Es útil para detectar la presencia de quinonas. Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL 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 (+++).

#### **2.4.2.2.4. Ensayo para identificación de compuestos Lactónicos (Cumarinas)**

##### **PRUEBA DE BALJET**

Reconoce 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 1 mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.

#### **2.4.2.2.5. Ensayo para identificación de Compuestos Grasos**

##### **PRUEBA DE SUDAN III**

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 agua hasta evaporación del solvente.

La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayo respectivamente, indica la presencia de lípidos y/o aceites esenciales.

#### **2.4.2.2.6. Ensayo para identificación de Catequinas**

##### **PRUEBA DE CATEQUINAS**

De la solución alcohólica tomar una gota con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica positiva la prueba.

#### **2.4.2.2.7. Ensayo para la identificación de Resinas**

##### **PRUEBA DE RESINAS**

Adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.

#### **2.4.2.2.8. Ensayo para identificación de Saponinas**

### **PRUEBA DE ESPUMA**

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto de tipo esterooidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces de 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 2 mm de altura y persiste por más de 2 minutos.

#### **2.4.2.2.9. Ensayo para identificación de compuestos Fenólicos y/o Taninos**

### **PRUEBA 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 añade 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 cloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- a) Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- b) Desarrollo de una coloración verde-intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- c) Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalónicos.

#### **2.4.2.2.10. Ensayo para identificación de Aminoácidos**

### **PRUEBA DE NINHIDRINA**

Permite reconocer en un extracto la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2% de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5-10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.

#### **2.4.2.2.11. Ensayo para identificación de Flavonoides**

Evaporar el equivalente a 5 gramos de material en una cápsula y evaporar en baño maría. Se trituro el residuo con 15 mL de éter de petróleo y filtró. Se repitió con volúmenes adicionales hasta que sea incoloro, descartando el extracto. Este remueve materiales grasos solubles tales como: pigmentos, clorofila, resinas, etc., y retienen flavonoides, los cuales en general no son solubles en éter de petróleo. Posteriormente se disolvió el residuo desengrasado en 10mL de etanol y se filtro. Para su ensayo.

#### **PRUEBA DE SHINODA**

A la solución alcohólica añadir 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

#### **PRUEBA DE ANTOCIANIDINAS**

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia  $C_6-C_3-C_6$  del grupo de los flavonoides. Se calienta 2 mL del extracto etanólico por 10 minutos con 1 mL de HCl concentrado. Dejar enfriar y luego adicionar 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Agitar y dejar separar las 2 fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica indica ensayo positivo.

#### **2.4.2.2.12. Ensayo para identificación de Azúcares Reductores**

#### **PRUEBA 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 adiciona 2 mL del 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.

#### **2.4.2.2.13. Ensayo para identificación de Mucílagos**

Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C, si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.

#### **2.4.2.2.14. Ensayo para identificación de principios Amargos y Astringentes**

El ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios bien diferenciados al paladar.

### **2.4.3. CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO**

#### **2.4.3.1. Determinación de los Requisitos Organolépticos**

- **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. De huele y se determina si corresponde con la característica del producto.
- **Determinación del color:** se toma un tubo de ensayo 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.

#### **2.4.3.2. Determinación del pH**

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

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

**FÓRMULA No 5.**

$a[\text{H}^+]$  = 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 realizara la determinación. Posteriormente determínese el valor del pH de la muestra.

#### **2.4.3.3. Determinación de la Densidad Relativa**

Se entiende por densidad 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 secos 2 °C y llénese con la porción de ensayo, manténgalo a la temperatura de 25 °C ( $\pm 1$  °C) durante 15 minutos y ajústese el líquido a nivel empleado, si es preciso, una tira de papel para extraer el exceso secar exteriormente el picnómetro.

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

Expresión del resultado:

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

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

**FÓRMULA No 6.**

Donde:

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

$M_2$  = peso del picnómetro con agua (g)

$M$  = peso del picnómetro vacío (g)

#### 2.4.3.4. 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:

$$n = \text{Sen}_i / \text{Sen}_r$$

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 indica sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.

Expresión de resultados:

Se hace tres lecturas y se calcula el promedio de las mismas. Dos o más lecturas no deben diferir en más de 0,002.

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

$$n_{25} = n_t + 0,00044 (t-25)$$

**FÓRMULA No 7.**

Donde:

$n_{25}$  = índice de refracción a 25 °C.

Ndt = valor leído a 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.

#### **2.4.3.5. 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 lleva a una capsula previamente tarada a 105 °C, se evapora sobre un baño de agua hasta que el residuo este aparentemente seco. Se pasa entonces hacia una estufa y se deja hasta peso constante (aproximadamente 3 horas). Se retira la capsula de la estufa y se coloca, en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente.

Para obtener la más constante entre una pesada y otra se mantendrá un tiempo de secado de 60 minutos.

Expresión de resultados:

La cantidad de sólidos totales, expresados en % R, se calcula por la siguiente fórmula:

$$St = ((Pr - P) / (V)) \times 100$$

#### **FÓRMULA No 8.**

Donde:

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.

#### 2.4.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE FLAVONOIDEOS POR TLC

1. Se pesa 1 gramo de droga en polvo con 10 mL de metanol por 5 minutos en un baño de agua (60 ° C).
2. Tomar 5 mL de la solución metanólica y concentrar hasta casi sequedad.
3. Colocar 1 mL de agua y 10 mL de acetato de etilo, agitar por 10 minutos en embudo de separación.
4. Usar el concentrado para la cromatografía.
5. Se aplica 10 µL del concentrado en una placa cromatográfica de silica gel 60 F<sub>254</sub> con la ayuda de un capilar.
6. Dejar secar después de cada aplicación.
7. Se introduce la placa en la cuba cromatográfica, hasta que el solvente recorra las  $\frac{3}{4}$  partes de la placa.
8. Retirar de la cuba y dejar secar para luego observar en la lámpara UV 365 nm.
9. Revelar la placa y dejar secar; anotar los Rf.

Adsorbentes: Silica gel 60 F<sub>254</sub>.

Sistemas de solventes:

A.- Tolueno: Acetato de etilo: Acido acético; (36:12:5)

Revelador: Sulfato de Cerio.

Calculo:

$$Rf = \frac{\textit{distancia recorrida de la muestra}}{\textit{distancia recorrida del solvente}}$$

#### 2.4.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE TRITERPENOS POR TLC

1. Se pesa 1 gramo de droga en polvo con 10 mL de metanol concentrar por 5 minutos en un baño de agua (60 ° C).
2. Tomar 5 mL de la solución metanólica y concentrar hasta obtener 2 mL.
3. Usar el concentrado para la cromatografía.

4. Se aplica 10  $\mu$ L del concentrado en una placa cromatográfica de sílica 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 solvente recorra las  $\frac{3}{4}$  partes de la placa.
7. Retirar de la cuba y dejar secar para luego observar en la lámpara UV 365 nm.
8. Revelar la placa y dejar secar, calentar en la estufa y anotar los Rf.

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

Sistema de solventes:

Acetato de etilo: Acido acético glacial: Acido fórmico: Agua; (100:11:11:26).

Revelador: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Vainillina.

Calculo:

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

#### 2.4.6. ANÁLISIS 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 Sílica 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 cromatografica. 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: Silica 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:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida de la muestra}}{\text{distancia recorrida del solvente}}$$

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

Para droga seca y producto final:

1. Pesar exactamente 1 gramo de muestra y colocar en un balón redondo de 250 mL.
2. Añadir 20 mL de etanol al 50% V/V y 8 mL de ácido sulfúrico concentrado.
3. Reflujar por dos horas en baño de agua.
4. Dejar enfriar y filtrar a través del filtro Buchner, utilizando papel filtro.
5. Lavar el residuo con 10 mL de etanol al 50% V/V para desecharlo finalmente.
6. Reunir los filtrados, el filtrado se evapora en baño de agua hasta la mitad del volumen inicial.
7. Enfriar sobre un baño de hielo durante 30 minutos.
8. Filtrar, el papel con el residuo se lava con 70 mL de etanol al 96% V/V caliente a 50°C.
9. Se trasvasa a un balón volumétrico de 100mL 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:

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

## 2.5. TRATAMIENTO A BASE DE EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO *Ilex guayusa L*

Se realizó un tratamiento durante 15 días con el extracto hidroalcohólico de *Ilex guayusa L* a tres concentraciones diferentes se evaluó el nivel de estradiol antes y después del tratamiento; así como el peso en (mg) del útero y ovarios al final del tratamiento.

### 2.5.1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

**TABLA No 14. MATERIALES Y REACTIVOS EMPLEADOS PARA COMPROBAR EL EFECTO ESTROGÉNICO (ensayo pre-clínico *in vivo*)**

MATERIALES	REACTIVOS	EQUIPOS
Algodón	Alcohol antiséptico	Analizador de estradiol; Analizadores Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170, COBAS e 610 y COBAS e 602
Mandil, guantes y mascarilla	Agua destilada	Equipo de disección
Jeringas de 1 y 3 mL	Suero fisiológico	Balanza BOECO Germany
Lancetas y Capilares	<i>Rattus norvegicus</i>	
Cánulas orogástricas	MCIAS (FARMA, S.A- Venezuela)	
Vaselina	Extracto hidroalcohólico <i>Ilex guayusa L</i>	
Envases ambar	Gel desinfectante	
Fundas plásticas, tabla para la disección	KIT reactivos para el análisis hormonal	
Toallas de mano	Éter etílico	
Lapiza graso		
Cámara de anestesia		
Pipetas volumétricas de 1 y 3 mL		
Balones aforados de 25 mL		
Vasos de precipitación 50 y 100 mL		

FUENTE: TUQUINGA M, 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:

RG1 “Grupo Control”	X1	Vehículo NaCl 0.9%
RG2 “Grupo Patrón”	X2	CMIAS (3,64mg/Kg)
RG3 “D <sub>1</sub> ”	X3	Dosis baja (9mg/Kg/día ) del extracto de Guayusa
RG4 “D <sub>2</sub> ”	X4	Dosis media(18mg/Kg/día) del extracto de Guayusa
RG5 “D <sub>3</sub> ”	X5	Dosis alta (36mg/Kg/día) del extracto de Guayusa

FUENTE: TUQUINGA M, 2012.

## 2.5.2. VÍAS DE EXTRACCIÓN PARA OBTENER MUESTRAS SANGUÍNEAS

### 2.5.2.1. Obtención de Sangre de la Vena Facial

#### **Materiales**

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

#### **Procedimiento**

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.

### **2.5.2.2. Obtención de Sangre Intracardiaca**

#### **Materiales**

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

#### **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.

### **2.5.3. 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 compite con el derivado añadido del estradiol marcado con el quelato de rutenio [Quelato tris (2-2'-bipiridina) rutenio (II) (Rubpy) $_3^{2+}$ ]; por los sitios de fijación del anticuerpo biotinilado.

- **Principio el test**

Principio de competición con una duración total de 18 minutos.

1ª incubación: Al incubar la muestra (35 $\mu$ L) con un anticuerpo biotinilado específico anti-estradiol se forma un inmunocomplejo cuya cantidad depende de la concentración del analito en la muestra.

2ª incubación: Tras la adición de un derivado de estradiol marcado con quelato de rutenio y de macropartículas recubiertas de estreptavidina, se forma un complejo anticuerpo-apteno que ocupa los puntos de fijación aun libres del anticuerpo biotinilado. El complejo total se fija a la base sólida por la interacción de la biotina y la estreptavidina.

La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las macropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya medición de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.

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.

- **Reactivos-Soluciones de trabajo**

- M** Macropartículas recubiertas de estreptavidina (tapa transparente), 1 frasco, 6,5 mL. Macropartículas recubiertas de estreptavidina: 0,72 mg/mL; conservante.
- R1** Anticuerpo anti-estradiol~biotina (tapa gris), 1 frasco, 8mL: Anticuerpo policlonal biotilado anti-estradiol (conejo) 45 ng/mL; mesterolona 130 ng/mL; tampón MES 50 nmol/L, pH 6,0; conservante.
- R2** Péptido de estradiol-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (tapa negra), 1 frasco, 8 mL: Derivado de estradiol marcado con quelato de rutenio 2,75 ng/mL; tampón MES 50 nmol/L, pH 6,0; conservante.

- **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 azida. 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. (Ver Anexo No 2).

#### 2.5.4. EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS FEMENINO DE LA *Rattus nivergicus*

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.

#### 2.5.5. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

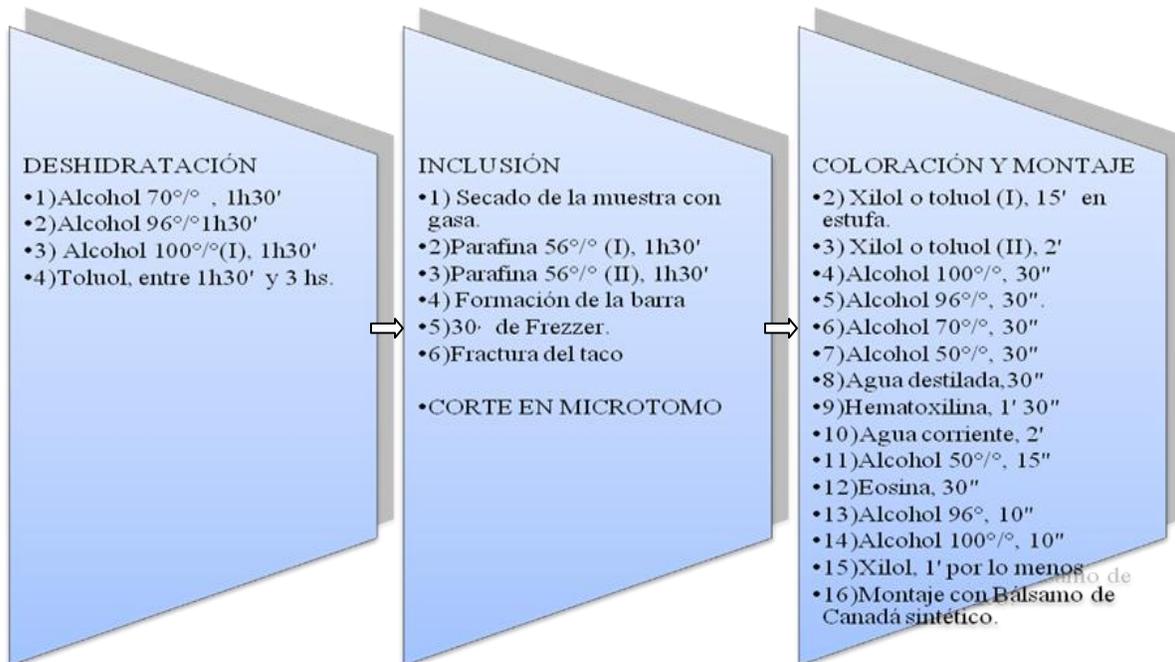
Para verificar los efectos toxicológicos que puede presentar como resultado adverso sobre los órganos farmacocinéticos más importantes; Hígado, Riñón, Estómago; mediante la administración de las dosis estudiadas. Se realizó el análisis histopatológico de los sujetos de cada grupo, cuyo trabajo fue realizado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

#### **Materiales y reactivos**

- Material biológico *Rattus novergicus*.
- Equipo de disección.
- Alcohol antiséptico.
- Formol bufferado al 10%.
- Estufa memmert 32-153L.
- Micrótopo.
- Dispensador de parafina.
- Hematoxilina-eosina.
- Microscopio CLX-300.
- Cámara de anestesia.

## Procesamiento de los tejidos

CUADRO No 1. TÉCNICA HISTOLÓGICA TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA.



FUENTE: TUQUINGA M, 2012.

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo de la investigación se procedió inicialmente al control de calidad de la materia prima vegetal.

#### 3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA PRIMA

Para realizar el control de calidad se utilizó las hojas secas y trituradas de la planta de guayusa (*Ilex guayusa L*) con muestras por triplicado para cada prueba, con lo que se obtuvo los siguientes resultados:

##### 3.1.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

**CUADRO No 2. HUMEDAD DE LA DROGA SECA Y TRITURADA DE GUAYUSA (*Ilex guayusa L*). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

	<b>% HUMEDAD</b>	<b>LIMITE DE HUMEDAD</b>
<b>Planta seca</b>	8,64 ± 0,42	Hasta 14%

Este parámetro de calidad sirve para determinar la proliferación bacteriana y micótica seguido de la hidrólisis de los principios activos. Los resultados obtenidos en el (Cuadro No. 2), indica que el contenido de humedad presente en las hojas de la *Ilex guayusa L* es de 8,64% con una variación estándar de  $\pm 0,42$ ; valor que en comparación con el límite máximo admitido (14%) por la Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos, se encuentra dentro de los valores aceptados, por lo tanto este porcentaje bajo indica que la planta se puede conservar por un tiempo moderado siendo favorable para nuestro estudio.

### 3.1.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Este parámetro de control de calidad da el porcentaje de minerales presentes en las plantas, sirve para establecer el grado de limpieza de materias primas vegetales, las cenizas solubles e insolubles sirven para determinar adulteraciones en los vegetales y las cenizas insolubles en ácido son una medida de la materia arenosa proveniente de la cosecha de las especies vegetales. Cuando hay un alto contenido de cenizas, superior a las especificaciones se sugiere la presencia de un adulterante inorgánico.

**CUADRO No 3. CENIZAS TOTALES DE LA DROGA SECA Y TRITURADA DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

	<b>%CENIZAS TOTALES</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>
<b>Planta seca</b>	5,84 ± 0,19	Hasta 12 %

El (Cuadro No. 3), indica que el porcentaje del contenido de cenizas totales fue de 5,84 ± 0,19 que corresponde al contenido de minerales presentes en la muestra, lo que se encuentra dentro de los límites aceptados para drogas vegetales por la USP (33).

**CUADRO No 4. CENIZAS SOLUBLES EN AGUA DE LA DROGA SECA Y TRITURADA DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

	<b>%CENIZAS SOLUBLES EN AGUA</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>
<b>Planta seca</b>	2,61 ± 0,03	7 %

En el (Cuadro No. 4), indica que el porcentaje de cenizas insolubles en agua fue de 2,61 ± 0,03 que corresponde al material de tipo orgánico presente en la muestra, lo que se encuentra dentro de los límites establecidos (7%) dada por la Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos.

**CUADRO No 5. CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO DE LA DROGA SECA Y TRITURADA DE GUAYUSA (*Ilex guayusa L.*). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

	<b>%CENIZAS INSOLUBLES EN HCl</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>
<b>Planta seca</b>	1,1 ± 0,10	5 %

El porcentaje de cenizas in solubles en HCl indicado en el (Cuadro No. 5), demuestra que el valor encontrado  $1,1 \pm 0,10$  se encuentra dentro de límites aceptados (5%) en la Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos, lo que indica que la droga seca no tiene una presencia considerable de materia arenosa.

### **3.2. CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE GUAYUSA *Ilex guayusa L.***

El análisis de control de calidad se realizó a partir del extracto obtenido por percolación con alcohol al 70% de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa L.*).

#### **3.2.1. PARÁMETROS ORGANOLÉPTICOS**

**CUADRO No 6. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE GUAYUSA *Ilex guayusa L.* LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

<b>Parámetros</b>	<b>Resultado</b>
Olor	Característico, agradable
Color	Café-rojizo oscuro
Sabor	Dulce
Aspecto	Líquido, sin precipitaciones

Las características organolépticas indicada en el (Cuadro No. 6), se muestran todos los parámetros propios de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa L.*), es así que el extracto hidroalcohólico de guayusa es de un color café rojizo debido a la presencia de polifenoles y

a sus pigmentos. Tiene un olor característico agradable debido a los componentes que poseen los mismos. Además posee un sabor dulce por la presencia de azúcares reductores. Comparación que se lo hace con la investigación desarrollada por HIDALGO J, (2010).

### 3.2.2. PARÁMETROS FÍSICOS

**CUADRO No 7. PARÁMETROS FÍSICOS DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

Parámetro	Resultado
pH	5,15
Índice de refracción	1,389
Densidad relativa	0,964
Sólidos totales	8,94%

De acuerdo con los resultados indicados en el (Cuadro No. 7), se observa que el pH del extracto fue de 5,15 lo que representa un pH ácido debido a la presencia de cafeína por la conversión de la misma en sus respectivas sales ocasionando un intercambio iónico para que su pH sea moderadamente baja; además de ello también se debe a la presencia de fenoles que pueden dar ácidos orgánicos.

En índice de refracción fue de 1,389 lo que demuestra la presencia de componentes extraídos por el solvente al ser comparado con el índice de refracción del agua 1,333; la densidad del extracto es menos denso que el agua ya que el resultado fue de 0,964; el porcentaje de sólidos totales que abarca sales, metabolitos y residuos orgánicos fue de 8,94% obtenido por la pérdida o eliminación de sustancias volátiles por acción del calor. Comparación que se lo hace con la investigación desarrollada por HIDALGO J, (2010) e PACHA A, (2012).

### 3.3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico nos permite conocer cualitativamente a los metabolitos secundarios con potencial farmacológico, se utilizaron pruebas de identificación mediante cambios en la muestra de ensayo, formación de precipitados o cambios de coloración.

**CUADRO No 8. IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LAS HOJAS SECAS Y TRITURADAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L), LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

ENSAYO	METABOLITO	EXTRACTO		
		ETÉREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
SUDÁN	ACEITES Y GRASAS	+	-	-
BALJET	LACTONAS Y CUMARINAS	-	-	-
DRAGENDORFF	ALCALOIDES	-	+++	+++
MAYER	ALCALOIDES	-	+++	+++
WAGNER	ALCALOIDES	-	+++	+++
LIEBERMANN- BUCHARD	TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES	+	++	-
CATEQUINAS	CATEQUINAS	-	+	-
RESINAS	RESINAS	-	-	-
FEHLING	AZUCARES REDUCTORES	-	+	++
ESPUMA	SAPONINAS	-	-	+
FeCl <sub>3</sub>	TANINOS	-	+	+
BORNTRAGER	ANTRAQUINONAS	-	+	-
SHINODA	FLAVONOIDES	-	+++	++
ANTOCIANIDINAS	FLAVONOIDES	-	++	-
MUCILAGOS	MUCILAGOS	-	-	-
PRINCIPIOS AMARGOS	PRINCIPIOS AMARGOS	-	-	-

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

Teniendo en cuenta los objetivos fijados para la realización del presente trabajo de investigación 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).

En el (Cuadro No. 8), se encontró la presencia de alcaloides, triterpenos y/o esteroides y flavonoides, la presencia de estos metabolitos muestran una alta evidencia en los solventes etanólico y acuoso, los que concuerdan con los metabolitos mencionados en Rosero A, (2007) e Hidalgo J, (2010). Esta variación de metabolitos, se puede dar debido a la influencia de varios factores climáticos de almacenamiento o propios de la planta ya que en el momento de la recolección ciertos metabolitos se encuentran en baja concentración y no sobrepasan los límites de detección de los métodos y reactivos empleados.

Al realizar la identificación preliminar es muy interesante destacar que los metabolitos secundarios representativos con potencial farmacológico son, los esteroide y los compuestos fenólicos entre ellos los flavonoides, encontrándose dentro de este grupo los glicósidos (nucleo flavonoide básico + una o varias unidades de carbohidratos) y las agliconas flavonoide (que no están ligadas a la moléculas de carbohidratos). (1). Cuya actividad fitoestrogénica los hacen idóneos 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 atribuyo la actividad estrogénica a este grupo complejo de flavonoides y esteroides. (9) (21)

### **3.4. ESTUDIO CROMATOGRÁFICO DE FLAVONOIDES POR TLC**

El análisis cromatográfico permite separar e identificar compuestos contenidos en una mezcla mediante el cálculo de los Rf de cada una de las manchas. Se utilizó placas de sílica

gel 60 F<sub>254</sub> y un sistema de solventes: Tolueno, Acetato de etilo, Acido acético; (36:12:5) y como revelador Sulfato de cerio.

**CUADRO No 9. Rf PARA METABOLITOS FLAVONOIDES DE LA MUESTRA DE HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L) EN CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

PLACA	COLOR	Rf	COMPUESTOS IDENTIFICADOS
Rf9	Amarillo	0,27	Quercetina
Rf8	verdoso		
Rf7	Café	0,33	Ácido cafeico
Rf6			
Rf5	Amarillo	0,57	Naringenina
Rf4	Amarillo	0,62	Flavonona
Rf3	Amarillo	0,67	Galangina
Rf2		0,71	
Rf1		0,75	
	Amarillo	0,82	3-Hidroxiflavona
	oscuro		
	Amarillo	0,91	Flavona

FUENTE: TUQUINGA M, 2012.

Gracias a la cromatografía en capa fina para flavonoides nos permitió evidenciar la presencia de nueve metabolitos y para realizar su identificación se comparó los Rf encontrados con los citados en Croat C. (2004), es así que los flavonoides presentes en las hojas podrían ser:

Rf<sub>1</sub> = 0.27 Quercetina, es un (flavonol)

Rf<sub>2</sub> = 0.33 Ácido cafeico

Rf<sub>3</sub> = 0.57 Naringenina, es una (flavonona)

Rf<sub>4</sub> = 0.62 Flavonona

Rf<sub>5</sub> = 0.67 Galangina, es un (flavonol)

Rf<sub>8</sub> = 0.82 3-Hidroxiflavona, es una (flavona)

Rf<sub>9</sub> = 0.91 Flavona

Estos compuestos identificados son Agliconas Flavonoides ya que no están ligadas a moléculas de carbohidratos por lo tanto estas agliconas tienen la propiedad de ser solubles en solventes de baja polaridad; por esta razón el solvente de corrido que se utilizó fue el más apropiado para separar este tipo de compuestos. (32)

### 3.5. ESTUDIO CROMATOGRÁFICO DE TRITERPENOS POR TLC

Se utilizó placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> y un sistema de solventes: Acetato de etilo, Acido acético glacial, Ácido fórmico, Agua; (100:11:11:26) y como revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Vainillina.

**CUADRO No 10. Rf PARA TRITERPENOS DE LA MUESTRA DE HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L) EN CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

PLACA	COLOR	Rf	COMPUESTOS IDENTIFICADOS
	Violeta	0,075	1. Onocerin (18)
	Amarillo	0,57	2. Ácido clorogénico (18)
	Amarillo verdoso	0,63	3. Hiperósido (18)
	Café verdoso	0,73	4. Ononin (7-O-glucosido de formononetina) (18)

FUENTE: TUQUINGA M, 2012.

Mediante el desarrollo de la cromatografía en capa fina para triterpenos, se encontró la presencia de cuatro metabolitos y para realizar su identificación se comparó los Rf encontrados con los citados en Wagner H, (1996) e Croat C, (2004), es así que los compuestos presentes en las hojas podrían ser:

Rf<sub>1</sub> = 0,075 Onocerin (Triterpeno)

Rf<sub>6</sub> = 0,57 Ácido clorogénico

Rf<sub>7</sub> = 0,63 Hiperósido

Rf<sub>9</sub> = 0,72 Ononin (7-O-glucosido de formononetina)

Los compuestos identificados contienen en su estructura un gran número de grupos hidroxilos, por esta razón, la silicagel actúa reteniendo los componentes más polares del extracto y los menos polares son eluidos con facilidad al emplear la fase móvil, Acetato de etilo: Acido acético glacial: Ácido fórmico: Agua: (100:11:11:26). (32)

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

Se utilizó placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> y dos sistema de solventes: el primer sistema de solventes consta de Cloroformo: Metanol: Agua: (10:1:0.05) y el segundo sistema conformado por 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.

**CUADRO No 11. Rf PARA EL ( $\beta$ -SITOSTEROL) DE LA MUESTRA DE HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L) EN COMPARACIÓN CON EL ESTANDAR DE ( $\beta$ -SITOSTEROL). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

PLACA	COLOR	Rf	COMPUESTO
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Morado-violáceo</li> <li>▪ Morado-violáceo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 0,76</li> <li>▪ 0,76</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\beta</math>-sitosterol (Estándar)</li> <li>▪ <math>\beta</math>-sitosterol (Guayusa)</li> </ul>

FUENTE: TUQUINGA M, 2012.

Se realizó la cromatografía en capa fina, la muestra se corrió paralelamente con un estándar de  $\beta$ - sitosterol evidenciando la mancha de color morado-violáceo con un Rf = 0.76 similar al del  $\beta$ -sitosterol estándar.

La silicagel actúa reteniendo los componentes más polares y al aplicar la primera fase móvil, ayuda a que eluya todos los componentes polares al hacer correr un 40% de la placa y los menos polares como el  $\beta$ -sitosterol son débilmente retenidos, por tal razón son separados en el restante de la placa con facilidad al emplear la segunda fase móvil de cloroformo. Ya que el cloroformo arrastra la fracción lipídica permitiendo una buena separación del  $\beta$ -sitosterol.

(17)

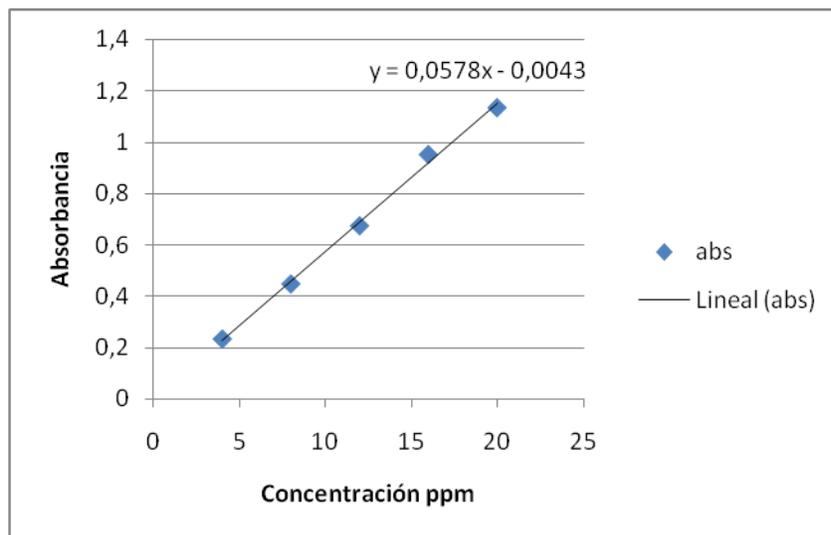
### 3.7. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV

Para realizar la cuantificación de flavonoides en droga cruda y seca, se utilizó la curva de calibración con el estándar de quercetina, tomando diferentes alícuotas se obtuvo la siguiente ecuación.

CUADRO No 12. ABSORBANCIAS DE QUERCETINA A DISTINTAS CONCENTRACIONES

CURVA DE CALIBRACIÓN (QUERCETINA)		MUESTRA <i>Ilex guayusa L</i>
Concentración,(ppm)	Absorbancia	Absorbancia
4	0,233	0,587
8	0,448	
12	0,675	
16	0,953	
20	1,136	

FUENTE: TUQUINGA M, 2012.



FUENTE: TUQUINGA M, 2012.

GRAFICO No 1. CURVA DE ABSORBANCIA Vs CONCENTRACIÓN DE QUERCETINA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.

**Cálculos:**

$$Y = a + b \times$$

$$A = a + bC$$

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

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

$$C = \frac{0,587 + 4,30 \times 10^{-3}}{0,057775} = \frac{10 \mu g}{mL}$$

$$\%Concentración = \frac{10 \mu g Querc}{1 mL} \times \frac{25 mL}{3,5 mL} \times \frac{100 mL}{1 g Muestra} \times \frac{1 mg}{1000 \mu g} \times \frac{1 g}{1000 mg} \times 100$$

$$\%Concentración = 0,71\%$$

**CUADRO No 13. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN LAS HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L) A UNA LONGITUD DE ONDA DE 258 nm. LABORATÓRIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

Muestra	Absorbancia	Concentración	%
Droga seca	0,587	10 ppm	0,71

En el (Cuadro No. 13), se indica que la absorbancia de la muestra a 258 nm fue de 0,587 y reemplazando este valor en la ecuación de la curva de calibración de la quercetina (Gráfico No 1), se obtuvo una concentración de 10 ppm dando como resultado un porcentaje de flavonoides totales del 0,71% o 7,142 mg/ g de planta. La *Ilex paraguariensis* señala la presencia de flavonoides en un porcentaje no superior al 2.6% citada en Bruneton J (2001).

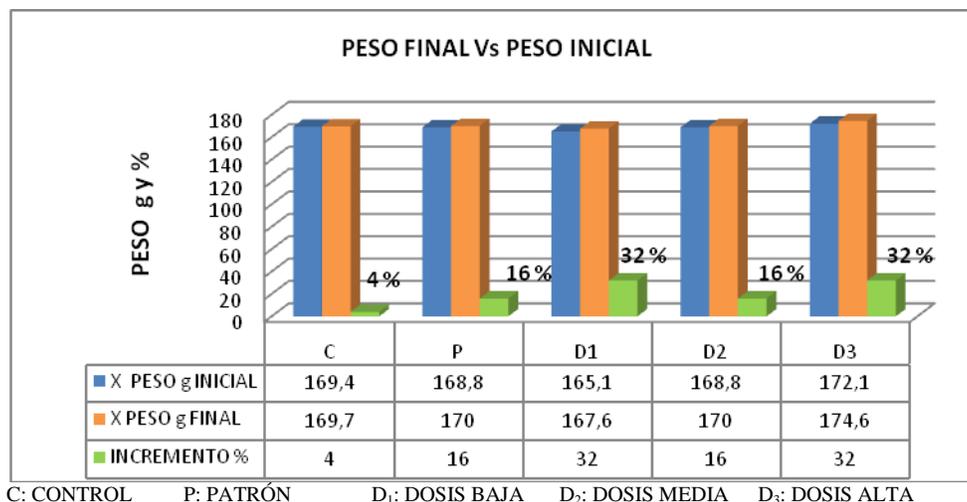
### 3.8. ACTIVIDAD ESTROGÉNICA DEL EXTRACTO *Ilex guayusa* L

#### 3.8.1. EVALUACIÓN DEL PESO EN GRAMOS DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO.

**CUADRO No 14. PESO PROMEDIO DE LAS RATAS DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

GRUPOS EXPERIMENTALES	X PESO g ANTES	X PESO g DESPUES	INCREMENTO g	INCREMENTO %
CONTROL	169,4 ± 4,13	169,7 ± 4,28	0,3	4
PATRÓN	168,8 ± 3,47	170,0 ± 3,10	1,2	16
DOSIS BAJA	165,1 ± 1,01	167,6 ± 0,84	2,5	32
DOSIS MEDIA	168,8 ± 0,26	170,0 ± 0,10	1,2	16
DOSIS ALTA	172,1 ± 0,81	174,6 ± 0,99	2,5	32
PROMEDIO	168,8		1,5	

FUENTE: TUQUINGA M, 2012.



**GRAFICO No 2. COMPARACIÓN ENTRE EL PESO INICIAL Y PESO FINAL DURANTE LA INVESTIGACIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES. BIOTERIO DE LA FACULTAD CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012.**

El (Cuadro No. 14) y en la (Gráfica No. 2), indica el promedio de los pesos iniciales de los animales de experimentación en un rango de  $170 \pm 5$  g que en comparación con los pesos finales muestran un incremento de 1.5g al final del experimento. Valor que no se considera

muy significativo con respecto al tratamiento recibido cada grupo: P (MCIAS), D<sub>1</sub> (9mg/Kg), D<sub>2</sub> (18mg/Kg) y D<sub>3</sub> (36mg/Kg) durante quince días.

### 3.8.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO – ANOVA DEL ESTRADIOL INICIAL pg/mL EN RATAS, PREVIO AL TRATAMIENTO QUE RECIBIRÁ CADA GRUPO EXPERIMENTAL.

**CUADRO No 15. CUANTIFICACIÓN DE ESTRADIOL INICIAL ANTES DEL TRATAMIENTO. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012.**

<b>GRUPOS EXPERIMENTALES</b>	<b>ESTRADIOL INICIAL pg/mL</b>	<b>X Estradiol inicial pg/mL</b>
<b>CONTROL</b>	12,70	12,72 ± 0,017
	12,73	
	12,73	
<b>PATRÓN</b>	12,71	12,70 ± 0,01
	12,69	
	12,70	
<b>DOSIS BAJA</b>	12,72	12,71 ± 0,01
	12,70	
	12,70	
<b>DOSIS MEDIA</b>	12,71	12,69 ± 0,03
	12,65	
	12,70	
<b>DOSIS ALTA</b>	12,73	12,71 ± 0,02
	12,69	
	12,70	

FUENTE: TUQUINGA M.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como lo indica en el (Cuadro No. 15), los niveles de estradiol obtenidos en los grupos experimentales previo al tratamiento se mantienen en un rango promedio de 12,69 a 12,72 pg/mL, con una mínima dispersión de datos que va de 0,01 a 0,03; es decir que los niveles de estradiol para los cinco grupos experimentales son casi iguales, debido a los estrógenos endógenos presentes en el organismo del animal.

3.8.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO – ANOVA DEL ESTRADIOL FINAL pg/mL EN RATAS, DESPUES DE HABER RECIBIDO LOS TRATAMIENTOS RESPECTIVOS CADA GRUPO EXPERIMENTAL.

**CUADRO No 16. CUANTIFICACIÓN DE ESTRADIOL FINAL, DE LOS GRUPOS BAJO TRATAMIENTO. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012.**

<b>GRUPOS EXPERIMENTALES</b>	<b>TRATAMIENTO RECIBIDO</b>	<b>ESTRADIOL FINAL pg/mL</b>	<b>X Estradiol final pg/mL</b>
<b>CONTROL</b>	Vehículo NaCl 0,9%	12,71	12,72 ± 0,02
		12,73	
		12,74	
<b>PATRÓN</b>	MCIAS 3,64 mg/Kg/día	14,44	14,50 ± 0,13
		14,65	
		14,42	
<b>DOSIS BAJA</b>	9mg/Kg/día del extracto <i>Ilex guayusa L</i>	23,66	23,70 ± 0,06
		23,67	
		23,77	
<b>DOSIS MEDIA</b>	18mg/Kg/día del extracto <i>Ilex guayusa L</i>	41,79	41,70 ± 0,08
		41,70	
		41,63	
<b>DOSIS ALTA</b>	36mg/Kg/día del extracto <i>Ilex guayusa L</i>	53,46	53,48 ± 0,03
		53,51	
		53,47	

Fuente: TUQUINGA M, 2012.

Como lo indica en el (Cuadro No.16), los niveles de estradiol obtenidos en los grupos experimentales al final tratamiento muestran los siguientes resultados:

En el grupo control los niveles de estradiol, no cambian se mantiene en un mismo nivel que es de 12,72 ± 0,02 pg/mL debido a que solo se administró suero fisiológico.

En el grupo patrón (administrado el MCIAS) los resultados expuestos en el (Cuadro No.16), señala que estos valores se incrementan en un 14,50 ± 0,13 pg/mL en comparación con el grupo control que fue de 12,72 ± 0,02pg/mL.

Con respecto a los diferentes tratamientos del extracto de guayusa se indica que tanto la dosis baja, como la dosis media y la dosis alta muestran un incremento en un rango de  $23,70 \pm 0,06$  pg/mL a  $53,48 \pm 0,03$  pg/mL sobre los niveles de estradiol del grupo patrón y el grupo control.

**CUADRO No 17. ANOVA DE UN FACTOR DEL ESTRADIOL FINAL pg/mL**

Variable Respuesta: **ESTRADIOL FINAL mg**  
 Variable Explicativa: **GRUPOS**

Número de Casos: **15**

	Suma de Cuadrado	G.L.	Cuadrados Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	3790.6353	4	947.6588	173563.8889	0.0004E-20
Dentro Grupos	0.0546	10	0.0055		
Total (corr.)	3790.6899	14			

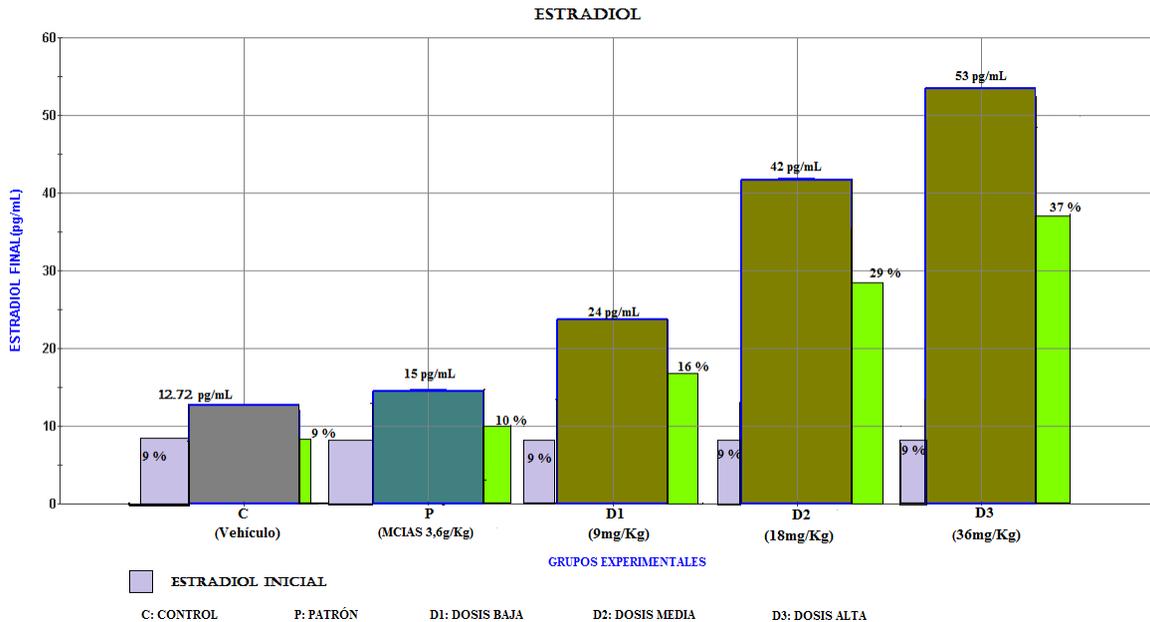
El p-valor es igual a 0.0004E-20, fue obtenido al comparar las varianzas del estradiol final entre los diferentes grupos.

**CUADRO No 18. COMPARACIONES MULTIPLES TUKEY HSD AL 99.00% DE CONFIANZA DEL ESTRADIOL FINAL pg/mL ENTRE LOS GRUPOS BAJO TRATAMIENTO**

Variable Respuesta: **ESTRADIOL FINAL pg/mL**  
 Variable Explicativa: **GRUPOS**  
 Número de Casos: **15**

Método: Tukey HSD al 99.00%

GRUPOS	N	Media	Grupos Homogéneos
C (Vehículo)	3	12.7267	X
P (3.6mg/Kg)	3	14.5033	X
D <sub>1</sub> (9mg/Kg)	3	23.7000	X
D <sub>2</sub> (18mg/Kg)	3	41.7067	X
D <sub>3</sub> (36mg/Kg)	3	53.4800	X



**GRAFICO No 3. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL SÉRICO INICIAL Y FINAL ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES, TRATADOS CON MEDICAMENTO (MCIAS) Y EXTRACTO DE *Ilex guayusa* L. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se ha encontrado en la *guayusa* metabolitos secundarios como los fitoestrogenos (ononin, quercetina,  $\beta$ -sitosterol) que podrían ser responsables del efecto estrogénico.

Los fitoestrógenos al ser ingeridos son hidrolizados por glucosidasas, una dieta alta de carbohidratos aumenta la fermentación intestinal, permitiendo una extensa biotransformación de fitoestrógenos a sus metabolitos específicos. Los fitoestrógenos son absorbidos a lo largo de todo el intestino delgado por medio de una difusión pasiva no-ionica. Al igual que los estrógenos endógenos, los fitoestrogenos al ser absorbidas entran a la circulación entero hepática. El primer paso es la conjugación de los fitoestrógenos al ácido glucorónico, reacción catalizada por la isoenzima glucoroniltransferasas. Es así que los fitoestrógenos se encuentran unidos mayormente en el plasma en la forma de conjugados glucorónicos. (9) (20)

La mayoría de los estrógenos están unidos a proteínas séricas como albúmina y globulina de unión de hormonas sexuales, un cierto porcentaje está circulando libre. Se ha observado en algunos estudios que el fitoestrógeno tiene menor afinidad con las proteínas séricas de unión a comparación con el estradiol, lo cual hace que una mayor porción esté disponible a ocupar el receptor estrogénico. (20)

Como lo indica el (Cuadro No. 17), el p-valor obtenido al comparar las varianzas del estradiol final entre los diferentes grupos es menor al nivel de significancia del 1% (0.01), rechazando con ello la hipótesis nula y se aceptando la hipótesis alternativa. Así como lo indica esquemáticamente el (Cuadro No. 18), los cinco grupos (**C**, **P**, **D<sub>1</sub>**, **D<sub>2</sub>** y **D<sub>3</sub>**) difieren estadísticamente en los valores del estradiol en función del tratamiento recibido, es decir que el nivel de estradiol va incrementándose.

Y como se observa en la (Gráfica No. 3), se ejecutó una comparación entre el estradiol inicial y el final. Donde que los niveles séricos de estradiol inicial se encuentra en un rango de 12,72 pg/mL lo que corresponde al 9 % lo que no experimenta cambio alguno en el valor del estradiol al ser tratado con suero fisiológico. Por otro lado se observa un aumento del 10% del grupo **P** tratado con MCIAS (3,6mg/Kg/día), sobre el 9% de estradiol del grupo **C**.

Los tres grupos tratados con extracto de guayusa a **D<sub>1</sub>** (9mg/Kg/día), **D<sub>2</sub>** (18mg/Kg/día) y **D<sub>3</sub>** (36mg/Kg/día) muestran una mayor afinidad de sus metabolitos estrogénicos hacia las proteínas séricas albumina y globulina, ocasionando un aumento del 16, 29 y 37% de los niveles séricos de estradiol sobre el 9% de estradiol perteneciente al grupo **C**. Por lo tanto la guayusa contribuye a mantener el equilibrio hormonal.

El nivel de estradiol sérico de ratas inmaduras tratadas durante 15 días con diferentes dosis de extracto hidroalcohólico de guayusa se muestra en el (Gráfico No. 3). Se presenció un aumento significativo del 24 pg/mL, 42 pg/mL y 53 pg/mL en los niveles séricos de estradiol después del tratamiento con **D<sub>1</sub>**, **D<sub>2</sub>** y **D<sub>3</sub>** por día.

3.8.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO – ANOVA DEL PESO DE LOS OVARIOS (mg) AL FINAL DEL PERIODO EXPERIMENTAL.

**CUADRO No 19. PESO DE LOS OVARIOS BAJO TRATAMIENTO. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012.**

GRUPOS EXPERIMENTALES	TRATAMIENTO RECIBIDO	PESO DE OVARIOS mg	X Peso ovarios mg
CONTROL	Solución salina NaCl 0,9%	132	132,33 ± 0,57
		133	
		132	
PATRÓN	MCIAS 3,64 mg/Kg/día	200	201,33 ± 2,30
		200	
		204	
DOSIS BAJA	9mg/Kg/día del extracto <i>Ilex guayusa L</i>	201	198,66 ± 2,51
		199	
		196	
DOSIS MEDIA	18mg/Kg/día del extracto <i>Ilex guayusa L</i>	221	221, 33 ± 0,57
		222	
		221	
DOSIS MEDIA	36mg/Kg/día del extracto <i>Ilex guayusa L</i>	255	253,66 ± 1,15
		253	
		253	

FUENTE: TUQUINGA M, 2012.

**CUADRO No 20. ANOVA DE UN FACTOR DEL PESO DE LOS OVARIOS EN mg**

Variable Respuesta: PESO DEL OVÁRIO mg

Variable Explicativa: GRUPOS

Número de Casos: 15

	Suma de Cuadrado	G.L.	Cuadrados Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	23720.4000	4	5930.1000	2169.5488	0.0001E-10
Dentro Grupos	27.3333	10	2.7333		
Total (corr.)	23747.7333	14			

El p-valor es igual a 0.0001E-10, fue obtenido al comparar las varianzas del peso de los ovarios entre los diferentes grupos.

**CUADRO No 21. COMPARACIONES MULTIPLES TUKEY HSD AL 99.00% DE CONFIANZA DEL PESO DEL OVARIO mg ENTRE LOS GRUPOS BAJO TRATAMIENTO. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO DEL 2012.**

Variable Respuesta: PESO DEL OVARIO mg  
 Variable Explicativa: GRUPOS  
 Número de Casos: 15

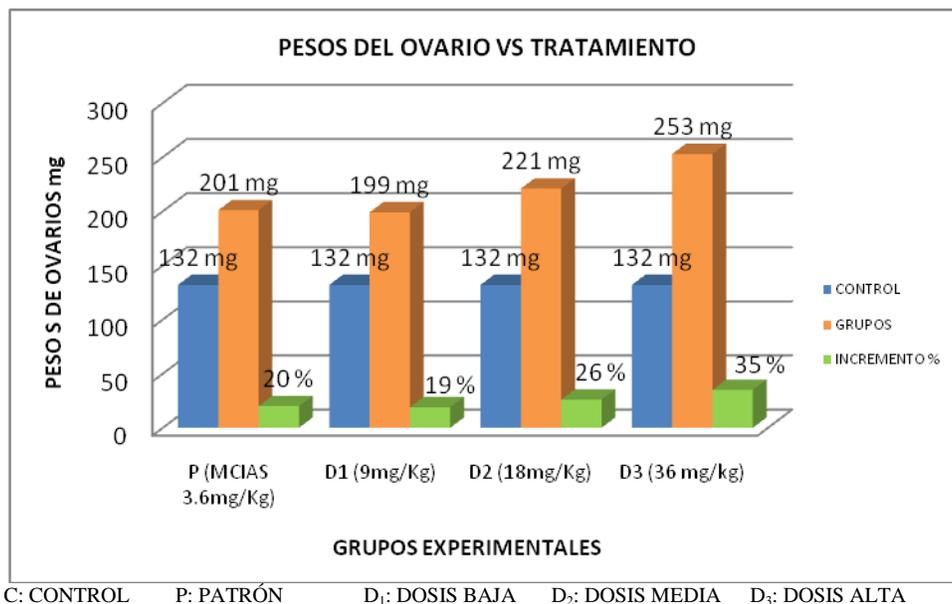
Método: Tukey HSD al 99.00%

GRUPOS	N	Media	Grupos Homogéneos
C(Vehículo)	3	132.3333	X
D <sub>1</sub> (9mg/Kg)	3	198.6667	X
P (3.6mg/Kg)	3	201.3333	X
D <sub>2</sub> (18mg/Kg)	3	221.3333	X
D <sub>3</sub> (36mg/Kg)	3	253.6667	X

**CUADRO N°22. COMPARACIÓN ENTRE LOS PESOS DEL OVARIO DEL GRUPO CONTROL FRENTE AL GRUPO PATRÓN Y GRUPOS EXPERIMENTALES QUE RECIBIERON EL TRATAMIENTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L). FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012.**

**PESOS DE LOS OVARIOS mg**

Muestras	Patrón (MCIAS 3,64mg/Kg)	Dosis baja (9mg/Kg)	Dosis media (18mg/Kg)	Dosis alta (36mg/Kg)
Control	132mg	132mg	132mg	132mg
Grupos	201mg	199mg	221mg	253mg
Incremento %	20	19	26	35



**GRAFICO No 4. GRÁFICA DEL PESO DE LOS OVARIOS DE LAS RATAS TRATADAS CON DIFERENTES DOSIS DE EXTRACTO DE *Ilex guayusa* L. FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012.**

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los fitoestrógenos de la guayusa son compuestos que estructuralmente y funcionalmente son similares al 17-  $\beta$  estradiol y se unen a los receptores de este.

La principal función de los estrógenos es causar la proliferación celular y el crecimiento de los tejidos de los órganos sexuales y de otros tejidos relacionados con la producción.

Una vez ingerido los fitoestrógenos son metabolizados en el organismo, una parte de ellos se une a las proteínas séricas y otra porción está disponible a ocupar el receptor estrogénico (ER). Esta porción libre ejerce su efecto a través de dos tipos de receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  que tienen diferente distribución en los tejidos, de manera que el  $\beta$  es más ubicuo que el  $\alpha$  el primero se expresa en tejidos no reproductivos como hueso, cerebro, hipófisis tracto urinario, aparato vascular y próstata; y tejido reproductivos como ovario y útero. (9)

El receptor de estrógeno (RE) es una proteína perteneciente a la “súper familia de receptores nucleares”, y actúa como un factor transcripcional al unirse al ADN estimulando la

transcripción de ciertos genes, de ahí el nombre de receptores nucleares, ya que ejercen su acción a nivel del núcleo. (30)

Como lo indica el (Cuadro No. 20), el p-valor obtenido al comparar las varianzas del peso de los ovarios entre los diferentes grupos es menor al nivel de significancia del 1% (0.01), rechazando con ello la hipótesis nula y se aceptando la hipótesis alternativa. Así como lo indica esquemáticamente el (Cuadro No. 21), los cinco grupos (**C**, **P**, **D<sub>1</sub>**, **D<sub>2</sub>** y **D<sub>3</sub>**) difieren estadísticamente en los pesos del ovario en función del tratamiento recibido, es decir que el peso de los ovarios va incrementándose. Además se observa que el grupo **P** y el grupo **D<sub>1</sub>** muestran sus pesos casi homogéneos.

Y como se observa en (Cuadro No. 22) y el (Gráfico No. 4), los grupos tratados con MCIAS 3,64 mg/Kg/día y extracto de guayusa a dosis **D<sub>1</sub>** 9mg/Kg/día, dosis **D<sub>2</sub>** 18mg/Kg/día y dosis **D<sub>3</sub>** 36mg/Kg/día, los cuatro grupos muestran un incremento significativo en sus pesos que expresados en porcentaje fue del 20% grupo **P**, 19% dosis **D<sub>1</sub>**, 26% dosis **D<sub>2</sub>** y 35% dosis **D<sub>3</sub>** con respecto al grupo **C**.

Estos resultados obtenidos en la investigación se deben a que la guayusa contiene en su composición metabolitos fitoestrogénicos que al ser administrado por vía oral estos ejercen su efecto a través de los (RE $\alpha$  Y RE $\beta$ ) ubicados en el tejido cortical y el medular del ovario provocando la proliferación celular y el crecimiento del tejido. (21)

Este efecto estrogénico ejercido por la guayusa corrobora a la unión entre el óvulo y el espermatozoide. Ya que un medio ambiente del moco cervical es esencial para la fertilidad. El metabolismo de los carbohidratos del cérvix, bajo la influencia de los estrógenos, suministra energía al espermatozoide durante su migración hasta llegar a unirse con el óvulo (fecundación) que tiene lugar en el tercio externo de la trompa a donde llegan los espermatozoides depositados en el canal femenino durante la relación sexual. Los estrógenos estimulan la secreción de glucógeno en el moco cervical y la actividad de la fosfatasa alcalina mejora la utilización del glucógeno por el espermatozoide en el moco cervical. (10)

3.8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO – ANOVA DEL PESO DEL ÚTERO mg AL FINAL DEL PERIODO EXPERIMENTAL.

**CUADRO No 23. PESO DEL ÚTERO BAJO TRATAMIENTO. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH.RIOBAMBA AGOSTO 2012.**

GRUPOS EXPERIMENTALES	TRATAMIENTO RECIBIDO	PESOS DEL ÚTERO mg	X Peso del útero mg
CONTROL	Solución salina NaCl 0,9%	353	356 ± 3,60
		355	
		360	
PATRÓN	MCIAS 3,64 mg/Kg	509	510,66 ± 3,78
		515	
		508	
A	9mg/Kg/día del extracto <i>Ilex guayusa L</i>	489	489,33 ± 0,57
		489	
		490	
B	18mg/Kg/día del extracto <i>Ilex guayusa L</i>	521	521,66 ± 1,15
		521	
		523	
C	36mg/Kg/día del extracto <i>Ilex guayusa L</i>	633	630,33 ± 2,30
		629	
		629	

FUENTE: TUQUINGA M,2012.

**CUADRO No 24. ANOVA DE UN FACTOR DEL PESO DEL ÚTERO EN mg**

Variable Respuesta: PESO DEL ÚTERO mg

Variable Explicativa: GRUPOS

Número de Casos: 15

	Suma de Cuadrado	G.L.	Cuadrados Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	115220.9333	4	28805.2333	4194.9369	0.0004E-12
Dentro Grupos	68.6667	10	6.8667		
Total (corr.)	115289.6000	14			

El p-valor es igual a 0.0004E-12, fue obtenido al comparar las varianzas del peso del útero entre los diferentes grupos.

**CUADRO No 25. COMPARACIONES MULTIPLES TUKEY HSD AL 99.00% DE CONFIANZA DEL PESO DEL ÚTERO EN mg ENTRE LOS GRUPOS BAJO TRATAMIENTO**

Variable Respuesta: PESO DEL ÚTERO (mg)  
 Variable Explicativa: GRUPOS  
 Número de Casos: 15

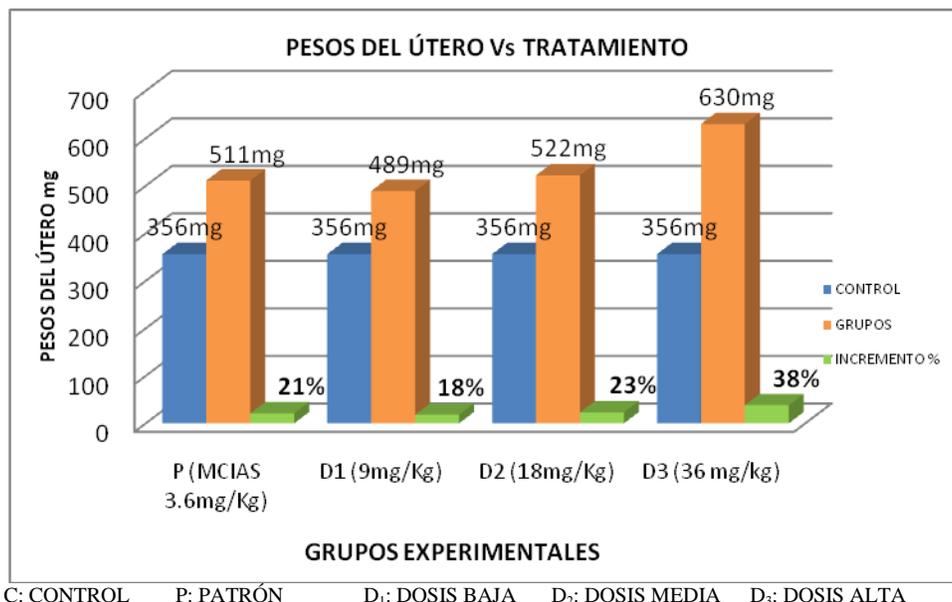
Método: Tukey HSD al 99.00%

GRUPOS	N	Media	Grupos Homogéneos
C (Vehículo)	3	356.0000	X
D <sub>1</sub> (9mg/Kg)	3	489.3333	X
P (3.6mg/Kg)	3	510.6667	X
D <sub>2</sub> (18mg/Kg)	3	521.6667	X
D <sub>3</sub> (36mg/Kg)	3	630.3333	X

**CUADRO No 26. COMPARACIÓN ENTRE LOS PESOS DEL ÚTERO DEL GRUPO CONTROL FRENTE AL GRUPO PATRÓN Y GRUPOS EXPERIMENTALES QUE RECIBIERON EL TRATAMIENTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L). FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012.**

**PESOS DE LOS ÚTEROS mg**

Muestras	Patrón (MCIAS 3,64mg/Kg)	Dosis baja (9mg/Kg)	Dosis media (18mg/Kg)	Dosis alta (36mg/Kg)
Control	356mg	356mg	356mg	356mg
Grupos	511mg	489mg	522mg	630mg
Incremento %	21	18	23	38



**GRAFICO No 5. GRÁFICA DEL PESO DEL ÚTERO DE LAS RATAS TRATADAS CON DIFERENTES DOSIS DE EXTRACTO *ILEX GUAYUSA L* .FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012.**

### ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como lo indica el (cuadro No. 24), el p-valor obtenido al comparar las varianzas del útero entre los diferentes grupos es menor al nivel de significancia del 1% (0.01), rechazando con ello la hipótesis nula y se aceptando la hipótesis alternativa. Así como lo indica esquemáticamente el (Cuadro No. 25), los cinco grupos (**C**, **P**, **D<sub>1</sub>**, **D<sub>2</sub>** y **D<sub>3</sub>**) difieren estadísticamente los pesos del útero en función del tratamiento recibido, es decir que el peso del útero va incrementándose. Además se observa que los grupos no son homogéneos entre sí.

Y como se observa en el (Cuadro No. 26) y el (Gráfico No. 5), los grupos tratados con MCIAS 3,64mg/Kg/día y extracto de guayusa a dosis **D<sub>1</sub>** (9mg/Kg/día), dosis **D<sub>2</sub>** (18mg/Kg/día) y dosis **D<sub>3</sub>** (36mg/Kg/día), los cuatro grupos muestran un incremento significativo del peso, que expresados en porcentaje fue del 21% grupo **P**, 18% dosis **D<sub>1</sub>**, 23% dosis **D<sub>2</sub>** y 38% dosis **D<sub>3</sub>** con respecto al grupo **C**.

Estos resultados obtenidos en la investigación se deben a que la guayusa contiene metabolitos fitoestrogénicos que al ser administrado por vía oral estos estrógenos exógenos ejercen su efecto a través de los (RE $\alpha$  Y RE $\beta$ ) ubicados en el tejido del endometrio estimulando la proliferación celular de dicho tejido. Además se observó que existe una mayor irrigación sanguínea proveniente de las arterias uterinas. (9) (21)

Una vez que se ha producido la fecundación, el óvulo fecundado se traslada lentamente hacia el útero donde la acción hormonal se encarga de sincronizar varios acontecimientos, el endometrio próliferativo se comienza a transformar en endometrio secretor preparándose para la anidación del embrión. (11)

Los peso ovaricos y uterinos de ratas inmaduras tratadas durante 15 días con diferentes dosis de extracto hidroalcoholico de la planta se muestra en las figuras 4 y 5 respectivamente. Existió un aumento significativo del 19, 26, 35% y 18, 23, 38% respectivamente, ésto se observó despues del tratamiento con 9mg/Kg, 18mg/Kg y 36mg/Kg por dia.

### **3.9.TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE LAS HOJAS DE GUAYUSA (*Ilex guayusa* L)**

El estudio de toxicidad aguda, no reportó ningún deceso de los grupos de experimentación sometidos a las dosis administradas por vía oral (9, 18 y 36 mg/Kg/día). Así como su comportamiento fue normal a lo largo de la fase, 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-RIOBAMBA). Con estos estudios realizados resulta ser segura y eficaz nuestra planta a las dosis establecidas. (Ver anexo No 4)

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES

1. Los tres tratamientos con extracto de guayusa D<sub>1</sub> (9mg/Kg), D<sub>2</sub> (18mg/Kg) y D<sub>3</sub> (36mg/Kg) por día, producen efecto estrogénico sobre los ovarios, útero y estradiol sérico de ratas inmaduras; por lo tanto la utilización de la guayusa *Ilex guayusa L* nativa de la región oriental resultara beneficiosa en el tratamiento de algunos casos de infertilidad de las mujeres.
2. Los resultados del control de calidad de la droga cruda pulverizada de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa L*) cumplen con los parámetros de calidad establecidos por la USP e Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos. (Ver cuadro No. 2, 3, 4, 5)
3. El extracto hidroalcohólico empleado presentó las siguientes características: líquido turbio, café rojizo, olor característico-agradable, de sabor dulce; pH 5,15; índice de refracción 1,389; densidad relativa 0,964 e sólidos totales de 8,94%.
4. Los grupos fitoquímicos determinados en los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Ilex guayusa Loes*, fueron: alcaloides, triterpenos y/o esteroides y flavonoides. (Ver cuadro No. 8)
5. Las tres dosis administradas por vía oral (9, 18 y 36 mg/Kg/día) de extracto de *Ilex guayusa L*, no resultó ser tóxico en los órganos farmacocinéticos. (Ver Anexo No 4).

## CAPÍTULO V

### 5. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda se realice nuevas investigaciones que permitan profundizar más aun los beneficios que pueden infundir las diversas moléculas provenientes de la guayusa.
2. Por otra parte se recomienda además se realicen más pruebas de la actividad estrogénica de guayusa (*Ilex guayusa Loes*), Utilizando otros modelos de inducción como materia vegetal liofilizada por vía parenteral.
3. Difundir los resultados beneficiosos de esta investigación a la población ya que es un aporte importante para la salud. La manera de como remediar un desequilibrio de estrógenos dentro del organismo a través de un tratamiento natural de guayusa (*Ilex guayusa L*).
4. Se estudie los efectos secundarios de la toma de guayusa (*Ilex guayusa L*) en la población y su correspondencia con lo observado en los tratamientos hormonales para la menopausia e infertilidad.
5. Estudiar el efecto anticonceptivo de la guayusa (*Ilex guayusa L*) a grandes dosis.

## CAPÍTULO VI

### RESUMEN

El objetivo de la investigación es comprobar el efecto estrogénico del extracto de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa Loes*) en ratas (*Rattus norvegicus*), investigación desarrollada en el Laboratorio de Fitoquímica y en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Se utilizó como metodología experimental la administración por vía oral y estadísticamente el Test de ANOVA ( $p < 0.05$ ) comparaciones múltiples a un intervalo de confianza del 99% empleando la prueba de Tukey HSD. A las 15 ratas albinas hembras se las dividió en 5 grupos denominados; **control**, **patròn** y sujetos experimentales **D<sub>1</sub>**, **D<sub>2</sub>** y **D<sub>3</sub>**.

Durante el tratamiento recibieron: **grupo control** suero fisiológico, **grupo patròn** MCIAS 3,64mg/kg de peso y los sujetos experimentales tres dosis de 9mg/Kg, 18 mg/Kg y 36 mg/Kg de extracto de guayusa respectivamente.

Al final del tratamiento los niveles de estradiol sérico fueron los siguientes: **grupo control** 12.72pg/mL; **grupo patròn** 14.50 pg/mL, **D<sub>1</sub>** 23.70pg/mL, **D<sub>2</sub>** 41.70 pg/mL y **D<sub>3</sub>** 53.48pg/mL, por otro lado los pesos del ovario fueron los siguientes: **grupo control** 132mg, **grupo patròn** 201mg, **D<sub>1</sub>** 199mg, **D<sub>2</sub>** 221mg y **D<sub>3</sub>** 253 mg, y finalmente los pesos del útero fueron los siguientes: **grupo control** 356mg, **grupo patròn** 511mg, **D<sub>1</sub>** 489mg, **D<sub>2</sub>** 522mg y **D<sub>3</sub>** 630mg.

Se concluye que los tres tratamientos con extracto de guayusa producen efecto estrogénico en ratas tanto en los niveles de estradiol y en los pesos de los órganos de reproducción. Se recomienda se realicen nuevas investigaciones que permitan profundizar más aun los beneficios que pueden infundir las diversas moléculas provenientes de la guayusa.

## SUMMARY

The objective of the investigation is to test the estrogenic effect of extract of guayusa leaves (*Ilex guayusa Loes*) in rats (*Rattus norvegicus*). The research was developed at the laboratory of Phytochemistry and in the Science Faculty bioterio of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

The oral administration and the ANOVA test ( $p < 0.05$ ) used as an experimental methodology, and multiple comparisons in a confidence interval of 99% by using the Tukey test HDS. The female albino rats were divided into five groups called: standard and experimental subjects **D<sub>1</sub>**, **D<sub>2</sub>** and **D<sub>3</sub>**.

During the treatment, they received: control group: physiological saline, commercial group: pharmacological pattern 3,64 mg/Kg and experimental tests: three doses of 9 mg/Kg, 18 mg/Kg and 36 mg/Kg of guayusa extract, respectively.

At end of treatment, seric estradiol levels were: **control group** 12,72 pg/mL; **pattern group** 14,50 pg/mL, **D<sub>1</sub>** 23.70 pg/mL, **D<sub>2</sub>** 41.70 pg/mL and **D<sub>3</sub>** 53.48 pg/mL. In addition ovarian weights were: **control group** 132 mg, **pattern group** 201 mg, **D<sub>1</sub>** 199 mg, **D<sub>2</sub>** 221 mg and **D<sub>3</sub>** 253 mg. Finally the uterus weights were: **control group** 356mg, **pattern group** 511 mg, **D<sub>1</sub>** 489 mg, **D<sub>2</sub>** 522 mg and **D<sub>3</sub>** 630 mg.

It is concluded that the three treatments with guayusa extract produce an oestrogenic effect in rats, both, in estradiol levels and the weights of reproduction organs. It is recommended further investigations to deepen the profits which may influence the different molecules coming from guayusa.

## CAPÍTULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍAS

1. **BRUNETON, J.**, Farmacognosia Fitoquímica de Plantas Medicinales., 2<sup>a</sup> ed., Zaragoza-España., Editorial Acribia., 1993., pp. 239-275; 301-349; 455-760; 773-793.
2. **CÁRDENAS, M.**, Farmacología., 1<sup>a</sup> ed., Riobamba-Ecuador., Editorial Workcenter., 2011., pp. 490-493.
3. **CORREA, B.**, Especies vegetales promisoras., 1<sup>a</sup> ed., Bogotá-Colombia., Editorial Secab., Tomo I., 1989., pp. 400-412.
4. **GARCIA, H.**, Flora medicinal de Botánica Médica., 1<sup>a</sup> ed., Bogotá-Colombia., Editorial Imprenta Nacional Bogotá., Tomo II., 1975., pp. 139-143.
5. **GARCIA, H.**, Aplicabilidad de las plantas medicinales en la terapéutica moderna., 2<sup>a</sup> ed., Bogotá-Colombia., Editorial Tercer Mundo., 1986., pp. 79-88.
6. **GARCIA, H.**, Flora medicinal de Botánica Médica., 2<sup>a</sup> ed., Bogotá-Colombia., Editorial Tercer Mundo., Tomo II., 1992., pp. 120-121; 292-537.
7. **GOODMAN & GILMAN.**, Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10<sup>a</sup> ed., México., Editorial McGraw-Hill Interamericana., Volumen I., 2000., pp. 255, 257, 752, 755.

8. **GONZÁLEZ, J.**, Esterilidad e infertilidad en ginecología., 4ª ed., Barcelona - España., Editorial Salvat., 1986., pp.136-148.
9. **GUYTON, H.**, Tratado de fisiología medica., 10ª ed., México., Editorial Mc Graw Hill Interamericana., 2001., pp.1117-1133.
10. **HARRISON.**, Principios de Medicina interna., 15ª ed., España., Editorial Mc Graw Hill Interamericana., Volumen I., 2002., pp. 345-362.
11. **HARRISON.**, Principios de Medicina Interna., 15ª ed., México., Editorial Mc Graw Hill Interamericana., Volumen II., 2002., pp. 2519-2536.
12. **HIPOLITO, A. COSTAS, F.**, Plantas medicinales., 1ª ed., México., Editorial Biblioteca Práctica de México., 1976., pp. 54-100.
13. **IGLESIAS, J.**, Hierbas medicinales de los quichuas del Napo., 1ª ed., Quito-Ecuador., Editorial Abya-Yala., Tomo I., 1985., pp. 11, 12,13.
14. **MIRANDA, M. CUELLAR, A.**, Farmacognosia y Productos naturales., 1ª ed., Habana-Cuba., Editorial Universidad de la Habana., 2000., pp. 40-60.
15. **MIRANDA, M., CUELLAR, M.**, Farmacognosia y Productos Naturales., 2ª ed., Habana-Cuba., Editorial Félix Varela., 2001., pp. 159-165; 168-171; 242-245; 261-265; 273-274; 278-290.
16. **ÑUCANCHIC PANPA JANPICUNA.**, Plantas Medicinales del Campo., 2ª ed., Quito-Ecuador., Editorial Abya-Yala., 1993., pp. 46-106.
17. **PAMPLONA, J.**, Enciclopedia de las Plantas Medicinales., 2ª ed., Argentina., Editorial Safelix., 2006., pp. 365- 368.

18. **WAGNER, H., BLADT, S.**, Análisis de plantas y drogas., 2ª ed., Berlín., Editorial Springer Verlag., 1996., pp. 334-347.
19. **ADLERCREUTZ, H., y Otros.**, Plasma concentrations of phytoestrogens., Lancet., Washington-EEUU., 1993., Vol 342., pp. 1209-1210.
20. **BEATO, M. CHAVEZ, S. TRUSS, M.**, Phytiestrogens Steroids., Steroids., Washington-EEUU., 1996., Vol 4., pp. 240- 251.
21. **BAKER, V., LEITMAN, D., JAFFE, R.**, Selective estrogens receptor modulators in reproductive medicine and biology., Obst Gynecol Surgery., Berlín-Alemania., 2000., Vol 55., pp. 21-47.
22. **BRANDI, M.**, Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases calcif tissue int., Suppl., Missouri-EEUU., 1997., Vol 1., pp. 5-8.
23. **BRÜCHER, H.**, Useful Plants of Neotropical Origen and their Wild Relatives., Springer-Verlag., Berlín-Alemania., 1989., Vol 5., pp. 200-296.
24. **CLARKSON, TB., y Otros.**, The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy., Biol Med., Washington-EEUU., 1998., Vol 3., pp. 365-368.
25. **DAHLMAN-WRIGHT, K., y Otros.**, International Union of Pharmacology estrogen receptors., Pharmacol., Berlín-Alemania., 2006., Vol 58., pp. 773–801.
26. **DIXON, D. SHAIKH, N.**, Growth inhibition of human breast cancer cells by herbs and phytoestrogens., Oncol Rep., Washington-EEUU., 1999., Vol 6., pp. 1383-1393.

27. **ELSEVIER.**, Manual de Ensayos de Fitoterapia. Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaundé I, Elsevier., Yaundé-Camerún., 2001., pp. 472-478.
28. **FUNDACIÓN CHANKUAP.**, Plan de manejo de *Ilex guayusa Loes.*, Fundación Chankuap., Macas-Ecuador., 2006., Vol 1., pp. 5-20.
29. **HALVERSON, M.**, Guía para Cuidados y Uso de Animales de Experimentación., Ed Universitaria., Buenos Aires-Argentina., 2005., Vol 1., pp. 85-100.
30. **JENSEN, A. JACOBSON, H.**, Receiver Phytoestrogens., Recent Prog Horm., Washington-EEUU., 1962., Vol 18., pp. 387-414.
31. **JORGENSEN, P.M. y S. LEÓN-YÁNEZ.**, Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador., Monographs in Systematic Botany from The Missouri Botanical Garden., Missouri-EEUU., 1999., Vol 75., pp. 1-1181.
32. **JOANNOU, GE., y Otros.**, A urinary profile study of dietary phytoestrogens., Ster Bio Mol Bio., Missouri-EEUU., 1995., Vol 54., pp. 167-184.
33. **KALDAS, R., HIJGIES, C.**, Reproductive y general metabolic effects of phytoestrogens in mammals., Reprod toxicol., Valencia-España., 1989., Vol 3., pp. 81-89.
34. **KING, R. BROADBENT, J., HEAD, R.**, Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats., Nutrition., Valencia-España., 1996., Vol 126., pp. 176-182.
35. **LIEN, L., LIEN, E.**, Hormone therapy and phytoestrogens., J Clin Phar Ther., Sevilla-España., 1996., Vol 21., pp. 101-111.

- 36. MESSINA, MARK.,** Revisión de la soja y de las isoflavonas, en relación al rol potencial en la prevención y tratamiento de patologías crónicas., Atributos nutricionales de la soja., Valencia-España., Vol 2., pp. 40-79.
- 37. MORENO, C., NÚÑEZ, R., CABALLERO, P.,** Sexualidad y reproducción humana información psicológica., Col-legi Oficial de Psicòlegs., Valencia-España., 1999., Vol 69., pp. 38-41.
- 38. PARADA, L.,** Infertilidad y pareja construcciones narrativas como horizonte para la intervención., Diversas-Perspectivas en psicología., Buenos Aires-Argentina., 2006., Vol 4., pp. 149-158.
- 39. PATIÑO, V.,** Guayusa a neglected stimulant from the Eastern foothills., Economic Botany., Bogotá-Colombia., 1986., Vol 24., pp. 311-316.
- 40. PRICE, K., FENWICK, G.,** Naturally occurring estrogens in foods-A review., Food Addit Contam., Missouri-EEUU., 1985., Vol 2., pp.73-106.
- 41. SAUER, M., y Otros.,** Marijuana interaction with the estrogen receptor., Pharmacol., Valencia-España., 1983., Vol 224., pp. 404-407.
- 42. SETCHELL, KD., y Otros.,** Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease., Clin Nutrition., Valencia-España., 1984., Vol 40., pp. 569-578.
- 43. SFAKIANOS, J., y Otros.,** Intestinal uptake and biliary secretion of the isoflavone genistein in the rat., J Nutr., Valencia-España., 1997., Vol 127., pp.1260-1268.
- 44. SHUTT, D., CON, R.,** Steroid y phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors in vitro., Ji Endocr., Valencia-España., 1972., Vol 52., pp. 299-310.

- 45. THAM, D., GARDNER, C., HASKELL, W.,** Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence., *J Clin Endocrinol Metab.*, Sevilla-España., 1998., Vol 7., pp. 2223-3500.
- 46. TOFT, D., GORSKI, J.,** Phytoestrogens., *Proc Natl Acad Sci.*, Missouri-EEUU., 1966., Vol 6., pp. 1574-81.
- 47. TOP, S., y Otros.,** Selective estrogen-receptor modulators (SERMs) in the cyclopentadienylrhenium tricarbonyl series: synthesis and biological behavior., *ChemBiochem.*, Valencia-España., 2001., Vol 2., pp. 346-475.
- 48. UMLAND, E., y Otros.,** Phytoestrogens as Therapeutic Alternatives to Traditional Hormone Replacement in Postmenopausal Women., *Pharm.*, Valencia-España., 2000., Vol 20., pp. 981-990.
- 49. CÁCERES, H.,** El efecto del fitoestrógeno de la soya (isoflavonas) sobre el endometrio de las ratas., Título de Médico y Cirujano en el grado de Licenciado., Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina., Guatemala., **TESIS**, 2003., pp. 4-12.
- 50. CARRILLO, P.,** Comprobación del efecto hipoglucemiante del zumo del fruto de noni (*Morinda citrifolia*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con hiperglucemia inducida., Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba-Ecuador., **TESIS**, 2011., pp 50-55.
- 51. CUSCO, C.,** Determinación de los compuestos presentes en el extracto metanólico de la pulpa del fruto de *Mauritia flexuosa* L. “aguje” y su efecto sobre el nivel de estradiol en ratas hembras jóvenes normales., Facultad de Ciencias Biológicas Escuela de Post-Grado en Recursos Vegetales y Terapéuticos., Universidad Nacional Mayor de San Marcos., Lima-Perú., **TESIS**, 2009., 122p.

- 52. HIDALGO, J.,** Efecto Hipoglucemiante del Extracto Hidroalcohólico de Guayusa (*Ilex guayusa*) en Ratas de Experimentación (*Rattus norvegicus*) con Hiperglucemia Inducida., Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba-Ecuador., **TESIS**, 2010., 80p.
- 53. LEÓN, J.,** Efecto Hipoglucemiante del Extracto de las Hojas de Frutipan (*Artocarpus altilis*), en Ratas (*Rattus norvegicus*) con Hiperglicemia Inducida., Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba-Ecuador., **TESIS**, 2012., pp. 40-49.
- 54. ROSERO GORDÓN, A.,** Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de cafeína de un extracto hidroalcohólico de *Ilex guayusa*., Laboratorio CIVABI., Universidad Politécnica Salesiana Quito., Quito-Ecuador., **TESIS**, 2007., pp. 25-32.
- 55. VAZQUEZ, I., RODRIGUEZ, M.,** Efecto del pastoreo de la alfalfa tierra de campos en secano, sobre aspectos fisiológicos y anatómicos del aparato reproductor de ovejas manchegas., Doctorado, Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal II, Universidad Complutense de Madrid., Madrid-España., **TESIS**, 1993., pp. 5-18.

### **Bibliografía de Internet**

**56. ANÁLISIS FITOQUIMÍCO Y METABOLITOS SECUNDARIOS**

<http://www.macapeurana.com/analisis.htm>.

2012/06/16

**57. ANATOMÍA GENERAL DEL OVARIO**

<http://www.gratislibros.com.ar/textos/anatomia-y-fisiologia.html>

2011/02/21

**58. BETA SITOSTEROL**

[http://www.fredmeyer.com/Es-Supp/Beta\\_Sitosterol.htm](http://www.fredmeyer.com/Es-Supp/Beta_Sitosterol.htm)

2012/07/14

**59. CLIMASOY**

[http://www.edifarm.com.ec/edifarm\\_quickmed/pdfs/productos/CLIMASOY-20120718-152050.pdf](http://www.edifarm.com.ec/edifarm_quickmed/pdfs/productos/CLIMASOY-20120718-152050.pdf)

2012/09/01

**60. DIAGNÓSTICOS DE LA INFERTILIDAD**

[http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet.html](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet.html).

2012/01/02

**61. ELABORACIÓN DE UN PROTOTIPO DE FITOFÁRMACO “GUAYUSA”**

<http://es.escribd.com/doc/63647125/guayusa-caracterizacionfitoquimica>

2010/12/14

**62. ESTROGENOTERAPIA**

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

2012/03/23

**63. ETIOLOGÍA DE LA INFERTILIDAD FEMENINA**

<http://fertilidad.elembarazo.net/causas-de-la-infertilidad-femenina.html>.

2010/06/20

**64. EXTRACCIÓN DE SANGRE EN LOS MAMÍFEROS Y AVES DE LABORATORIO.**

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

2011/10/01

## **65. FITOESTRÓGENO**

Schiele L. Soy phytoestrogens; Natutal Menopause Health

<http://www.naturalmenopausehealth.com/soyphyto.htm>

2001/03/01

## **66. GALANGINA**

<http://www.ayudacancer.com/foro/viewtopic.php?pid=31067>

2012/07/21

## **67. GUAYUSA (*Ilex guayusa* L), COMPOSICIÓN QUÍMICA**

<http://es.scribd.com/doc/63647125/guayusa-caracterizacionfitoquimica>

2012/01/20

## **68. GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes), CONTRAINDICACIONES Y PRECAUCIONES.**

<http://www.latiendanaturista.com/vademecum/guayusa.htm>

2010/07/26

## **69. INDICACIONES DE LA GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes)**

<http://www.siamazonia.org.pe/archivos/publicaciones/amazonia/libros/28/28000007.htm>

2009/03/22

## **70. INFERTILIDAD DEFINICIÓN**

<http://www.humn.fcm.unc.edu.ar/pages/Gineco/Clase%202/INFERTILIDAD.pdf>

2010/04/15

## **71. INFERTILIDAD FEMENINA**

[http://espanol.pregnancy-info.net/infertilidad\\_femenina.html](http://espanol.pregnancy-info.net/infertilidad_femenina.html)

2012/01/07

## **72. INFERTILIDAD HORMONAL**

<http://fertilidad.elembarazo.net/causas-de-la-infertilidad-femenina.html>

2011/05/25

## **73. INFERTILIDAD Y SUS TRATAMIENTOS**

<http://www.todopapas.com/fertilidad/fertilidad-en-la-mujer/la-infertilidad-y-sus-tratamientos-66>

2011/12/21

## **74. INSTITUTO EUROPEO DE FERTILIDAD Y LA ESTERILIDAD**

<http://www.iefertilidad.com/profesionales>.

2011/03/26

## **75. MANIPULACIÓN, SUJECIÓN, SEXADO, IDENTIFICACIÓN**

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

2011/11/12

## **76. NARINGENINA**

<http://es.sw3c.com/chemical/formulas/cas-486-62-4.html>

2012/06/01

## **77. ONONIN**

<http://www.astragalusextract.net/ononin.html>

2012/08/25

## **78. PROBLEMAS QUE ORIGINAN LA INFERTILIDAD FEMENINA**

Artículo de la Enciclopedia Medica Plus de la Biblioteca Nacional de Medicina de los EEUU y los Institutos Nacionales de Salud.

<http://saludchicago.com/infertilidad.htm>.

2007/01/02

**79. QUERCETINA**

<http://www.ehrlichshopping.com/contents/es/p4.html>

2012/04/22

**80. RATAS DE LABORATORIO**

<http://www.profesorenlinea.cl/fauna/RatasLaboratorio.htm>

2011/07/25

**81. TÉCNICAS DE INOCULACIÓN EN RATAS**

[http://es.scrib.com/doc/3288391/TECNICAS-DE-INOCULACION-Y-SANGRE-DE-ANIMALES.](http://es.scrib.com/doc/3288391/TECNICAS-DE-INOCULACION-Y-SANGRE-DE-ANIMALES)

2012/01/07

## CAPÍTULO VIII

### 9. ANEXOS

#### ANEXO No 1. TÉCNICA UTILIZADA EN LA INVESTIGACIÓN

ELSEVIER

FITOTERÁPIA

[www.elsevier.com/locate/litote](http://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. Tchouanguép

Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Dschang, PO Caja de 67, Dschang, Camerún

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.

*Keywords:* Female rats; Ovary; Oestradiol; Aminopyrine N-demethylase

## 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 ( $26 + 2$  ° 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 immature 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 1), 49 mg / kg para el segundo extracto (grupo PE2) 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 t-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 la figura 1 y 2, respectivamente. Una parte significativa

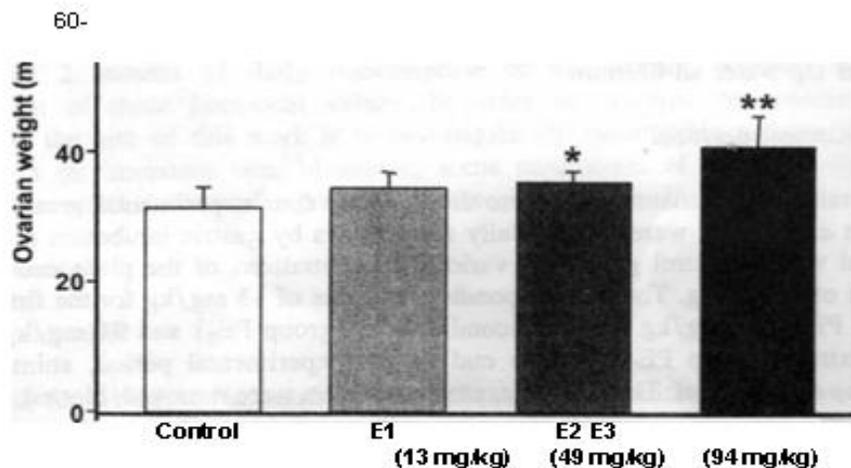


Fig. 1. Effect of oral administration of PE on ovarian weight (mg) of immature rats treated for 15 days.  $n = 5$ .  $P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  (Student's *t*-test). PE = aqueous extract of the leaf mixtures of *A. buettneri*, *D. verticillata*, *H. macranthus* and *J. insularis*.

Fig. 1. Efecto de la administración oral de PE en peso ovárico (mg) de ratas inmaduras tratadas durante 15 días.  $n = 5$ .  $P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$  (estudiante F-test). PE = extracto acuoso de las mezclas de hojas de *A. buettneri*, *verticillata* D., *macranthus* H. y *J. 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.

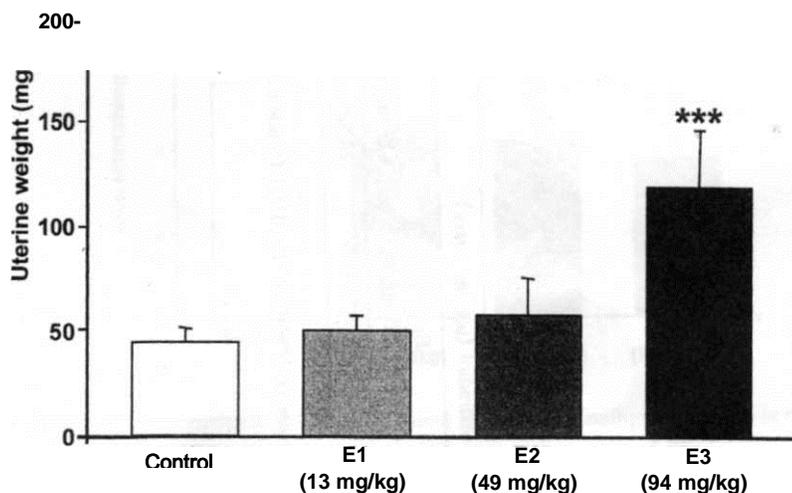


Fig. 2. Effect of oral administration of PE on uterine weight (mg) of immature rats treated for 15 days. n = 5, \*\*\* $P < 0.001$  (Student's t-test). PE = aqueous extract of the leaf mixtures of *A. buettneri*, *D. verticillata*, *H. macranthus* and *J. insularis*.

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 ± 1,11	13,24 ± 0,80	15,35 ± 2,09	14,33 ± 1,02

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

Values are mean ± 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).

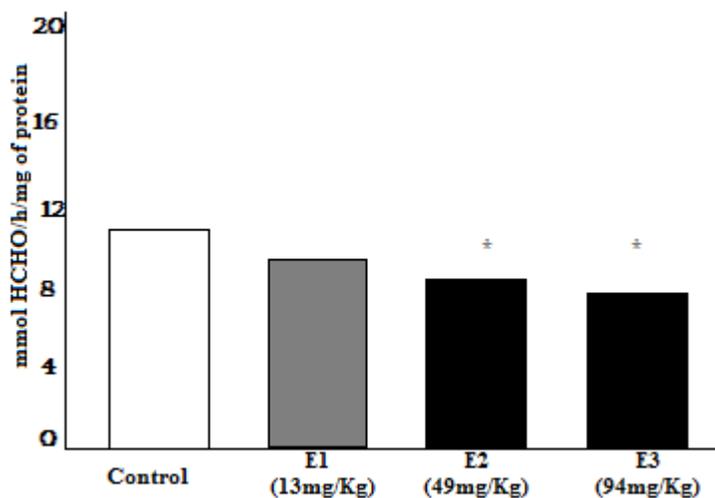


Fig 3. Actividad de aminopirina JV-desmetilasa (HCHO nmol / h por miligramo de proteína) en el sobrenadante OOOXg 10 hígado de ratas inmaduras tratadas durante 15 días con diversas dosis de PE. \* P <0,05 (t de Student-test). PE = extracto acuoso de las mezclas de hojas de *A. buettneri*, *verticillata*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

### Agradecimientos

Damos las gracias a la CTA por sus dones preciosos de documentación. También agradecemos la ayuda de la siguiente durante la realización de este trabajo: Célestin Tchouanguep para proporcionar a las plantas en estudio, el Dr. Jean Michel Onana del Herbario Nacional (IRAD) para la determinación de las especies, de Jean Bicki OCEAC (Yaundé, Camerún), por su la asistencia técnica.

## ANEXO No 2. TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ESTRADIOL

12176190001V16

# Estradiol II

Estradiol - E2

REF 03000079 122 100 tests

• Indica los analizadores en los cuales puede utilizarse el estuche

Elecys 2010	MODULAR ANALYTICS E170	cobas e 411	cobas e 601	cobas e 602
•	•	•	•	•

**Español**

**Uso previsto**  
Test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de estradiol en suero y plasma humanos. Este inmunoensayo "ECLIA" (electrochemiluminescence Immunoassay) de electroquimioluminiscencia está concebido para ser utilizado en los inmunoanalizadores Elecys y cobas e.

**Características<sup>1,2,3,4</sup>**  
Los estrógenos son responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de la mujer. Junto con los gestágenos, los estrógenos controlan todos los procesos de reproducción femenina. El estrógeno biológicamente más activo es el 17β-estradiol, una hormona esteroide con un peso molecular de 272 daltons. Los estrógenos se forman en primer lugar en los ovarios (folículo, cuerpo lúteo), pero también, aunque en menor cantidad, en los testículos y en la corteza suprarrenal. Durante el embarazo, los estrógenos se generan principalmente en la placenta. Aprox. el 98 % del estradiol está ligado a proteínas transportadoras (SHBG = Sexual Hormone binding Globulin). La secreción de estrógeno durante el ciclo menstrual se efectúa en dos fases. La determinación de estradiol está clínicamente indicada para localizar las causas de trastornos de fertilidad dentro del sistema hipotálamo-hipófisis-gonadas, para detectar ginecomastias, tumores ováricos y testiculares productores de estrógenos, así como hiperplasias de la corteza suprarrenal. La determinación se aplica asimismo para controlar los tratamientos de fertilidad y detectar la ovulación dentro del marco de la fertilización in vitro (FIV). El test Elecys Estradiol II se basa en un principio de test competitivo empleando un anticuerpo policlonal específicamente dirigido contra el 17β-estradiol. El estradiol endógeno, liberado de la muestra por la mesterolona compete con el derivado añadido del estradiol marcado con el quelato de rutenio<sup>99</sup> por los sitios de fijación del anticuerpo biotinilado.

a) [Quelato tris (2'-2'-bipiridina) rutenio (II)] (Rubbpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>

**Principio del test**  
Principio de competición con una duración total de 18 minutos.

- 1ª incubación: Al incubar la muestra (35 µL) con un anticuerpo biotinilado específico anti-estradiol se forma un inmunocomplejo cuya cantidad depende de la concentración del analito en la muestra.
- 2ª incubación: Tras la adición de un derivado de estradiol marcado con quelato de rutenio y de micropartículas recubiertas de estreptavidina, se forma un complejo anticuerpo-hapteno que ocupa los puntos de fijación aún libres del anticuerpo biotinilado. El complejo total se fija a la fase sólida por la interacción entre la biotina y la estreptavidina.
- La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.
- Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

**Reactivos - Soluciones de trabajo**

M Micropartículas recubiertas de estreptavidina (tapa transparente), 1 frasco, 6,5 mL:  
Micropartículas recubiertas de estreptavidina: 0,72 mg/mL; conservante.

R1 Anticuerpo anti-estradiol-biotina (tapa gris), 1 frasco, 8 mL:  
Anticuerpo policlonal biotinilado anti-estradiol (conejo) 45 ng/mL; mesterolona 130 ng/mL; tampón MES 50 mmol/L, pH 6,0; conservante.

R2 Péptido de estradiol-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (tapa negra), 1 frasco, 8 mL:  
Derivado de estradiol marcado con quelato de rutenio 2,75 ng/mL; tampón MES 50 mmol/L, pH 6,0; conservante.

**Medidas de precaución y advertencias**  
Sólo para el uso diagnóstico in vitro.  
Observe las medidas de precaución usuales para la manipulación de reactivos. Eliminar los residuos según las normas locales vigentes. Ficha de datos de seguridad a la disposición del usuario profesional que la solicite.  
Evite la formación de espuma en reactivos y muestras de todo tipo (especímenes, calibradores y controles).

**Preparación de los reactivos**  
Los reactivos incluidos en el estuche están listos para el uso y forman una unidad inseparable. La información necesaria para el correcto funcionamiento se introduce en el analizador a través de los códigos de barras de los reactivos.

**Conservación y estabilidad**  
Conservar a 2-8 °C.  
Conservar el estuche de reactivos Elecys Estradiol II en posición vertical para garantizar la disponibilidad total de las micropartículas durante la mezcla automática antes del uso.  
Estabilidad:

en frasco cerrado, a 2-8 °C	hasta la fecha de caducidad indicada
una vez abierto, a 2-8 °C	12 semanas
en los analizadores	8 semanas

**Obtención y preparación de las muestras**  
Sólo se ha analizado y considerado apto el tipo de muestras aquí indicado. 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, la pendiente de 0,9-1,1 + intersección dentro de < ± 2 veces la sensibilidad analítica (LID) + coeficiente de correlación > 0,95.  
Estabilidad: 2 días a 2-8 °C, 6 meses a -20 °C. Congelar sólo una vez.<sup>5</sup>  
El tipo de muestras al que se hace referencia fue analizado con tubos de recogida de muestras seleccionados, comercializados en el momento de efectuar el análisis, sin haber empleado la totalidad de los tubos existentes de todos los fabricantes. Los sistemas de recogida de muestras de diversos fabricantes pueden contener materiales diferentes que, en ciertos casos, llegan a afectar los resultados analíticos. Si las muestras se procesan en tubos primarios (en sistemas de recogida de muestras), aténgase a las instrucciones del fabricante de los tubos.  
Centrifugue las muestras que contengan precipitado antes de efectuar la prueba. No emplee muestras inactivadas por calor. No utilice muestras ni controles estabilizados con azida.  
Se debe garantizar una temperatura de 20-25 °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.

**Material suministrado**  
Consultar la sección "Reactivos - Soluciones de trabajo" en cuanto a los reactivos suministrados.

2010-09, V 16 Español

1 / 4

Analizadores Elecys y cobas e

# Estradiol II

Estradiol - E2



## Material requerido adicionalmente (no suministrado)

- [REF] 03064921122, Estradiol II CalSet II, para 4 x 1 mL
- [REF] 11731416122, PreciControl Universal, para 2 x 3 mL de PreciControl Universal 1 e 2 c/u o [REF] 11731416190, PreciControl Universal, para 2 x 3 mL de PreciControl Universal 1 e 2 c/u
- [REF] 11731416160, PreciControl Universal, para 2 x 3 mL de PreciControl Universal 1 y 2 c/u (para los EE.UU.)
- [REF] 03609987190, Diluent MultiAssay, 2 x 16 mL de diluyente para muestras
- Equipo de laboratorio usual
- Analizadores Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170 ó **cobas e**

## Material adicional para los analizadores Elecsys 2010 y **cobas e** 411:

- [REF] 11662988122, ProCell, 6 x 380 mL de tampón del sistema
- [REF] 11662970122, CleanCell, 6 x 380 mL de solución detergente para la célula de lectura
- [REF] 11930346122, Elecsys SysWash, 1 x 500 mL de aditivo para el agua de lavado
- [REF] 11933159001, Adapter for SysClean
- [REF] 11706802001, Elecsys 2010 AssayCup, 60 x 60 tubos de ensayo
- [REF] 11706799001, Elecsys 2010 AssayTip, 30 x 120 puntas de pipeta

## Material adicional para los analizadores MODULAR ANALYTICS E170 y **cobas e** 601 y **cobas e** 602:

- [REF] 04880340190, ProCell M, 2 x 2 L de tampón del sistema
- [REF] 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L de solución detergente para la célula de lectura
- [REF] 03023141001, PC/CC-Cups, 12 recipientes para atemperar las soluciones ProCell M y CleanCell M antes de usar
- [REF] 03005712190, ProbeWash M, 12 x 70 mL de solución detergente para finalizar el procesamiento y enjuagar tras cambiar de reactivos.
- [REF] 03004899190, PreClean M, 5 x 600 mL de solución detergente de detección
- [REF] 12102137001, AssayTip/AssayCup Combimagazine M, 48 cargadores con 84 tubos de ensayo o puntas de pipeta, bolsas de residuos
- [REF] 03023150001, WasteLiner, bolsas de residuos
- [REF] 03027651001, SysClean Adapter M

## Material adicional para todos los analizadores:

- [REF] 11298500316, Elecsys SysClean, 5 x 100 mL de solución detergente del sistema
- [REF] 11298500160, Elecsys SysClean, 5 x 100 mL de solución detergente del sistema (para los EE.UU.)

## Ejecución del test

Para garantizar el funcionamiento óptimo del test, observe las instrucciones de uso del analizador utilizado. Consultar el manual del operador apropiado para obtener las instrucciones de ensayo específicas del analizador.

Analizadores MODULAR ANALYTICS E170, **cobas e** 601 y **cobas e** 602: Es necesario emplear la solución PreClean M.

Las micropartículas se mezclan automáticamente antes del uso. Los parámetros de test se introducen a través de los códigos de barras impresos en el reactivo. Pero si, excepcionalmente, el analizador no pudiera leer el código de barras, el código numérico de 15 cifras deberá introducirse manualmente.

Antes del uso, atemperar los reactivos refrigerados a aprox. 20 °C y colocarlos en el rotor de reactivos (20 °C) del analizador. Evitar la formación de espuma. El analizador realiza automáticamente los procesos de atemperar, abrir y taponar los frascos.

## Calibración

Trazabilidad: El presente método ha sido estandarizado por ID-GC/MS ("dilución isotópica - cromatografía de gas y espectrometría de masa").<sup>6</sup> Cada reactivo de test Elecsys Estradiol II contiene un código de barras que incluye toda la información específica necesaria para la calibración del lote de reactivos. La curva máster preestablecida es adaptada al analizador a través del Elecsys Estradiol II CalSet II.

**Intervalo de calibraciones:** Efectuar una calibración una vez por lote con reactivos frescos (registrados como máximo 24 horas antes en el analizador). Se recomienda repetir la calibración:

- tras 1 mes (28 días) si se trata del mismo lote de reactivos
- tras 7 días (al emplear el mismo estuche de reactivos en el analizador)
- en caso necesario, p.ej.: si el control de calidad se encuentra fuera del intervalo indicado

## Control de calidad

Para el control de calidad, emplear Elecsys PreciControl Universal 1 y 2. Pueden emplearse otros materiales de control apropiados.

Los controles con diferentes intervalos de concentración deberían efectuarse junto con el test en determinaciones simples por lo menos 1 vez cada 24 horas, con cada estuche de reactivos y siempre que se realice una calibración. Los intervalos y límites de control tienen que adaptarse a las necesidades individuales de cada laboratorio. Los resultados deben hallarse dentro de los límites definidos.

Cada laboratorio debería establecer medidas correctivas en caso de obtener valores fuera del intervalo preestablecido.

Sírvase cumplir con las regulaciones gubernamentales y las normas locales de control de calidad pertinentes.

## Cálculo

El analizador calcula automáticamente la concentración de analito de cada muestra (en pmol/L, pg/mL, ng/L o bien, adicionalmente en los analizadores MODULAR ANALYTICS E170, **cobas e** 601 y **cobas e** 602, en nmol/L).

Factores de conversión:  $\text{pmol/L} \times 0,273 = \text{pg/mL (ng/L)}$   
 $\text{pg/mL} \times 3,67 = \text{pmol/L}$

## Limitaciones - Interferencias

El test no se ve afectado por ictericia (bilirrubina < 1129 µmol/L ó < 66 mg/dL), hemólisis (Hb < 0,621 mmol/L ó < 1,0 g/dL), lipemia (Intralipid < 1000 mg/dL), ni biotina < 147 nmol/L ó < 36 ng/mL.

Criterio: Recuperación dentro de ± 10 % del valor inicial.

En pacientes en tratamiento con altas dosis de biotina (> 5 mg/día), la extracción de la muestra no debería efectuarse antes de 8 horas tras la última administración.

No se han observado interferencias por factores reumatoides hasta una concentración de 1200 UI/mL.

Se analizaron in vitro 18 fármacos de uso extendido sin encontrar interferencias.

Los resultados del test pueden ser erróneos para muestras de pacientes que hayan recibido vacunas con sueros de conejo o que tengan conejos como animales domésticos.

En casos aislados pueden presentarse interferencias por títulos extremadamente altos de anticuerpos específicos contra el analito, la estreptavidina y el rutenio. Estos efectos se han minimizado gracias a una concepción analítica adecuada.

Para el diagnóstico, los resultados del ensayo siempre deben interpretarse conjuntamente con el historial médico del paciente, el análisis clínico así como los resultados de otros exámenes.

## Límites e intervalos

### Intervalo de medición

18,4-15781 pmol/L (5,00-4300 pg/mL), definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva máster. Los valores inferiores al límite de detección se indican como < 18,4 pmol/L ó < 5,00 pg/mL. Los valores superiores al intervalo de medición se indican como > 15781 pmol/L (> 4300 pg/mL) o bien diluidos por el factor 5 respectivamente hasta 78905 pmol/L (> 21500 pg/mL).

### Límites inferiores de medición

Límite inferior de detección (LDL)

Límite inferior de detección: 18,4 pmol/L (5,00 pg/mL)

El límite de detección equivale a la menor concentración medible de analito que puede distinguirse de cero. Se calcula como la concentración situada



12176190001V16

# Estradiol II

Estradiol - E2

a 2 desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (calibrador máster, estándar 1 + 2 DE, estudio de repetibilidad, n = 21).

### Dilución

Las muestras con concentraciones de estradiol superiores al intervalo de medición pueden ser diluidas automáticamente con el diluyente Elecsys Diluent MultiAssay en los analizadores MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 y **cobas e**. Se recomienda efectuar una dilución de 1:5. La concentración de las muestras diluidas debe ser > 1835 pmol/L (> 500 pg/mL). El software de los analizadores MODULAR ANALYTICS E170, Elecsys 2010 y **cobas e** toma en cuenta la dilución automática al calcular la concentración de las muestras. El contenido endógeno de analito del diluyente (< 220 pmol/L ó < 60,0 pg/mL) no se toma en cuenta en diluciones que superan el intervalo de medición.

### Valores teóricos

Los estudios efectuados con el ensayo Elecsys Estradiol II en cuatro centros clínicos de Alemania y Austria con un total de 520 muestras de personas sanas proporcionaron los valores de referencia indicados a continuación (Estudio N°: B00P023 y C00P032 - de diciembre del 2001):

Probandos	N	Percentiles			
		50°		5-95°	
		pmol/L		pg/mL	
Hombres	109	76,2	28,0-156	20,8	7,63-42,6
Mujeres					
• Fase folicular	88	228	46,0-607	62,2	12,5-166
• Fase ovulatoria	49	812	315-1828	221	85,8-498
• Fase lútea	83	389	161-774	106	43,8-211
• Posmenopausia	32	44,0	< 18,4-201*	12,0	< 5,00-54,7*
Gestación					
• 1° trimestre	20	3685	789-> 15781	1004	215-> 4300
Niños (1-10 años)					
• Varones	74	40,4	< 18,4-73,4	11,0	< 5,00-20,0
• Niñas	65	47,7	22,0-99,1	13,0	6,0-27,0

\*18,4 pmol/L (5,0 pg/mL) constituye la sensibilidad analítica del test. Si se desea información más detallada, sírvase solicitarla o consultar la información de producto Elecsys Estradiol II.

Cada laboratorio debería comprobar si los intervalos de referencia pueden aplicarse a su grupo de pacientes y en caso necesario establecer sus propios valores.

### Datos específicos de funcionamiento del test

A continuación, se indican los datos representativos de funcionamiento de las pruebas en los analizadores. Los resultados de cada laboratorio en particular pueden diferir de estos valores.

### Precisión

La precisión ha sido determinada mediante reactivos Elecsys, una mezcla de sueros humanos y controles según un protocolo modificado (EP5-A) del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): en 6 determinaciones diarias durante 10 días (n = 60); la repetibilidad, en el módulo MODULAR ANALYTICS E170, n = 21, habiéndose obtenido los siguientes resultados:

Muestra	Analizadores Elecsys 2010 y <b>cobas e</b> 411							
	VM		Reproducibilidad <sup>b)</sup>			Precisión intermedia		
	pmol/L	pg/mL	DE	CV	DE	CV	DE	CV
SH <sup>c)</sup> 1	128	34,8	7,24	1,97	5,7	7,99	2,18	6,2
SH 2	286	77,9	10,4	2,84	3,6	11,2	3,06	3,9
SH 3	484	132	10,3	2,82	2,1	11,2	3,04	2,3
SH 4	3734	1018	70,1	19,1	1,9	105	28,7	2,8
SH 5	11043	3009	248	67,5	2,2	398	108	3,6
PC U <sup>d)</sup> 1	398	108	8,28	2,26	2,1	11,7	3,20	2,9
PC U2	5093	1385	83,1	22,6	1,6	119	32,5	2,3

b) Reproducibilidad = precisión intraserie

c) SH = Suero humano

d) PC U = PreciControl Universal

**cobas**<sup>®</sup>

### Analizadores MODULAR ANALYTICS E170, **cobas e** 601 y **cobas e** 602

Muestra	Reproducibilidad					Precisión intermedia				
	VM		DE		CV	VM		DE		CV
	pmol/L	pg/mL	pmol/L	pg/mL	%	pmol/L	pg/mL	pmol/L	pg/mL	%
SH 1	130	35,4	4,28	1,17	3,3	120	32,7	5,70	1,55	4,7
SH 2	257	70,0	5,78	1,57	2,2	249	67,9	8,28	2,26	3,3
SH 3	467	127	7,90	2,15	1,7	472	129	11,8	3,20	2,5
SH 4	4681	1276	92,1	25,1	2,0	4693	1279	105	28,5	2,2
SH 5	13633	3715	415	113	3,0	12935	3525	336	91,7	2,6
PC U1	338	92,2	5,93	1,62	1,8	335	91,3	16,3	4,43	4,9
PC U2	1248	340	16,9	4,60	1,4	1266	345	32,6	8,88	2,6

A continuación, se indican los resultados para la precisión total de las mezclas de suero humano en el intervalo bajo de concentración, que se obtuvieron durante el estudio del funcionamiento del analizador MODULAR ANALYTICS E170 en tres laboratorios (EE.UU., Japón, Austria):

### Analizadores MODULAR ANALYTICS E170, **cobas e** 601 y **cobas e** 602

Precisión total	VM			DE	CV
	pmol/L	pg/mL	pmol/L		
Lab 8	84,0	22,9	5,18	1,41	6,2
Lab 6	101	27,6	9,56	2,61	9,5
Lab 5	139	37,9	18,0	4,91	13

### Comparación de métodos

a) Comparación de métodos del test Elecsys Estradiol II (y) en 32 muestras determinadas por ID-CG/EM (x) - pg/mL:

Passing/Bablok<sup>7</sup> Regresión lineal  
 $y = 1,00x + 4,43$   $y = 1,01x + 18,0$   
 $r = 0,855$   $r = 0,996$

La concentración de las muestras se situó entre aprox. 13-11500 pmol/L o bien entre aprox. 3,6-3141 pg/mL

b) Comparación de métodos del test Elecsys Estradiol II (y) con un test comercial de estradiol (x) en 136 muestras de pacientes - pg/mL:

Passing/Bablok<sup>7</sup> Regresión lineal  
 $y = 1,06x - 18,6$   $y = 1,07x - 18,2$   
 $r = 0,918$   $r = 0,984$

La concentración de las muestras se situó entre aprox. 88-3652 pmol/L o bien entre aprox. 24-995 pg/mL

### Especificidad analítica

Para el anticuerpo empleado se han obtenido las siguientes reacciones cruzadas (en %):

a) Sustancia añadida cada 0,1 µg/mL:

Aldosterona	0,006
Androstendiona	n.d.*
Equilina	0,018
Estril	0,077
Estrona	0,515
Estrona 3β-glucurónido	0,012
Estrona-3-sulfato	0,004
Etisterona	0,010
Acetato de noretindrona	0,006
Pregnenolona	0,008
Progesterona	0,009
2-metoxi-estradiol	0,054
17β-Estradiol-3,17-sulfato	0,411
17β-Estradiol 3-β-D-glucurónido	0,033
17β-Estradiol 17-β-D-glucurónido	0,014
17β-Estradiol-3-glucurónido -17-sulfato	0,013
17β-Estradiol-3-sulfato-17-glucurónido	0,011
17β-Estradiol-3-sulfato	0,038
17β-Estradiol-17-valerato	0,294

# Estradiol II



**Estradiol - E2**

17β-Estradiol-17-sulfato	0,002
17-hidroxiprogesterona	0,010
<b>a) Sustancia añadida cada 0,2 µg/mL:</b>	
Cortisol	0,003
Cortisona	n.d.
Tamoxifeno	n.d.
17-α-etinil estradiol	0,309
<b>c) Sustancia añadida cada 0,25 µg/mL:</b>	
Clomifeno	n.d.
<b>d) Sustancia añadida cada 1,0 µg/mL:</b>	
Prednisolona	0,001
<b>e) Sustancia añadida cada 10 µg/mL:</b>	
Danazol	0,001
DHEA-S	n.d.
Mesterolona	0,011
Testosterona	n.d.
5-α-dehidrotestosterona	0,001
5-Androsteno-3β-,17β-diol	0,001

\* n.d. = no detectable

### Sensibilidad funcional

44 pmol/L (12 pg/mL)

La sensibilidad funcional es la menor concentración de analito cuya medición puede reproducirse con un coeficiente de variación intermedio para la precisión ≤ 20 %.

### Referencias bibliográficas

- Johnson MR, Carter G, Grint C, Lightman SL. Relationship between ovarian steroids, gonadotropin and relaxin during the menstrual cycle. *Acta Endocrinol* 1993;129/2:121-125.
- Lichtenberg V, Schulte-Baukloh A, Lindner Ch, Braendle W. Discrepancies between results of serum 17β-Oestradiol E2 determinations carried out using different immunoassay kits in women receiving oestrogen replacement therapy. *Lab med* 1992;16:412-416.
- Runnebaum B, Rabe T. *Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin* Springer Verlag 1994; Band 1:83-86,517-524. Band 2:395-400,403-408. ISBN 3-540-57345-3, ISBN 3-540-57347-x.
- Iqbal MJ, Dalton M, Sawers RS. Binding of testosterone and oestradiol to sex hormone binding globulin, human serum albumin and other plasma proteins: evidence for non-specific binding of oestradiol to sex hormone binding globulin. *Clin Science* 1983;64:307-314.
- DG Klinische Chemie Mitteilungen 1995;26(5):210.
- Thienpont L, Verhsege PG, Van Brussel KA, De Leenheer AP. Estradiol-17β Quantified in Serum by Isotope Dilution-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *ClinChem* 1988(34);10:2066-2069.
- Passing H, Bablok W, et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:783-790.

Para más información acerca de los componentes, consultar el manual del operador del analizador, las hojas de aplicación, la información de producto y las metódicas correspondientes.

La barra del margen indica cambios o suplementos significativos. Introducir manualmente los cambios que afecten parámetros del código de barras ya leído.  
© 2010, Roche Diagnostics.



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim  
www.roche.com



**ANEXO No 3. REPORTES DE LA CUANTIFICACIÓN DE ESTRADIOL, GRUPO CONTROL, GRUPO PATRÓN, DOSIS BAJA, DOSIS MEDIA Y DOSIS ALTA. RIOBAMBA SEPTIEMBRE DEL 2012.**

	 09078017	
	<b>Dra. Diana Pazmiño Narváez</b> MD - Patóloga Clínica Directora de Laboratorios	Página 1 de 1
<b>Nombre</b> : CONTROL CONTROL <b>Documento</b> : 09078017-12 <b>Medico</b> : NO APLICA <b>Entidad</b> : LAB. RIOBAMBA AFILIADOS		<b>Codigo</b> : 09078017 <b>Edad/Sexo</b> : 3 M / F <b>Fecha Ingreso</b> : 2012-09-07 09:22:49 <b>Fecha Impresión</b> : 2012-09-10 17:22:59.
<b>ANALISIS</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>INTERVALOS BIOLÓGICOS</b>
<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 Posmenopausia: < 5.0 a 54.7 <b>EMBÁRAZO</b> 1er. trimes. 215 a 4584 2do. trimes. 801 a 5763 3er. trimes. 1810 a 13890
Técnica: ECLIA		
Validado por: LCDA. NANCY GUEVARA		

---

**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 Of. 103 Teléfono: (02) 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 ofc. 106 Telf.: (02) 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



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



Página 1 de 1

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

HORMONAS

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
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

Técnica: ECLIA

Validado por: LCDA. NANCY GUEVARA

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 Of. 103 Teléfono: (02) 3 625-222 - 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 ofic. 106 Telf.: (02) 3 319-089 - Quito

CUMBAYÁ: Clínica La Primavera • Telfs.: (02) 2693-040 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@andinet.net / info@pazminonarvaez.com



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



Nombre : DOSIS BAJA  
Documento : 09078012-12  
Medico : NO APLICA  
Entidad : LAB. RIOBAMBA AFILIADOS

Codigo : 09078012  
Edad/Sexo : 3 M / F  
Fecha Ingreso : 2012-09-07 09:08:15  
Fecha Impresión : 2012-09-10 17:15:10.

ANALISIS	RESULTADOS	INTERVALOS BIOLÓGICOS
<b>HORMONAS</b>		
ESTRADIOL	23.66 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

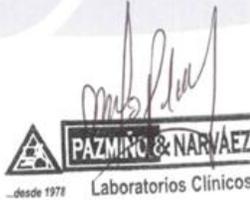
Nombre : DOSIS MEDIA  
Documento : 09188048-12  
Medico : NO APLICA  
Entidad : LAB. RIOBAMBA AFILIADOS

Codigo : 09188048  
Edad/Sexo : 3 M / F  
Fecha Ingreso : 2012-09-18 17:11:20  
Fecha Impresión : 2012-09-19 17:15:02

ANALISIS	RESULTADOS	INTERVALOS BIOLÓGICOS
<b>HORMONAS</b>		
ESTRADIOL	41.58 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 Posmenopausia: < 5.0 a 54.7
PROGESTERONA	6.95 ng/mL	<b>EMBARAZO</b> 1er. trimes.: 215 a 4584 2do. trimes.: 801 a 5763 3er. trimes.: 1810 a 13890  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> 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 <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 : DOSIS ALTA  
Documento : 09078013-12  
Medico : NO APLICA  
Entidad : LAB. RIOBAMBA AFILIADOS

Codigo : 09078013  
Edad/Sexo : 3 M / F  
Fecha Ingreso : 2012-09-07 09:13:50  
Fecha Impresión : 2012-09-10 17:16:28.

ANALISIS

RESULTADOS

INTERVALOS BIOLÓGICOS

HORMONAS

ESTRADIOL 53.46 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

Técnica: ECLIA

Validado por: LCDA. NANCY GUEVARA

**ANEXO No 4. REPORTE DE RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DE HÍGADO, RIÑÓN Y ESTOMAGO DE RATAS INDUCIDAS CON EXTTRACTO DE GUAYUSA, EMITIDO POR EL DR. OSWALDO DUQUE (ANATOMO-PATOLOGO SOLCA-CHIMBORAZO). RIOBAMBA, SEPTIEMBRE DEL 2012.**

MUESTRA		EXAMEN MACROSCÓPICO	EXAMEN MICROSCÓPICO
<b>DOSIS BAJA</b>	M <sub>1</sub> CH/12 HÍGADO	Color: rojo-pardo Largo: 5 cm Ancho: 3,8 cm Profundidad: 0,6 cm Peso: 6,32 g	Lobulillos conservados; hepatocitos de tamaño y estructura normal; sinusoides de calibre normal; espacios porta con vasos normales.
	M <sub>1</sub> CR/12 RIÑÓN	Color: rojizo Largo: 1,5 cm Ancho: 1 cm Profundidad: 0,6 cm Peso: 0,71 g	Nefronas de distribución normal; glomérulos con vascularidad y membrana normal; túbulos de calibre normal y luz permeable.
	M <sub>1</sub> CE/12 ESTÓMAGO	Color: rojo-oscuro Largo: 3 cm Ancho: 2 cm Profundidad: 0,3 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>1</sub> CH/12 HÍGADO	Color: rojo-pardo Largo: 5 cm Ancho: 3,7 cm Profundidad: 0,7 cm Peso: 6,32 g	Lobulillos conservados; hepatocitos de tamaño y estructura normal; sinusoides de calibre normal; espacios porta con vasos normales.
	A <sub>1</sub> CR/12 RIÑÓN	Color: rojizo Largo: 1,5 cm Ancho: 1 cm Profundidad: 0,6 cm Peso: 0,74 g	Nefronas de distribución normal; glomérulos con vascularidad y membrana normal; túbulos de calibre normal y luz permeable.
	A <sub>1</sub> CE/12 ESTÓMAGO	Color: rojo-oscuro Largo: 3 cm Ancho: 2 cm Profundidad: 0,3 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 No 5. FOTOGRAFÍAS**



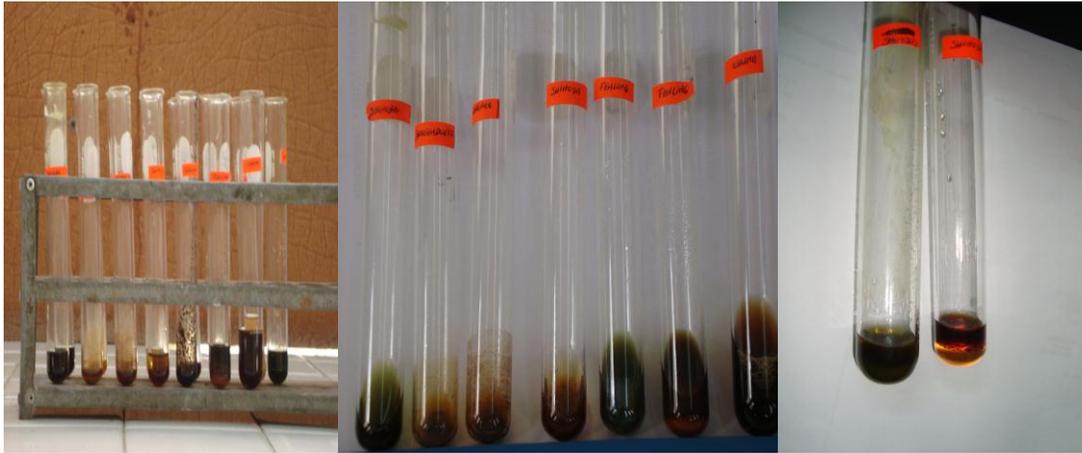
**FOTOGRAFÍA No 3. HOJAS DE *Ilex guayusa* L.**



**FOTOGRAFÍA No 4. CONTROL DE CALIDAD DE LA GUAYUSA *Ilex guayusa* L.**



**FOTOGRAFÍA No 5. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE *Ilex guayusa* L.**



FOTOGRAFÍA No 6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA *Ilex guayusa* L.



FOTOGRAFÍA No 7. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LA *Ilex guayusa* L.



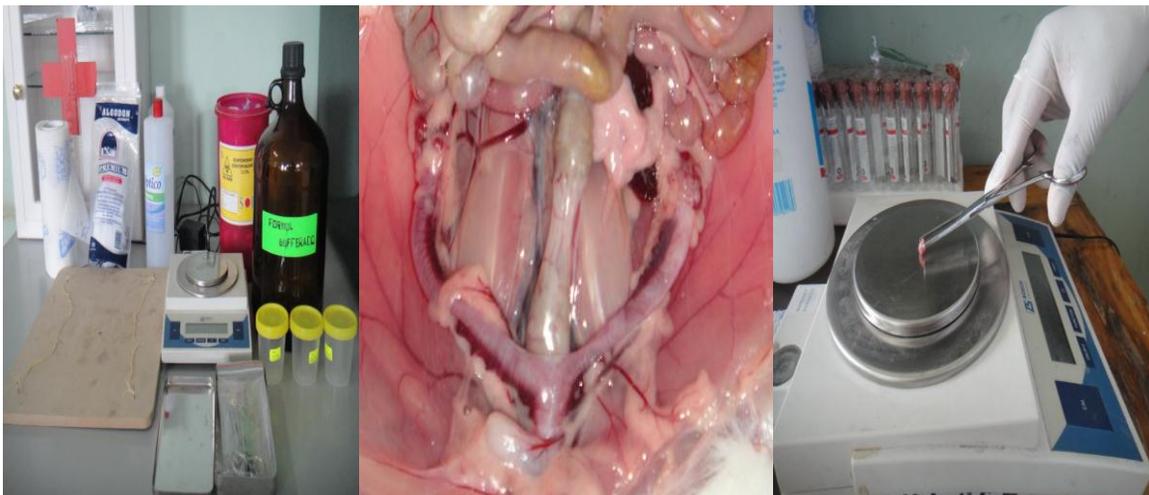
FOTOGRAFÍA No 8. AMBIENTACIÓN DE LA *Rattus norvegicus*.



FOTOGRAFÍA No 9 ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO DE *Ilex guayusa* L.



FOTOGRAFÍA No 10. TOMA DE MUESTRAS SANGÜÍNEAS DE LA *Rattus norvegicus*.



FOTOGRAFÍA No 11. DISECCIÓN DE LA *Rattus norvegicus*.