

## EFECTO ESTROGÉNICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Medicago sativa* L (ALFALFA) EN RATAS ALBINAS OVARIECTOMIZADAS

Estrogenic effect of *Medicago sativa* L (alfalfa) hydroalcoholic extract in albino rats ovariectomized

Sandra G. Bezada<sup>1</sup>, Jorge L. Arroyo<sup>2</sup>, Martín Condorhuamán<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria. <sup>2</sup>Facultad de Medicina Humana. <sup>3</sup>Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara", Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

### RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo demostrar las propiedades estrogénicas del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L (alfalfa) en ratas albinas ovariectomizadas (OVX). Se utilizaron 48 ratas albinas Sprague Dawley, hembras, de 200 a 250 g, de 8 semanas de edad, de las cuales 40 fueron sometidas a extirpación quirúrgica de ambos ovarios siguiendo la técnica de ovariectomía bilateral por el flanco. Luego del post-operatorio se dividieron en seis grupos y se administró el extracto hidroalcohólico por vía oral bajo el siguiente esquema de trabajo: Grupo 1 control negativo: (OVX), vehículo del extracto 2mL/kg; Grupo 2 control positivo: (OVX), estradiol subcutáneo 3µg/kg; Grupo 3, 4 y 5: (OVX) más extracto a 100, 500 y 1000 mg/kg, respectivamente; y Grupo 6: No OVX, control del procedimiento quirúrgico (SHAM). El tratamiento duró 14 días y se evaluó el peso corporal, peso del útero, cambios del ciclo estral mediante frotis vaginal y análisis del perfil hormonal. Se observó aumento en el peso corporal, en el peso del útero, en los niveles del estradiol y cambios en la citología vaginal. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L (alfalfa) presentó efecto estrogénico al modificar los parámetros evaluados.

**Palabras clave:** Papaya de altura, composición química, valor nutritivo, valor tecnológico-nutricional.

### SUMMARY

This study aimed to demonstrate the estrogenic properties of the hydroalcoholic extract of *Medicago sativa* L (alfalfa) in albino rats ovariectomized (OVX). Were used 48 albino Sprague Dawley rats of 200 to 250 g, 8 weeks of age, of whom 40 underwent surgical removal of both ovaries, following the technique of bilateral ovariectomy on the flank. After the post-operative were divided into six groups and hydroalcoholic extract was administered orally under the following scheme of work: Group 1 negative control: (OVX), vehicle of the extract 2mL/kg; Group 2 positive control: (OVX), estradiol subcutaneous 3 µg/kg; Group 3, 4 y 5: (OVX) more extract 100, 500 and 1000 mg/kg, respectively; and Group 6: not OVX control the surgical procedure (SHAM). The treatment lasted 14 days and was evaluated the body weight, uterine weight, changes of oestrus by vaginal smears and hormonal profile analysis. Were observed increase in body weight, uterine weight, in estradiol levels and changes in vaginal cytology. Was conclude that the hydroalcoholic extract of *Medicago sativa* L (alfalfa) showed estrogenic effect by modifying the parameters evaluated.

**Keywords:** Papaya height, chemical composition, nutritional value, technological and nutritional value.

### INTRODUCCIÓN

La deficiencia de estrógenos, asociada con la menopausia en la mujer, condiciona la aparición de síntomas denominados "sofocos", predisposición a osteoporosis, enfermedad cerebro-vascular, disminución de la memoria de corto plazo e incluso atrofia y sequedad vaginal, lo que disminuye la calidad de vida en la mujer<sup>(1-4)</sup>. Si bien el tratamiento de primera línea para el cese o disminución de estos síntomas continúa siendo la terapia de reemplazo hormonal, en la actualidad muchas mujeres vienen optando por el uso de remedios botánicos con indicios de actividad estrogénica debido a los riesgos que conlleva el uso prolongado de hormonas sintéticas<sup>(5,6)</sup>.

Es de conocimiento general que la mayoría de plantas leguminosas poseen fitoestrógenos, los cuales varían dependiendo de numerosos factores como son la humedad, temperatura, horas-luz, edad de la planta, incluso si se emplea o no abono y el tipo del mismo<sup>(7)</sup>. La alfalfa (*Medicago sativa* L) es un reconocido miembro de esta familia; dentro de su composición química se encuentran fitoestrógenos tales como las coumarinas y pequeñas cantidades de formononetina y biochanina<sup>(8,9)</sup>.

El fitoestrógeno que se encuentra presente en mayor cantidad es el coumestrol, el cual es de 30 a 100 veces más potente que las isoflavonas<sup>(9)</sup> y 4'-metoxi coumestrol (forma inactiva)<sup>(7)</sup>. Todas estas sustancias estrogénicas de origen vegetal se encuentran en

**Tabla 1.** Distribución de grupos para la determinación del efecto estrogénico.

Grupo	Categoría	Técnica	Tratamiento	Vía administración	Dosis
G-1	Control Negativo	OVX	Vehículo	Oral	2mL/kg
G-2	Control Positivo	OVX	Estradiol	SC	3µg/kg
G-3	Experimento	OVX	Extracto alfalfa	Oral	100 mg/kg
G-4	Experimento	OVX	Extracto alfalfa	Oral	500 mg/kg
G-5	Experimento	OVX	Extracto alfalfa	Oral	1000 mg/kg
G-6	CPQ (Control procedimiento quirúrgico)*	SHAM (No OVX)	Alimento/agua	Oral	Ad libitum

(\*) Al sexto grupo, denominado Control del Procedimiento Quirúrgico (SHAM), se le realizó toda la manipulación quirúrgica sin llegar a extirpar los ovarios. OVX: ovariectomía.

pequeñas cantidades de manera natural en el forraje y se le atribuyen también efectos antimicrobianos y fungicidas<sup>(10,11)</sup>.

Bajo ciertas condiciones, la cantidad de coumestrol en la alfalfa puede llegar a superar los 100 mg/kg materia seca (MS); cantidad elevada que puede causar, en las hembras que consumen dicho forraje, aumento en la repetición de celos, abortos, metritis y quistes ováricos; patologías que se agrupan bajo el término de “síndrome estrogénico”<sup>(12)</sup>.

Precisamente por su actividad estrogénica, se ha difundido su uso para aliviar los síntomas propios de la menopausia. La doble actividad de las isoflavonas (actuando a la vez como estrogénicas y antiestrogénicas), le confieren una serie de cualidades que permiten regular el balance hormonal en la mujer, pudiendo prevenir la osteoporosis y actuar como potentes antioxidantes que protegen frente al cáncer de mama. Asimismo, contribuyen a disminuir la intensidad y frecuencia de los sofocos, fatiga, sudor nocturno y cambios en el estado de ánimo<sup>(13,14)</sup>.

Uno de los modelos para evaluar actividad estrogénica es el incremento del peso del útero en hembras ovariectomizadas (OVX). Este efecto es fundamental y reproducible en animales expuestos a agonistas estrogénicos. El modelo de hembra adulta ovariectomizada consiste en la extirpación mediante cirugía de ambos ovarios. De esta manera se elimina la

fuente primaria de síntesis de estrógenos<sup>(15,16)</sup>. Por lo tanto,

el incremento del peso relativo y absoluto de los cuernos uterinos en estos animales es el principal indicativo de que el extracto o droga empleada presenta actividad estrogénica<sup>(17)</sup> y estaría causado por la interacción del estrógeno administrado con receptores que presentan actividad en los tejidos del útero, lo cual induce cambios

**Tabla 2.** Análisis fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L.

Reactivo	Metabolito secundario	Resultado
Dragendorff	Alcaloides	++
Shinoda	Flavonoides	++
Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	-
Gelatina	Taninos	++
Lieberman-Burchard	Triterpenoides y esteroides	-
Baljet A y B	Lactonas	+
Salkowski	Núcleo esteroideal	+
Borntrager	Quinonas	-
Espuma	Saponinas	++

Abundante cantidad: +++ ; Regular cantidad: ++ ; Poca cantidad: + ; Ausencia: -



**Figura 1.** Abordaje bilateral por ambos flancos. Visualización del cuerno uterino izquierdo.

**Tabla 3.** Efecto del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa sobre el peso corporal en ratas OVX,

Grupos	Tratamiento	Dosis	Peso corporal (g)		
			Peso 0	Peso inicial	Peso final
Control Negativo	Vehículo	2mL/kg	220,13 ± 2,90	307,13 ± 6,8 *	314,0 ± 3,7 **
Control Positivo	Estradiol	3µg/kg	220,75 ± 3,37	302,00 ± 8,3 *	296,25 ± 6,71 *
Experimento	Extracto alfalfa	100 mg/kg	219,75 ± 2,82	302,88 ± 6,4 *	308,75 ± 8,29 **
Experimento	Extracto alfalfa	500 mg/kg	220,25 ± 3,81	301,25 ± 6,7 *	314,5 ± 6,8 **
Experimento	Extracto alfalfa	1000 mg/kg	219,75 ± 3,45	302,13 ± 5,4 *	305,75 ± 4,3 **
(CPQ) SHAM	Alimento/Agua	Ad libitum	221,38 ± 3,11	267,75 ± 6,6	281,25 ± 3,3

(\*) p < 0,05 Comparación con el grupo SHAM (ANOVA). Los resultados fueron expresados como Media ± DE.

(+) p < 0,05 Comparación con el grupo Control positivo (ANOVA). Los resultados fueron expresados como Media ± DE.

celulares que traen como consecuencia imbibición de agua en los tejidos y en el lumen uterino <sup>(18)</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto estrogénico del extracto hidroalcohólico de la especie *Medicago sativa* L (alfalfa) en el modelo de ratas albinas ovariectomizadas (OVX).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se recolectó la planta entera (hojas, tallos y flores) sin raíz en la provincia de Canta, región Lima, en los meses de abril y mayo. Se identificó en el Herbario de la Universidad Nacional Agraria La Molina. La muestra fresca se llevó a una estufa con aire circulante a una temperatura de 40°C para su secado.

### Obtención del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L alfalfa

Se emplearon 680 gramos de muestra seca y molida, los cuales fueron macerados en 7 litros de etanol a 96°, al que se añadió agua destilada en una proporción de 2:8 (agua:etanol). El tiempo de maceración fue por un periodo de 21 días bajo protección de la luz y calor <sup>(19)</sup>. Posteriormente se filtró la solución y se concentró en rotavapor, para luego ser colocada en estufa a una temperatura de 37°C hasta obtener una masa homogénea de consistencia blanda. Se realizó el análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico obtenido.

### Tamaño de muestra, distribución y tratamiento de los animales

Se emplearon 48 ratas albinas Sprague Dawley de 8 semanas de edad, las cuales fueron alojadas en jaulas metálicas de crianza para su aclimatación, con libre acceso a agua y alimento, distribuyéndose en seis grupos constituidos por ocho ratas cada grupo, tal como se indica en la tabla 1. El extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* se administró durante 14 días por vía oral.

### Técnica de Ovariectomía (OVX)

Se seleccionaron al azar 40 ratas, las cuales se mantuvieron en ayunas ocho horas antes de la intervención, anestesiándolas por vía intramuscular con una combinación de xilazina (3 mg/kg) y ketamina (50 mg/kg), luego se colocó a los animales en posición de decúbito lateral derecho, realizando una incisión de aproximadamente 1 cm en el cuadrante inferior del abdomen (fosa del ijar izquierdo), se alcanza el ovario que se separa con una ligadura junto con unos 5 mm del cuerno uterino correspondiente y se extrae de la cavidad peritoneal. La incisión se cierra y se procede de igual forma al lado derecho. Entre los diez y quince días postcirugía se realizaron frotices vaginales de cada uno de los animales, para comprobar que las ratas ovariectomizadas se encontraran en fase diestro o fase inactiva (figura 1).

### Parámetros evaluados

**Peso corporal de los animales:** en balanza analítica al inicio y al término del tratamiento.

**Tabla 4.** Efecto del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa sobre el peso del útero en ratas OVX.

Grupos	Tratamiento	Dosis	Peso corporal (g)	
			Absoluto (g)	Relativo (%)
Control Negativo	Vehículo	2mL/kg	0,22 ± 0,07	0,07 ± 0,03
Control Positivo	Estradiol	3µg/kg	1,45 ± 0,21 **	0,52 ± 0,07 **
Experimento	Extracto alfalfa	100 mg/kg	0,29 ± 0,06	0,10 ± 0,02
Experimento	Extracto alfalfa	500 mg/kg	0,38 ± 0,03 *	0,13 ± 0,03 *
Experimento	Extracto alfalfa	1000 mg/kg	0,66 ± 0,04 **	0,22 ± 0,01 **
(CPQ) SHAM	Alimento/Agua	<i>Ad libitum</i>	0,79 ± 0,08 *	0,28 ± 0,03 *

(\*) p<0,05 Comparación con el grupo control negativo (ANOVA). (+) p<0,05 Comparación con los demás grupos (ANOVA). (\*\*) p<0,05 Comparación con el grupo 3 (ANOVA). Los resultados fueron expresados como Media ± DE.

**Tabla 5.** Efecto del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa sobre la citología vaginal en ratas OVX.

Grupos	Tratamiento	Dosis	Citología vaginal			
			24 h	48 h	72 h	96 h
Control Negativo	Vehículo	2mL/kg	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
Control Positivo	Estradiol	3µg/kg	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Experimento	Extracto alfalfa	100 mg/kg	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
Experimento	Extracto alfalfa	500 mg/kg	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
Experimento	Extracto alfalfa	1000 mg/kg	Diestro	Diestro	Diestro	Proestro
(CPQ) SHAM	Alimento/Agua	<i>Ad libitum</i>	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro

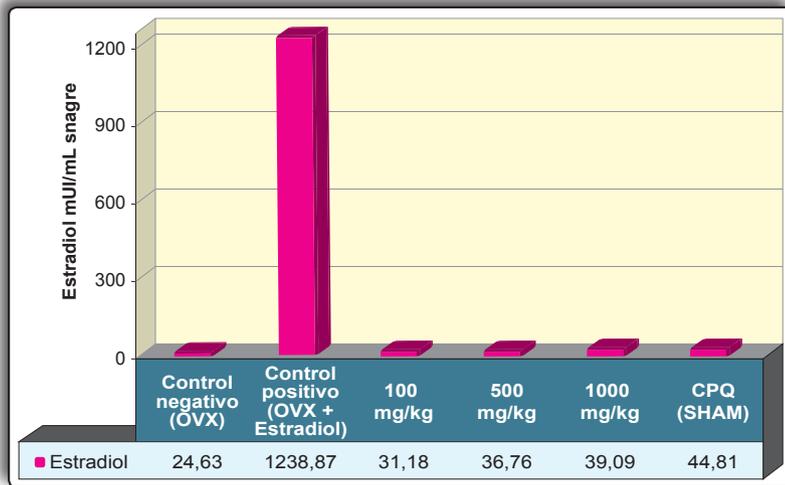


Figura 2. Promedio de los niveles de estradiol en suero de ratas ovariectomizadas.

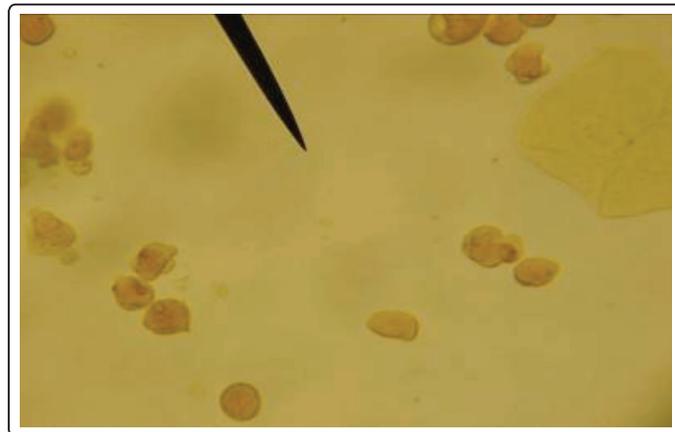


Figura 3. Citología vaginal de rata ovariectomizada, fase diestro. 100x.



Figura 4. Citología vaginal de rata ovariectomizada, fase estro (células cornificadas). 100x.

**Peso del útero:** el que fue separado de la vagina por el cuello uterino e inmediatamente pesado en balanza analítica.

**Cambios en el ciclo estral:** mediante el estudio del frotis vaginal a las 24, 48, 72 y 96 horas del inicio de la administración, vía oral, del extracto hidroalcohólico.

**Análisis del perfil hormonal:** mediante la técnica de quimioluminiscencia, se determinaron los niveles de estradiol en plasma sanguíneo de los animales.

### Análisis estadístico

La diferencia entre los grupos tratados se determinó mediante análisis de varianza ANOVA. Para las comparaciones entre grupos se utilizó el Test Tukey, considerándose significativo  $p < 0,05$ . Todo el procedimiento se realizó con el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versión 15.0 en español.

## RESULTADOS

### De la técnica quirúrgica ovariectomía (OVX) en ratas albinas

La combinación anestésica xilazina y Ketamina indujo un plano quirúrgico óptimo (plano 2) para realizar la ovariectomía bilateral por el flanco (OVX), sin causar complicaciones

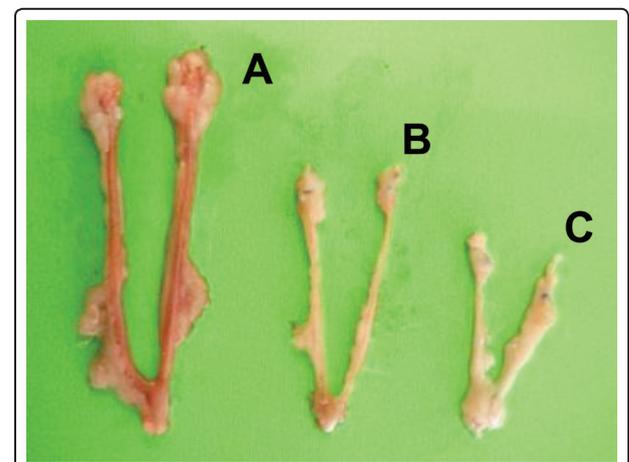


Figura 5. Involución de Cuernos Uterinos postcirugía. A: Rata no ovariectomizada (No OVX): cuernos uterinos y ovarios. B: Rata ovariectomizada, cuernos uterinos sin ovarios, 02 semanas postcirugía. C: Rata ovariectomizada, cuernos uterinos sin ovarios, 04 semanas postcirugía.

en el postoperatorio, ni la muerte de ninguno de los animales. El tiempo de duración de la anestesia obtenida con este protocolo fue de 40 minutos aproximadamente y el tiempo de recuperación fue de 4-6 horas al término de los cuales los animales iniciaban la ingesta de alimento y agua.

### De los parámetros evaluados

Los resultados referentes al peso corporal, peso del útero, citología vaginal y niveles de estradiol, pueden observarse en las tablas 3 a 5 y figuras 2 a 5, respectivamente.

### DISCUSIÓN

De las veinticuatro variedades de alfalfa que son cultivadas en la sierra de nuestro país <sup>(21)</sup>, para el presente estudio sólo se ha considerado la variedad "Moapa Superior", recolectada en la provincia de Canta, yaunque todavía no se ha determinado la concentración de coumestrol en dicha variedad, ésta puede verse afectada por los cambios de temperaturas, fotoperíodo y régimen hídrico en que se cultivan <sup>(21)</sup>; por lo que se deben tener en cuenta al formular suplementos estrogénicos para uso humano provenientes de esta leguminosa.

La acción que tiene la vitamina K sobre la osteocalcina podría trabajar en forma sinérgica con el coumestrol, para la prevención de osteoporosis en mujeres menopáusicas; ambos se encuentran en la alfalfa <sup>(22)</sup>.

El contenido de alcaloides hallado fue en regular cantidad, lo que podría atribuirse al estado de floración de la variedad de alfalfa "Moapa superior", el cual llega a un 20% de floración lo cual es indicativo del estado de madurez de la planta <sup>(23)</sup>. Asimismo, se ha determinado la presencia de saponinas en regular cantidad, la que no está relacionada al contenido de coumestrol en esta leguminosa, aunque hasta la fecha, no se ha publicado ninguna investigación relacionando ambos compuestos <sup>(24)</sup>.

En relación a la técnica de ovariectomía bilateral realizada en las ratas albinas (figura 2), el protocolo de anestesia empleado utilizando xilazina (3 mg/kg) y ketamina (50 mg/kg), proporcionó un buen plano anestésico con un óptimo grado de analgesia sumado a una pronta recuperación de los animales <sup>(16)</sup>.

Los hallazgos estadísticos indican que en las condiciones experimentales, el extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* aumentó los valores sanguíneos de estradiol en ratas albinas ovariectomizadas en

comparación con el grupo control negativo, sin embargo, estos valores no fueron suficientes para provocar cambios en la citología vaginal (figuras 3 y 4), con excepción del grupo 5 que recibió una dosis de 1000 mg/kg (proestro al cuarto día de iniciado la administración del extracto); pero si fueron suficientes para provocar un marcado incremento en el peso del útero con respecto al control negativo (figura 5). Los niveles hormonales de estradiol fueron directamente proporcionales a la concentración de los extractos hidroalcohólicos administrados. Los resultados relacionados con los pesos del útero, absoluto y relativo, así como del análisis serológico en los grupos control negativo, CPQ (SHAM) y control positivo demuestran la consistencia del modelo de ratas ovariectomizadas (OVX) empleado con el tratamiento del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa. Por lo que se recomienda realizar posteriores estudios sobre efecto estrogénico de otras variedades de *Medicago sativa* separando el contenido de clorofila y demás compuestos que pudieran interferir con la actividad y cantidad de los fitoestrógenos contenidos.

### CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa presentó efecto estrogénico al aumentar el peso del útero y los niveles de estradiol en las ratas ovariectomizadas.
- Los metabolitos secundarios: flavonoides, saponinas, taninos y alcaloides se encuentran en regular cantidad.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rossouw J, Prentice R, Manson J, Wu L, Barad D, Barnabei V, Ko M et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* 2007; 297 (13): 1465-77.
2. Matthews K, Kuller L, Sutton-Tyrrell K, Chang Y. Changes in cardiovascular risk factors during the perimenopause and postmenopause and carotid artery atherosclerosis in healthy women. *Stroke*. 2001; 32(5): 1104-11.
3. McEwen B, Stephen A. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews* 1999; 20(3): 279-307.
4. Leiblum S, Bachmann G, Kemmann E, Colburn D, Swartzman L. Vaginal atrophy in postmenopausal women. The importance of sexual activity and hormones. *JAMA* 1983; 249(16): 2195-8.
5. Geller S, Studee L. Botanical and dietary supplements for menopausal symptoms: what works, what doesn't. *J Womens Health (Larchmt)* 2005; 14(7): 634-49.

6. Geller S, Studee L. Soy and red clover for mid-life and aging. *Climacteric* 2006; 9(4): 245-63.
7. Adams NR. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J Anim Sci* 1995; 73(5): 1509-15.
8. Ravnkar VA. Compliance with hormone therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156(5): 1332-36
9. Boué SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, et al. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem* 2003; 51(8): 2193-9.
10. Bickoff AM, Livingston AL. Forage estrogens, relative potencies of several estrogenlike compounds found in forages. *J Agric Food Chem*. 1962; 10(5): 410-2.
11. Cowan MM. Plants products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol Rev*. 1999; 12(4): 564-82.
12. Le Bars J, Le Bars P, Et Brice G. Presence accumulation et devenir du coumestrol dans la luzerne et ses derives. *Rec Med Vet* 1990; 166(5): 463-9.
13. Burton JJ, Wells M. The effect of phytoestrogens on the female genital tract. *J Clin Pathol* 2002; 55(6): 401-7.
14. Nikander E, Metsä-Heikkilä M, Ylikorkala O, Tiitinen A. Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(3): 1207-12.
15. Mei J, Yeung SS, Kung AW. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(11): 5217-21.
16. Davidge S, Zhang Y, Stewart KG. A comparison of ovariectomy models for estrogen studies. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280(3): R904-7.
17. Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: phase 1. *Environ Health Perspect* 2001; 109(8): 785-94.
18. Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies. *Environ Health Perspect*. 2003; 111(12): 1550-8.
19. CYTED. Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-1. Búsqueda de principios bioactivos en plantas de la región. 1995. p. 220.
20. Lock De Ugaz O. Investigación Fitoquímica. 2<sup>da</sup> ed. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, 1994.
21. Noli C. Producción de forrajes para cuyes. INIA. Curso Nacional de crianza de cuyes. Marzo 15-16 de 2005. Huancayo - Perú, 2005.
22. Cheung A, Tile L, Lee Y, TomLinson G, Hawker G, Scher J, Hu H, et al. Vitamin K supplementation in postmenopausal women with osteopenia (ECKO Trial): A Randomized Controlled Trial. *PLoS Med* 2008; 5(10): 1461-72.
23. Stochmal A, Piacente S, Pizza C, De Riccardis F, Leitz R, Oleszek W. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *J Agric Food Chem* 2001; 49(2): 753-58.
24. Anaya AL, Espinosa-García F, Cruz-Ortega R, Abou-Mansour E. Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Plaza y Valdez. México, 2001.

Manuscrito recibido el: 06/10/14

Aceptado para su publicación el: 20/10/14

#### Correspondencia:

Nombre: Sandra G. Bezada

Dirección: Jr. Puno 1002 - Lima 01

Email: marcofi71@yahoo.es