

# EFECTO SOBRE LA GRAVIDEZ, LA PROLACTINA Y HORMONAS SEXUALES EN RATAS DEL SUBEXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS DE *Tagetes filifolia* "ANISILLO"

Effect on the pregnancy, prolactin and sex hormones in rats of methanol subextract of leaves of *Tagetes filifolia* "anisillo"

Pablo Bonilla R.<sup>1</sup>, Nancy Lozano R.<sup>1</sup>, Jorge Arroyo A.<sup>2</sup>, Hamilton Beltrán S.<sup>3</sup>

Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"  
Facultad de Farmacia y Bioquímica<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina<sup>2</sup>  
Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos<sup>3</sup>

## RESUMEN

*Tagetes filifolia* Asteraceae de uso medicinal, según datos etnobotánicos indican los usos para aliviar afecciones de las vías digestivas, para la secreción láctica y la fertilidad. Factores ambientales y estresantes ocasionan problemas de fertilidad, por ello es necesario buscar productos que regulen la fertilidad, que mejoren la espermatogénesis y la ovulación. Se evaluó el efecto de los componentes del subextracto metanólico de hojas de anisillo sobre la fertilidad en ratas, mediante el método de Rani Srivastava S. et al (2004) con modificaciones. 36 ratas normales cepa Holtzmann de  $150 \pm 20$  g adquiridas del INS, se distribuyeron al azar en tres grupos de 12 animales, seis machos y seis hembras, juntos desde el inicio de la administración de las sustancias, por vía oral durante 18 días: Grupo 1, suero fisiológico 2 mL/kg; Grupo 2, anisillo 200 mg/kg; y, Grupo 3 metoclopramida 15 mg/kg; los indicadores de evaluación fueron en machos: testosterona expresado en ng/dL; en hembras: estado de la gravidez, prolactina (ng/mL), estrógenos (pg/mL), progesterona (ng/mL). El subextracto de anisillo administrado en ratas machos, mostraron variaciones mínimas de testosterona ( $p < 0,418$ ); en hembras: hubo más ratas grávidas ( $p < 0,022$ ), el tamaño de los fetos o el avance del estado de gravidez fue mayor ( $p < 0,009$ ); hubo incremento de estrógenos, progesterona y prolactina. Se demostró incremento de la gravidez de las ratas hembras que recibieron tratamiento con el subextracto de anisillo en el que se detectaron flavonoides y alcaloides los que posiblemente han permitido la mejora de la espermatogénesis y de la ovulación.

**Palabras clave:** *Tagetes filifolia*, flavonoides, gravidez, prolactina.

## SUMMARY

*Tagetes filifolia* a medicinal Asteraceae according to data by ethnobotany show the uses to alleviate ailments of the digestive tract, for the secretion of lactic and fertility. Stressful environmental factors are causing an increase in fertility problems, so it is necessary to look for products that regulate fertility, that improve spermatogenesis and ovulation. Was detected the effect of the components of the methanol subextract of leaves of anisillo on fertility in rats, using the method of Rani Srivastava S. et al (2004) with modifications. 36 normal rats strain Holtzmann  $150 \pm 20$  g acquired by the NIH, were distributed randomly into three groups of 12 animals, six males and six females, together since the beginning of the administration of substances, orally for 18 days: Group 1, saline 2 mL / kg; group\_2, anisillo 200 mg / kg, and Grupo3 metoclopramide 15 mg / kg; evaluation indicators were in males: Testosterone expressed as ng / dL in females: the state of pregnancy, prolactin (ng / ml), estrogen (pg / ml), progesterone (ng / ml). The subextract of anisillo administered in male rats showed minor variations of testosterone ( $p < 0418$ ); in females: there were more pregnant rats ( $p < 0022$ ), the size of fetuses or the advancement of the state of pregnancy was higher ( $p < 0009$ ), there were increases estrogens, progesterone and prolactin. To increase the pregnancy of female rats treated with the subextract of anisillo, was detected flavonoids and alkaloids which may have allowed the improvement of spermatogenesis and ovulation.

**Key words:** *Tagetes filifolia*, flavonoids, pregnancy, prolactin.

A quien debe dirigirse la correspondencia. Email: pabloenriquebr@yahoo.com

## INTRODUCCION

*Tagetes filifolia* "anisillo" "anís serrano", Asteraceae de uso medicinal originaria de Perú, crece abundantemente en el Departamento de Ayacucho, localidad de Tambillo, a una altitud entre 2800 a 3000 msnm<sup>1-4</sup> y según la etnobotánica, la medicina popular y antropológica, a sus infusiones de la parte aérea y su aceite esencial se le atribuyen usos como alivio de afecciones de las vías digestivas, promueve la secreción láctica y la fertilidad. En una búsqueda constante de los investigadores de encontrar productos que regulen la fertilidad, al presente, se hace necesario encontrar compuestos químicos procedentes de productos naturales que mejoren la espermatogénesis y la ovulación, porque la sociedad moderna frente a los factores ambientales y estresantes conlleva a un incremento de la infertilidad (5). En Ecuador existe la planta *Tagetes pusilla* con actividad antiinflamatoria y para desórdenes digestivos (6-7). El extracto y fracciones de *Tagetes minuta* han mostrado diferentes grados de actividad antiinflamatoria (8).

Los Flavonoides son compuestos fenólicos distribuidos ampliamente en la naturaleza y han demostrado tener una gran actividad biológica, principalmente como antioxidante. (9), (10), (11), (12). El presente trabajo de investigación pretende demostrar la acción de los metabolitos secundarios presentes en el subextracto metanólico de anisillo sobre la fertilidad en ratas normales y el efecto sobre hormonas sexuales.

## MATERIALES Y METODOS

### Lugar de ejecución

Laboratorios del Instituto en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y en los Laboratorios del Instituto de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

La muestra vegetal de anisillo fue recolectada en el departamento de Ayacucho localidad de Tambillo(1-4).

### Descripción botánica y clasificación taxonómica

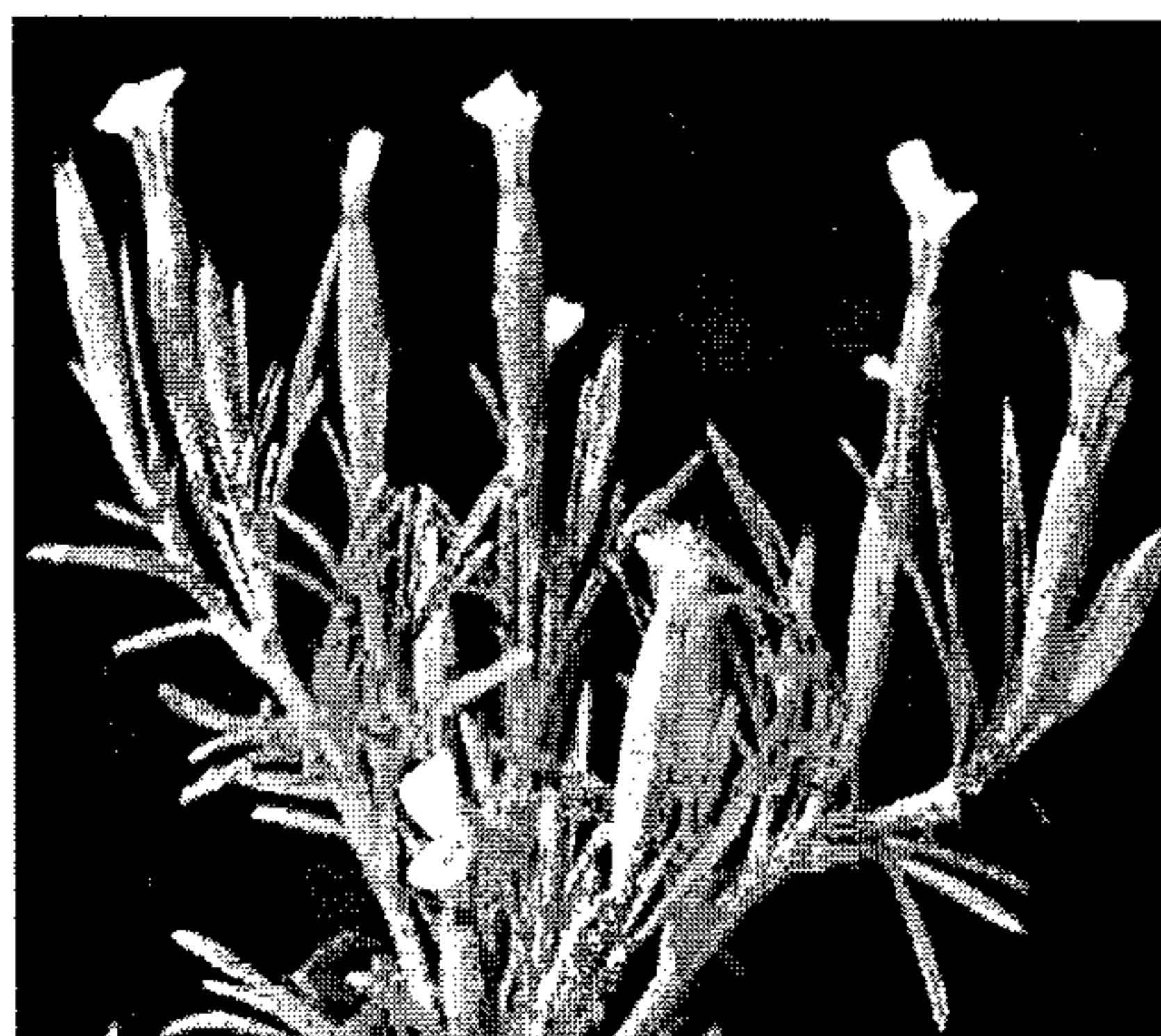
El anisillo o anís serrano es una hierbita ampliamente distribuida en lugares perturbados y abiertos, o en pastizales. Es conocida por su olor

aromático y agradable; se utiliza por lo general en infusión. Nombres comunes usados en español: Anisillo, cirucumín, flor de Santa María, hierba anís, pericón, periquillo y manzanilla<sup>4</sup>.

### Taxonomía:

Reino: Plantae Subreino: Traqueobionta  
Superdivisión: Spermatophyta  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida (dicotiledoneae)  
Subclase: Asteridae  
Orden: Asterales.  
Especie: *Tagetes filifolia*

Fig. 1. *Tagetes filifolia*



### Preparación de la muestra

Las hojas de anisillo fueron secadas bajo sombra, terminándose de secar en una estufa temperada a 38°C, luego fueron pulverizadas en un molino a cuchillas, guardándose los polvos en frascos de color ámbar para una buena conservación y su posterior tratamiento químico y biológico.

### Obtención de extractos

Se hicieron extracciones por maceración etanólica de porciones de 200 g de polvo de hojas de anisillo en un litro de etanol puro, durante siete días, al cabo de este tiempo se filtró y concentró a sequedad en una estufa de aire circulante a 38°C, se obtuvo el vextracto etanólico total seco E.

A partir del extracto etanólico total se fraccionó mediante cromatografía en columna rápida con solventes de polaridad creciente, se obtuvo los subextractos en n-hexano, diclorometano, metanol y agua destilada.

**Marcha fitoquímica del subextracto metanólico E<sub>1</sub> de hojas de anisillo**

Con reactivos de coloración y precipitación: gelatina, ninhidrina, tricoloruro de fierro, hidróxido de sodio al 5%, reactivo de Mayer, reactivo de Dragendorf, α naftol + gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mg de Mg metálico + gotas de HCl y un tubo se deja como blanco para poder observar el cambio de coloración (9-14).

**Análisis cromatográfico del extracto E<sub>1</sub>**

Con el subextracto metanólico E1 se realizaron estudios cromatográficos para detectar y visualizar el número de los metabolitos secundarios presentes. Mediante cromatografía en capa delgada analítica utilizando como fase fija silicagel G 60 y como fase móvil diclorometano: metanol 6:1, se observó que las cromato placas al ser reveladas a la luz UV a 366 nm, luz UV a 254 nm, tricoloruro de fierro, acido sulfúrico al 50% y con reactivo de Dragendorff dió los siguientes resultados: compuestos fenólicos (flavonoides, fenilpropanoides, taninos), glucósidos y alcaloides (9-14).

Componentes del extracto metanólico E<sub>1</sub> de hojas de anisillo: cinco compuestos fenólicos y flavonoides; dos alcaloides.

**Cromatografía analítica en capa fina del extracto metanólico E<sub>1</sub> de hojas de "Tagetes filifolia"**

FASE FIJA : Silicagel G-60 para ccf.  
 FASE MÓVIL : Diclorometano : Metanol 6:1  
 REVELADORES: Luz Uv 365 y 254 nm; Reactivo de Dragendorff; Reactivo FeCl<sub>3</sub>.

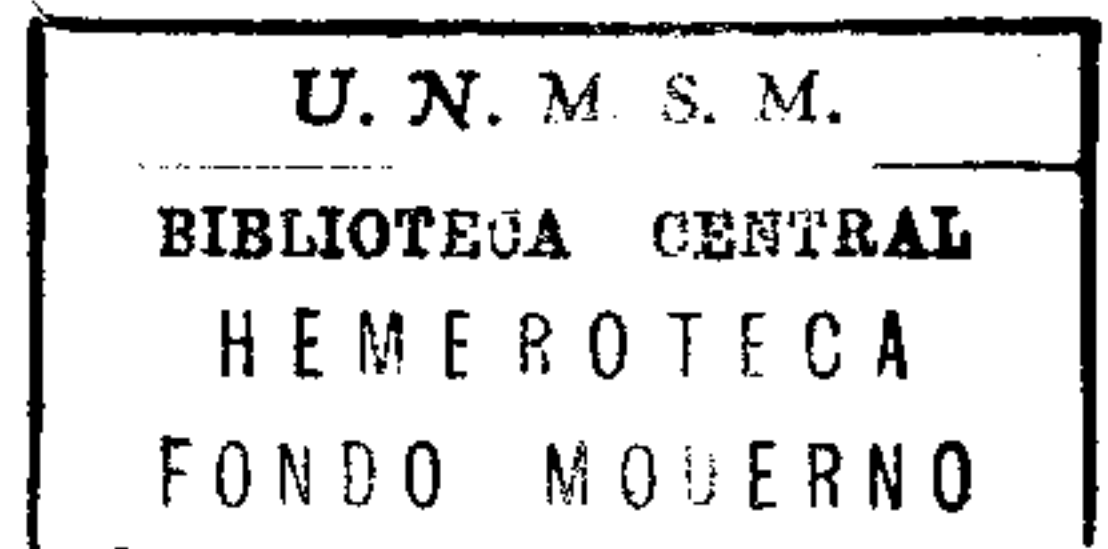
**Efecto sobre la gravidez, la prolactina y hormonas sexuales de los metabolitos secundarios contenidos en el subextracto metanólico de hojas de anisillo.**

**Método y procedimientos**

Se siguió el método de Rani Srivastava S. et al (15-18) con modificaciones. Se dispuso de 36 ratas cepa Holtzmann de 150 ± 20 g adquiridas del Instituto Nacional de Salud MINSA, con agua y alimento a libertad, que estuvieron juntos (machos y hembras en una misma jaula) desde el inicio de la administración de las sustancias, las que fueron administradas por vía oral durante 18 días. Grupo1 Normales 6 machos y 6 hembras, ambos recibieron suero fisiológico 2 mL/kg. Grupo2 Normales 6 machos 6 hembras, ambos recibieron 200 mg/kg del subextracto metanólico de hojas de anisillo, diariamente por vía oral. Grupo3 Normales 6 machos 6 hembras, ambos recibieron metoclopramida 15 mg/kg, diariamente por vía oral.

**Indicadores de evaluación**

En machos: testosterona expresada en ng/dL. En hembras: gravidez, estado de la gravidez, dosaje de prolactina (ng/mL), estrógenos (ng/mL) y progesterona (ng/mL) (19-23).



**RESULTADOS**  
 Tabla 1.

**Marcha fitoquímica del subextracto metanólico de hojas de anisillo E<sub>1</sub>**

Reactivo	Resultado	Presencia de:
Gelatina	+	Taninos
Tricoloruro férrico	+++	Compuestos Fenólicos
NaOH 5 % (Bortranger)	+	Quinonas
Mayer	+	Alcaloides
Drangendorf	+	Alcaloides
α Naftol + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	++	Glicósidos
Mg metálico + HCl	++	Flavonoides

(+++) abundante, (++) regular, (+) poco.

Efecto sobre la Gravidéz, la Prolactina y Hormonas Sexuales en Ratas del Subextracto Metanólico de Hojas de *Tagetes Filifolia* "Anisillo"

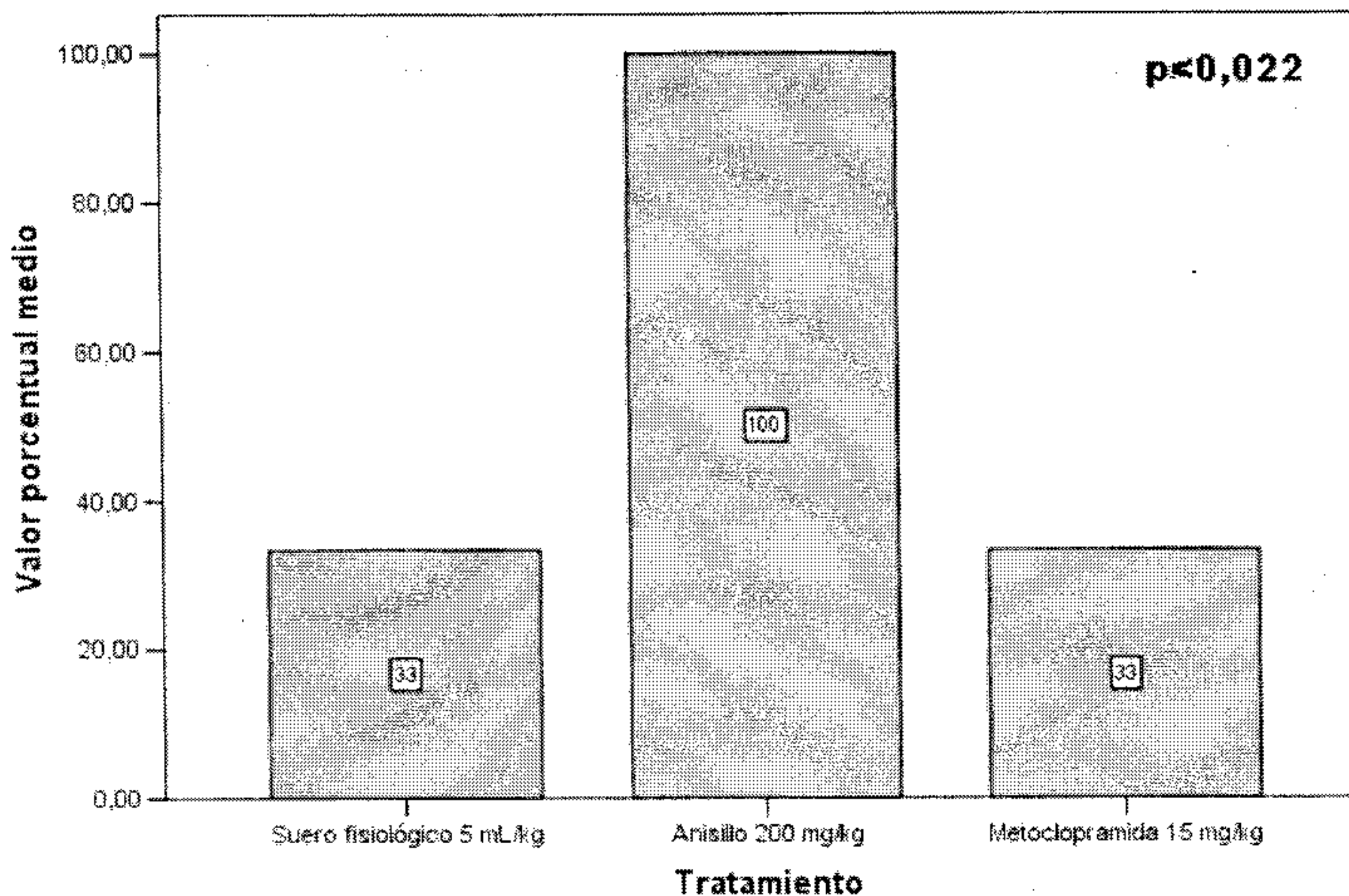


Fig. 2. Efecto sobre la gravidéz en ratas hembras por la administración oral del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo).

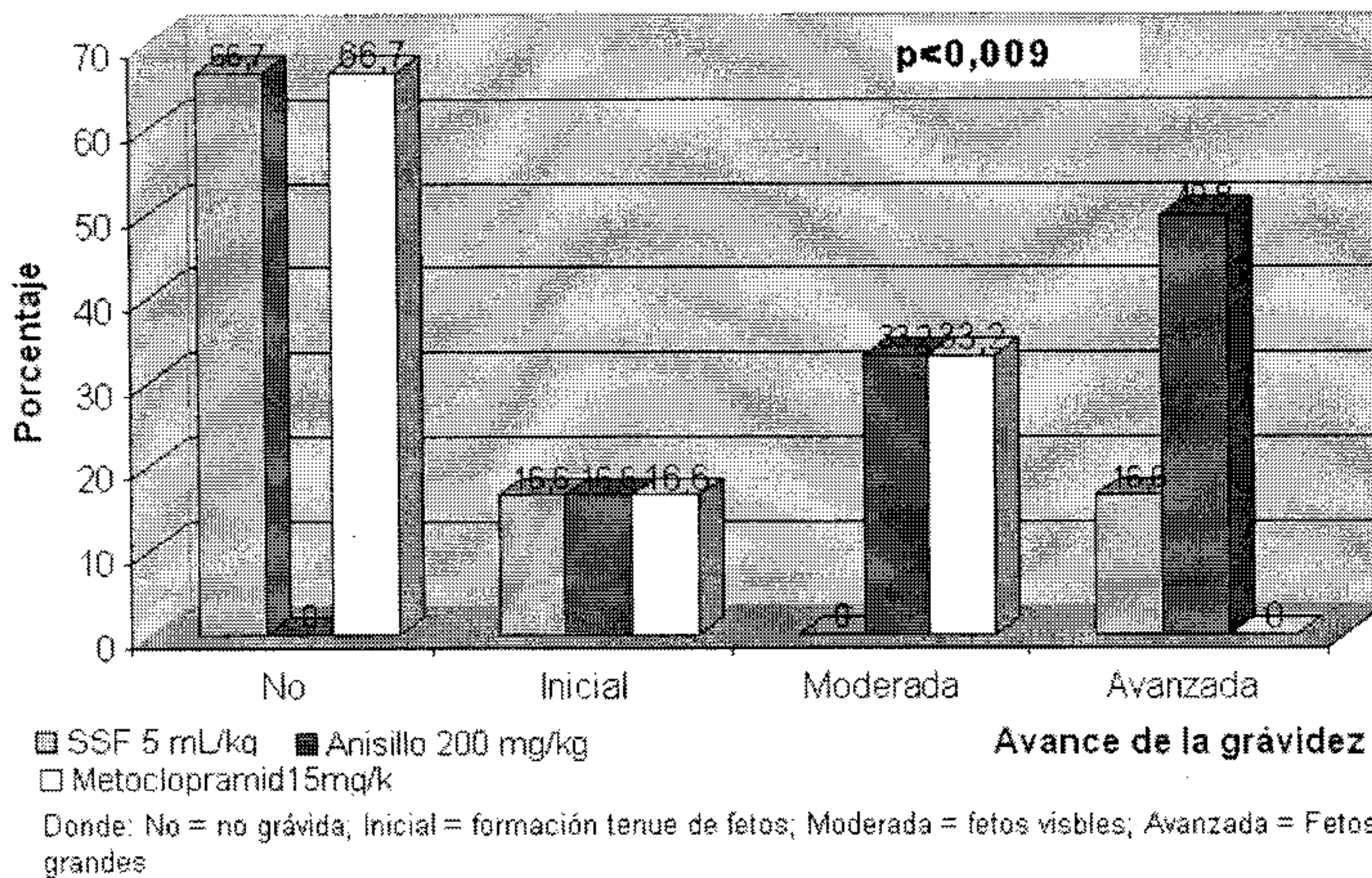


Fig. 3. Efecto sobre el avance de la gravidéz en ratas hembras por la administración oral del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo).

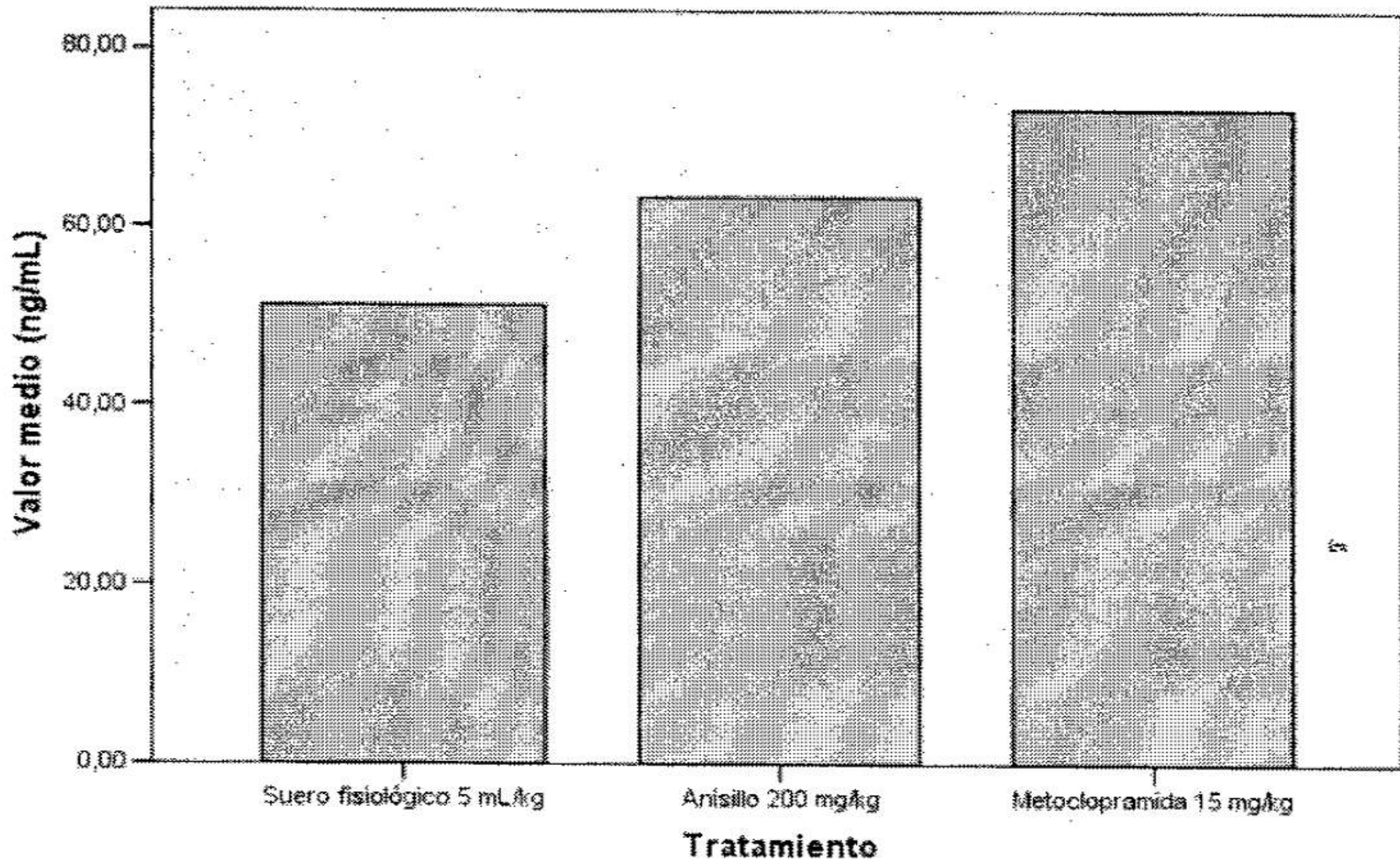


Fig. 4. Efecto sobre la prolactina en ratas hembras grávidas por administración oral del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo).

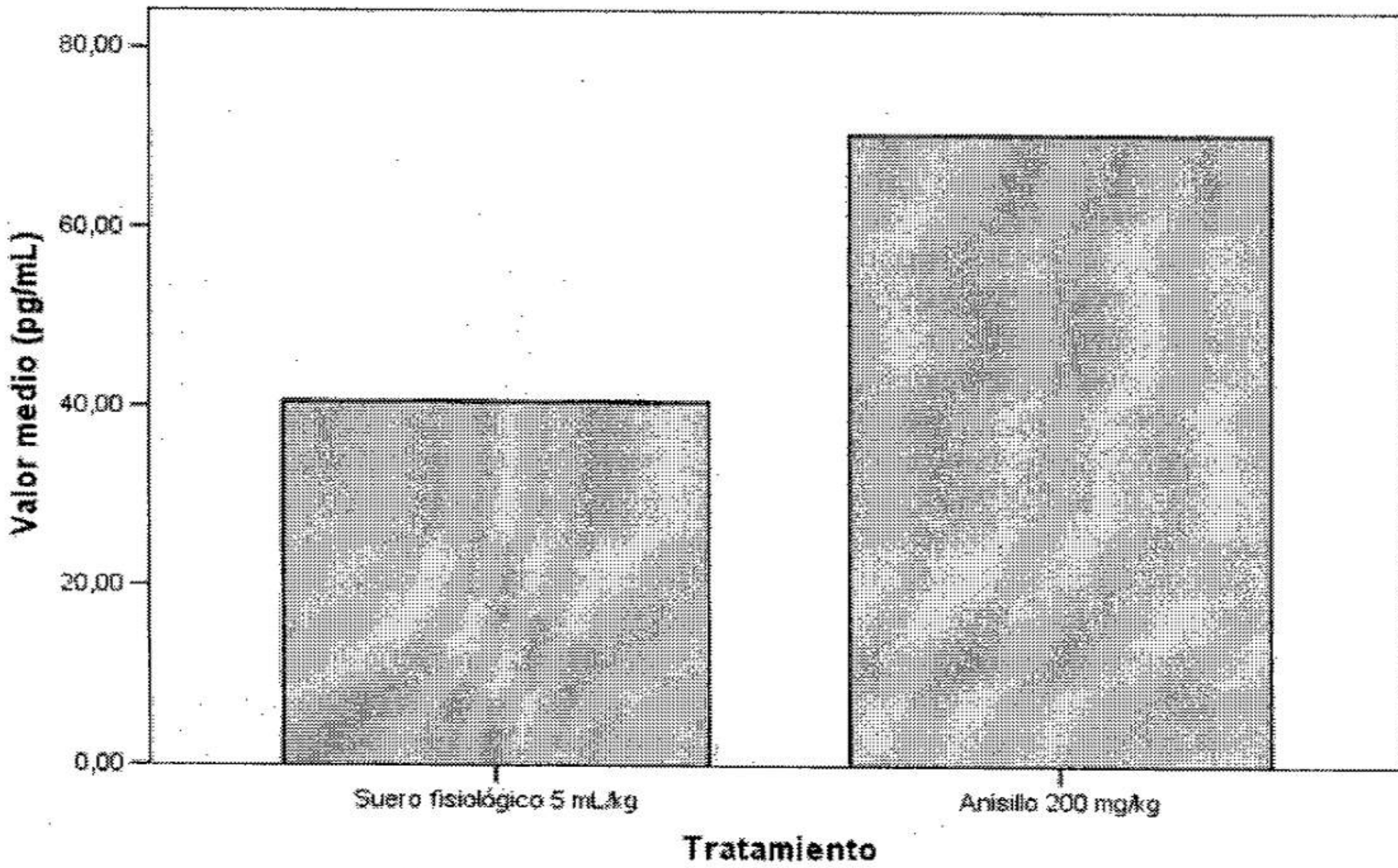


Fig. 5. Efecto sobre los estrógenos en ratas hembras grávidas por administración oral del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo).

Efecto sobre la Gravidez, la Prolactina y Hormonas Sexuales en Ratas del Subextracto Metanólico de Hojas de *Tagetes Filifolia* "Anisillo"

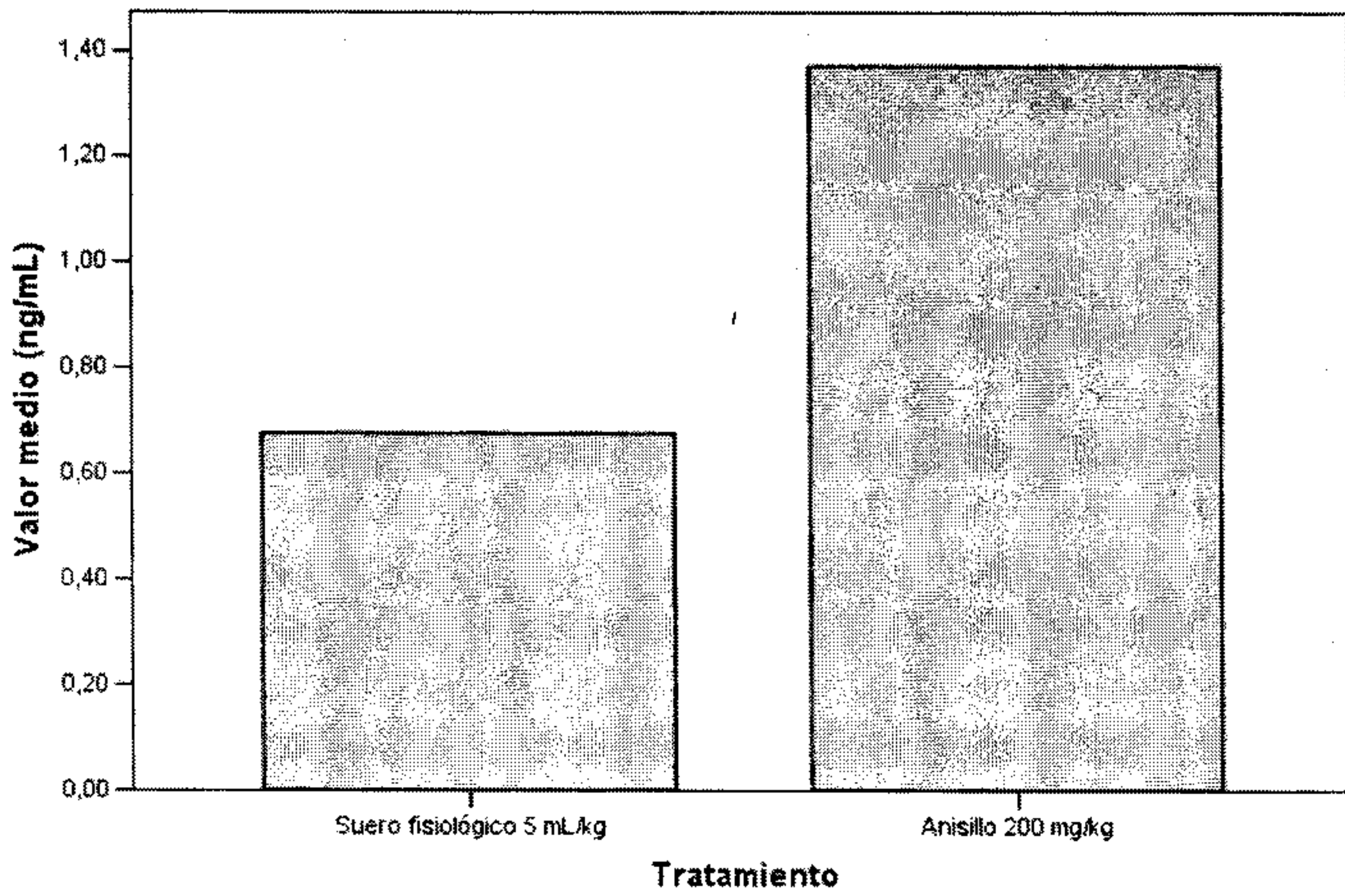


Fig. 6. Efecto sobre la progesterona en ratas hembras grávidas por administración oral del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo).

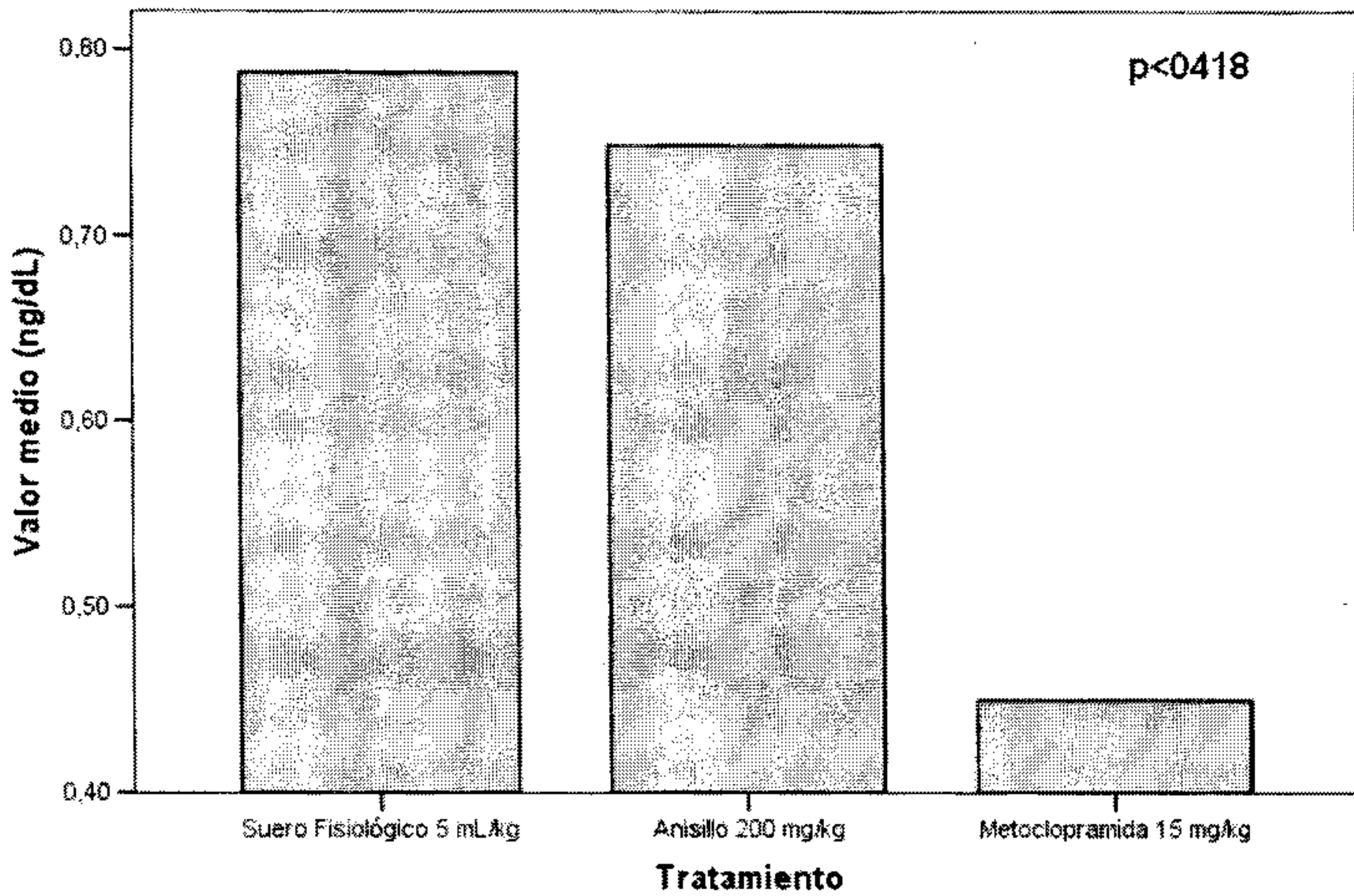


Fig. 7. Efecto sobre la testosterona en ratas macho por administración oral del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo).

## DISCUSIÓN

La muestra vegetal investigada *Tagetes filifolia* "anisillo" "anís serrano", cuyo sinónimo es *Tagetes pusilla*, de la familia Asteraceae. Las hojas de anisillo secadas a 38°C, molidas se guardaron en frascos ámbar para una buena conservación y su posterior tratamiento. Se obtuvo el extracto E por maceración etanólica de 200 g de polvo de hojas de anisillo en un litro de etanol puro, durante siete días, al cabo de este tiempo se filtró y concentró a sequedad en una estufa de aire circulante a 38°C. A partir del extracto etanólico total seco E se fraccionó mediante cromatografía en columna rápida con solventes de polaridad creciente: n-hexano, diclorometano, metanol y agua destilada. Se obtuvo el subextracto metanólico E<sub>1</sub> con el que se realizaron los ensayos químicos y biológicos.

Se realizó el ensayo de solubilidad de E<sub>1</sub> con solventes de polaridad creciente, observándose que los componentes químicos mayoritarios son de mediana y alta polaridad. Mediante la marcha fitoquímica, se evidenció la presencia mayoritaria de compuestos fenólicos como flavonoides, y alcaloides en menor cantidad, los que fueron confirmados mediante cromatografía en capa delgada analítica y a escala preparativa. Con el subextracto metanólico E<sub>1</sub> se realizaron estudios cromatográficos para detectar y visualizar el número de los metabolitos secundarios presentes, mediante cromatografía en capa delgada analítica utilizando como fase fija silicagel G 60 y como fase móvil diclorometano : metanol 6:1, se observó al ser reveladas a la luz UV a 366 nm, luz UV a 254 nm, triclóruo de hierro, ácido sulfúrico al 50% y con reactivo de Dragendorff, compuestos fenólicos como flavonoides, y alcaloides (9-14). Generalmente las causas de infertilidad en hombres incluye anomalías en el semen o espermatozoides, desórdenes en el transporte y azospermia; así como también alteraciones en los testículos y la producción de esperma por ellos. La causa de infertilidad en las mujeres es variada: alteraciones tubáricas, desórdenes en la ovulación tales como amenorrea, menstruación anovulatoria, anovulación esporádica. La espermatogénesis es afectada por numerosos nutrientes y enzimas tales como vitaminas (C, E, B<sub>12</sub>) (19-20), minerales (zinc, cobre, selenio, calcio) (21), aminoácidos (22), coenzima Q10 (23).

Se estudió el efecto sobre la gravidez, sobre prolactina, estrógenos y progesterona en ratas hembras, además del efecto sobre la testosterona en ratas macho, por administración oral del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo). Treintiseis ratas holtzmann normales, se distribuyeron al azar en tres grupos de 12 animales cada uno, a su vez cada grupo estaba formado por seis machos y seis hembras, permaneciendo los machos y hembras de cada grupo juntos, las que fueron administradas por vía oral durante 18 días: Grupo1, suero fisiológico 2 mL/kg; Grupo2, anisillo 200 mg/kg; y, Grupo3 metoclopramida 15 mg/kg; los indicadores de evaluación fueron en machos: testosterona expresado en ng/dL; en hembras: estado de la gravidez, prolactina (ng/mL), estrógenos (ng/mL), progesterona (ng/mL).

Los resultados indicaron que el extracto de anisillo administrados en ratas machos, mostraron variaciones mínimas de testosterona ( $p < 0,418$ ); en hembras: hubo más ratas grávidas ( $p < 0,022$ ), el tamaño de los fetos o el avance del estado de gravidez fue mayor ( $p < 0,009$ ); asimismo, hubo incremento de estrógenos, progesterona y prolactina. En las condiciones experimentales se ha demostrado incremento de la gravidez de las ratas hembras que recibieron tratamiento con el extracto de anisillo.

En el anisillo se han identificado compuestos fenólicos como flavonoides y alcaloides, que posiblemente han permitido favorecer la mejora de la espermatogénesis y de la ovulación, por ello se ha observado mayor número de ratas grávidas comparativamente con el grupo control que solamente recibieron suero fisiológico (Fig. 2-7).

Queda por realizar ensayos experimentales que conduzcan a determinar los cambios morfológicos del testículo, epidídimo, espermatozoides, la influencia sobre la ovulación, el ciclo estral, y otros cambios en los órganos reproductivos tanto de ratas machos y hembras, para arribar a mayores explicaciones, así como elucidar estructuras de los componentes activos de la actividad biológica probada.

Luego, los componentes activos del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo), son flavonoides y alcaloides. En las condiciones experimentales indicadas el subextracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* (anisillo), incrementa la fertilidad de las ratas que las recibieron.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Brack Egg A.** 1999. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Cuzco: Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas.
2. **Soukup J.** 1987. Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana y Catálogo de los Géneros. Lima: Editorial Salesiana.
3. **Brako L, Zaruchi J L.** 1993. Catalogue of Flowering Plants and Gymnosperm of Perú. Kansas City: Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.
4. **Comisión Nacional para el conocimiento y el uso de la biodiversidad (CONABIO)** 1997. *Tagetes filifolia* Lag. [Revisado 10 nov 2007] Disponible en: [http://www.conabio.gob.mx/malezas-demexico/asteraceae/Tagetes\\_filifolia/fichas/ficha.htm](http://www.conabio.gob.mx/malezas-demexico/asteraceae/Tagetes_filifolia/fichas/ficha.htm).
5. **Jeong-Sook P, Gee-Young K, Kun Hana.** 2006. The spermatogenic and ovogenic effects of chronically administered Shilajit to rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 107: 349-353.
6. **Basten J.** 1981. Las Plantas Medicinales de los Kallawayas, 1st ed. La Paz: Proyecto Concern Bolivia. p. 145.
7. **Gupta M P.** 1995. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. In: M.P. Gupta (Ed.), Bogotá: Convenio Andrés Bello. p. 112, 126, 162.
8. **Tereschuk M, Riera M, Castro G, Abdala L.** 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology*. 56: 227-235.
9. **Bruneton J.** 2001. Plantas Medicinales. Fitoquímica y Farmacognosia. Zaragoza: Editorial Acribia.
10. **Villar del Fresno M.** 1999. Farmacognosia General. Madrid: Editorial Síntesis.
11. **Lock de Ugaz O.** 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales. 2º edición. Lima: Fondo Editorial PUCP. p.5.
12. **Kuklinski C.** 2000. Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas. Barcelona: Ediciones Omega.
13. **Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. CYTED.** 1995. Manual de Técnicas de Investigación. Bogotá: Edit. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
14. **Sharapin Nikolai.** 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoquímicos. Santa Fé: Convenio Andrés Bello.
15. **Mello F B, Jacobus D, Carvalho K, Mello J R B.** 2005. Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. *Toxicol.* 45: 459-466.
16. **Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. CYTED.** 1999. Manual de Técnicas Farmacológicas. Bogotá: Edit. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
17. **Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J.** 2004. Manual de Modelos Experimentales de Farmacología. Lima.
18. **Di Carlo G, Pacilio G, Capasso R, Di Carlo R.** 2005. Effect on prolactin secretion of *Echinacea purpurea*, *Hypericum perforatum* and *Eleutherococcus senticosus*. *Phytomedicine*. 12: 644-647.
19. **Sandler B, Faragher B.** 1984. Treatment of oligospermia with vitamin B12. *Infertility*. 7: 133-138.
20. **Rolf C, Cooper T G, Yeung C H, Nieschlag E.** 1999. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Human Reproduction*. 14: 1028-1033.
21. **Scott R, MacPherson A, Yates R W S.** 1998. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *British Journal of Urology*. 82: 76-80.
22. **Schacter A, Goldman J A, Zukerman Z.** 1973. Treatment of oligospermia with the amino acid arginine. *Journal of Urology*. 110: 311-313.
23. **Lewin A, Lavon H.** 1997. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Molecular Aspects of Medicine*. 18: S213-S219.