



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE FARMACIA

**EFFECTOS DEL ACEITE ESENCIAL DE RUDA (*Ruta graveolens*) SOBRE
PROCESOS REPRODUCTIVOS EN RATAS HEMBRAS. IDENTIFICACIÓN DE
PRINCIPIOS ACTIVOS**

Presentado por:

EDIS MARÍA GUERRA CRUZ

C.I.P. 4-168-1004

Trabajo de Graduación presentado como parte de los
Requisitos Para Optar por el Grado de
Licenciada en Farmacia

Asesoras:

Dra. Lisbeth Gómez Martínez

Dra. Viviana Morales V.

Chiriquí, República de Panamá 2015

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme alcanzar este logro dándome siempre, la fe y fortaleza para alcanzar mis metas.

A todas las personas que me apoyaron para culminar mi carrera y mi tesis, en especial a mi esposo, que estuvo presente en todo momento, apoyándome siempre incondicionalmente, sacrificándose para que pudiera alcanzar mis sueños. A mis hijas por su motivación y valiosa ayuda, gracias por su amor y paciencia que me impulsaron a seguir avanzando y terminar lo que había comenzado. A mi madre, mis hermanas, hermanos y a mis cuñadas, por sus palabras de apoyo.

Al igual quiero agradecer a mis compañeras de clases: Ruth, Liz Sabrina, Blanca, Johanna Lara, Johanna Olmos y Lauri, que estuvieron siempre presentes y me brindaron palabras de aliento a lo largo de mi carrera. Así también, a mis profesores, por sus consejos y enseñanzas.

Finalmente, con mucho cariño y agradecimiento, a mis asesoras de tesis, la doctora Lisbeth Gómez, por su amistad asesoramiento y ayuda, a la doctora Viviana Morales, pues sin vuestro apoyo no hubiera sido realidad este trabajo.

Muchas gracias a todos, Dios les bendiga.

RJS-TGB-16

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo a mi esposo Ángel Rodríguez, a mis hijas Yaris Mileth y Edis Lisbeth, por darme su apoyo y comprensión, por sus sacrificios en beneficio de mis metas. Ellos han sido el pilar fundamental en cada minuto de mi vida, gracias a ellos pude culminar esta etapa tan importante para mí: mi superación profesional.

A mi madre, mis hermanos y hermanas, en particular a mi hermana Celsa, por su ejemplo y consejos.

A mis cuñadas y amigas que siempre me brindaron palabras de aliento para seguir adelante y vencer aquellos obstáculos del camino.

De manera muy especial quiero dedicar mis sueños alcanzados a la memoria de mi padre, José Ángel Guerra, por enseñarme los valores fundamentales para conducirme con dignidad, orgullo y valor a lo largo de mi vida.

ABREVIATURAS

AER: Aceite esencial de ruda

CG/EM: Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas

CL: Cuerpo lúteo

CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución

E: Estrógenos

F.E: Fase estacionaria

FM: Fase móvil

FSH: Hormona Folículo estimulante

GNRH: Hormonas Gonadotrópicas

H: Hora

INDICASAT: Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología

LH: Hormona luteinizante

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: Principio Activo

P: Progesterona

Ruda: Ruta graveolens

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	ii
DEDICATORIA	iii
ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE GRÁFICAS	xi
RESUMEN	xii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 Planteamiento del problema.....	5
1.3 Justificación.....	5
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 Objetivo General.....	7
1.4.1 Objetivo Específico.....	7
1.5 Hipótesis.....	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	
2.1 Plantas medicinales y medicina reproductiva tradicional.....	10
2.2 Taxonomía de la ruda.....	12

2.3 Descripción químicos de la ruda.....	12
2.4 Componentes químicos de la ruda.....	13
2.5 Propiedades de la ruda.....	13
2.6 Generalidades sobre aceites esenciales.....	14
2.7 Aceite esencial de ruda.....	15
2.8 Extractos.....	15
2.8.1 Extractos Hidroalcohólicos.....	16
2.8.2 Infusión.....	16
2.8.3 Extracción de aceites esenciales.....	17
2.9 Marcha fitoquímica.....	17
2.10 Cromatografía.....	18
2.10. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG/EM.....	18
2.11 Ciclo menstrual.....	19
2.11.1 Fase folicular.....	20
2.11.2 Fase lútea.....	21
2.12 Ciclo estral de los mamíferos.....	22
2.13 Similitudes y diferencias entre ciclo menstrual y ciclo estral.....	25

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Área de muestreo.....	27
3.2 Determinación de condiciones físico-químicas.....	28
3.2.1 Humedad.....	28

3.2.2 Determinación de cenizas.....	28
3.3 Extracto hidroalcohólico de ruda.....	29
3.4 Concentración del extracto hidroalcohólico de ruta graveolens.....	29
3.5 Infusión acuosa de hojas de ruda.....	30
3.6 Extracción de aceite esencial de ruta graveolens.....	30
3.7 Marcha fitoquímica de ruta graveolens.....	31
3.7.1 Alcaloides.....	31
3.7.2 Taninos.....	32
3.7.3 Flavonoides.....	32
3.7.4 Terpenos.....	32
3.7.5 Glucósidos.....	33
3.8 Identificación de los componentes del aceite esencial mediante Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.....	33
3.9 Modelo biológico utilizado, ratas wistar.....	34
3.10 Administración subcutánea del aceite de ruta graveolens.....	34
3.11 Ensayo uterotrófico y determinación del ciclo estral.....	35
3.12 Análisis estadísticos.....	36

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de condiciones físico-químicas de ruta graveolens.....	38
4.2 Rendimiento del aceite esencial de ruda.....	38
4.3 Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de ruta graveolens.....	38
4.4 Citología vaginal y determinación del ciclo estral.....	40

4.5 Identificación de los componentes del aceite esencial de ruda.....	40
4.6 Resultados de la administración del aceite esencial de ruda sobre parámetros reproductivos de la rata hembra.....	43
4.6.1 Efecto del Aceite Esencial de <i>Ruda</i> sobre el peso de los ovarios después de administración subcutánea de Ratas Wistar Jóvenes..	43
4.6.2 Efecto del Aceite Esencial de <i>Ruda</i> sobre el peso de la Vagina Después de administración subcutánea a Ratas Wistar Jóvenes...	44
4.7 Porcentaje de Células en el frotis vaginal de ratas wistar hembras tratadas subcutáneamente con aceite esencial de ruda	46
4.8 Ganancia de peso en ratas wistar hembras tratadas subcutáneamente con el aceite esencial de ruda.....	50
 CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	
5.1 Conclusiones.....	53
5.2 Recomendaciones.....	54
 BIBLIOGRAFÍA.....	 55
 ANEXO.....	 61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1 Ruda (<i>Ruta graveolens</i> L.).....	11
Figura 2-2 Ciclo menstrual.....	19
Figura 2-3 Fases del Ciclo Estral de la rata y concentraciones de las principales hormonas.....	24
Figura 3-1 Ruda (<i>Ruta Graveolens</i>). Vivero San Pablo Nuevo.....	27
Figura 3-2 Concentración del extracto hidroalcohólico de ruda.....	29
Figura 3-3 Esquema de la extracción hidroalcohólica de ruda.....	30
Figura 3-4 Rata Wistar.....	34
Figura 3-5 Frotis Vaginal.....	35
Figura 4-1 Fases del ciclo estral de las ratas.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Descripción botánica de la ruda; <i>Ruta graveolens</i>	12
Tabla 4-1. Análisis físico-químico de las hojas de ruda porcentaje de humedad y porcentaje de cenizas.....	38
Tabla 4-2. Principales metabolitos secundarios presentes en la infusión y en el extracto hidroalcohólico de <i>Ruta graveolens</i>	39
Tabla 4-3. Componentes del aceite esencial de <i>Ruda</i> obtenido por Hidrodestilación Mediante análisis GC/MS.....	41

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 4-1. Media \pm D.S del peso del útero de ratas Wistar hembras jóvenes tratadas subcutáneamente con el aceite esencial de ruda.....	43
Gráfica 4-2. Media \pm D.S del peso de los ovarios de ratas Wistar hembras jóvenes tratadas subcutáneamente con el aceite esencial de ruda.....	44
Gráfica 4-3. Media \pm D.S del peso de la vagina de ratas Wistar hembras jóvenes tratadas subcutáneamente con el aceite esencial de ruda.....	45
Gráfica 4-4. Cada barra representa la media \pm DE del porcentaje de células observadas en el frotis vaginal de tres ratas por tratamiento observadas durante cuatro ciclos (25 días aproximadamente).....	47
Gráfica 4-5. Ganancia de peso en ratas tratadas subcutáneamente con aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i>	49

RESUMEN

Ruta graveolens L. (*Ruda*) es una planta perteneciente a la familia de las Rutáceas, utilizada en la medicina popular para el tratamiento de diversas afecciones. Debido a que esta planta es muy usada empíricamente en diversas condiciones a nivel del sistema reproductivo de la mujer, el objetivo básico de este trabajo fue el de evaluar los efectos de la ruda en algunos modelos biológicos representativos. Existen varios trabajos en los que se han evaluado preliminarmente estos efectos a partir de extractos acuosos ó hidroalcohólicos. Considerando que la ruda posee un fuerte aroma y que muchos de sus efectos se le atribuyen a su aceite esencial, en este trabajo evaluamos los efectos del aceite esencial de *ruda* en el ciclo reproductivo de ratas Wistar (hembras).

El aceite esencial se extrajo a partir de las hojas frescas de ruda, utilizando el método de hidrodestilación. Los principales componentes químicos del aceite esencial se determinaron por Cromatografía de Gases acoplado a Masa (CG/MS). Los principales componentes observados fueron 1,6-anhydro-4-(3,4-methylenedioxi)benzeno (18.13 %), 1-1.3-dimetil-3-butenil benceno (17.53 %), 2- fenil-etil-isobutanoato 9,40 % y el isomaturin (10.41 %).

En el modelo biológico se observó una dependencia de la dosis del aceite con un aumento significativo en el peso del útero (efecto uterotrófico), desequilibrio en el ciclo estral con predominio de células cornificadas en el frotis vaginal, aumento significativo en el peso de la vagina y ovarios de las ratas tratadas con respecto al control, y un marcado incremento en la ganancia de peso de los animales tratados con las dosis más altas con respecto al control. El ciclo estral fue alterado en

forma significativa observándose un marcado predominio de células nucleadas y cornificadas en el frotis vaginal, lo cual puede ser indicativo de una alteración a nivel de la función normal del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios, lo que puede estar relacionado con los efectos abortivo y de antifertilidad que se le atribuyen a la ruda.

Con base a estos resultados podemos concluir que el aceite esencial de ruda altera el ciclo estral de la rata (hembra) y produce efecto uterotrófico positivo. Estos efectos pueden estar relacionados con la alteración en algún proceso vinculado con la fisiología de las hormonas reproductivas de la rata. Un desequilibrio en los niveles y en la función de esas hormonas puede estar relacionado con los efectos abortivos y de antifertilidad que se le han atribuido a esta planta.

Palabras claves: Aceite esencial de *ruda*, extracto hidroalcohólico de *ruta graveolens*, infusión de ruda, ciclo estral, efectos uterotróficos, cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masa.

CAPÍTULO I ANTECEDENTES

1.1 Antecedentes

En la actualidad existe marcado interés a nivel mundial por el estudio de principios activos de origen natural, muy especialmente los provenientes del reino vegetal. Muchos de ellos están siendo utilizados, ya sea usando las plantas en su forma natural o como base en la síntesis o hemisíntesis de nuevos medicamentos.

Muchos de los principios activos utilizados por la moderna industria farmacéutica se han extraído de fuentes naturales, en base a las propiedades medicinales que han sido transmitidas tradicionalmente por el conocimiento popular.

Una de las plantas que ha despertado mayor interés por sus múltiples propiedades es la *Ruda (Ruta Graveolens)*, la cual es originaria del sur de Europa y del Mediterráneo Oriental, pero que en la actualidad ha sido introducida y naturalizada en muchos lugares del mundo. Esta planta fue descrita por Carlos Linneo en el año 1753 en sus primeros taxones *Species Plantarum* (Linnaeus, 1800).

Las propiedades emenagogas, antiesterilidad, y oxitócica atribuidas a la ruda, son algunos de los efectos que mayor interés han originado en varios grupos de investigación.

En la obra *Historia de las plantas de la Nueva España* (Hernández, 1959) relata que la ruda "mitiga los ardores de las fiebres, fortalece, y es remedio prontísimo y seguro para picaduras venenosas principalmente de los escorpiones, quita el ardor de los riñones, mitiga las inflamaciones de la garganta y los dolores del pecho".

Cervantes (1790), en su investigación "Ensayo a la Materia Médica Vegetal Mexicana", refiere que la planta es "resolutiva, carminativa, diurética, expelente y antihelmíntica y se usa también en la peste, histéria, epilepsia, cefalalgia y singulto".

Otros autores también han mencionado las propiedades de la ruda en el tratamiento de la amenorrea atónica, clorosis e histerismo; como antihelmíntica, resolutiva, carminativa, y antiespasmódica (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Al igual se ha mencionado por algunos autores la acción de la ruda sobre el útero, en las hemorragias pasivas o cuando dependen de la presencia de los restos de la placenta o del feto (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Martínez (1959), en su libro *Las Plantas Medicinales de México*, describe a la *ruda* como "antiartrálgica, antiespasmódica, antiparasitaria, antitusígena, emenagoga, diurética, tratamiento útil en la ciática, cefalalgias, oxitócica, útil en la inflamación del sistema respiratorio, astringente del vientre, analgésica y de utilidad en gastroenteritis". Cabrera (1943), la señala como "acaricida, antiepiléptica, antiespasmódica, antiparasitaria, oxitócica, para la amenorrea y la histeria".

Muñoz et al, (2001), en estudios realizados en tiras de músculo uterino de rata y de perra, notificaron un aumento significativo en la amplitud y duración de las contracciones del útero dependiente de la dosis del extracto de *ruda*. El efecto fue más marcado en rata.

Castro et al, (2011), demostraron in vitro, citotoxicidad del aceite esencial de *ruda* sobre el desarrollo embrionario de *Tetrapygus niger* (erizo de mar negro). La toxicidad se manifestó a concentraciones de 50 y 75 μ L, observándose alteración en la morfología de los óvulos, lisis, y retraso en el desarrollo de los embriones del erizo de mar.

En una investigación realizada por Solís et al., (2012), se observó que la *ruda* actúa sobre la musculatura uterina produciendo fuertes estimulaciones que dan lugar a hemorragias uterinas. Esto puede provocar el aborto en mujeres embarazadas.

En un trabajo de investigación presentado por González et al., (2007), se observó que la administración de 10 mg/kg del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *R. chalepensis*, en ratonas albinas preñadas, durante el periodo de post-implantación, produjo un efecto negativo en el peso del útero y en el peso de los fetos. También se evidenció presencia de malformaciones esqueléticas en los productos.

Pérez (2003), en un estudio sobre las plantas más utilizadas en distintos Estados de la República Mexicana, encontró que la *ruda* se usa en ese país como abortiva, agente antifertilidad y emenagoga.

Informes sobre el uso de la *ruda* en Egipto señalan que el zumo obtenido a partir de la parte aérea de la planta se aplica en forma de gotas para aliviar el dolor de oídos. El masticar las hojas de *ruda* ayuda a aliviar los vértigos, dolores de cabeza de origen nervioso y palpitaciones. Asimismo las hojas de *ruda*, se utilizan en infusión como abortivo, antiinflamatorio y antiespasmódico. La parte

aérea se emplea como emenagogo, hemostático, rubefaciente, tónico uterino y por vía tópica, para tratar esguinces y afecciones oculares (Tarek, 2013).

1.2 Planteamiento del problema

La Organización Mundial de la Salud define la medicina tradicional como el conjunto de prácticas, enfoques, conocimientos y creencias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados ya sea en forma individual o en combinación para mantener el bienestar y la salud.

Según los datos registrados por la OMS, muchas mujeres en los países de Latinoamérica, utilizan la medicina tradicional para cuidar su salud sexual y reproductiva, como uno de los usos más frecuentes. Existen diversas plantas consideradas por la OMS por sus efectos anti fertilidad y otras propiedades a nivel reproductivo en muchos países. Entre estas se encuentran varias especies de *ruda* (OMS, 2013).

1.3 Justificación

Los agentes reguladores de la fertilidad obtenidos de plantas, han sido de gran beneficio tanto para nuestros antepasados, como para aquellas comunidades alejadas de la civilización, en donde los fármacos anticonceptivos están fuera de sus posibilidades. Aunque muchas veces estas plantas son útiles para los propósitos deseados, a veces su uso empírico e indiscriminado puede dar lugar a efectos secundarios indeseables en la salud de quienes las consumen.

La Ruda (*Ruta graveolens*), ha sido utilizada para problemas reproductivos de la mujer desde tiempos ancestrales en muchos lugares del mundo incluyendo Panamá.

En varios países se han realizado estudios tanto para determinar los efectos de esta planta como para determinar sus principios activos (Madaleno, 2007). Varios estudios han demostrado dependencia en la constitución y calidad de principios activos que varían de acuerdo del sitio geográfico donde crezca la planta, efectos climáticos, la época y lugar de recolección, parte de la planta recolectada y de la forma de preparación de los extractos (Osorio, 2009).

En Panamá, aunque esta planta se utiliza para muchos de los propósitos que se han mencionado previamente, no existen estudios sobre la cuantificación de sus principios activos, ni sobre la evaluación farmacológica de sus efectos. En base a estas consideraciones el conocimiento de los metabolitos secundarios y los principios activos de la *Ruta graveolens* (*ruda*), cultivada en Panamá y la caracterización de sus efectos es de mucha importancia. Considerando que la ruda se usa ampliamente a nivel mundial, por sus efectos a nivel reproductivo a nivel mundial, en este trabajo se investigarán los componentes activos de esta planta en algunas de las formas de administración de mayor uso, en este caso infusión acuosa, el aceite esencial.

La *ruda* tiene un aroma penetrante, acre, muy particular, que para algunas personas es considerado desagradable. Sin embargo, según la tradición, este olor está relacionado con muchos de sus efectos, entre estos el antibacteriano, antifúngico y otros. Debido a que los aromas se relacionan con la presencia de aceites esenciales los cuales poseen múltiples propiedades farmacológicas, es

de interés determinar la relación entre los componentes de estos aceites y los efectos de las plantas. En la medicina tradicional la ruda se utiliza generalmente en infusión para uso oral y en preparaciones hidroalcohólicas para uso externo.

Es por ello que uno de los propósitos de este trabajo es el de determinar algunos de los principios presentes en el aceite esencial y en extractos acuosos e hidroalcohólicos de la *Ruta graveolens* cultivadas en Panamá y además determinar algunos de los efectos sobre procesos reproductivos en ratas Wistar hembras.

1.4 Objetivos

Los parámetros planteados en esta investigación son los siguientes:

1.4.1 Objetivos generales

Detectar posibles efectos del aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens*) sobre los procesos reproductivos en ratas hembras e identificar principios activos y metabolitos secundarios en extractos acuosos e hidroalcohólicos de plantas de ruda cultivadas en Panamá.

1.4.2 Objetivos específicos

- Extraer aceite esencial de *Ruta graveolens*, mediante un sistema de hidrodestilación.
- Determinar de forma cualitativa, metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólico y acuoso de *ruta graveolens*, mediante tamizaje fitoquímico.

- Identificar por Cromatografía de Gases-Masa, los principales componentes presentes en el aceite esencial de *Ruta graveolens*.
- Determinar los efectos del aceite esencial de ruda sobre el ciclo estral de la rata hembra y determinar los efectos sobre el modelo uterotrófico.

1.5 Hipótesis

El aceite esencial de *Ruta graveolens* (*ruda*), contiene principios activos que actúan a nivel de las funciones fisiológicas reproductivas de ratas Wistar hembras.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

2.1 Plantas medicinales y medicina reproductiva tradicional

Según la OMS (2013), la medicina tradicional es todo el “conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales”.

Dentro de la medicina tradicional la “herbolaria” (uso de plantas con propósitos terapéuticos), ha representado desde tiempos inmemoriales un valioso recurso para la mayoría de las culturas. Además de ser básica, en la búsqueda y preservación de la salud, ha cumplido propósitos espirituales, y mágicos. Aunque los productos farmacéuticos alopáticos, contribuyeron en forma importante a que el conocimiento y uso empírico de las plantas, fuera durante algún tiempo relegado en forma considerable de las prácticas terapéuticas, en años recientes, ese conocimiento tradicional ha cobrado nuevamente gran interés, ya que la medicina institucional en muchas regiones, diversos organismos internacionales relacionados con la salud, centros de investigación y la industria farmacéutica, invierten esfuerzo y dinero en la búsqueda de principios activos novedosos provenientes de plantas, que puedan servir de base para nuevos medicamentos y que puedan contribuir a solucionar los diversos problemas de salud que hoy afectan a la humanidad (OPS, 1999). De particular interés dentro del arsenal de plantas usadas en la medicina tradicional son aquellas que se utilizan para tratar diversos padecimientos de la mujer. Plantas usadas para evitar el embarazo, para producir abortos, ayudar en las labores de parto y aliviar los dolores durante la

menstruación y otros muchos padecimientos femeninos han sido usados tradicionalmente en todas las culturas. La *ruda* (*Ruta graveolens*) (figura 2-1) ha sido usada para estos y muchos otros propósitos terapéuticos a través de los tiempos y por múltiples culturas. Aunque es una planta que ha despertado el interés de algunos grupos de investigación, la base científica de muchos de sus efectos no ha sido completamente dilucidada.



Figura 2-1. Ruda (*Ruta graveolens* L.)

La *Ruda* (*Ruta graveolens*) es una planta originaria del sur de Europa y del Mediterráneo oriental, que ha sido introducida y cultivada en diversas partes del mundo, encontrándose actualmente en huertos y jardines tanto para propósitos ornamentales como medicinales (Nevada, 2010).

2.2 Taxonomía

La ruda (*R. graveolens*) pertenece a la familia de las Rutáceas. En la tabla 2-1 presentamos la clasificación taxonómica actual de la ruda según Carlos Linneo.

Tabla 2-1. Descripción botánica de la ruda: *Ruta graveolens*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Familia	Rutáceas
Subfamilia	Rutoideae
Género	Ruta
Especie	<i>R. graveolens</i>
Nombre Binominal	<i>Ruta graveolens</i> Linneo

Ruda (Ruta graveolens, Linneo). La clasificación taxonómica fue realizada por Carlos Linneo en el año 1753 en sus primeros taxones *Species Plantarum* (Nevada, 2002).

2.3 Descripción botánica

La *ruda* (Figura 2.1) es una planta arbustiva, leñosa en la base, que alcanza hasta un metro de altura. Su tallo es redondeado, fuerte y erguido, con ramas superiores herbáceas, leñosas en la base y cubiertas por una corteza rugosa (IICA, 2005). Las hojas de la *ruda* son alternas de color verde, subdivididas con

segmentos oblongos de 15 mm de largo. Estas contienen glándulas translúcidas donde almacenan el aceite esencial responsable de su olor característico. Las flores, son de color amarillo, pequeñas, agrupadas en ramillete. La flor central tiene 5 sépalos, mientras que las restantes 4 pétalos y 4 sépalos. Los pétalos son cóncavos. Los frutos son cápsulas redondeadas los cuales contienen las semillas que son de color negro (Nevada, 2010).

2.4 Componentes químicos de la *ruda*

De la *Ruta graveolens*, se han aislado más de 120 compuestos entre los que se encuentran el aceite esencial, rutina y otros flavonoides como quercetina, cumarinas, bergapteno, dafnoretina, isoimperatorina, naftoherniarina, psoraleno, rutamarina, rutarina, escopoletina y umbeliferona, taninos y alcaloides como arborinina, fagarina, ggraveolina, cocusaginina, rutacridina, 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona, entre otros. En la raíz se han encontrado lignanos como savinina y helioxantina (Ratheesh, 2009).

2.5 Propiedades de la *ruda*

A la *ruda* se le reconocen propiedades para calmar las molestias digestivas, para provocar la menstruación, las alergias, las infecciones bacterianas y el herpes. También posee propiedades antiinflamatorias y antiespasmódicas, previene el cáncer y protege el hígado (Solís, 2012).

A la *ruda* se le atribuyen además propiedades anticonceptivas, antiinflamatorias, fungicidas, herbicidas, emenagoga y citotóxicas (Ratheesh et al. 2009).

El extracto acuoso de la raíz y de las partes aéreas de la ruda ha mostrado propiedades anticonceptivas en rata (Gandhi et al., 1991).

2.6 Generalidades sobre aceites esenciales. Aceite esencial de *ruda*.

Los aceites esenciales son agentes volátiles, líquidos a temperatura ambiente, son incoloros o ligeramente amarillos, menos densos que el agua. Su índice de refracción es elevado. Son solubles en alcoholes y disolventes orgánicos habituales como éter o cloroformo y alcohol etílico. Se extraen generalmente por arrastre de vapor de agua (Guerra, 2012).

Los aceites esenciales contienen una mezcla de componentes volátiles, hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, esterés, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos), que son los que transmiten a los aceites el olor que los caracteriza (Saldaña et al., 2012).

Muchos de los aceites esenciales pueden presentar propiedades antiinflamatorias y anticonceptivas, las cuales están generalmente relacionadas con la presencia de flavonoides, terpenos, polifenoles, oligoelementos o sustancias antioxidantes (Saldaña et al., 2012).

Los aceites esenciales se clasifican en terpenoides y no terpenoides. En el grupo de los no terpenoides se encuentran sustancias alifáticas de cadena corta, componentes aromáticos, azufrados y nitrogenados.

Los terpenoides contienen unidades de isopreno, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos. Pueden ser alifáticos y cíclicos aromáticos.

Según los grupos funcionales pueden contener alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, hidrocarburos (Carrillo 2006).

2.7 Aceite esencial de *ruda*

El aceite esencial de *ruda* es de color amarillo, tiene olor fuerte, desagradable, "Por el frío se fija en cristales regulares, es notable por su solubilidad en agua, que es mayor que la mayoría de los demás aceites esenciales, se considera como la parte enérgica de esta planta" (Soubeiran, 1847).

El aceite esencial de *ruda* tiene propiedades como abortivo, emenagogo antiespasmódico, antibacteriano y antiséptico. Es eficaz para las pieles inflamadas, en eczemas y otros tipos de dermatitis. Posee múltiples acciones en el sistema reproductor femenino y es estimulante estomacal (Soubeiran, 1847).

El aceite esencial de *ruda*, en dosis altas es tóxico, provocando inflamación intestinal violenta, inflamación en lengua y laringe, excitación nerviosa seguida por fatiga, vértigo, confusión mental, temblor, nefritis, hinchazón uterina, daño al hígado, daño intestinal, y finalmente la muerte. En mujeres embarazadas puede provocar aborto (Asgarpanah, 2012).

Según Carrillo (2006), los aceites esenciales de *ruda* (*Ruta graveolens*), tuya, ajeno, tanaceto, sabina y enebro, poseen propiedades abortivas que son inherentes a los componentes terpénicos de tipo carburo o cetónico.

2.8 Extractos

Un extracto es la concentración de una sustancia, obtenida mediante la separación de la parte activa de la planta (semillas, flores, tallo, raíces y hojas)

con el uso de un solvente que puede ser (agua, alcohol, o una mezcla de estos) y un método de extracción adecuado.

2.8.1 Extractos Hidroalcohólicos

Un extracto hidroalcohólico, consiste en la separación de los principios activos de la planta al ponerla en contacto con un solvente o la mezcla de ellos, capaz de solubilizar dichos principios. Estos deben pasar de la planta al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido y un residuo (Nevada, 2010).

Para obtener un extracto hidroalcohólico se debe tener en cuenta las características de la materia prima vegetal como secado, tamaño de las partículas, el solvente, la temperatura, agitación, relación líquido-líquido y tiempo de contacto (Pérez, 2009).

La parte de la planta a utilizar se macera, se coloca dentro de un recipiente de vidrio, color ámbar de boca ancha, se agrega el alcohol y el agua a las concentraciones deseadas, asegurándose que la materia vegetal quede apenas cubierta por el solvente. El recipiente se tapa en forma hermética. Se deja en reposo por unos 8 a 10 días agitando periódicamente.

Posteriormente se filtra para separar el líquido del bagazo. El extracto se almacena hasta por 2 años en un lugar donde no le penetre directamente la luz (Pérez, 2001).

2.8.2 Infusión

La infusión es el método más antiguo utilizado por nuestros antepasados para extraer los principios activos de las hojas, flores, frutos y raíces de la materia

prima vegetal. Habitualmente las infusiones son el resultado de disolver un soluto en agua. El soluto será siempre la sustancia que va a ser disuelta en el diluyente (Tarek, 2013).

2.8.3 Extracción de aceite esencial

En el proceso de hidrodestilación, la materia prima vegetal se introduce en un balón de destilación de vidrio con fondo redondo (hidrodestilador) con agua, de manera que forme un lecho fijo compactado. Esta materia puede ser introducida en este balón molida, triturada o entera. Conforme la temperatura aumenta, a un máximo de 100 °C, se forma el vapor que entra en contacto con la materia prima. Por su volatilidad a medida que se calienta el aceite se va evaporando y es arrastrado, corriente arriba hacia el tope del hidrodestilador. La mezcla de vapor saturado y aceite esencial, fluye por el conducto de salida del hidrodestilador. La mezcla es enfriada a temperatura ambiente separada posteriormente por un decantador (Cerpa, 2007).

2.9 Marcha fitoquímica

La marcha fitoquímica o tamizaje fitoquímico, es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica. La misma permite determinar cualitativamente los principales componentes químicos presentes en las plantas. Este primer proceso es orientador para posteriores extracciones y/o fraccionamientos de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Palacios, 2008).

La marcha fitoquímica, se basa en la aplicación de reacciones de color, turbidez y precipitación. Este procedimiento permite una evaluación rápida, con

reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Por ejemplo, cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es muy probable que la acción farmacológica pueda estar en la fracción alcaloidal (Palacios, 2008). Esto puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometimiento a pruebas más específicas de estos compuestos (Villacrés et al., 1995).

2.10 Cromatografía

La cromatografía es un proceso físico que nos permite separar los componentes de una mezcla en la cual una, es una fase estacionaria y la otra es una fase móvil. A la vez se pueden estimar cuantitativamente los componentes.

2.10.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG/E

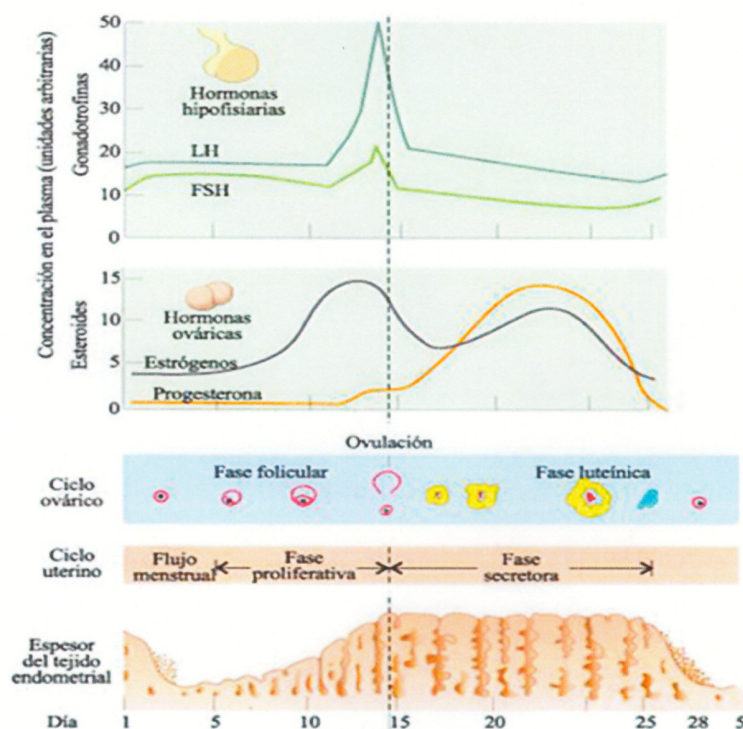
La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, es una herramienta muy útil para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas.

Durante las dos últimas décadas se ha demostrado que uno de los métodos más eficientes para el estudio de la composición de los aceites esenciales es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas CG-EM (Mérida 2012). Consiste en la separación de una mezcla de compuestos mediante una columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales que son detectados en el espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de un pico cromatográfico y se identifica

mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, actúa como detector registrando la corriente iónica generada en la fuente iónica. La corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado. La corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado. La representación gráfica constituye el cromatograma (Gutiérrez, 2002).

2.11 Ciclo menstrual

Con el inicio de la pubertad hasta la menopausia los ovarios femeninos van produciendo hormonas que tienen acción en varios órganos de su cuerpo (figura 2-2), algunas de estas hormonas dan lugar al ciclo menstrual.



La figura 2-2. Fisiología Reproductiva. Icarito (2012).

La menstruación o ciclo menstrual es el sangrado uterino o periódico de la mujer. En el periodo femenino ocurren cambios cíclicos que se dan paralelamente en el ovario como en el útero, se desarrollan en forma simultánea e interdependiente. La producción y control están dirigidos por el hipotálamo. Las hormonas que conforman el ciclo menstrual son los estrógenos y la progesterona, las gonadotrofinas hipofisarias FSH y LH y la hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH) del hipotálamo. El ciclo menstrual se puede dividir en dos fases, fase folicular y fase lútea:

2.11.1 Fase folicular

La fase folicular inicia el primer día de sangrado uterino y se extiende hasta el día anterior al pico sanguíneo de la hormona luteinizante (LH). Bajo la influencia de la FSH (hormona folículo-estimulante), comienza el desarrollo de varios folículos y solamente uno madurará en el curso de 10 - 12 días de un ciclo normal de 28 días. El folículo que madura y que está destinado a ovular se llama folículo De Graaf, y el proceso de ruptura del folículo destinado a liberar el óvulo se denomina ovulación. En esta etapa se producen varios cambios hormonales. Los estrógenos (principalmente estradiol E2) y la progesterona se encuentran en concentraciones reducidas; los niveles de FSH son crecientes, mientras que los niveles de LH son muy reducidos. Los niveles elevados de FSH estimulan el crecimiento folicular y la secreción de estrógenos, particularmente estradiol E2. A partir de los días 7 y 8, la elevación de estradiol es muy rápida y alcanza su pico máximo justo antes de la ovulación. Los niveles crecientes de estradiol producen una retro inhibición de la liberación de FSH y desencadena un rápido aumento de

LH. Justo antes de la elevación abrupta de LH comienza a elevarse la concentración en sangre de progesterona (Novalab, 2015).

2.11.2 Fase Lútea

La fase lútea comienza unas horas después de haber sido expulsado el ovocito del folículo maduro, mientras las células remanentes de la granulosa y de la teca sufren una transformación morfológica rápida que constituirá el cuerpo lúteo o amarillo en el ovario. El cuerpo lúteo secreta progesterona y una menor cantidad de estrógenos. Bajo la influencia de ambas hormonas, pero sobre todo de la progesterona, el endometrio comienza su fase secretora, que es indispensable en la preparación del útero para la implantación en caso de que el ovocito sea fecundado. La LH es responsable del mantenimiento del cuerpo lúteo durante esta etapa del ciclo. Si no hay implantación, el cuerpo lúteo degenera en unos cuantos días a cuerpo albicans conforme disminuyen las concentraciones hormonales. Esto lleva a desencadenar una nueva menstruación al desprenderse la capa decidual funcional del endometrio. Si ocurre fecundación e implantación, el cuerpo lúteo se mantiene y continúa secretando progesterona y estrógenos para mantener el embarazo, (Roos et al. 2007); (Sanín et al., 2011).

2.12 Ciclo estral de los mamíferos

El ciclo estral es el conjunto de procesos fisiológicos (Figura 2-3) que se presentan en algunos mamíferos. Estos se producen en el ovario a intervalos de tiempo cíclicos como consecuencia de las variaciones en los niveles hormonales. No obstante a diferencia del ciclo menstrual el ciclo estral se presenta por fases

periódicas diarias y está relacionado con características propias de cada especie, (Alcívar, 2011).

En la actividad reproductora de los animales suele presentarse un modelo cíclico impuesto por diversos factores tanto externos (temperatura, luz, oscuridad disponibilidad de alimentos, entre otros), como internos (ritmos endógenos, cantidad de vitelo a depositar en los ovocitos entre otros). En todos los casos conocidos, esta actividad reproductora está regulada, en última instancia, por el sistema endocrino. En los mamíferos es típico que el ciclo esté determinado por una fase conocida como "calor", "celo" o estro, único en el que la hembra permite la copulación (Mendiola, et al., 1993).

El Ciclo estral de la rata se define como el tiempo que transcurre entre un periodo de celo y el comienzo del siguiente. Su duración es variable en la especie, siendo en las hembras de rata y ratón de cuatro a cinco días, (Mendiola, et al., 1993).

Así pues la causa fisiológica básica del ciclo estral está en la liberación periódica de hormonas que determinarán los cambios en el aparato reproductor. Dado que la hembra de rata sólo recibirá al macho durante este período, la ovulación y la fecundación están perfectamente coordinadas.

De acuerdo a Mendiola, et al., (1993), el ciclo estral puede ser dividido en cuatro fases:

1. Proestro: serie de folículos ováricos, aproximadamente 12, crecen rápidamente aumentando también la secreción de estrógenos. El útero se va engrosando progresivamente. La mucosa vaginal sufre numerosas

mitosis, apareciendo células epiteliales nucleadas en el Frotis vaginal (figura 2-3) Duración aproximada de esta fase, 16 horas.

2. Estro: La secreción de estrógenos alcanza su nivel máximo inhibiendo la liberación de FSH y aumentando la de LH (hormona luteinizante), lo cual produce la ovulación. El útero permanece ensanchado. Tras la numerosa mitosis que sufre la mucosa vaginal, aparecen células epiteliales degeneradas, con forma poligonal, cornificadas y sin núcleo o con núcleo eosinófilo (figura 2-3). El estro tiene una duración aproximada de 20 horas.
3. Metaestro: Se forma en el ovario el cuerpo luteo, responsable de la secreción de elevados niveles de progesterona, característico de esta fase. La mucosa vaginal entra en regresión y es invadida por leucocitos, también se encuentran en el frotis células queratinizadas (figura 2-3). Esta fase dura más o menos 10 horas.
4. Diestro: Si no ha habido fecundación, durante esta fase se produce la regresión del cuerpo lúteo y disminuyen los niveles de estrógenos y progesterona. Como consecuencia, el útero se hace pequeño y poco contráctil. La mucosa vaginal es muy delgada y los leucocitos que emigran a través de ella constituyen la mayoría de las células del frotis vaginal; también se encuentran algunas células epiteliales nucleadas (figura 2-3). Duración de esta fase aproximadamente de 2 días y medio.

En caso de fecundación, el ciclo se interrumpe durante el período de gestación, cuya duración en la rata es de aproximadamente 21 días.

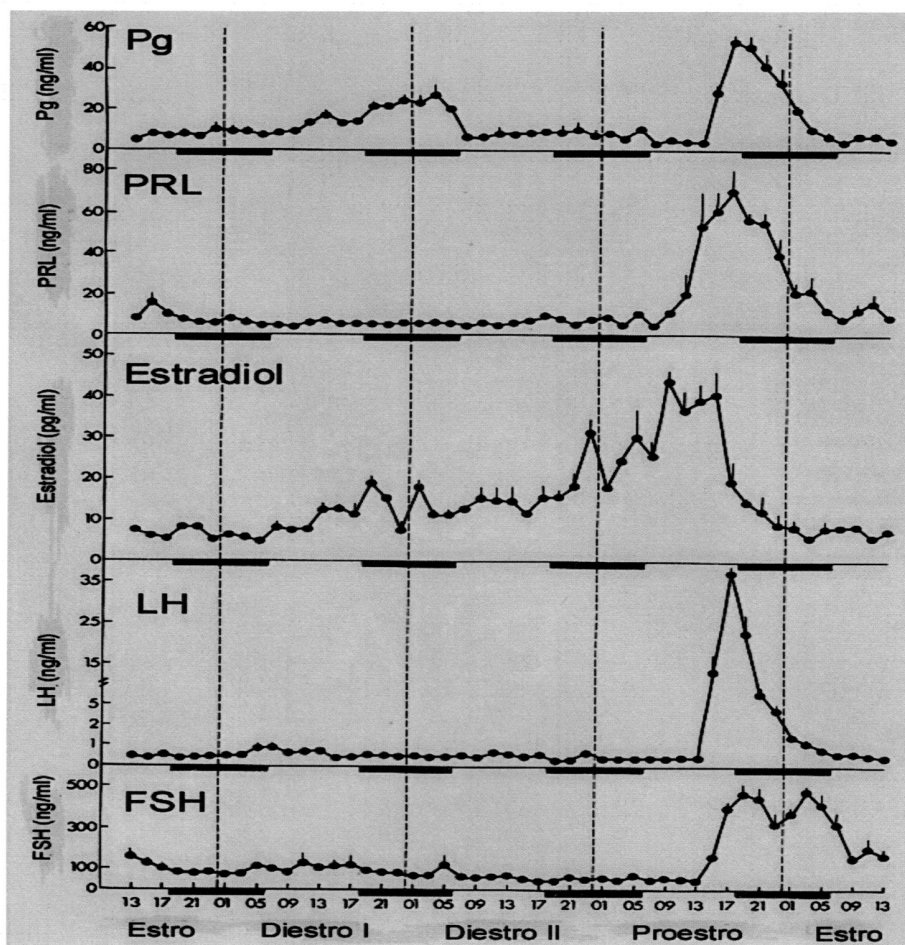


Figura 2-3. Fases del Ciclo Estral de la rata y concentraciones de las principales hormonas.

Las barras negras señalan las horas del ciclo en que generalmente ocurren los picos hormonales. Tomado de Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Neill J (Ed). Vol. 2. Elsevier. 3 ed.

2.13 Similitudes y diferencias entre ciclo menstrual y ciclo estral

A) Similitudes

Pico de LH induce la ovulación

OVARIO UTERO

Fase pre-ovulatoria = folicular = proliferativa

Fase post-ovulatoria = lútea = secretoria

Niveles de estrógeno superiores a los de progesterona en la fase pre-ovulatoria

Niveles de progesterona superiores a los de estrógeno en la fase post-ovulatoria

B) Diferencias

Ciclo menstrual

Fase lútea prominente

Cambios cíclicos notables en el endometrio uterino

Menstruación cíclica

Cambios cíclicos poco notables en el epitelio vaginal

Ciclo estral

Fase lútea atenuada

Cambios uterinos menos evidentes

No hay menstruación

Cambios prominentes en la morfología del epitelio vaginal

Rosa de la Cruz, Rosario Pásaro (1998)

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Área de muestreo

La planta de *ruda* (*Ruta graveolens*) (figura 3-1) fue recolectada inicialmente en la región de San Miguel de Bugaba, Provincia de Chiriquí (Latitud: 8.55 Longitud: 82.7333). Posteriormente fue cultivada en un vivero de la comunidad de San Pablo Nuevo (Latitud: 8.41667 Longitud: -82.5167). Todo el material vegetal utilizado se obtuvo en esta plantación (figura 3-1).



Figura 3-1. Ruda (*Ruta Graveolens*). Vivero San Pablo Nuevo.

De la materia prima vegetal recolectada, se tomó una muestra la cual fue depositada en el Herbario de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI), donde se le identificó como *Ruta graveolens* Linneos (*ruda*), del género *Ruta* de la familia de las *Rutáceas*.

3.2 Determinación de condiciones físico-químicas

La determinación físico-química, consiste en pruebas (humedad, cenizas entre otras) que se realizan a la materia prima vegetal ya sea pulverizada en trozos o extractos, y nos permite identificar las sustancias encontradas en dicha materia vegetal y determinar su concentración.

3.2.1 Humedad

Para determinar el porcentaje de humedad se pesaron 25 g de hojas de ruda (*Ruta graveolens*) en una balanza electrónica (Boeco, Germany, Modelo BBa 51). El material pesado se desecó en una estufa de aire forzado (Precisión Scientific, Modelo 625-A), por convección horizontal a 105 °C, con un flujo de aire de 4,2 m/s durante 2 horas. La determinación se hizo por duplicado.

3.2.2 Determinación de cenizas

Para la determinación del porcentaje de cenizas se utilizaron 11 g de hojas de ruda seca, la cual se distribuyó en crisoles previamente pesados en una balanza analítica (KERN Mod .AEJ 120-4M). Se introdujo en un horno mufla a 600 °C por 3 horas. Posteriormente se enfriaron los crisoles conteniendo la muestra hasta temperatura ambiente y se determinó su peso. El peso de las cenizas se obtuvo por diferencia entre el peso inicial del crisol y el peso final del crisol con la muestra seca.

3.3 Extracto hidroalcohólico de *ruda*

Las hojas de ruda fueron lavadas con agua destilada para eliminar impurezas. La extracción se realizó a partir 100 gramos de hojas frescas maceradas en 100 ml de una solución hidroalcohólica etanol-agua (70/30v/v).

Se almacenó el extracto en un frasco de vidrio color ámbar por 11 días realizándose agitación periódica.

3.4 Concentración del extracto hidroalcohólico de *ruta graveolens*

El extracto hidroalcohólico de *ruda* (figura 3-2) mencionado en 3.3.1 se filtró al vacío. Se obtuvieron como filtrado final 35 ml los cuales se concentraron hasta volumen final de 10 ml en un rotavapor BÜCHI (Suiza) modelo R-3.



Figura 3-2. Concentración del extracto hidroalcohólico de *ruda*

3.5 Infusión acuosa de hojas de *ruda*

Se pesaron 10 g de hojas de ruda y se añadieron 60 ml de agua. Se llevó a hervor en una plancha caliente (Modelo Kern 572). Se dejó hervir por 1 minuto. Luego se retiró del fuego, se enfrió a temperatura ambiente. Con este extracto se realizó posteriormente un tamizaje fitoquímico.

3.6 Extracción de aceite esencial *ruta graveolens*

La extracción del aceite esencial (figura 3-3) se realizó mediante el sistema de destilación por arrastre de vapor a partir de 450 gramos de hojas frescas de *Ruta graveolens*,



Figura 3-3. Esquema de la extracción hidroalcohólica de ruda.

en proporción 1:1 masa/ volumen. Este procedimiento se realizó ocho veces en igualdad de condiciones.

El aceite esencial obtenido por hidrodestilación se extrajo con Cloroformo de la siguiente manera:

En un embudo de decantación con capacidad de 250 ml se colocaron 25 ml del hidrodestilado al cual se añadieron 5 ml de Cloroformo como solvente extractor. Se agitó manualmente y se separó la fase orgánica de la acuosa. Esta operación se repitió cinco veces para cada destilado. La fase clorofórmica de las cinco extracciones se mezcló. Se añadieron aproximadamente 0.5 mg de Sulfato de Sodio anhidro a la mezcla clorofórmica para eliminar la humedad. Esta mezcla se llevó a evaporación a temperatura ambiente en una campana (CFAUT Mex 120). El volumen final recuperado de Aceite Esencial de Ruda a partir de 8 experimentos fue de 1.5 ml.

3.7 Marcha fitoquímica de *ruta graveolens*

Se identificaron los metabolitos secundarios de *Ruta graveolens* por las técnicas convencionales de reacciones de color y precipitación, a partir del concentrado del extracto hidroalcohólico y del extracto acuoso obtenido por infusión. La identificación se realizó en base a los siguientes procedimientos:

3.7.1 Alcaloides: En un tubo de ensayo se disolvió 1 ml del concentrado hidroalcohólico de ruda o del extracto acuoso obtenido por infusión en 3 ml de ácido clorhídrico al 10% v/v. Estos se filtraron en papel Whatman No 1.

Se pasaron tres fracciones de 1 ml del filtrado a diferentes tubos de ensayo,

- Tubo 1: Se le agregó 0.25 ml de Reactivo de Mayer,
- Tubos 2: Se le agregó 0.25 ml de Reactivo de Wagner
- Tubo 3: Se le agregó 0.25 ml de Reactivo de Dragendorff.

La aparición de turbidez y precipitado en cualquiera de las pruebas es indicativa de la presencia de alcaloides.

3.7.2 Taninos: Se utilizaron cuatro tubos de ensayo. A uno se adicionaron 0.5 ml del concentrado hidroalcohólico de *ruda* a otro 0.5 ml de la infusión de *ruda*, 1 ml de solución del reactivo de gelatina-sal. Los otros dos tubos se utilizaron como testigo, al cual se adiciono únicamente 0.5 ml del reactivo de gelatina-sal.

La aparición de un precipitado es indicativo de presencia de taninos.

3.7.3 Flavonoides: En dos tubos de ensayo se adicionaron trozos de viruta de magnesio, 3 gotas de HCL, 1 ml del concentrado hidroalcohólico de *ruda* y 1 ml de la infusión de *ruda*.

La aparición de color rojo es indicativa de presencia de flavonoides.

3.7.4 Terpenos: 0.5 ml del concentrado hidroalcohólico de *ruda* se mezcló con 1 ml de cloroformo, se dejó deslizar por las paredes del tubo 1 ml de ácido sulfúrico. También se realizó para la infusión.

La formación de color amarillo es indicativa de presencia de terpenos.

Durante la reacción una coloración azul verde durante el progreso de la reacción es indicativa de carotenoides.

3.7.5 Glucósidos: A 3 tubos de ensayo se adiciono 1 ml del concentrado del extracto hidroalcohólico de *ruda*, al cual se le agrego 2 gotas de los reactivos de Baljet, 2 gotas del reactivo de Grignard y 2 gotas de FeCl_3 , respectivamente. El mismo procedimiento se realizó con la infusión de *ruda*.

<La coloración anaranjada es indicativo de la presencia glucósidos.

3.8 Identificación de los componentes del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

La composición química del aceite se determinó en un cromatógrafo de gases de la Serie Agilent 6890 con un inyector de tipo "Split Splitless" (relación de Split 20:1), acoplado con un espectrómetro de masa de la serie Agilent 05973.

La espectrometría se llevó en modo scan de adquisición a 71eV. Se utilizó un analizador cuadrupolar a 150°C de temperatura; el detector trabajó en un rango de masas de 33-800 uma. La temperatura de la interfase y de la fuente fueron 280°C y 230°C respectivamente. Se utilizó una columna capilar HP-5 (Longitud: 30 m, diámetro interno: 0,25mm, f = 0,10mm) El volumen de inyección fue de 2 μL . La temperatura del horno fue programada: 60°C (2 minutos isotérmicos), seguido de una rampa de calentamiento hasta 100°C a razón de 4°C. min^{-1} , otra desde 10°C hasta 250°C donde permaneció por 5 minutos isotérmicos. Se utilizó Helio como gas portador, con un flujo constante de 1.0 μLmin^{-1} . La identificación de los compuestos se realizó mediante el uso combinado de las bases de datos automatizadas NBS-NISTASCI y Wiley 275 y el Atlas Registry of Mass Spectra Data.

3.9 Modelo biológico utilizado, ratas wistar

Se utilizaron ratas Wistar hembras (3 ratas por grupo) (Figura 3.4) con un peso entre 180 a 200 g, de aproximadamente 100 días de edad, las cuales se mantuvieron en el Bioterio del Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Autónoma Chiriquí, bajo condiciones controladas de temperatura (entre 23 y 25 °C), humedad entre 60 y 70 %, en un ciclo luz-oscuridad normal (luz de 7 a.m. a 7 p.m.) agua y alimentación (Lab Diet 5010) *ad libitum*.



Figura 3-4. Rata Wistar.

3.10 Administración subcutánea del aceite de *Ruta graveolens*

Los tratamientos se inyectaron por vía subcutánea en un pliegue del cuello de acuerdo al siguiente esquema:

Grupo 1: Control: 0.3 ml con aceite de oliva (vehículo)

Grupo 2: 75 μ l del aceite esencial de Ruda disuelto en 0.3 ml del vehículo

Grupo 3: 150 μ l del aceite esencial de Ruda disuelto en 0.3 ml del vehículo

Grupo 4: 300 μ l del aceite esencial de Ruda disuelto en 0.3 ml del vehículo.

Diariamente se registró la ganancia de peso, y se observaron diferentes parámetros macroscópicos de salud.

3.11 Ensayo uterotrófico y determinación del ciclo estral

Se utilizaron ratas hembras Wistar, a las cuales se les evaluó diariamente el consumo de agua y alimento. Previo al inicio del tratamiento se realizó seguimiento de por lo menos 4 ciclos estrales a las ratas (figura 3-5) asignadas al estudio, mediante frotis vaginal con el fin de reconocer los parámetros de ciclicidad normal de las mismas. Las ratas normales presentan generalmente un ciclo estral de 4 ó 5 días, en el que pueden ser reconocidas claramente 4 fases.



Figura 3-5. Frotis vaginal.

El *proestro* caracterizado por células epiteliales nucleadas; el *estro* caracterizado por células escamosas cornificadas de forma irregular el cual es representativo de una predominancia de hormonas estrogénica en el organismo. Durante el *estro* ocurre la ovulación, la rata presenta receptividad sexual. La presencia de células cornificadas y nucleadas en el frotis vaginal es considerado generalmente como índice de estrogenicidad. El *metaestro* se caracteriza por presencia de leucocitos y algunas células nucleadas y cornificadas y en el *Diestro 1* y *Diestro 2* hay predominancia de leucocitos.

Un día después de finalizado el tratamiento las ratas fueron sacrificadas por decapitación posterior a la anestesia por inhalación de éter. Se disecó el útero registrando su peso húmedo y seco (modelo uterotrófico). Se registró además el peso de vagina, y ovarios tanto húmedos como secos.

3.13 Análisis estadísticos

La comparación de los resultados de los diferentes grupos fue realizada mediante el programa ANOVA de una vía a un nivel mínimo de significancia estadística de $p \leq 0.05$. En caso de significancia estadística positiva los grupos fueron comparados posteriormente mediante el método Tukey. En todos los casos se utilizó el Programa GraphPad-Versión 6.01.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación físico-químico de las hojas de *ruta graveolens*

El porcentaje de humedad obtenido a partir de las hojas húmedas y el porcentaje de cenizas obtenido a partir de hojas secas de *Ruta graveolens* se muestran en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1. Análisis físico-químico de las hojas de ruda

Porcentaje de Humedad	Porcentaje de Cenizas
76.82% \pm 0.6%	50.97% \pm 0.3%

4.2. Rendimiento de la extracción del aceite esencial a partir de hojas de ruda

La hidrodestilación de las hojas de *R. graveolens* dio por resultado un aceite esencial ligeramente amarillo, con olor característico, cuyo rendimiento fue del 0.04% ml/g

Para obtener el porcentaje de rendimiento se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{[(\text{Volumen de aceite esencial} \times \text{Densidad}) / \text{Masa (g)}] \times 100}{(1.5 \text{ ml} \times 0.84 / 3600^* \text{ g}) \times 100} = 0.04\%$$

* 8 experimentos utilizando 450 g de hojas de ruda húmeda.

4.3 Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *ruta graveolens*

En la Tabla 4-2 Presentamos los resultados obtenidos al someter extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Ruda* a una batería de pruebas para la evaluación cualitativa de metabolitos secundarios de la planta.

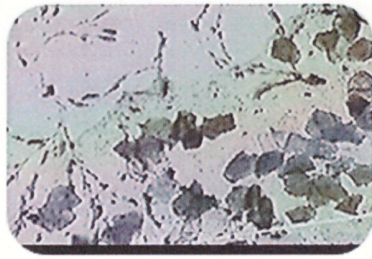
Tabla 4-2. Principales metabolitos secundarios presentes en la Infusión y en el Extracto hidroalcohólico de *Ruta graveolens*.

Reactivos	Metabolitos secundarios	Concentrado del Extracto Hidroalcohólico de <i>ruda</i>	Infusión de hojas de <i>ruda</i>
Dragendorff	Alcaloides	+++	+++
Wagner	Alcaloides	+++	+++
Mayer	Alcaloides	+++	+++
Prueba con gelatina	Taninos	+	-
Shinoda	Flavonoides	+	-
Liebermann	Triterpenos	+++	+
Baljet	Glucósidos	+++	-
Grignard	Glucósidos	+++	-
FeCl ₃	Glucósidos	+++	-

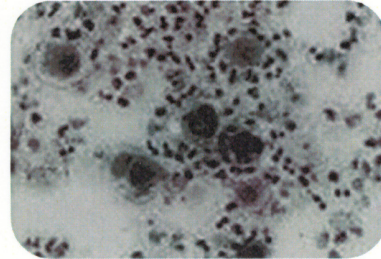
+++ Mayor cantidad; ++ Cantidad moderada; + Escasa cantidad; - no hay presencia.

Como puede observarse tanto en el extracto hidroalcohólico como en la infusión acuosa de *ruda* una alta presencia de alcaloides. Es notoria también la presencia de triterpenos y de glicósidos en el extracto hidroalcohólico. Saponinas, Taninos y glicósidos han sido encontrados en la raíz de *ruda* (Hashemi et al., 2011).

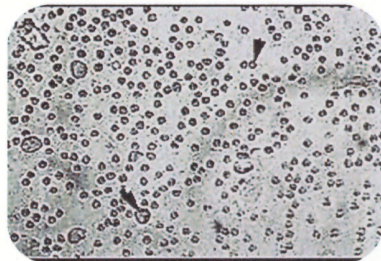
4.4 Citología vaginal y determinación del ciclo estral



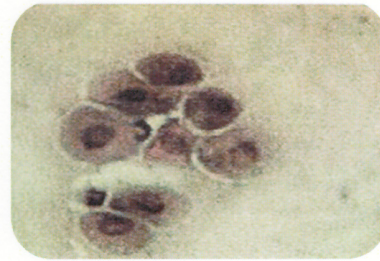
Estro: células epiteliales.



Metaestro: Células epiteliales y pocos leucos



Diestro: abundante leucocitos



Proestro: células nucleadas

Figura 4-1. Fases del ciclo estral. Tomado de João Lúcio dos Santos (2007)

Como puede observarse en la figura 4.1, el ciclo estral normal de las ratas hembras está conformado por abundancia de células epiteliales, leucocitos y células nucleadas.

4.5 Identificación de los componentes del aceite esencial de *ruda*

El análisis del aceite esencial de Ruda mediante GC-EM permitió la identificación de 12 compuestos los cuales se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4-3. Componentes del aceite esencial de Ruda obtenido por hidrodestilación. Mediante análisis GC/MS.

COMPUESTOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE RUTA GRAVEOLENS	TIEMPO DE RETENCION (TR) (min)	% EN LA MUESTRA
2 – nonanona	12.25	3.30
2- Nonanal	12.53	0.26
2 – decanona	15.44	0.35
2 – undecanona	18.42	12.46
2-metoxo-4-(2-propenyl)fenol	20.16	1.59
2 – dodecanona	20.40	1.74
2 - Tridecanona	22.76	1.80
3,4-metilendioxibencilacetona	26.12	3.77
2-feniletilisobutanoato	27.83	9.40
1,6-anhydro-4-(3,4-methylendioxane)	30.44	18.13
1-(1,3-dimetil-3-butenil)benceno	35.25	17.53
Isomaturin	37.74	10.41

Como puede observarse en la Tabla 4.3 los componentes que se encontraron en mayor proporción en el aceite esencial de *Ruta graveolens* cultivada en la Provincia de Chiriquí, República de Panamá, fueron: 1,6-anhydro-4-(3,4-methylendioxane) (18.13 %), 1-(1,3-dimetil-3-butenil) benceno (17.53 %), 2 – undecanona (12.46%), isomaturin (10.41%), 2-feniletilisobutanoato (9.40 %).

En menor proporción se obtuvieron otros componentes cetónicos y aldehídos. Algunos de los componentes presentes en el aceite esencial en la planta en estudio son similares a los encontrados en otras latitudes geográficas. Sin embargo se observan diferencias en cuanto al número y proporción de los mismos.

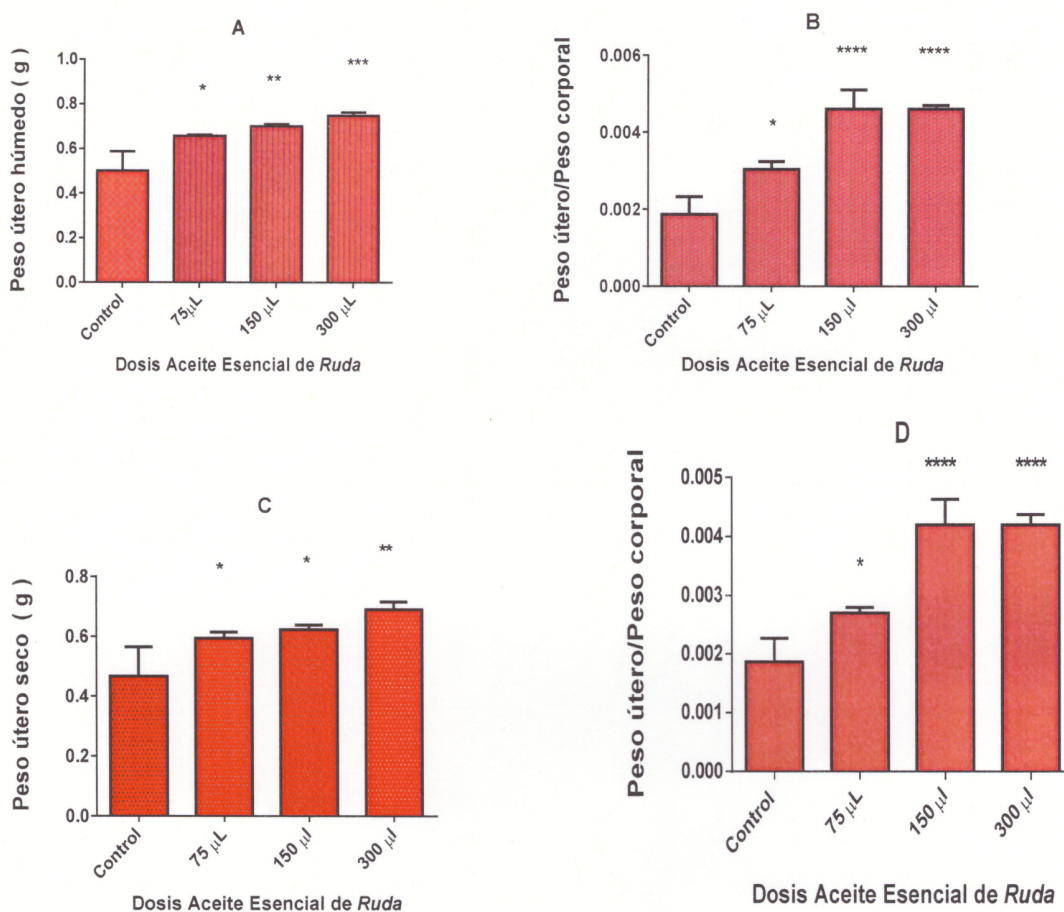
Las plantas originarias de Egipto Sayed et al., (2000) reportan como principales componentes 2- nonanal, 2-nonanona, 2-undecanona. De Feo (2002) reporta un 46.8 % de undecan-2-ona y 18.8 % de nonan-2-ona. En aceites esenciales procedentes de Irán se encontró 2, undecanona (33 %), y 2, heptanol acetato como componentes principales (Soleimani et al, 2009).

Las divergencias en cuanto a identidad y proporción de constituyentes se ha relacionado con factores climáticos, geográficos, tiempo y procedimientos de colección, procedimiento de extracción entre otras (Rojas et al., 2011), (Rustaiyan et al, 2002), (Fakhfast et al, 2012).

4.6 Resultados de la administración del aceite esencial de ruda sobre parámetros reproductivos de la rata hembra

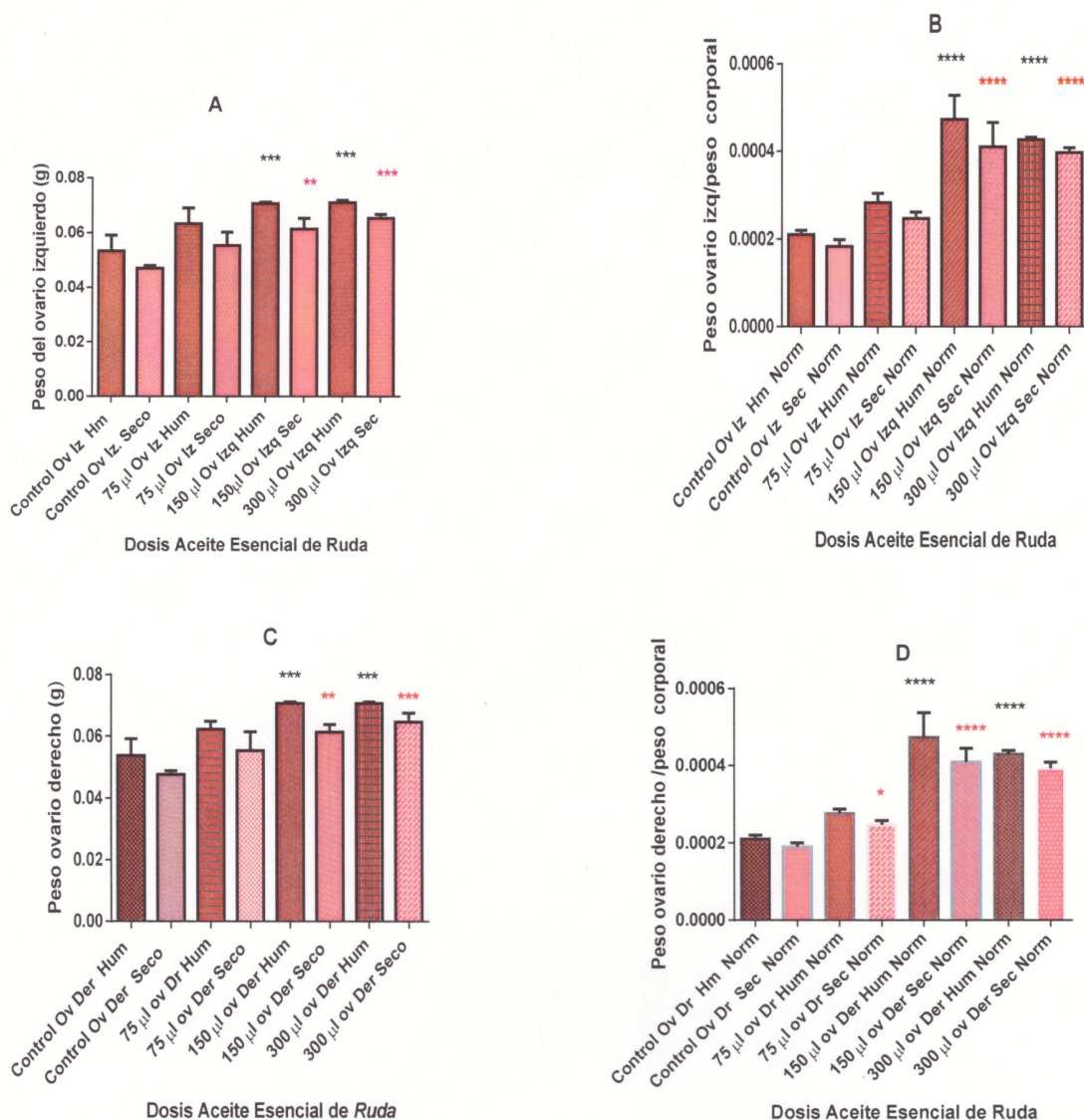
En las gráficas 4.1 a la gráfica 4.4 se muestran los resultados obtenidos después de administrar el aceite esencial de ruda a ratas hembras juveniles.

4.6.1 Efecto del Aceite Esencial de *Ruda* sobre el peso del útero



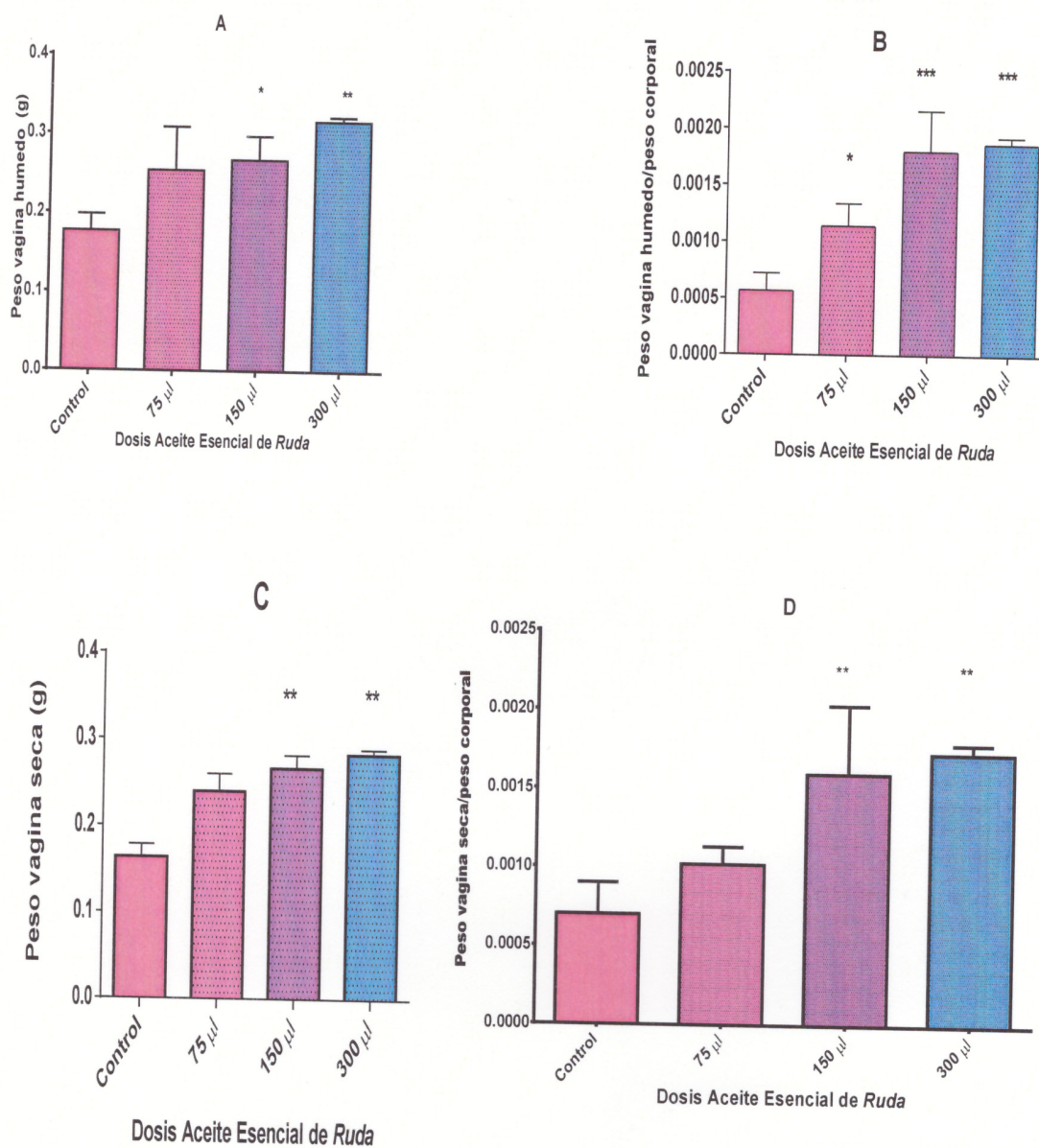
Grafica 4-1. Media \pm D.S del peso del útero de ratas Wistar hembras jóvenes tratadas subcutáneamente con el aceite esencial de ruda. Diferencias estadísticas * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ vs grupo control tratado con aceite de oliva. A: Peso absoluto húmedo; B: Peso útero normalizado por el peso corporal; C: Peso del útero seco, D: Peso útero seco normalizado por el peso corporal.

4.6.2 Efecto del Aceite Esencial de *Ruda* sobre el peso de los ovarios después de administración subcutánea a Ratas Wistar Jóvenes



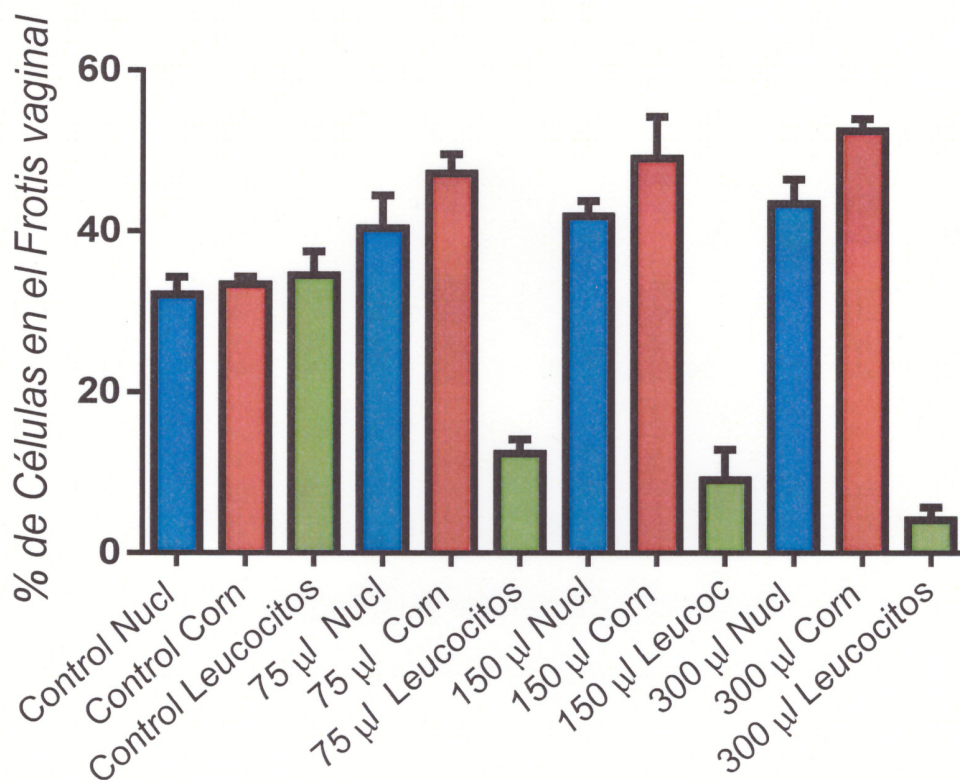
Grafica 4-2. Media \pm D.S del peso de los ovarios de ratas Wistar hembras jóvenes tratadas subcutáneamente con el aceite esencial de ruda. Diferencias estadísticamente significativas: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ vs grupo control tratado con aceite de oliva. A: Peso húmedo y seco del ovario izquierdo; B: Peso del ovario izquierdo normalizado por el peso corporal; C: Peso húmedo y seco del ovario derecho; D: Peso del ovario derecho normalizado por el peso corporal.

4.6.3 Efecto del Aceite Esencial de *Ruda* sobre el peso de la vagina después de administración subcutánea a Ratas Wistar Jóvenes.



Grafica 4-3. Media \pm D.S del peso de la vagina de ratas Wistar hembras jóvenes tratadas subcutáneamente con el aceite esencial de ruda. Diferencias estadísticamente significativas: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, vs grupo control tratado con aceite de oliva.

4.7 Porcentaje de células en el frotis vaginal de ratas wistar hembras tratadas subcutáneamente con aceite esencial de ruda.



Dosis Aceite Esencial de Ruda

Grafica 4-4. Cada barra representa la media \pm DE del porcentaje de células observadas en el frotis vaginal de tres ratas por tratamiento observadas durante cuatro ciclos (25 días aproximadamente).

El modelo uterotrófico es aceptado como uno de los más sensibles para evaluar la presencia de sustancias estrogénicas (Reel et al, 1996).

Los resultados mostrados en las gráficas 4.1-A-B-C-D claramente demuestran un efecto uterotrónico positivo. Esto es un aumento en los pesos del útero dependientes de la dosis del aceite esencial de ruda. Este aumento fue significativo tanto en el peso de los órganos húmedos como en el peso de los órganos secos. Con el fin de ponderar posibles errores relacionados con diferencias en peso corporal se normalizaron los pesos de los órganos en estudio en base al peso corporal de los animales. Estos resultados se muestran en las gráficas 4B y 4D, que como puede observarse demuestran un aumento ligeramente significativo en el peso del útero en animales tratados con 75 μ L del aceite esencial, efecto que es altamente significativo a las dosis de 100 y 300 μ L.

Los efectos estrogénico mostrados por el aceite esencial de ruda se corroboraron con la respuesta vaginotrónica que se observan en las gráficas 4.3-A, B, C, y D, y con un aumento significativo en el peso de los ovarios, resultados que se muestran en las gráficas 4.2 A, B, C y D. Esta respuesta también es dependiente de estrógenos por lo que este modelo también está considerado dentro de los altamente sensibles para medir respuestas estrogénicas (Reel et al, 1996).

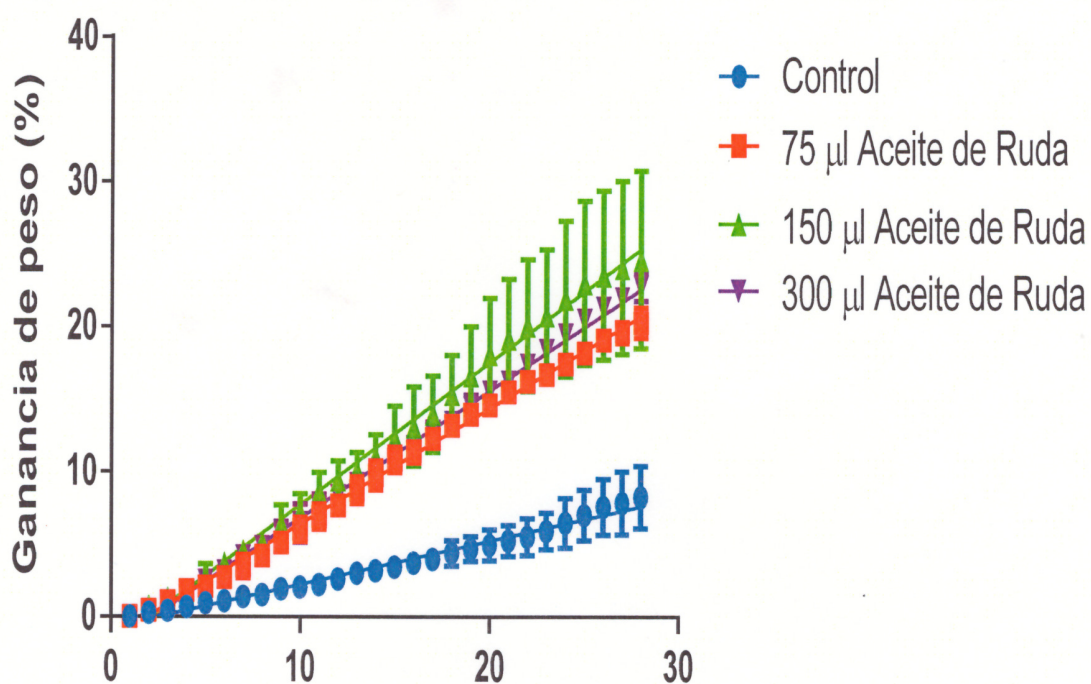
La evaluación de alteraciones en los patrones cíclicos del estro en la rata es otro parámetro altamente sensible para evaluar sustancias que alteran el ciclo hormonal. De allí que el monitoreo del ciclo estral mediante la observación del frotis vaginal es un modelo ampliamente aceptado para evaluar sustancias con potencial estrogénico (Reel et al, 1996). La presencia de xenoestrógenos se manifiesta generalmente con mayor proporción de células nucleadas y cornificadas y disminución en el porcentaje de leucocitos.

La gráfica 4.4. muestra los efectos de la administración de dosis crecientes de aceite esencial de Ruda por vía subcutánea sobre el ciclo estral y sobre el porcentaje de células nucleadas, cornificadas y leucocitos en el frotis vaginal. Durante el tratamiento los animales pasaron de un patrón cíclico antes del tratamiento a completa aciclicidad, con marcada presencia de células cornificadas y nucleadas en el frotis y prevalencia de las etapas de estro y metaestro, cambios que fueron dependientes de la dosis del aceite administrada. La estimación del porcentaje de células en el frotis se presenta en la Gráfica 4.4. Como puede observarse en los animales controles los tres tipos de células permanecen en equilibrio con un ligero predominio de leucocitos. El aumento de la dosis se correlaciona con una disminución significativa en el porcentaje de leucocitos y un aumento significativo dependiente de dosis de las células nucleadas y cornificadas con respecto al control. Estos efectos podrían estar relacionados con sustancias estrogénicas presentes en el aceite esencial. Aunque en el aceite esencial no hubo gran presencia de compuestos terpenoides, y flavonoides estos fueron abundantes tanto en los extractos acuosos como en los hidroalcohólicos. En el aceite esencial se presentaron compuestos aromáticos fenólicos que pueden ser responsables del efecto estrogénico. La actividad estrógenica reportada en estos resultados puede explicar los efectos emenagogo, antifertilidad y abortivo que se le atribuyen a la *Ruta graveolens*.

La interrupción de las alternancias de la fase folicular estrogénica y luteal (progestagénica), por una influencia de xenoestrógenos puede inhibir la secreción de hormona luteinizante y consecuentemente inhibir la ovulación. Igualmente si se inhibe la alternancia de la fase folicular hacia la fase luteal puede inhibirse la

implantación del blastocito. Este efecto antiimplantatorio puede contribuir también al efecto antifertilidad. Es conocido además que la contribución estrogénica en la última etapa del embarazo es básica. Aunque no está totalmente dilucidado el papel de los estrógenos estos estimulan cambios en el útero y en las membranas fetales necesarias para la labor y el parto. Los estrógenos se han relacionado además con cambios en la excitabilidad del miometrio y con el aumento de su sensibilidad a agentes uterotónicos y a la oxitocina (Messiano, 2001). Uno de los efectos atribuidos a la *Ruda* desde tiempos inmemoriales es el de abortivo y oxitóxico. Considerando los efectos fisiológicos de los estrógenos en el parto y en el útero embarazado, este efecto de la ruda podría también estar parcialmente relacionado con un aumento significativo de sustancias estrogénicas.

4.8 Ganancia de peso en ratas wistar hembras tratadas subcutáneamente con el aceite esencial de ruda.



Días de tratamiento con Aceite Esencial de Ruda

Grafica 4-5. Ganancia de peso en ratas tratadas subcutáneamente con aceite esencial de *Ruta graveolens*.

Cada punto representa la media \pm de la determinación diaria del peso de tres animales por cada tratamiento. El peso del primer día de tratamiento se tomó como porcentaje de referencia (0%).

No se observaron efectos macroscópicos indeseables en la salud de los animales tratados con el aceite esencial de ruda. Sin embargo, como se observa en la Gráfica 4.5, el aceite esencial de ruda indujo un aumento significativo en el

peso corporal, el cual fue dependiente de dosis. Este efecto ha sido observado previamente en machos tratados con extractos acuosos de la planta administrados por vía intragástrica ((Azar-Khoury & El-Awaki, 2005). Esto puede ser un efecto directo sobre aumento en el consumo de alimento, o efecto del aumento en estrógenos circulantes, sin embargo se necesitan posteriores experimentos para dilucidar los posibles mecanismos involucrados en este efecto.

CAPITULO V CONCLUSIONES

5.1 CONCLUSIONES

El Aceite esencial de la *Ruta graveolens* cultivada en Chiriquí, República de Panamá posee principios activos que se han encontrado también en plantas de la misma especie originarias de otras regiones, sin embargo existen diferencias en cuanto a la identidad, proporción y composición de los principios activos.

Es de considerar que dos de los principios que están presentes en casi todas las plantas estudiadas, también están presentes en alta proporción en la ruda nativa de Chiriquí, Uno de ellos es la 2-undecanona (12.46%) y el otro es la 2-nonanona (3.30%).

Un aspecto importante que puede considerarse característico de la planta nativa de Chiriquí es la presencia de 1,6-anhydro-4-(3,4-methylenedio)oxane, que constituye el principal componente (18.13%), el 1-(1,3-dimetil-3-butenil) benceno (17.53%) y un compuesto aromático el isomaturin (10.41%). Este último fue notificado por primera vez en plantas originarias de Irán pero también se ha encontrado en plantas originarias de Brasil y como constituyente también del propóleos procedente de varias regiones geográficas.

El aceite esencial de ruda mostró un significativo efecto uterotrófico, y vaginotrófico dependiente de dosis, lo que indica que posee algún componente que influye en forma agonista con la actividad hormonal relacionada con los receptores de estrógenos.

El efecto estrogénico de la ruda es confirmado por la alteración en el ciclo estral de la rata con alto predominio de células cornificadas y nucleadas en el frotis vaginal.

El potencial estrogénico observado puede explicar los efectos abortivos, de antifertilidad, emenagogos y oxitócicos que se le atribuyen a la Ruta graveolens en la medicina tradicional.

5.2 RECOMENDACIONES

En este estudio se demuestra por primera vez los mecanismos de acción involucrados en los efectos reproductivos de la Ruta graveolens originaria de Chiriquí Panamá, y una correlación directa de estos efectos con la dosis del aceite esencial. Este estudio sin embargo abre el campo para posteriores estudios de esta planta en los que se han aislado los principios activos y se establezca una correlación directa con los efectos específicos.

BIBLIOGRAFIA

- Alcivar J. (2011). Anestro Lactacional,
<https://es.scribd.com/doc/76105032/Anestro-lactacional>
- Asgarpanah J., Khoshkam R. (2012). Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Ruta graveolens* L. *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (23)
- Azar Khouri N, El-Akawi Z (2005). Antiandrogenic activity of *Ruta graveolens* L in male albino rats with emphasis on sexual and aggressive behavior. *Neuroendocrinology Letters* 26 (6) 823-829.
- Bellakhdar J. (1978). *Medicine Tradition et Toxicologie Ouest - Saharienne Contribution an'l'étude de la Pharmacopée Marocaine*. Ed. Techniques Nord – Africaines. Rabat, Marruecos.
- Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009). *Ruta graveolens*., <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=3&t=Rutagraveolens>.
- Carlson, B. (2005). *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. Ed. Elsevier. Madrid, Tercera edición.
- Cabrera L. (1943). *Plantas Curativas de México*. Ed. Cicerón, México.
- Campos F. (2009). *Ciclo Menstrual*, es.slideshare.net/fhcatgo/ciclo-menstrual
- Carrasco G. (2014). *Ciclo Menstrual y sus Trastornos*.
<https://es.scribd.com/doc/240564437/Ciclo-Menstrual-y-Sus-Trastornos>.
- Carrillo M. (2006). *Evaluación del Rendimiento de Aceite Esencial de Hinojo (Foeniculum Vulgare Miller) Procedente de Dos Niveles Altitudinales de Guatemala*. Tesis Ingeniería Química. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ingeniería Escuela de Ingeniería Química. Guatemala.
- Castro A., Juárez, J., Ramos N. (2011). *Elucidación Estructural del Aceite Esencial de *Ruta graveolens* L. (Ruda), Actividad antioxidante y bioensayo de*

Citotoxicidad. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Rev. Ciencia e Investigación, v.14, (1), 26-29.

-Cerpa M. (2007). Hidrodestilación de Aceites Esenciales: Modelo y Caracterización. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid, Departamento de Ingeniería Química y Tecnológica del Medio Ambiente. Valladolid.

-Cervantes V. (1889). Ensayo a la materia Médica Vegetal de México, (Edición de El Estudio), México, Secretaria de Fomento p. 50.

-Departamento de Salud y Servicios Humanos, para la Salud de la Mujer (2009). La Menstruación y el ciclo Menstrual.
<http://womenshealth.gov/espanol/publicaciones/nuestraspublicaciones/hojas-datos/menstruacion.pdf>.

-De Feo V., De Simone F., Senatore F (2002). Potential allelochemicals from essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 61 (5) 573-578 61-64

-Ducros A. (1930). Essai sur le Droguier Populaire Arabe de l'inspectorat des Pharmacies du Caire. *Memoires de l'Institut d'Egypte* v.15: (8), 1-162.

-El-Sayed N, Ammar N, Alokby S, Abou E, Mabry T. (2000). Bioactive chemical constituents of *Ruta graveolens*. *Revista Latinoamericana de Química* 28 (2).

-Fakhfakh N, Zouari S, Zouari M, Loussayef C, Zouari N (2012). Chemical composition of volatile compounds and antioxidant activities of essential oil, aqueous and ethanol extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L (Rutacea). *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (4) 593-600

-Gandhi M, Lal R, Sankaranarayanan A, Sharma P. (1991). Post-coital antifertility action of *Ruta graveolens* in female rats and hamsters. *J Ethnopharmacol*; v. 34(1). 49-59.

-Gonzales J., Beñavides V., Rojas R., Pino J. (2007). Efecto embriotóxico y Teratogénico de *Ruta Chalepensis* L. «ruda», en Ratón (*Mus musculus*), *Revista Peruana de Biología*, v.13 (3).

- González T. (2009). Citología del ciclo estral. Práctica de laboratorio de Biología de Animales III. <http://biologia.fciencias.unam.mx/bioanim3/estral.ppt>
- Guerra A., Panduro D., David H. (2012). Aceites y Grasas. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Facultad de Ingeniería Química, UNAPI quito-Perú.
- Gutiérrez M., Droguet M. (2002). La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de masas: Identificación de Compuestos Causantes de mal olor. Boletín Intexter (U.P.C.). N° 122
- Hashemi K, Sadeghpour H, Gholampour A, Mirzaei J (2011). Survey the antifungal effect of root ethanolic extract of *Ruta graveolens* on *Saprolegnia* Spp. Int. Con. Biotech. Environ. Manage. 18, 19-23.
- Hernández, F. (1959). Historia de las plantas de la Nueva España. In: Obras Completas. Universidad Nacional Autónoma de México: Imprenta Universitaria. México, D.F. Vol. 2. Pp. 227-229
- (IICA). Instituto Interamericano de Cooperación Para la Agricultura y Centro Para el Desarrollo de la Medicina Tradicional (CEDEMETRA). (2005). Plantas Medicinales y Otras Especies útiles, Diagnostico Situacional Sobre la Producción, Industrialización y Comercialización, Managua Nicaragua.
- Linnaeus, C. (1800). *Species plantarum* (Vol. 4). Universidad de Gante, Bélgica: Impensis G. C. Nauk.
- Knobil and Neill's (1994). *Physiology of Reproduction*. (Ed). Neill J., Vol. 2. Elsevier. 3 ed.
- Madaleno M. (2007). Etno-Farmacología en Iberoamérica, una Alternativa a la Globalización de las Prácticas de Cura. Cuadernos Geográficos, v. 41 p.p. 61-95.
- Martínez M. (1959). *Las Plantas Medicinales de México*. Editor Ed. Botas, v 4 p.656
- Mendiola P., Penalva A., Pérez F. (1993). Ciclo Estral de la Rata. Manual de Clases Prácticas de Fisiología Animal, Ed. J. de Costa, J.A. Madrid, S. Zamora, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, España. p.147. ISBN 84-7684-469-7.
- Mérida S. (2012). Estudio del Rendimiento y Composición del Aceite Esencial de Diferentes Poblaciones Silvestres de *Lippia Chiapasensis* Loes, del Altiplano

Occidental Guatemalteco. Tesis Licenciatura en Biología. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.

-Messiano F. (2001). The endocrinology of Parturition. En: *Frontiers in hormonal Research. Basic Science and Clinical Applications*. Roger Smith (Ed). Bassel Karger AG, Switerland, pp- 86-104.

-Muñoz A., Covarrubias S., Delena J., Pacheco U., Sánchez C., Alvarado J., Yahuaca P. (2001). Efecto de Extractos de *Ruta Graveolens* (*Ruda*) Sobre la Contractilidad de Útero de Rata y Perro, ex Vivo. 5ta Jornada de Investigación. Universidad Autónoma de Zacatecas, México.

-Nauroy J. (1954). Contribution a Etude de la Pharmacopée Marocaine Traditionnelle (drogues vegetales). Tesis Doctoral, Universidad de París. Ed. Jouve, París, Francia.

-Netter F. (2007). Colección Netter de Ilustraciones Médicas, Sistema Reproductor. Ed. Salvat, España V. 11, 108-109-113.

-Neira J. (2000). Fisiología Reproductiva, Curso de Formación General "Sexualidad, Fertilidad y Procreación". Pontificia Universidad Católica de Chile Escuela de Medicina - Facultad de Medicina Departamento de Obstetricia y Ginecología.

-Nevada G. (2010). Establecimiento de un Proceso de Obtención de Extracto de Ruda (*Ruta graveolens*), con Alto Contenido de Polifenoles. Tesis, Ingeniería Agroindustrial. Escuela Politécnica nacional, Universidad de Ingeniería Química y Agroindustrial. Quito.

-Novalab Ibérica, S.A.L. (2015). Ciclo de la Mujer.
<http://www.novalab.es/mujer/index.html>.

-OMS- Organización Mundial de la Salud (2013). Estrategia de la OMS Sobre Medicina Tradicional 2014-2023. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

-OPS.- Organización Panamericana de la Salud (1999). Medicinas y Terapias tradicionales, complementarias y Alternativas. Washington D.C. División de Desarrollo de sistemas y Servicios de Salud. Equipo de Medicina Tradicional. Departamento de Medicamentos Esenciales y Políticas de Medicina. OMS.

-Osorio E. (2009). Aspectos Básicos de Farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia.

-Palacios M. (2008). Introducción a la Farmacognosia. Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica.

-Pérez T (2009). Obtención de Extractos a Partir de Plantas medicinales. Grupo de Desarrollo y Biotecnología Industrial Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. www.monografias.com.

-Pérez L. (2003). Plantas Utilizadas en la Medicina Tradicional en México como Abortivas y Anticonceptivas. Tesis de Licenciatura. División de Ciencias Biológicas y de la Salud Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud Coordinación de Biología experimental, México.

-Pino O., Sánchez Y., Rojas M., Abreu Y., Correa T., Martínez D., Montes de Oca R. (2014). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta chalepensis* L. Rev. Protección Vegetal. vol.29 (3) La Habana Cuba.

-Ramírez L. (2006). El ciclo Estral y Menstrual, Universidad de Los Andes – Trujillo. Venezuela. Mundo Pecuario, v 2 (2) 30-31.

-Ratheesh M., Shyni, G., Helen A. (2009). Methanolic extract of *Ruta graveolens* L. Inhibits Inflammation and Oxidative stress in Adjuvant Induced Model of Arthritis in Rats. *Inflammopharmacology*, v 17(2). p.p 100-5.

-Reel J, Lamb C, Neal B. (1996). Survey and Assessment of Mammalian Estrogen Biological Assays for Hazard Characterization. *Fundamental and Applied Toxicology*. 34-288-305.

-Rodríguez J., (1991). Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Editorial Reverté, Cap. 8: p. 179.

-Rojas J, Mender T, Rojas L, Gullien E, Buitrago A, Lucena M, Cardenas N (2011). Estudio comparativo de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. recolectada en los estados Merida y Miranda, Venezuela. *Avances en Química* 6 (3) 89-93

-Ronco A., Garrido A. (2005). Cuantificación por Cromatografía y Espectrometría de un Pigmento Natural (Astaxantina). <https://www.ucursos.cl/ingenieria/2005/1/BT30A/1/material.../bajar>

-Rustaiyan A, Khossravi M, Sultani-Lotfabadi F, Yari M, Masoudi S, Monfared A (2002). Constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* L from Iran. . *Essent Oil Res.* 14-378-379

-Saldaña R., Torres V. (2012). Efecto Analgésico de Aceites Esenciales de Hierba Luisa (*Chymbopogon citratus*), Ruda (*Ruta graveolens*), Formulados como Conos Nasales. Tesis en Bioquímica Farmacéutica. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas Ecuador. P.13-16.

-Sanín L., Páez A., Correa C., De Bortoli M. (2011). Ciclo Menstrual, Sintomatología y Regularidad del Estilo de Vida Diario. Universidad Nacional de San Luis, Argentina. *Fundamentos en Humanidades*, vol. 12 (24), pp. 103-123.

-Soleimani M, Azar P, Saber-Tehrani M, Rustaiyan A (2009). Volatile Composition of *Ruta graveolens* L., of North Iran. *World Applied Sciences Journal* 7 (1) 124-126.

-Solís S., Hurtado L., Pérez M., Alcántara L. (2012). Análisis, Extracción y Efectos Toxicológicos de Rutina a Partir de *Ruta graveolens* (ruda) por Medio de la Técnica de Maceración Metanólica. Laboratorio de Análisis Microbiológico, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. México.

-Soubeiran E. (1847). *Tratado de Farmacia Teórica y Práctica*, Volumen 2, Traducido por Antonio Cáceres (2008). Editor Sociedad de Autores, Impresos de España, Procedente del Original - Universidad Complutense de Madrid (2006).

-Tarek F. (2013). Estudio de la actividad Sobre el Sistema Nervioso Central de Especies Vegetales Procedentes de la Flora Egipcia. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Farmacia Departamento de Farmacología. Madrid, España.

-Weinstein E, Message D, Negri G, Salatino A, Stringeta P (2010). Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian Propolis samples. *Advances Access Publications* 7 (3) 307-315.

-Varamini P., Soltani, M., Ghaderi, A. (2009). Cell Cycle Analysis and Cytotoxic Potential of *Ruta graveolens* Against Human Tumor Cell Lines. *Neoplasma* pp. 490-493.

-Villacrés V., Urgirles R., Tafur V., Suarez M. (1995). Bioactividad de Plantas Amazónicas de Estados Americanos. Universidad Central de Ecuador Editorial ABYA-YALA, Cayambe, Ecuador.

ANEXO

Proceso de extracción hidroalcohólica de hojas de *ruda*

LA RUDA PLANTA MEDICINAL
Maximino Fdez. Sendín 2011



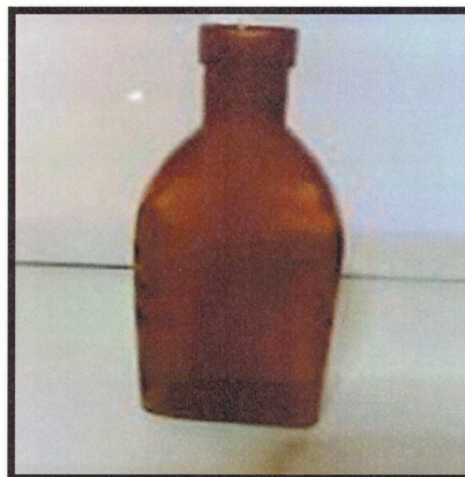
Selección de las hojas de *ruda*



Pesando las hojas de *ruda*



Maceración de las hojas de *ruda*



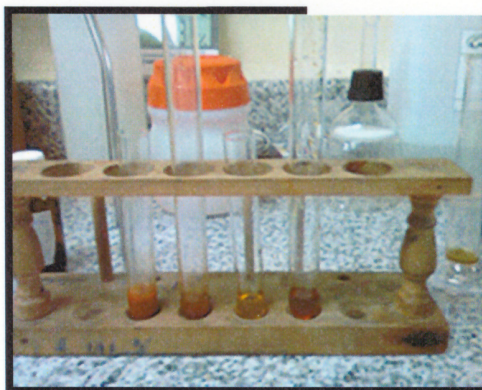
Frasco utilizado para el extracto Hidroalcohólico de *ruda*



Concentración del extracto Hidroalcohólico de *ruda* En rotavapor marca wucchi



10 mL de extracto hidroalcohólico de *ruda*

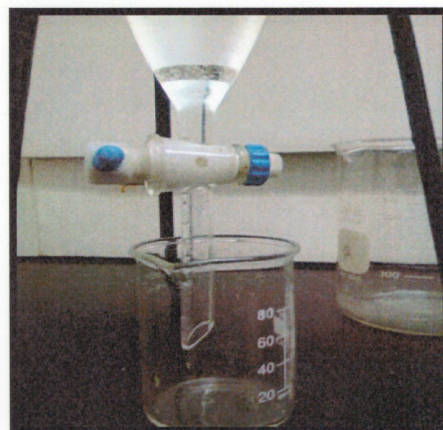


Tamizaje Fitoquímico

Proceso de extracción del aceite esencial de *ruda*



Hidrodestilación del aceite esencial de *ruda*



Cloroformo reactivo utilizado para separar el aceite esencial de *ruda*

Separación del aceite esencial de *ruda*



1.5 mL de aceite esencial de *ruda*

Modelo biológico utilizado, ratas wistar



Rata wistar



Control de peso de las ratas
En experimento



Balanza electrónica utilizada para
pesar las ratas (Boeco, Germany,
Modelo BBa 51

Control del ciclo estral de las ratas en tratamiento con aceite esencial de *ruda*, mediante frotis vaginal



Frotis vaginal de las ratas en control

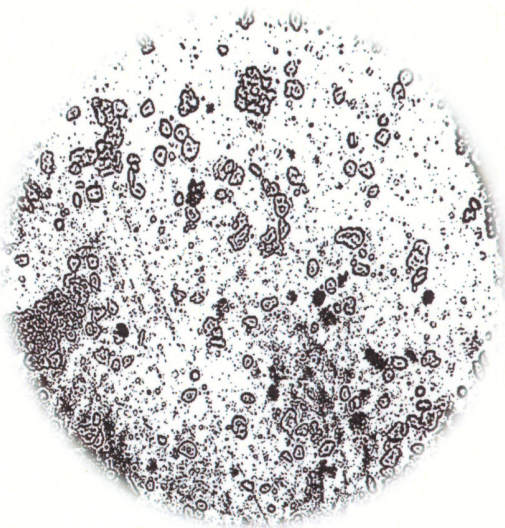


Muestra de exudado vaginal de las ratas en tratamiento con aceite esencial de *ruda*

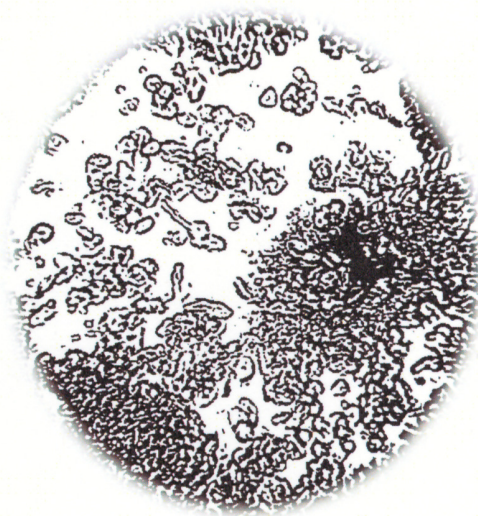


Análisis del exudado vaginal de las ratas tratadas con aceite esencial de *ruda*

Células del ciclo estral normal



Proestro (células nucleadas)



Estro (células Cornificadas)

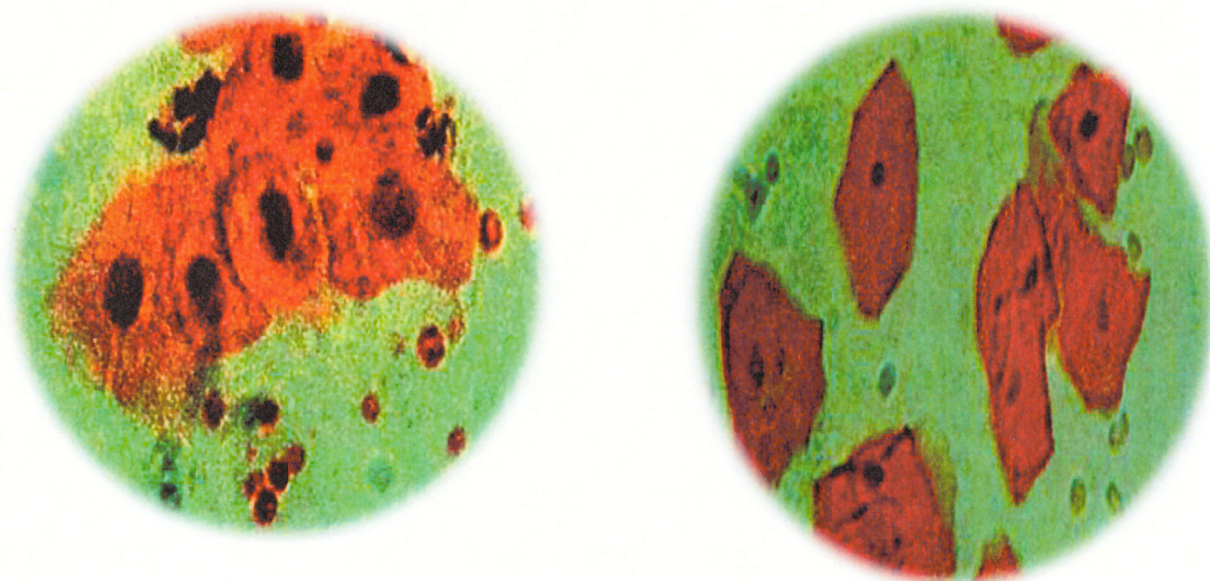


Diestro (células leucocitos)







Metaestro (células nucleadas, Cornificadas y leucos)

Ciclo estral durante el tratamiento



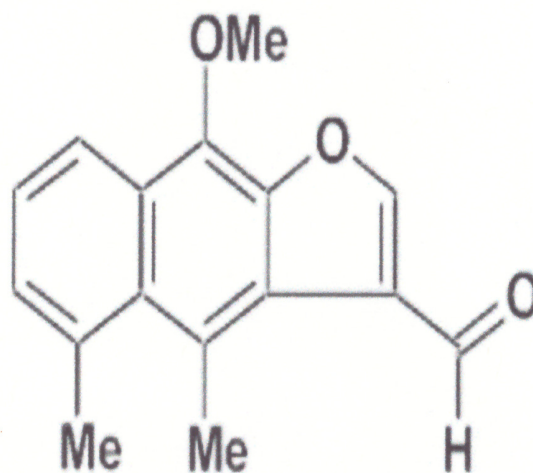
Ejemplos de Células Proestro y Estro durante el tratamiento con aceite esencial de *ruda*. Tomado Citología del ciclo estral. Práctica de laboratorio de Biología de Animales III. Tanya González Martínez (2009).

Citología del ciclo reproductivo de la rata

Fase del ciclo	Genitalia externa	Frote vaginal		Comportamiento	Duración
		Descripción	Cuadro Histológico		
ESTRO	Labios hinchados (engrosados) Vagina seca.	Gran cantidad de células epiteliales queratinizadas (placas o escamas cornificadas sin núcleo visible) y unas muy pocas células nucleadas.		Calor sexual (Aceptación del macho) Cópula Lordosis	12 hrs
METESTRO	Labios hinchados ligeramente Masa caseinosa en la vagina	Buena cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales queratinizadas.		Ovulación No hay calor sexual (No hay aceptación del macho)	21 hrs
DIESTRO	Labios normales (no hinchados engrosados) Mucosa vaginal húmeda.	Gran cantidad de leucocitos, muy pocas células queratinizadas y, a veces, algunas células nucleadas.		No hay calor sexual (No hay aceptación del macho)	65 hrs
PROESTRO	Labios ligeramente hinchados. Vagina seca.	Gran cantidad de células epiteliales nucleadas y unos muy pocos leucocitos.		Puede ocurrir calor sexual (puede haber aceptación del macho)	12 hrs

Tomado de: Citología del ciclo estral **Práctica de laboratorio** de Biología de Animales III. Tanya González Martínez (2009).

Terpeno Isomaturnin es uno de los compuestos mayoritario encontrado en el aceite esencial de *ruda*



Estructura química del Terpeno Isomaturnin encontrado en alto porcentaje (10.41%),
En el aceite esencial de ruda, mediante el método de CG/EM