

ARS PHARMACEUTICA

REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tomo XII - Núm. 11-12

Noviembre-Diciembre, 1971

Director: PROF. DR. JESUS CABO TORRES

Subdirector: PROF. DR. JOSE M.^a SUÑÉ ARBUSSA

Jefe de Redacción: PROF. Adj. DR. JUAN OLIVER VERD

Redacción y Administración:

FACULTAD DE FARMACIA. GRANADA-ESPAÑA

Imprime: Gráficas del Sur, S. A. - Boquerón, 27-Granada 1972

1.000 ejemplares

Dep. Legal GR. núm. 17-1960

Sumario

PAG.

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

- Estudio farmacodinámico del lúpulo. (*Humulus Lupulus L.*).—II. Acción estrógena, por L. Bravo, J. Cabo, A. Fraile, J. Jiménez y A. Villar... 421
- Estudio comparativo de diversos tipos de esencias de espliego españolas, por M. Martín Mesonero y J. Cabo Torres ... 427
- Evidencia electroforética de la formación de compuestos de asociación entre osas y ω -aminoácidos, por F. Sánchez-Medina y F. Mayor ... 437
- Estudio farmacotécnico de los esteres grasos de polietilenglicoles. 4. Mezclas cuaternarias vaselina-emulgente-alcohol cetílico-glicerina e "hidrophilic ioatmen", U.S.P. XV, por A. Parera y J. M.^a Suñé ... 445
- Técnica de desinfección de semillas para su cultivo aséptico, con vistas a la inoculación bacteriana específica, por J. M.^a Barea, M. Escorihuela y V. Callao ... 459

TRABAJOS DE COLABORACION

- Ensayo de la lucha contra el "repilo" del olivo en Granada. II. Persistencia de algunos fungicidas, por P. Ramos, E. Esteban y V. Callao ... 471
- Ensayo de la lucha contra el "repilo" del olivo en la provincia de Granada. III, por P. Ramos Clavero ... 479

ECOS DE FACULTAD

- Bodas de Plata de la promoción de 1947 de la Facultad de Granada ... 487

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

DEPARTAMENTO DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA
Prof. Dr. J. CABO TORRES

ESTUDIO FARMACODINAMICO DEL LUPULO. (*Humulus Lupulus* L.) II.—ACCION ESTROGENA

L. BRAVO, J. CABO, A. FRAILE, J. JIMENEZ. A. VILLAR (*)

Son frecuentes las alteraciones del ciclo menstrual en las mujeres empleadas en la recolección del lúpulo, de forma que la menstruación suele aparecer a los dos días del comienzo de la recolección, independientemente de la fase del ciclo en que se encuentren en dicho momento. Este fenómeno hace sospechar la existencia de sustancias de actividad estrogénica en el lúpulo. En efecto, KOCH y HEIM (1) encuentran valores que oscilan entre 20.000 y 300.000 U. I. de actividad estrogénica por gramo de inflorescencia.

Estas sustancias estarían contenidas también en la cerveza (elaborada con lúpulo) si bien en cantidad muy inferior, pues son destruidas en gran parte durante la fermentación. No obstante, se estima que el contenido en sustancias estrogénicas de la cerveza oscila entre 1 a 35 γ por litro (de 10 a 360 U.I.), cantidad no despreciable si se considera que la eliminación diaria de fenolesteroides en la mujer sexualmente activa es del orden de 20 a 25 γ.

Los citados autores no excluyen la posibilidad de que las alteraciones generales (obesidad, esterilidad, degeneraciones hepáticas, etc.), que se observan en los grandes bebedores de cerveza, que consumen habitualmente cantidades diarias de hasta 10 litros, pueda ser debida, además de la intoxicación alcohólica, a la intoxicación estrogénica.

Desde el punto de vista terapéutico, estos autores señalan el posible empleo de la cerveza en aquellos casos en que está indicada la administración prolongada de estrógenos a dosis débiles, como en la perturbación del climaterio, hipersexualidad de la especie masculina, etc.

Dada la facilidad con que los estrógenos son absorbidos por vía cutánea, estos autores preconizaron, además, el empleo de extractos de lúpulo para baños, en los casos en que está indicada una terapia estrogénica.

(*) Los autores figuran por orden alfabético.

TECNICA

Existen métodos químicos y físicos de gran especificidad para la determinación de los diferentes estrógenos, si bien su aplicación a las mezclas complejas (orina, por ejemplo) requiere laboriosas operaciones para el fraccionamiento de los extractos.

El método biológico más clásico es el del frotis vaginal de la rata, originalmente propuesto por ALLEN y DOISY (2). La técnica ha sido modificada, en sus detalles, por los diferentes autores. Así, algunos emplean como animal de experimentación el ratón; otros trabajan con ratas inmaduras en lugar de ratas ovariectomizadas; también existen diversas técnicas en las que la administración del producto no se hace por vía subcutánea, sino por aplicación intravaginal; y, en fin, el tratamiento matemático de los datos obtenidos en el ensayo, para hallar el resultado final, también ha sido ampliamente debatido.

Otros criterios de actividad que también pueden tomarse en cuenta para la valoración de los estrógenos son: el aumento de peso del útero en ratas ovariectomizadas o inmaduras; la apertura de la vagina en cobayas, ratas o ratones inmaduros; el desarrollo del oviducto en pollos de cuatro días de edad, etc.

A continuación describimos el método del frotis vaginal de la rata o de Allen-Doisy (2):

Para llevar a cabo la valoración son necesarias 40 ratas, hembras ovariectomizadas un mes antes del ensayo, y en las que se ha comprobado la eficacia de los estrógenos para producir el estro.

Es recomendable seguir la marcha que se expone a continuación: Se seleccionan 50 ratas hembras, de un peso comprendido entre 80 y 100 g. y se les extirpan los ovarios. Entre los diez y los quince días siguientes a la operación se estudian los exudados vaginales de cada uno de estos animales en frotis que se preparan cada día, y se comprueba que en ninguno de ellos aparece estro; en caso contrario, se eliminan los animales que lo presenten. A cada uno de los restantes se les inyectan subcutáneamente 2 μ g de estrona disueltos en 0,2 ml de aceite y se preparan frotis vaginales a las 24, 48, 72 y 96 horas de la inyección. Las ratas que no presentan estro bien definido en alguna de las observaciones realizadas deberán eliminarse. Entre las restantes se seleccionan 40, cuyo peso corporal sea aproximadamente igual, y con ellas se realiza la valoración, no antes de 10-15 días después de efectuada la prueba anterior.

Las ratas se distribuyen en dos lotes de 20 animales cada uno, de tal manera que estén repartidas por igual en ambos grupos atendiendo a sus pesos. Los animales de uno de los lotes reciben, por inyección subcutánea en el dorso, una dosis, igual para todos e independiente de su peso, del patrón internacional. Dicha dosis debe ser tanteada previamente para que cause aproximadamente un 50 por ciento de reacciones positivas en los animales. También se ha de tener en cuenta que la dosis en cuestión deberá estar contenida en 0,2 ml de aceite (si el producto a valorar es oleoso). Generalmente se obtiene este resultado con 5-10 uni-

dades de estrona, es decir, que la solución del "standard" deberá tener unos 5 y por mililitro.

Las otras 20 ratas reciben el preparado problema. La dosis por animal también será elegida por tanteo previo para que corresponda aproximadamente a la actividad del "standard".

Se preparan frotis vaginales de cada uno de los 40 animales a las 24, 48, 72, 84 y 96 horas de la inyección, tomando nota de las ratas que presentan estro típico en alguna de las observaciones.

A los 15 días de la prueba anterior se repite el ensayo, pero inyectando ahora el problema a los animales que habían recibido antes el "standard", y viceversa (ensayo cruzado).

Lúpulo empleado

Hemos trabajado con dos lúpulos procedentes de distinta cosecha y de distinta provincia, uno de León y otro de Galicia, pero para hacer más corta nuestra exposición nos limitaremos a mencionar el lúpulo, sin especificar a cual de ellos nos referimos, entendiéndose que todas las pruebas han sido realizadas con ambos.

El lúpulo, una vez recogido de la fábrica de cerveza, lo hemos mantenido herméticamente cerrado y a una temperatura de 0° aproximadamente.

Animales

Los animales empleados fueron ratas de raza "Nestle", de un peso aproximado de 100 gramos.

A cada animal del lote tipo le inyectamos 7 unidades de estrona por 100 gramos de peso.

Los frotis vaginales los fijamos en alcohol metílico durante unos cinco minutos, se secan al aire y posteriormente los teñimos con azul de metileno.

Extractos

Los extractos realizados, tanto para el lúpulo de Galicia como para el de León, así como para el de distinta cosecha, fueron los siguientes: *Suspensión de lúpulo en polvo/H₂O al 10%*. Administramos 2 ml a cada animal, por vía oral.

Maceración con agua al 5%.—A 5 de lúpulo previamente tamizado por el tamiz núm. 50, se añaden 50 ml de agua destilada y a la temperatura ambiente. En estas condiciones, se mantienen en maceración durante seis días, agitando de vez en cuando, al cabo de los cuales filtramos con expresión y recogemos el filtrado en vasija tarada, al que añadimos agua destilada hasta completar los 50 ml. Al marco le añadimos otros 50 ml de agua, agitando de vez en cuando. Se filtra con expresión añadiendo cantidad suficiente de agua destilada para completar los 50 ml. Se reúnen los filtrados.

De este extracto recogido, administramos, por vía oral 2 ml a cada animal del lote problema.

Maceración con éter al 5%.—A 1 gramo de lúpulo, previamente tamizado por el tamiz núm. 50, añadimos 10 ml de éter, manteniéndolo en maceración durante seis días, agitando de vez en cuando. Filtramos con expresión, y al marco le añadimos otros 10 ml de éter. Al cabo de cuatro días, lo filtramos. Reunidos los filtrados, destilamos en baño maría a 43°, y al residuo obtenido le adicionamos 3 ml de aceite, previamente neutralizado. A cada animal del lote problema le inyectamos 0,2 ml.

Maceración con éter al 10%.—Igual al anterior, pero con la única excepción de que la cantidad de lúpulo empleado fue doble; es decir, 2 gramos.

Soxhlet con éter.—Las pesadas dieron los siguientes resultados:

Matraz vacío	24,6770	gramos
Cartucho vacío... ..	0,9584	"
Cartucho con lúpulo	2,4451	"
	<hr/>	
Lúpulo	1,4867	"

La cantidad de éter fue de 15 ml, el tiempo de extracción de siete horas y la temperatura de 43°.

El extracto recogido lo llevamos a baño maría a la misma temperatura que lo habíamos extraído, y una vez destilado el disolvente, le añadimos 3 ml de aceite neutralizado. De esta solución, inyectamos 0,2 ml a cada animal.

Este ensayo lo repetimos en las mismas condiciones, pero la cantidad de lúpulo fue superior: 2,8325 gramos, permaneciendo constante la de éter. Una vez destilado, le añadimos 3 ml de aceite e inyectamos 0,2 ml a cada animal.

Maceración con alcohol de 30° al 10%.—La técnica seguida, así como las cantidades empleadas, fueron exactamente iguales a las ya reseñadas en la maceración con agua al 10%.

La dosis administrada a cada animal del lote problema fue de 2 ml por vía oral.

Maceración con alcohol de 60° al 10%.—Exactamente igual al anterior.

Maceración con alcohol de 70° al 10%.—Exactamente igual al anterior.

Maceración con alcohol de 96° al 10%.—Exactamente igual al anterior.

Hemos de hacer constar que las ratas soportaron bien los 2 ml de alcohol de 96°, sin que se notaran síntomas de intoxicación alcohólica.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Todos los resultados obtenidos con los diversos extractos fueron negativos. Sus causas las desconocemos, aunque, como ya indicamos anteriormente, pueden ser debidas o bien a que el lúpulo no era fresco.

además había sufrido una serie de manipulaciones industriales, o a que el disolvente empleado no fuese idóneo.

En lo que se refiere a los resultados obtenidos en el lote tipo, hemos de indicar que fueron óptimos, es decir, que aproximadamente al 50 por ciento le provocamos el estro.

CONCLUSIONES

1.—Trabajando con la técnica de Allen-Doisy, convenientemente puesta a punto y sensible a estrógenos diversos, no hemos conseguido en absoluto apreciar acción estrogénica en lúpulo seco de procedencia española, ni con suspensión en polvo de droga íntegra ni con extractos diversos en agua, éter y alcohólica de graduaciones distintas, con un total de nueve tipos de extractos más la suspensión de la droga.

2.—Que las muestras de lúpulo estudiadas, frente a lo establecido para lúpulos de otro origen por numerosos autores, no poseen acción estrógena sobre rata ovariectomizada. Esta sorprendente negativa que, sin embargo, demostramos claramente, frente a las afirmaciones de numerosos autores, nos sugiere una hipótesis, pendiente de comprobación, que conciliaría la controversia respecto a la acción estrógena del lúpulo, en el sentido de que ésta residiese en un componente menor isoflavónico demostrado en la droga (isoquercitrósido), cuya presencia podía variar de unas suertes a otras con el origen geográfico o con su proceso de desecación, como se ha demostrado en otras especies vegetales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—KOCH, W. y HEIM, G.—Münc. med. Woch., 95, 845, 1953.
- 2.—ALLEN, E. y DOISY, E. A.—J. Am. med. Ass., 81, 819, 1923