UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA, ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DE DOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS ELABORADOS A BASE DE ALFALFA (*Medicago sativa*) E IDENTIFICACIÓN DE SUS FITOESTRÓGENOS

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

PRESENTA

QFB. MARÍA GUADALUPE SOTO ZARAZÚA

Exp. 178934

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, CENTRO UNIVERSITARIO.

SEPTIEMBRE DE 2015

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA, ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DE DOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS ELABORADOS A BASE DE ALFALFA (*Medicago sativa*) E IDENTIFICACIÓN DE SUS FITOESTRÓGENOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

PRESENTA

QFB. MARÍA GUADALUPE SOTO ZARAZÚA

SINODALES

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

PRESIDENTE

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SECRETARIO

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA — Alejandra Rojas M.

VOCAL

Dra. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

SUPLENTE

Dra. MARÍA DEL RAYO CAMACHO CORONA

SUPLENTE

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, CENTRO UNIVERSITARIO.

SEPTIEMBRE DE 2015

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) por darme la oportunidad de continuar mi preparación académica en esta Facultad.

A la Maestría en Ciencias Químico Biológicas por permitirme desarrollar las habilidades necesarias para llevar a cabo investigación científica de calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría y por la Beca Mixta concedida para la realización de mi estancia en el extranjero.

Al proyecto INNOVAPYME número 213408 (Convocatoria 2013) por aportar recursos económicos para la realización de mi estancia de investigación en la Universidad de Oporto, Portugal.

Al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de Querétaro (FOMIX-QRO) Convocatoria 2012-01, por el proyecto “Fortalecimiento de la infraestructura del posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la UAQ para la formación de recursos humanos de alto nivel en las áreas de farmacia y salud” (Clave QRO-2012-C01-192954) y al proyecto con clave FOMIX-QRO-2014-C03-250284.

A la empresa Productora Sativa SPR de RL de CV (Qro., México) y al Lic. Erik Ruiz-Lang por proporcionar las muestras para la realización de este trabajo.

A la Universidad de Oporto (UP), por permitirme llevar a cabo mi estancia de investigación así como por permitirme asistir al aula “Certificación y Acreditación de Técnicas y Laboratorios”.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Bromatología e Hidrología de la Facultad de Farmacia de la UP, por todo su apoyo y trabajo en equipo durante la realización de mi estancia de investigación en dicho laboratorio, en especial a Anabela Costa, Filipa Pimentel, Francisca Rodrigues y a la profesora María Beatriz Oliveira, por todas su aportaciones a esta tesis.

Al Instituto Nacional de Salud Ricardo Jorge de Portugal, por permitirme llevar a cabo algunos experimentos que enriquecieron este trabajo de investigación, en especial a la Dra. Carla Costa y a la Maestra María Jõao, por su asistencia técnica.

Al Dr. Moustapha Bah, por dirigir esta de tesis y por todo su apoyo y confianza durante estos años de trabajo en conjunto.

A todos mis sinodales, en especial a la Dra. Laura Berumen y a la Dra. Alejandra Rojas por su apoyo en el desarrollo de la parte experimental y por todas sus valiosas aportaciones a este trabajo.

RESUMEN

La medicina moderna, a pesar de los enormes avances científicos, no ha podido proporcionar alternativas terapéuticas que combinen eficacia e inocuidad para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas, las crónico-degenerativas y las infecciosas. Por esta razón, el desarrollo de nuevos productos funcionales a partir de las plantas está emergiendo como una posible solución, lo cual está diluyendo cada vez más la frontera entre plantas medicinales y alimenticias. Con este fin, diversos productos de origen vegetal están siendo desarrollados actualmente a nivel industrial para satisfacer esta necesidad, aprovechando los recursos locales disponibles. El objetivo del presente trabajo consistió en explorar el potencial farmacológico, químico y nutrimental de dos nuevos productos (jugo liofilizado y material residual fibroso secado y pulverizado), ambos elaborados a base de alfalfa cultivada en cinco diferentes meses del año 2014 en el estado de Guanajuato, con el fin de soportar su uso como productos aptos para consumo humano y con beneficios para la salud. Los resultados mostraron que los dos productos son tan buenas fuentes de proteínas y minerales como algunas leguminosas como el frijol y cereales como el amaranto y contienen altas cantidades de compuestos fenólicos, donde los flavonoides representaron una parte importante de éstos. En cuanto a su análisis químico, además de la apigenina, cuatro isoflavonas (genisteína, genistina, daidzina y daidzeína), reconocidas por su buena actividad estrogénica, fueron detectadas y cuantificadas en ambos productos. Bajas cantidades de estas isoflavonas fueron encontradas, justificando la ausencia de actividad estrogénica de los dos tipos de productos en el ensayo uterotrófico realizado en ratas ovariectomizadas. En contraste, ambos productos dieron una muy buena actividad antioxidante *in vitro*. Por otra parte, ensayos *in vitro* fueron conducidos para evaluar los posibles efectos citotóxicos de ambos tipos de productos en cultivos de células Caco-2 (línea celular de cáncer de colon), encontrando un efecto dependiente de la concentración. Los jugos liofilizados produjeron mayores actividades citotóxicas que las demostradas por los polvos. Los resultados obtenidos muestran algunas variaciones en los parámetros estudiados, dependiendo del mes de cosecha de la alfalfa utilizada para elaborar los productos,

lo que refleja el efecto de factores ambientales de crecimiento de la planta y pone en evidencia la importancia de considerar estos aspectos para garantizar el mantenimiento de la alta calidad de los productos destinados al consumo humano. Finalmente, la actividad citotóxica de los dos productos los convierte en buenos candidatos para el desarrollo de fitomedicamentos con potencial terapéutico contra el cáncer, en particular el de colon.

Palabras clave: Alfalfa, nutrientes, compuestos fenólicos, fitoestrógenos, actividad estrogénica, citotoxicidad.

SUMMARY

Despite the huge scientific advances, modern medicine has failed to provide alternative therapies that combine efficiency and safety for the treatment of various diseases, including the so-called chronic-degenerative and those infectious ailments. For this reason, the development of new functional products from plants is reemerging as a possible solution, which is increasingly diluting the border between medicinal and food plants. For this reason, the development of new functional products from plants is emerging as a possible solution. Several plant-based products are being developed at industrial level to satisfy this requirement using available local resources. The aim of this investigation was to explore the pharmacological, chemical and nutritional qualities of two new alfalfa-derived products (dehydrated powder and freeze-dried juice) made with alfalfa harvested in Guanajuato in five different months of the year 2014, in order to provide scientific support for their use as functional products suitable for human consumption. The results obtained showed that both products are better natural sources of protein and mineral than legumes like beans and cereals like amaranth, and contain high amounts of phenolic compounds, including flavonoids. According to their chemical analysis, besides of apigenin, four isoflavones (genistein, genistin, daidzin and daidzein), well recognized as having good estrogenic activity, were detected and quantified in both alfalfa products. Low isoflavones contents were found, this fact being in accordance with the lack of estrogenic activity showed in the uterotrophic assay conducted on ovariectomized rats. In contrast, the two products produced very good antioxidant activity *in vitro*. Additionally, *in vitro* assays were conducted to assess the possible cytotoxic effects in Caco-2 cells cultures (human colon adenocarcinoma). In this assay, a concentration-dependent effect was observed. In all cases, freeze-dried juices showed higher cytotoxic activities than those of the dehydrated powders. Results obtained display some variations in the parameters studied, which depended on the month the plant material was harvested. This fact, not only reflects the impact of the environmental growth conditions, but also underlines the importance of considering these features in order to guarantee the high quality of these products intended for human consumption. Finally, the cytotoxic

activity of the two products makes them good candidates for the development of phytomedicines with therapeutic potential against cancer, in particular the adenocarcinoma.

Keywords: Alfalfa, nutrients, phenolic compounds, phytoestrogens, estrogenic activity, cytotoxicity.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	
SUMMARY	
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. El género *Medicago*	4
2.1.1. Saponinas	4
2.1.2. Flavonoides	5
2.2. *Medicago sativa*	7
2.2.1. Potencial nutricional de la alfalfa	8
2.2.2. Usos medicinales y metabolitos secundarios presentes en *M. sativa*	8
2.3. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos	10
2.3.1. Rol de los antioxidantes en la terapéutica	11
2.4. Fitoestrógenos	13
2.4.1. Isoflavonoides	14
2.4.2. Cumestanos	16
2.4.3. Lignanos	17
2.4.4. Otros fitoestrógenos	17
2.5. Metabolismo de los fitoestrógenos en el organismo	18
2.6. La actividad estrogénica	19
2.6.1. Receptores estrogénicos	20
2.6.2. Mecanismos de acción de los fitoestrógenos	22
2.6.2.1. Mecanismos genómicos	22
2.6.2.2. Mecanismos no genómicos	24
2.6.3. Fitoestrógenos como alternativa para el tratamiento de los síntomas de la menopausia	25
2.6.4. Fitoestrógenos en la prevención de osteoporosis	26

2.6.5. Fitoestrógenos y diversos tipos de cáncer 27
2.6.6. Fitoestrógenos en la prevención de enfermedades cardiovasculares 28
2.7. Seguridad de los productos funcionales de origen naturales 29
3. JUSTIFICACIÓN 31
4. HIPÓTESIS 33
5. OBJETIVOS 34
5.1. General 34
5.2. Específicos 34
6. METODOLOGÍA 35
6.1. Materiales y equipos 35
6.1.1. Material de estudio 35
6.1.2. Estándares 36
6.1.3. Equipos 36
6.2. Métodos 37
6.2.1. Elaboración de los productos de alfalfa 37
6.2.2. Análisis nutricional 37
6.2.2.1. Determinación de humedad 38
6.2.2.2. Determinación de cenizas 38
6.2.2.3. Determinación de grasa total 38
6.2.2.4. Determinación de proteínas 39
6.2.2.5. Carbohidratos 39
6.2.3. Evaluación de la capacidad antioxidante 39
6.2.3.1. Extracción de compuestos fenólicos 39
6.2.3.2. Estimación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteau 40
6.2.3.3. Determinación de flavonoides totales 40
6.2.3.4. Evaluación de la capacidad antioxidante (CAO) 40
6.2.3.4.1. Ensayo con el radical libre DPPH 41
6.2.3.4.2. Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) 41
6.2.4. Perfil de compuestos fenólicos individuales mediante HPLC 42

6.2.5. Determinación del perfil de isoflavonas 43
6.2.6. Viabilidad celular, integridad de la membrana y recuperación celular 44
6.2.6.1. Ensayo MTT 45
6.2.6.2. Ensayo LDH (lactato deshidrogenasa) 45
6.2.6.3. Ensayo de recuperación celular 45
6.2.7. Evaluación de la actividad estrogénica 46
6.2.8. Análisis estadístico 46
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 48
7.1. Rendimiento de los productos elaborados con alfalfa cosechada en diferentes meses del año 48
7.2. Análisis nutricional 49
7.3. Cuantificación de fenoles totales (FT) en los productos de alfalfa 52
7.4. Cuantificación de flavonoides totales en productos de alfalfa 55
7.5. Determinación de la capacidad antioxidante 59
7.5.1. Evaluación de la CAO por el método del DPPH 59
7.5.2. Evaluación de la CAO por el ensayo FRAP 62
7.6. Correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la CAO 65
7.7. Correlación entre el contenido de flavonoides y la CAO 65
7.8. Comparación de la CAO de los dos productos elaborados con alfalfa y la de dos frutos comunes (ciruela y uva) 66
7.9.Determinación del perfil de compuestos fenólicos individuales 67
7.10. Determinación del perfil de isoflavonas 73
7.11. Viabilidad celular, integridad de la membrana y recuperación celular 82
7.12. Actividad estrogénica de los productos elaborados con alfalfa 86
8. CONCLUSIONES 90
9. REFERENCIAS 91

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Claves asignadas a los productos de alfalfa obtenidos de las cinco colectas realizadas en 2014	35
2	Condiciones de análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC	42
3	Condiciones de análisis de isoflavonas mediante HPLC	44
4	Composición nutrimental de los dos productos de alfalfa colectada en diferentes meses del año	51
5	Comparación de los contenidos de fenoles y flavonoides totales y las CAO de los dos productos de alfalfa con dos frutos altamente antioxidantes	67
6	Linealidad, LD y LC del método empleado para cuantificación de isoflavonas	74
7ª	Concentración de isoflavonas extraídas en Agua 100%	75
7B	Concentración de isoflavonas extraídas en Metanol 100%	76
7C	Concentración de isoflavonas extraídas en Agua-Metanol	77
7D	Concentración de isoflavonas extraídas en Etanol 100%	78
7E	Concentración de isoflavonas extraídas en Agua:Metanol:Ac. Fórmico	79
8	Correlación de Spearman e IC_{50} encontrada para los productos de alfalfa	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Algunos flavonoides biosintetizados por especies de *Medigaco* y algunas de sus funciones	6
2	Vista de las partes aéreas de la planta alfalfa	7
3	Estructuras químicas de los isoflavonoides más estudiados	15
4	Cumestano más estudiado por su alta potencia como fitoestrógeno	16
5	Estructuras de dos lignanos con actividad estrogénica	17
6	Tres compuestos con actividad estrogénica	18
7	Ilustración del metabolismo de los fitoestrógenos	19
8	Constitución general de los receptores estrogénicos	21
9	Tejidos donde se expresan los receptores estrogénicos	21
10	Estructuras comparativas del estradiol y de un fitoestrógeno	22
11	Mecanismo genómico propuesto para los fitoestrógenos	23
12	Mecanismo no genómico propuesto para los fitoestrógenos	24
13	Gráfica de barras que muestra los rendimientos de los dos productos de alfalfa colectada en cinco meses del año	48
14	Contenido de FT en polvo de alfalfa deshidratada colectada en diferentes meses del año	53
15	Contenido de FT en jugo liofilizado de alfalfa colectada en diferentes meses del año	54
16	Contenido de flavonoides en polvo de alfalfa deshidratada colectada en diferentes meses del año	56
17	Contenido de flavonoides en jugo liofilizado de alfalfa colectada en diferentes etapas del año	57
18	Hojas de alfalfa frescas	58

19	Esquema que muestra la reacción durante el ensayo con el radical libre DPPH	60
20	Resultados de la evaluación de la CAO por el método DPPH para polvo de alfalfa deshidratada colectada en diferentes meses del año	61
21	Resultados de la evaluación de la CAO por el método DPPH para jugo liofilizado de alfalfa colectada en diferentes meses del año	62
22	Evaluación de la CAO por el método FRAP para polvo de alfalfa colectada en diferentes meses del año	63
23	Evaluación de la CAO por el método FRAP para jugo liofilizado de alfalfa colectada en diferentes meses del año	64
24	Perfil cromatográfico de una muestra de polvo de alfalfa deshidratada extraída con el método 1	68
25	Identificación de la apigenina	69
26	Cromatograma de polvo de alfalfa deshidratada utilizando el segundo método de extracción	70
27	Cromatograma de una muestra de polvo de alfalfa deshidratada extraída con el tercer método	71
28	Cromatograma de una muestra de jugo de alfalfa liofilizado extraída con el tercer método	71
29	Resultados del ensayo MTT a 3 horas de incubación	83
30	Resultados del ensayo MTT a 24 horas de incubación	83
31	Resultados del ensayo LDH a 3 horas de incubación	84
32	Resultados del ensayo LDH a 24 horas de incubación	84
33	Gráfica de resultados del ensayo uterotrófico	87
34	Tejido uterino luego de la administración de los productos de alfalfa	88

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el interés por los alimentos funcionales está aumentando considerablemente debido a diversos factores como la decepción frente a la incapacidad de la medicina moderna de proporcionar tratamientos eficaces y consistentes, a la alta incidencia de diversas enfermedades, a la idea de que lo natural es necesariamente lo más sano, al limitado acceso a los servicios de salud, a razones culturales, así como a los cambios en el estilo de vida que ha sufrido la población. En respuesta a esta situación, la industria (principalmente la alimentaria y la farmacéutica) se ha dado a la tarea de innovar y diseñar nuevos productos que ofrezcan mayores beneficios a la salud; ejemplos de ello son el desarrollo de los fitomedicamentos y el surgimiento de los alimentos funcionales y los nutracéuticos, que si bien estos dos últimos son productos alimenticios, también proporcionan al consumidor sustancias con la capacidad de prevenir o incluso controlar alguna enfermedad.

Actualmente, diversas empresas se están dedicando al desarrollo de nuevos productos con estas características por lo que una gran cantidad de especies vegetales están siendo estudiadas en busca de ingredientes funcionales. Como ejemplo de lo anterior podemos mencionar la alfalfa (*Medicago sativa*), que durante décadas se ha utilizado como alimento para ganado, ya sea en estado fresco o como forraje. Sin embargo, en los últimos años, esta planta ha captado la atención de los investigadores y empresarios debido a que, además de su composición nutricional, contiene un tipo de compuestos llamados fitoestrógenos que han demostrado tener un comportamiento similar al producido por los estrógenos de los mamíferos, lo que representa una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades derivadas de la disminución en la producción endógena de estrógenos.

Los fitoestrógenos han demostrado ser de gran utilidad para el tratamiento de los síntomas de la menopausia, para prevenir la osteoporosis, evitar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares e incluso hay estudios que sustentan su potencial como anticancerígenos. Además, no se puede perder de vista que la mayoría de los fitoestrógenos son polifenoles, por lo que ofrecen ventajas

adicionales por ser compuestos antioxidantes. Por esta razón, las fuentes de fitoestrógenos actualmente son estudiadas para conocer su potencial estrogénico y antioxidante. Sin embargo, para poder emplear este tipo de especies vegetales con fines alimenticios y terapéuticos, es importante como paso previo verificar que los compuestos funcionales se encuentran presentes en dichas especies y en las cantidades apropiadas; posteriormente se debe corroborar que éstos ejerzan el efecto deseado sin producir efectos tóxicos como manera de asegurar su inocuidad.

El presente trabajo fue conducido con el objetivo de conocer las potencialidades nutrimentales, químicas y farmacológicas de dos productos mexicanos elaborados a base de alfalfa, que se han desarrollado para consumo humano. Los resultados obtenidos comprueban, al menos en parte, que esos productos son aptos para consumo humano.

2. ANTECEDENTES

Dentro de las estrategias empleadas para controlar el aumento en la incidencia de las enfermedades más prevalentes en el mundo, se encuentra la búsqueda de nuevas alterativas terapéuticas, la cual se ha inclinado hacia aquellos alimentos que además de su contenido nutricional, contienen otros elementos que hacen de éstos una interesante fuente de compuestos bioactivos. Muchos alimentos ya han sido estudiados e incluso procesados para obtener productos con estas dos cualidades. Los productos fabricados con este fin han sido clasificados en su mayoría con base en su contenido, procesamiento y/o función (Alvídrez-Morales, 2002). Dentro de estos criterios, se encuentran los alimentos llamados funcionales, que son todos aquellos que pueden estar procesados o en su estado natural, que además de sus componentes nutritivos, contienen compuestos adicionales que favorecen la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona (Crowe and Francis, 2013). Para que un alimento pueda ser considerado funcional, éste debe contener ciertos ingredientes que le confieran tal propiedad; éstos son llamados ingredientes funcionales y generalmente son fracciones o extractos debidamente estandarizados y caracterizados con base en el contenido del(los) compuesto(s) bioactivo(s) (Siró *et al.*, 2008). La tendencia actual en la industria es hacia el procesamiento de alimentos que contengan este tipo de ingredientes funcionales, que además de ser nutritivos proporcionen otros beneficios a la salud del consumidor. Por otra parte, existen los nutracéuticos, que son todos aquellos alimentos o partes de ellos que poseen uno o varios efectos fisiológicos definidos. El término nutracéutico es una palabra compuesta que engloba el término nutritivo y farmacéutico debido a que son productos que se consumen como alimentos pero que tienen potencial farmacológico (Sahoimy, 2012).

Para llevar a cabo el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, es preciso generar conocimiento sobre las fuentes naturales de los ingredientes funcionales para poder utilizarlas de manera adecuada en la fabricación de cualquiera de estos productos.

Existen diversas especies vegetales que han sido exploradas en busca de nuevos ingredientes funcionales. Entre las características con que éstas deben

cumplir se encuentran las nutricionales, donde el alto contenido de proteínas, aminoácidos y minerales son buenos atributos a considerar. Además, estas especies deben contener otros ingredientes funcionales en las concentraciones adecuadas, que sean capaces de producir algún efecto farmacológico definido sin llegar a producir efectos secundarios. Las plantas del género *Medicago* constituyen ejemplos que han sido objeto de estudios con fines tanto curativos como preventivos (Rodrigues *et al.*, 2013).

2.1. El género Medicago

El género *Medicago* pertenece a la familia Fabaceae, junto con aproximadamente otras 87 especies de plantas florecientes. Las diversas especies de *Medicago* biosintetizan una gran variedad de compuestos bioactivos que participan en procesos simbióticos, como la fijación de nitrógeno donde participan hongos como rhizobia y micorrhizal, y para la protección contra patógenos y herbívoros. Estas plantas son de gran utilidad para la especie humana ya que algunas de ellas contienen compuestos de interés para la salud (Gholami *et al.*, 2014). Dentro de los metabolitos secundarios más importantes producidos por especies de *Medicago* destacan las saponinas y los flavonoides.

2.1.1. Saponinas

Las saponinas son un conjunto de compuestos que se caracterizan desde el punto de vista estructural por ser glicósidos anfipáticos constituidos por un esteroide lipofílico, un alcaloide esteroidal o un triterpeno (aglicona) unidos mediante un enlace covalente (mediante enlaces glicosídicos) a uno o más azúcares hidrofílicos (Osbourn *et al.*, 2011).

En el género *Medicago*, se distinguen dos tipos de saponinas: el primer grupo está constituido por agliconas con el carbono de la posición 28 oxidado, que a su vez es también acompañado por la oxidación del carbono 23. Dentro de este grupo, se encuentran el ácido queretaroico, la hederagenina, la caupilogenina, la bayogenina, los ácidos medicagénico y zánhico. El segundo grupo corresponde a

sapogeninas con un grupo hidroxilo en la posición 24 y a diferencia del grupo uno, el carbono 28 no presenta oxidación. Debido a que las partes verdes de las plantas son las más atacadas por los herbívoros, las saponinas proporcionan un mecanismo de defensa ya que éstas son abundantes en las partes aéreas (Tava *et al.*, 2011). Las saponinas que son acumuladas en las raíces de las plantas y que son liberadas en el medio, pueden protegerlas contra ciertos nemátodos; además, cuando son acumuladas en las semillas, sirven como medio de protección contra insectos (Argentieri *et al.*, 2008) y participan también en la interacción de las plantas con sus simbiontes (Gholami *et al.*, 2014).

2.1.2. Flavonoides

Los flavonoides -10,000 estructuras diferentes- constituyen una diversa clase de metabolitos que tienen varias funciones para el organismo que los produce. Dentro de las funciones que ejercen durante el crecimiento de las plantas, se destaca su participación en el proceso de adquisición de nutrientes, en la interacción entre la planta y los microorganismos de la tierra, como herramientas de defensa y en el fenómeno de alelopatía, así como en la regulación del desarrollo. La Figura 1 muestra un esquema completo de las funciones que ejercen los flavonoides en plantas de *Medicago*, así como algunos ejemplos de flavonoides específicos (Gholami *et al.*, 2014). Además de las funciones biológicas naturales, los flavonoides desempeñan un conjunto de cambios biológicos en el organismo humano. Estos compuestos tienen un gran potencial como agentes terapéuticos, que se sustenta en parte debido a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos y en algunos casos por su capacidad de actuar de forma similar a los estrógenos producidos por los mamíferos (Pan *et al.*, 2010).

En la medicina tradicional, muchas plantas se utilizan en infusiones y bálsamos, entre otras preparaciones farmacéuticas, que contienen flavonoides como parte los principios activos. Por ejemplo, *M. sativa* ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional de varias partes del mundo, además de consumirse como alimento rico en proteínas.

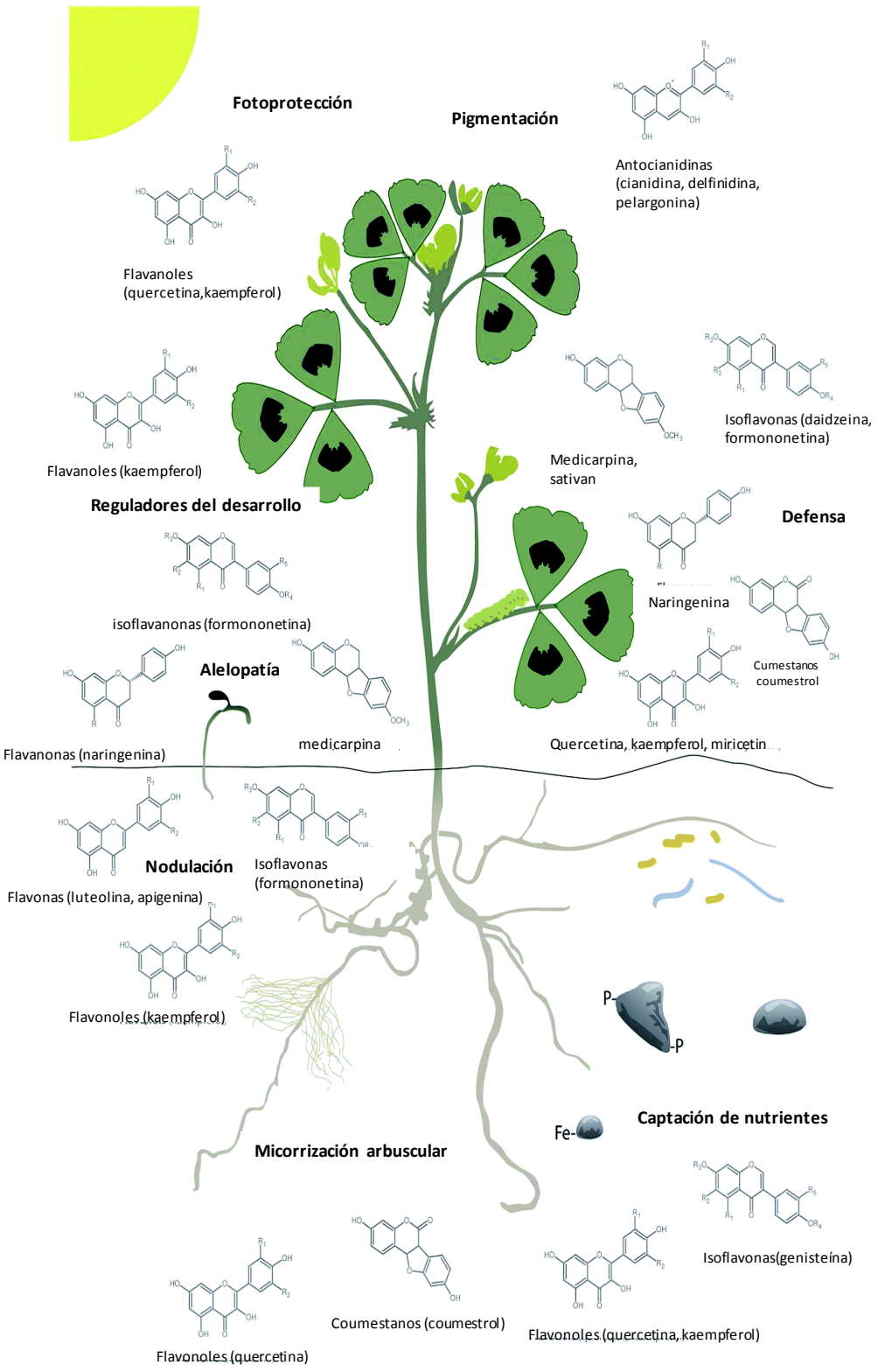


Figura 1. Algunos flavonoides biosintetizados por especies de *Medigaco* y algunas de sus funciones (Gholami *et al.*, 2014).

2.2. Medicago sativa

M. sativa (comúnmente conocida como alfalfa) es una planta forrajera de hasta 80 cm de altura que crece en terrenos secos de climas fríos o templados; posee tallos erectos, cubiertos de vellosidades blanquecinas y hojas compuestas, trifoliadas con foliolos obovados y dentados en el ápice (Figura 2). Produce flores de color azul púrpura con pétalos de hasta 1 cm agrupadas en racimos de unos 4 cm de longitud sobre peciolos de menor tamaño; posee también una raíz larga de unos 2 a 4 cm (Maddaloni, 2001).

Figura 2 . Vista de las partes aéreas de la planta alfalfa (tomada del campo de cultivo en 2014).

Su principal forma de aprovechamiento es la siega, aunque también se aprovecha en regadío, ya que permite la realización de cinco a seis cortes cada 25-35 días, siendo el primero y el último corte los de mayor calidad, debido a que hay una menor cantidad de material vegetal en flor. El forraje puede consumirse en fresco o conservarse mediante deshidratación. La alfalfa generalmente se utiliza para el pastoreo y representa un recurso fundamental para la producción agropecuaria en las regiones templadas del mundo. Su calidad nutritiva, producción de forraje, hábito de crecimiento, perennidad, plasticidad y capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico, la convierten en una especie esencial para muchos sistemas de producción agropecuaria, desde los intensivos en corral, que

la incluyen en la dieta animal como forraje cosechado y procesado, hasta los pastoriles que la utilizan en pastoreo directo (D´Attellis, 2005).

2.2.1. Potencial nutricional de la alfalfa

Debido a que la alfalfa es usada para la alimentación de ganado, el mayor parámetro nutrimental utilizado para definir su calidad es el contenido de proteínas. Además de éstas, pueden encontrarse otros componentes nutricionales como carbohidratos, aminoácidos (L-lisina, L-arginina, ácidos aspártico y glutámico) y aminoácidos no proteínicos (L-canavanina). La alfalfa también contiene altas cantidades de taninos, pectinas, aminas, derivados de cumarinas, triterpenos glicosilados, carotenoides, esteroles, fitoestrógenos y compuestos fenólicos (Gawel, 2012).

La alfalfa es también una importante fuente de las vitaminas A, D, E y K. *Medicago sativa* es consumida como planta en fresco, tanto por humanos como por animales, para mantener sus nutrientes esenciales que ejercen funciones benéficas en el organismo (Liang *et al.*, 2011).

La utilización de esta planta para la elaboración de productos para consumo humano es sin duda una de las alternativas más rentables por su bajo coste y por el beneficio que se obtiene a nivel nutricional. Sin embargo, el contenido de nutrientes en la alfalfa depende enteramente de las condiciones de cultivo y de las inevitables variaciones ambientales que se presentan durante las épocas del año, así como de la madurez de la planta al momento del corte (Scholtz *et al.*, 2009). Los parámetros nutricionales también se ven influenciados por el procesamiento post cosecha al que la planta se somete (Yari *et al.*, 2012). Por todo esto, el estudio de la variación en los principales parámetros nutricionales resulta fundamental tanto para consumo animal, como humano.

2.2.2. Usos medicinales y metabolitos secundarios presentes en M. sativa

La alfalfa se ha utilizado en la medicina tradicional de diversos países como China, Iraq, Turkia, India y América. Calidades farmacológicas tales como alimento

neuroprotector, hipocolesterolémico, antioxidante, anti úlceras, antimicrobiano, hipolipidémico, estrogénico, antiaterosclerótico y con efectividad para enfermedades cardiacas, cáncer, diabetes y síntomas de la menopausia le han sido atribuidas (Bora and Sharma, 2011). A pesar de esto, existen pocos estudios, tanto químicos como farmacológicos, que soporten su efectividad en algunos de estos padecimientos. Dentro de la información disponible sobre el contenido de compuestos bioactivos y su posible rol en el mejoramiento de la salud humana, se ha revelado que esta especie vegetal es una importante fuente de fitoestrógenos, los cuales han demostrado tener diversos efectos benéficos frente a diversas enfermedades. Se ha reportado que la alfalfa contiene cantidades importantes de algunos fitoestrógenos como el coumestrol, la apigenina, la luteolina, la quercetina y la medicarpina, los cuales han demostrado tener actividad estrogénica en animales y humanos (Seguin *et al.*, 2004).

Por otro lado, los resultados obtenidos a través de análisis cuantitativos de los compuestos presentes en la alfalfa son poco consistentes; por ejemplo, se ha reportado que las concentraciones de coumestrol en la alfalfa están entre 25 y 65 µg/gramo de material vegetal seco (Saloniemi, 1993), mientras que Moravcová y colaboradores reportaron 100 µg/g de material vegetal seco como la cantidad de coumestrol encontrada en la alfalfa (Moravcová *et al.*, 2004).

Además de los compuestos mencionados anteriormente, Hong y colaboradores reportaron el aislamiento de seis nuevos compuestos en los brotes de alfalfa, siendo la liquitirigenina y la isoliquiritigenina, los dos fitoestrógenos que mostraron la mayor transactivación de los RE (Receptores Estrogénicos), además del coumestrol que también fue aislado y mostró ser el fitoestrógeno con mayor potencia (Hong *et al.*, 2011).

Dado que los flavonoides son un grupo importante de metabolitos secundarios encontrados en la alfalfa, es posible esperar que ésta produzca una alta capacidad antioxidante, y por tanto, que ejerza algunos efectos protectores.

2.3. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

Dentro de los ingredientes funcionales más buscados para ser integrados en productos nutracéuticos se encuentran los antioxidantes. Se dice que aproximadamente dos tercios de las plantas distribuidas en todo el mundo tienen algún potencial medicinal, y que prácticamente todas éstas son excelentes fuentes de antioxidantes (Krishnaiah *et al.*, 2011).

Un antioxidante es todo compuesto capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, siendo la oxidación una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Estos procesos pueden generar radicales libres, también llamados especies reactivas de oxígeno (EROs), moléculas que poseen un electrón desapareado en la capa de valencia y que inician reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes dan fin a estas reacciones quitando intermedios del radical libre y evitando la producción de otras reacciones de oxidación, ya que ellos se oxidan a sí mismos originando un radical libre estable.

En los seres humanos, existen diversos procesos metabólicos que dan origen a radicales libres; sin embargo, el cuerpo posee sistemas antioxidantes naturales como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa que son capaces de eliminar estos radicales libres y mantener el balance entre su formación y su eliminación (López, 2014). Sin embargo, diversos factores ambientales y situaciones patológicas pueden generar un desequilibrio entre formación y eliminación de radicales, dando paso a las ya mencionadas reacciones en cadena, que pueden causar daños a macromoléculas, células y tejidos, ocasionando un estado patológico. Para prevenir estos acontecimientos, es preciso contar con fuentes externas de antioxidantes que puedan ser empleadas como defensa para lograr reestablecer los niveles de EROs. En este caso, los de origen natural son los más adecuados.

Los antioxidantes presentes en las plantas tienen una gran diversidad estructural, siendo una gran proporción de éstos de naturaleza fenólica. En su fuente natural, estos compuestos tienen un rol específico, principalmente participando en la defensa o bien para llevar a cabo procesos de crecimiento y

supervivencia; sin embargo, en algunos casos particulares, el rol de estos compuestos en las plantas continua siendo una interrogante (Gholami *et al.*, 2014).

Dentro de los compuestos antioxidantes de origen vegetal, los flavonoides son un grupo muy importante que a menudo son buscados en diversas especies vegetales con el fin de utilizarlos como ingredientes funcionales de diversos productos para consumo humano tanto alimentario como farmacéutico e incluso cosmético (de Groot and Rauen, 1998).

Debido a su diversidad y su amplia distribución, los compuestos fenólicos han sido estudiados con el fin de conocer su contribución en el tratamiento y prevención de todas aquellas enfermedades cuya aparición y desarrollo se favorece con el aumento en la producción de radicales libres.

2.3.1. Rol de los antioxidantes en la terapéutica

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener sustituyentes hidroxilo en diversas posiciones de los anillos aromáticos. Estos grupos funcionales les confieren la capacidad de ceder $H^{\bullet}$ a los radicales libres presentes para neutralizarlos.

Dentro de los diversos mecanismos empleados por los compuestos fenólicos para actuar como antioxidantes, los de los flavonoides son de los más conocidos. Su acción resulta principalmente de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres. Los flavonoides son capaces de inhibir diversas oxidasas como la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa y la xantina oxidasa, evitando la formación de especies reactivas de oxígeno e hidroperóxidos. Además de estos mecanismos, los flavonoides son capaces de inhibir enzimas involucradas en procesos oxidativos como la fosfolipasa A_2, al mismo tiempo que estimulan la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa (Sudheesh *et al.*, 1999).

Los polifenoles han demostrado ser eficaces en el cuidado de la salud; dentro de los efectos relacionados con el uso de polifenoles se encuentran los antimicrobianos, anti-inflamatorios, anticancerígenos e incluso como inmunomoduladores (Fantini *et al.*, 2015).

Varios polifenoles, principalmente flavonoides, han sido estudiados como agentes antibacterianos. Compuestos como la luteolina, quercetina, apigenina, así como el ácido clorogénico y el estilbeno resveratrol, han demostrado potenciales efectos contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, produciendo efectos sinérgicos y efectos aditivos (pero no efectos antagónicos) cuando son co-administrados con antibióticos (Su *et al.*, 2014). Otros estudios han demostrado una correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante por una parte, y por otra, la actividad antimicrobiana de extractos vegetales utilizados en la medicina tradicional (Carocho *et al.*, 2015).

Efectos anti-inflamatorios también han sido asociados con el uso de polifenoles. Un estudio demostró que la catequina es capaz de inhibir procesos inflamatorios (por la vía de las MAPKs) efectuados por macrófagos en ratones. Otros estudios han demostrado la participación de estos antioxidantes en diversos procesos de inflamación que involucran vías de señalización como la vía de Akt y NF-κB, inhibición de la producción de citosinas y quimiocinas inflamatorias, suprimiendo la actividad de COX y iNOS y disminuyendo la producción de EROs/ERN (Especies reactivas de nitrógeno) (Ichikawa *et al.*, 2004). Los procesos anti-inflamatorios pueden tener varias repercusiones en el desarrollo de otras enfermedades, por ejemplo en las cardiovasculares. Al respecto, estudios *in vitro* han demostrado que los diversos polifenoles reducen la viabilidad de adipocitos y evitan la proliferación de los pre-adipocitos y suprimen su diferenciación. Además, son capaces de evitar la acumulación de triglicéridos, estimular lipolisis y la oxidación de ácidos grasos (Wang *et al.*, 2014).

Existen también evidencias que indican que la generación excesiva de EROs bajo condiciones patológicas es una situación importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares o en la progresión de arterosclerosis prematura (Upadhyay and Dixit, 2015). Al respecto, se ha reportado que numerosos compuestos fenólicos (incluyendo flavonoides) son potentes inhibidores de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad LDL (de su denominación en inglés: Low Density Lipoprotein) y que ejercen su rol cardioprotector mediante sus efectos anti-inflamatorios a nivel micro vascular o a nivel sistémico. Además, los polifenoles

pueden incrementar los niveles de las lipoproteínas de alta densidad HDL (En inglés: High Density Lipoprotein) y mejorar la función endotelial (Terao, 2009).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado una relación positiva entre el alto consumo de antioxidantes con efectos terapéuticos relacionados con el cáncer. Durante el desarrollo del cáncer, es frecuente que se genere un estado de desajuste entre la formación y eliminación de EROs, generándose un estado de estrés oxidativo, el cual termina por dañar células y tejidos. Mediante algunos estudios, se ha demostrado que las células cancerígenas (que se encuentran en estrés oxidativo) pueden ser tratadas con polifenoles que, bajo esta situación, actúan como pro-oxidantes, generando muerte celular de una forma selectiva debido al aumento sustancial en los niveles de especies reactivas de oxígeno contenidas en las células (Martin-Cordero *et al.*, 2012).

Además de sus efectos terapéuticos como antioxidantes, diversos polifenoles han sido descritos como compuestos capaces de producir otros efectos farmacológicos, esto debido a su actividad estrogénica. A estos compuestos se les ha llamado fitoestrógenos.

2.4. Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos pertenecen a un extenso grupo de compuestos de origen natural que se han caracterizado por producir cambios fisiológicos en quien los consume. Inicialmente, las acciones de los fitoestrógenos se manifestaron en los animales que eran alimentados con trébol rojo (*Trifolium subterraneum* L., Fabaceae), una de las principales fuentes de fitoestrógenos. Posteriormente, los fitoestrógenos y sus fuentes naturales comenzaron a ser objeto d estudios tanto químicos como farmacológicos, luego de mostrar su capacidad de prevenir el desarrollo de cáncer de mama y disminuir la incidencia de síntomas vasomotores durante la menopausia en mujeres asiáticas (Cornwell *et al.*, 2004).

En 1940 diversos estudios científicos comenzaron a llevarse a cabo para determinar qué constituyentes químicos presentes en especies vegetales eran los responsables de diversas alteraciones reproductivas causadas por la alimentación del ganado con trébol rojo (Bennetts *et al.*, 1946), así como determinar si éstos eran

también los responsables del efecto protector de la soya, ya que ésta es un componente importante en la dieta de la mujer asiática. Los resultados indicaron que tanto el trébol rojo como la soya contienen un tipo de compuestos que son los responsables de estos efectos; a estos compuestos se les llamó “fitoestrógenos” debido a que ejercen efectos similares a los producidos por los estrógenos endógenos.

El término fitoestrógeno se utiliza para definir a aquellos metabolitos secundarios que inducen respuestas biológicas en organismos vertebrados y que son capaces de imitar o modular las acciones de los estrógenos endógenos, debido principalmente a su capacidad de unirse a los receptores estrogénicos (RE). Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos de origen vegetal o derivados del metabolismo *in vivo* de precursores presentes en las plantas que son consumidos por humanos (Poluzzi *et al.*, 2014). Debido a que los fitoestrógenos son un grupo muy heterogéneo de compuestos, éstos han sido clasificados desde el punto de vista estructural en isoflavonas, cumestanos y lignanos (Rezzani *et al.*, 2009).

2.4.1. Isoflavonoides

El estudio de los isoflavonoides -principalmente isoflavonas- como compuestos con actividad estrogénica se inició por la necesidad de conocer los compuestos químicos que causaban la llamada “la enfermedad del trébol” en ovejas australianas, la cual hacía referencia a desórdenes reproductivos en las ovejas que llevaban una alimentación basada principalmente en trébol. Estos desórdenes consistían en problemas reproductivos que reducían el número de partos que llegaban a término así como periodos de lactancia poco eficientes, cambios en los órganos sexuales e infertilidad permanente (Bennetts *et al.*, 1946).

Las isoflavonas son el grupo más común y más estudiado dentro de la clasificación, ya que se encuentran distribuidos en una gran variedad de plantas, incluidos varios frutos y diversos vegetales, predominantemente leguminosas. En su fuente natural, los isoflavonoides juegan un rol importante como agentes de defensa contra patógenos, mientras que para los humanos son útiles como promotores de la salud. Por todo esto, en los últimos años, los fitoestrógenos han

captado la atención de la industria farmacéutica y aquella dedicada a producir alimentos nutracéuticos, ya que pueden ser útiles tanto por su contenido en compuestos bioactivos como por ser suplementos dietéticos (Poluzzi *et al.*, 2014).

Dentro del amplio grupo de fitoestrógenos, las isoflavonas son los compuestos más estudiados por su actividad estrogénica. De éstas, las que más han mostrado esta actividad son las agliconas daidzeína y genisteína, la daidzina y la genistina (isoflavonas glucosiladas en la posición 7), los éteres de la daidzeína y genisteína (biochanina A y formoninetina, respectivamente) y la gliciteína (Figura 3) (Rishi, 2002).

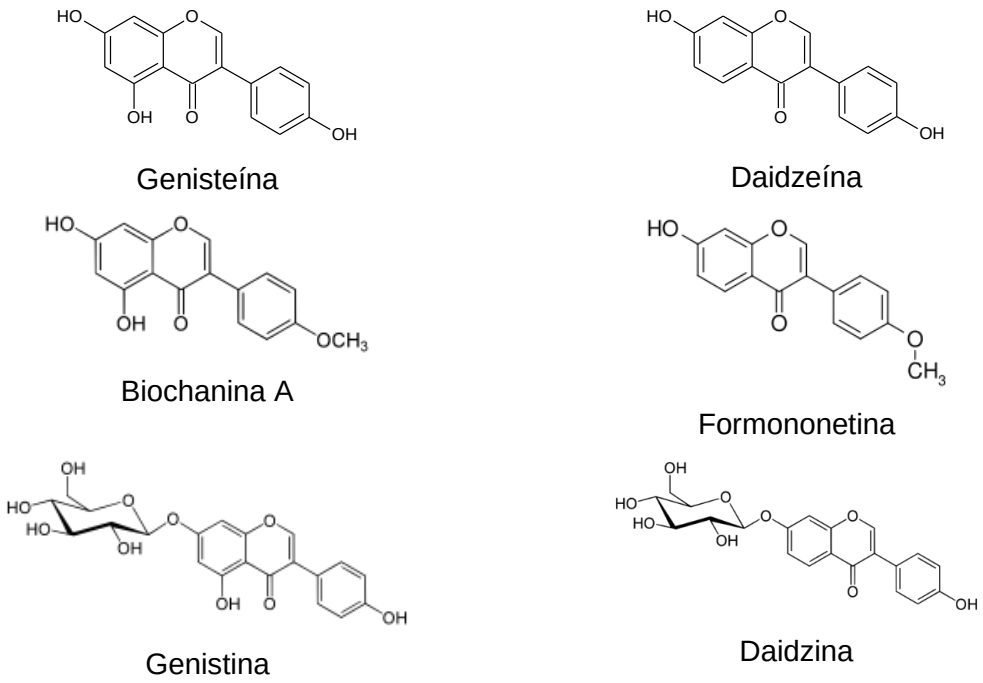


Figura 3. Estructuras químicas de los isoflavonoides más estudiados.

Cuando un mamífero ingiere algún alimento que contiene las isoflavonas daidzeína y/o genisteína, éstas son metabolizadas en el tracto gastrointestinal. La biochanina A y la formononetina por su parte, son metabolizadas dando genisteína y daidzeína, respectivamente (Rishi, 2002). Las isoflavonas son biosintetizadas en organismos vegetales de la familia Fabaceae, aunque también se han reportado en Iridaceae y Euphorbiaceae. Algunas de las fuentes principales de este tipo de

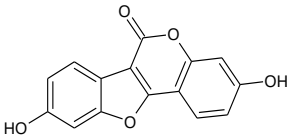
compuestos son la soya, los cacahuates, el trébol, la nuez y algunas semillas como las de girasol (Ibarreta *et al.*, 2001).

2.4.2. Cumestanos

Los cumestanos son otro grupo de compuestos fenólicos que muestran actividad estrogénica. Estos metabolitos secundarios poseen una estructura de cumarina y, desde el punto de vista biosintético, están relacionados con las isoflavonas. Dichos compuestos son biosintetizados principalmente durante la germinación de las legumbres y de algunas plantas forrajeras. El coumestrol y el 4-metoxi-coumestrol son los dos cumestanos que han mostrado mayor actividad estrogénica (Poluzzi *et al.*, 2014). Los cumestanos son menos comunes en la dieta humana que los isoflavonoides y los lignanos. Sus principales fuentes dietéticas son el trébol y la alfalfa (Ososki and Kennelly, 2003).

El coumestrol (Figura 4) fue reportado como un nuevo fitoestrógeno por primera vez en 1957 por Bickoff y colaboradores luego de ser aislado de *Trifolium repens* L., *Trifolium fragiferum* L. y *Medicago sativa* L., tres miembros de la familia Fabaceae (Bickoff *et al.*, 1957). El coumestrol es el cumestano más estudiado como fitoestrógeno, debido a que se ha demostrado que tiene una gran afinidad por los receptores estrogénicos y una alta potencia (Poluzzi *et al.*, 2014).

Se sabe además, que el contenido de coumestrol en las plantas que lo producen varía de acuerdo con el tipo de especie vegetal, etapa de crecimiento, presencia de alguna enfermedad, así como de la exposición de la planta al ataque de insectos y hongos. Se ha establecido por ejemplo que, cuando la alfalfa es atacada por insectos y hongos, ésta produce mayores cantidades de coumestrol y 4-metoxi-coumestrol como fitoalexinas (Adams, 1995).



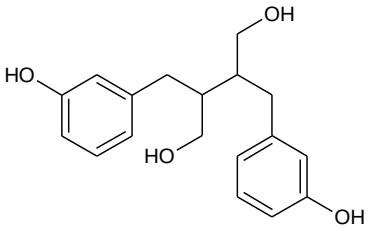
Coumestrol

Figura 4 . Cumestano más estudiado por su alta potencia como fitoestrógeno.

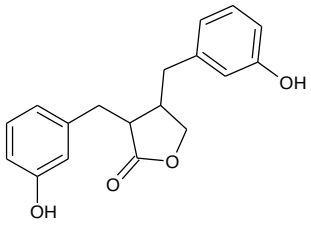
2.4.3. Lignanos

Los lignanos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, donde tienen un papel importante en el crecimiento. Se han identificado en diversos vegetales consumidos por el hombre, incluyendo semillas (linaza, calabaza, girasol, amapola y sésamo, centeno, salvado de avena y cebada) y muchas otras fuentes vegetales (Kuijsten *et al.*, 2005).

El secoisolaricirresinol y el matairresinol son los dos fitoestrógenos pertenecientes a este grupo que más se han reportado como agentes capaces de producir un efecto similar al de los estrógenos. Ambos compuestos son metabolizados por acción bacteriana en el intestino, produciendo sus metabolitos enterodiol y enterolactona, respectivamente (Figura 5). Adicionalmente, el enterodiol puede ser metabolizado a enterolactona (Ososki and Kennelly, 2003).



Enterodiol



Enterolactona

Figura 5. Estructuras de dos lignanos con actividad estrogénica.

2.4.4. Otros fitoestrógenos

Existen otros compuestos que tienen la capacidad de producir un efecto estrogénico como el resveratrol, que ha sido identificado en varias plantas donde ejerce el papel de fitoalexina, protegiéndolas de insectos y hongos (Bagchi *et al.*, 2001). Otros compuestos de origen sintético, han sido considerados por algunos autores como fitoestrógenos. Dentro de estos se encuentra el dietilestilbestrol, un estilbeno sintético que ha mostrado importante efecto estrogénico en humanos. Otros compuestos producidos por microorganismos, principalmente por hongos, han demostrado efectos estrogénicos. Dentro de estos, la zearalenona (el micoestrógeno que ha mostrado la actividad estrogénica más potente), el zearalenol

y sus derivados han sido ampliamente estudiados. Las estructuras químicas de algunos de estos compuestos considerados fitoestrógenos se muestran en la Figura 6 (Ibarreta *et al.*, 2001).

Figura 6. Tres compuestos con actividad estrogénica.

2.5. Metabolismo de los fitoestrógenos en el organismo

Como se mencionó anteriormente, los fitoestrógenos son compuestos de origen vegetal o derivados del metabolismo *in vivo* de sus precursores. El metabolismo de los fitoestrógenos resulta importante si se considera que algunos de los compuestos formados producen un efecto estrogénico mayor que el de sus precursores.

En humanos, después de consumir un alimento rico en fitoestrógenos, diversas conversiones enzimáticas son llevadas a cabo por la microflora del tracto gastrointestinal (Figura 7). Estos procesos complejos dan como resultado la formación de metabolitos con estructura similar a los estrógenos.

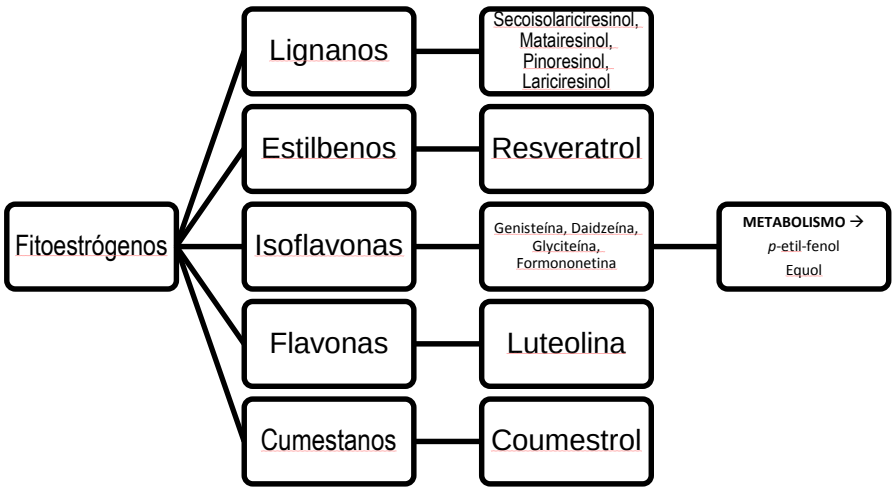


Figura 7. Ilustración del metabolismo de los fitoestrógenos en dos especies animales (Pilsakova *et al.*, 2010).

Una vez absorbidos, los fitoestrógenos sufren metabolismo enterohepático y pueden ser excretados por vía biliar sin previos cambios, reabsorbidos o conjugados por el hígado y excretados en la orina (Pilsakova *et al.*, 2010). Procesos metabólicos similares pueden llevarse a cabo por medio de microorganismos en el rumen de los animales que son alimentados con vegetales ricos en fitoestrógenos como el trébol rojo o la alfalfa (Murkies *et al.*, 1998).

Debido a sus propiedades químicas y a sus características estructurales, los fitoestrógenos pueden producir dos efectos farmacológicos importantes: generar actividad estrogénica y actuar como agentes antioxidantes.

2.6. La actividad estrogénica

El estradiol (17β-estradiol) es una hormona endógena que estimula la división y crecimiento celular de diversos tejidos en mamíferos. Estos procesos cíclicos son controlados principalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG). Durante este ciclo, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH), la cual actúa sobre la hipófisis anterior, provocando que ésta secrete las hormonas folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH) hacia la circulación periférica. Luego, estas dos hormonas regulan los cambios cíclicos en el ovario, mientras que en el útero y la vagina, los cambios durante el ciclo reproductivo son dependientes

de los esteroides producidos en el ovario (Guyton, 2011). La FSH estimula la proliferación de las células granulosas e induce los receptores para la LH en esas células. La LH por su parte estimula las células de la teca para secretar andrógenos. La FSH en el ovario regula la maduración del folículo y estimula a las células granulosas para producir aromatasa, una enzima que convierte andrógenos a 17β-estradiol. Este estrógeno es entonces liberado dentro del folículo y hacia la circulación periférica, lo cual promueve la proliferación y maduración celular del útero, cérvix y vagina (OPPTS, 2009).

El sitio principal de síntesis de estradiol es el ovario, aunque otros como la glándula suprarrenal también lo producen aunque en menor cantidad. En este caso, el estradiol actúa de manera local (por ejemplo, en el hueso y en el tracto reproductivo). Una vez que el organismo ha producido estrógenos suficientes para cubrir sus necesidades fisiológicas, estos mismos promueven la retroalimentación negativa que consiste en enviar el mensaje al hipotálamo para que ya no promueva más el proceso de producción de estrógenos (Guyton, 2011).

El 17β- estradiol es capaz de unirse a los RE y actuar como un agonista. En este caso, después de su unión con el RE, el complejo ligando-receptor activo se une a una porción del ADN, específicamente en el elemento de respuesta a los estrógenos (ERE), para regular la transcripción de genes específicos. El resultado final es la modulación de la transcripción de diversos genes (Barlas *et al.*, 2014).

La actividad estrogénica se define como la capacidad que tiene un compuesto de activar los receptores estrogénicos produciendo un efecto similar al producido por los estrógenos endógenos. Existen métodos para evaluar la actividad estrogénica de un compuesto determinado mediante ensayos *in vivo*. Particularmente, el ensayo uterotrófico es un método ampliamente utilizado para evaluar el efecto estrogénico de diversas moléculas tanto de origen natural como de disruptores endocrinos ambientales. En este ensayo, se utilizan preferentemente roedores por su fácil manipulación y debido a que tienen un ciclo estral corto que va de 4 a 5 días, tiempo suficiente para poder observar la estrogenicidad de un compuesto, la cual puede medirse con el aumento en el peso del tejido uterino como

resultado de la activación de la proliferación celular por la activación del receptor estrogénico.

2.6.1. Receptores estrogénicos

Los receptores estrogénicos (RE) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y moduladores de la transcripción de genes específicos dependientes de ligando. Los RE son capaces de unirse a un gran número de compuestos con características estructurales muy variadas. En condiciones fisiológicas, los estrógenos (principalmente el 17β-estradiol) se unen a los receptores estrogénicos y desencadenan la activación de diversas rutas fisiológicas y patológicas (Lorand *et al.*, 2010). Aquellas moléculas capaces de unirse a los RE lo hacen a través de su interacción con el dominio de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés: Ligand Binding Domain), con lo cual se induce un cambio conformacional que modifica la flexibilidad del C terminal de la hélice 12 de dicha porción del RE (Heldring *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, se conocen dos tipos de receptores, los RE-alfa (RE-α) y los RE-beta (RE-β) que sólo difieren en el C terminal del LBD (En inglés: Ligand Binding Domain) y en el N terminal del dominio de transactivación (Porción AF1 y AF-2). La Figura 8 muestra de manera general la constitución de ambos tipos de receptores estrogénicos.

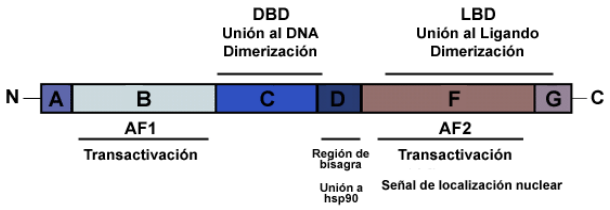


Figura 8. Constitución general de los receptores estrogénicos (Marquéz, 2000).

Tanto los RE-α como los RE-β se encuentran distribuidos en diversas partes del organismo como la glándula mamaria, ovarios, útero, hueso, cerebro, corazón, testículos, vejiga, pulmones, riñón, glándula suprarrenal, colon y próstata. Sin embargo, no todos los tejidos expresan ambos tipos de receptores y por lo general

uno de ellos se expresa con mayor abundancia que el otro. La Figura 9 muestra los tejidos donde se expresan los dos tipos de receptores (Drummond and Fuller, 2010).

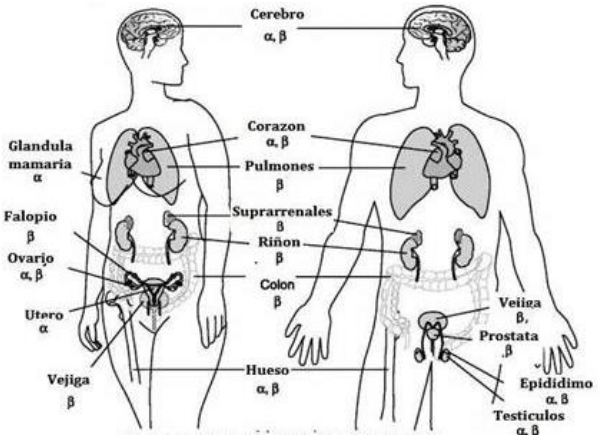


Figura 9. Tejidos donde se expresan los receptores estrogénicos (Drummond and Fuller, 2010).

Los fitoestrógenos son moléculas estables y de bajo peso molecular por lo que pueden atravesar las membranas celulares y así interactuar con enzimas y receptores. Se ha propuesto que los fitoestrógenos, al igual que los estrógenos endógenos, son capaces de interactuar con los RE y producir un efecto bajo diversos mecanismos (Ososki and Kennelly, 2003).

Los fitoestrógenos representan un grupo muy heterogéneo de compuestos naturales y se dice que éstos mantienen una gran similitud estructural con el estradiol a pesar de que son compuestos fenólicos y no esteroideos. Esta similitud ha sido esquematizada, ya que los fitoestrógenos están constituidos por un sistema plano que incluye un anillo aromático sustituido con un hidroxilo en la posición *para*, el cual está aproximadamente a 12 Å de distancia de un segundo grupo hidroxilo en el mismo plano, características que son similares a las del estradiol, como se muestra en la Figura 10 (Hu and Aizawa, 2003).

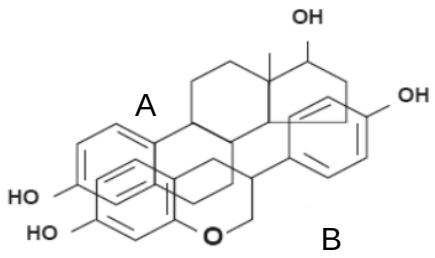


Figura 10. Estructuras comparativas del estradiol (A) y de un fitoestrógeno (B).

2.6.2. Mecanismos de acción de los fitoestrógenos

Para poder explicar el efecto de los fitoestrógenos observado en diversos experimentos *in vitro* e *in vivo*, se han propuesto dos mecanismos: el genómico y el no genómico.

2.6.2.1. Mecanismos genómicos

Este mecanismo clásico aborda el efecto de los fitoestrógenos utilizando la teoría clásica que explica el proceso seguido por el 17β-estradiol (Figura 11). En este mecanismo, el ligando (algún fitoestrógeno) se une al LBD del monómero del receptor localizado en el citosol, lo que produce un cambio de conformación y el consecuente desprendimiento de las denominadas proteínas de choque térmico (hsp), las cuales mantienen inactivo al RE en el citosol. Posteriormente, se produce la dimerización del receptor. Una vez formado el dímero (puede ser homodímero o heterodímero), éste se transloca al núcleo donde actúa como factor transcripcional y luego de reconocer una secuencia específica en el ADN llamada elemento de respuesta a estrógeno (ERE), el dímero se une al ADN estimulando la transcripción de genes. El proceso de transcripción es activado al formarse el complejo de iniciación de la transcripción donde participan diversos co-activadores y co-represores así como proteínas reguladoras de la transcripción. El proceso estimulado por el RE es finamente regulado dependiendo del tejido donde ocurre y su especificidad depende de la composición del complejo de iniciación de la transcripción. La Figura 11 ilustra el mecanismo genómico propuesto para los fitoestrógenos (Klein-Hitpass *et al.*, 1986).

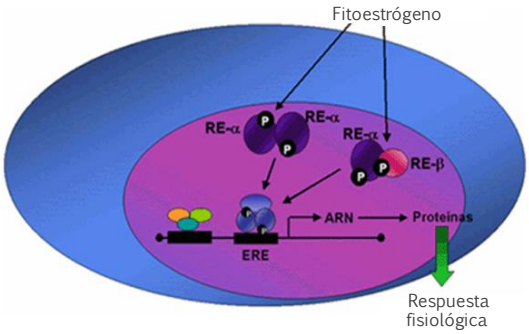


Figura 11. Mecanismo genómico propuesto para los fitoestrógenos (Klein-Hitpass *et al.*, 1986).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la activación de los RE puede ser mediada a través de un mecanismo alterno que no requiere la unión del fitoestrógeno al LBD. Esto sugiere que los RE pueden ser activados mediante la fosforilación de residuos específicos en la porción de transactivación AF-1 del RE, la cual es mediada por diversas cinasas que son activadas mediante cascadas de señalización desencadenadas por acción de receptores tirosina cinasa (Xiao *et al.*, 2014). Se ha sugerido que una enzima conocida como MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) es la encargada de llevar a cabo dicha activación en el residuo Ser-118 de la fracción AF-1 del RE (Figura 12). Una vez que el RE es activado, el proceso de señalización sigue su curso para llegar a la respuesta final que consiste en la producción de diversas proteínas relacionadas con proliferación, diferenciación y supervivencia celular.

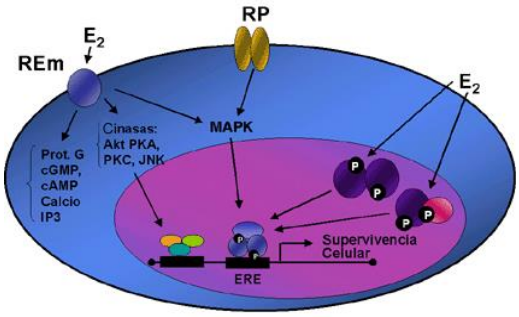


Figura 12. Mecanismo no genómico propuesto para los fitoestrógenos (Klein-Hitpass *et al.*, 1986).

2.6.2.2. Mecanismos no genómicos

El modo de acción “no-genómico” del estrógeno y en general de todas las hormonas esteroideas es un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción ni de síntesis de nuevas proteínas para producir su efecto primario. Por esta razón, debe ser mediado por un receptor localizado en la membrana. Entre estos efectos rápidos, se encuentran flujos de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas cinasas asociadas a la membrana (Kim and Levin, 2006).

Dentro de los efectos producidos por lo fitoestrógenos a través de mecanismos no genómicos, se incluyen: inducción de diferenciación en células cancerosas, de la activación de tirosina cinasas, de la actividad de las topoisomerasas de ADN, así como supresión de la angiogénesis y efectos antioxidantes. Se destacan también otros efectos a nivel celular y molecular que influencian la biosíntesis y el metabolismo de los esteroides y ácidos grasos, así como de proteínas acarreadoras de esteroides, además de interferir en la transferencia intracelular y transmembranal de hormonas. Se sabe también que los fitoestrógenos inhiben las enzimas necesarias para la conversión de hormonas, con lo cual se reduce su actividad y por lo tanto, la proliferación celular en tejidos con cáncer (Benassayag *et al.*, 2002).

Existe evidencia experimental que muestra el potencial de los fitoestrógenos para fines terapéuticos, siendo hasta el momento la genisteína y el coumestrol los dos fitoestrógenos más estudiados debido a que han mostrado mayor potencia y mayor afinidad a los RE-β (Hong *et al.*, 2011; Poluzzi *et al.*, 2014).

2.6.3. Fitoestrógenos como alternativa para el tratamiento de los síntomas de la menopausia

La menopausia es caracterizada por una drástica disminución en la producción de estrógenos que desencadena una serie de cambios fisiológicos en la mujer. Estos cambios a menudo producen síntomas que alteran la calidad de vida

de las mujeres menopáusicas debido a cambios drásticos de humor, alteraciones del sueño, síntomas vasomotores, etc. Además, la disminución de la producción de estrógenos incrementa el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, así como el riesgo de sufrir fracturas (Blumel *et al.*, 2000).

Durante muchos años, estos síntomas han sido tratados con la terapia de remplazo hormonal (HRT) que básicamente consiste en la administración de pequeñas cantidades de estrógenos que cubren la función básica de los estrógenos endógenos. Sin embargo, se sabe que el uso prolongado de la HRT con estrógenos en mujeres postmenopáusicas, además de proporcionar beneficios sobre los síntomas de la menopausia, también incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de endometrio y cáncer de mama (Beral, 2003). Por lo tanto, es de gran importancia encontrar compuestos capaces de producir el efecto benéfico de los estrógenos pero que no desencadenen la proliferación celular indeseable.

Se tienen antecedentes que muestran cómo las mujeres americanas presentan mayor incidencia de síntomas vasomotores (70% - 80% de mujeres) durante el periodo de climaterio, comparado con las mujeres asiáticas cuya incidencia es apenas de entre el 10 y 20% de la población. Este hecho se ha atribuido a las diferencias en la dieta, principalmente al alto consumo de soya por las mujeres asiáticas (Patisaul and Jefferson, 2010). Por esta razón, la búsqueda de compuestos novedosos se enfoca en las fuentes naturales de compuestos con actividad estrogénica.

Actualmente, se han llevado a cabo diversos estudios enfocados en la búsqueda de compuestos de origen natural que sean capaces de aliviar los diversos síntomas de la menopausia, pero que al mismo tiempo no produzcan los efectos indeseables que presenta la terapia hormonal. Sin embargo, la mayoría de estos estudios realizados en mujeres estuvo asociada con una gran limitación, ya que los sujetos de experimentación interrumpen el tratamiento antes de que la prueba concluya, afectando de esta forma el análisis de datos.

Un estudio realizado previamente reveló que la administración de 54 mg de genisteína al día durante dos años mejora la calidad de vida de mujeres menopáusicas (Atteritano *et al.*, 2014).

Hasta la fecha, todos los reportes que existen acerca del potencial de los fitoestrógenos para el alivio de los síntomas de la menopausia son bastante variados y poco concluyentes, debido a los inconvenientes que se tienen al trabajar con personas como sujetos de experimentación.

2.6.4. Fitoestrógenos en la prevención de osteoporosis

La palabra osteoporosis significa literalmente “hueso poroso” y es una enfermedad caracterizada por el deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, el cual conduce a una mayor fragilidad del hueso y a un aumento consiguiente de riesgo de sufrir fracturas (Cabrera, 1999). La osteoporosis es un padecimiento muy común en mujeres postmenopáusicas, siendo la primera causa de fracturas en mujeres de edad avanzada.

La disminución en la producción de estrógenos durante la menopausia es uno de los principales factores que llevan al debilitamiento de los huesos. La alternativa que se ha utilizado para evitar la pérdida de masa ósea es el uso de la terapia de remplazo hormonal con la cual se compensa la baja producción de estrógenos. Por eso se ha propuesto que los fitoestrógenos podrían tener el mismo efecto protector que los estrógenos. Los estudios enfocados a comprobar esta hipótesis se basan principalmente en estudios *in vivo* donde se evalúa el incremento en la masa ósea y/o la taza de remodelado óseo. Los datos con los que se cuenta actualmente son muy variados y contradictorios, ya que el resultado global de un tratamiento con fitoestrógenos depende de muchos factores como la dosis, la ruta y duración de la administración e incluso el tipo de modelo animal sobre el cual se realicen las pruebas (Patisaul and Jefferson, 2010).

Un estudio demostró que la administración de genisteína a mujeres postmenopáusicas producía un incremento significativo en la densidad mineral ósea además de una disminución en la concentración de los marcadores bioquímicos de resorción ósea (Turhan, 2008). De manera adicional, luego de la administración de genisteína durante un año, se produjo el incremento de la densidad ósea que fue comparable con el producido por los estrógenos utilizados en la terapia de remplazo hormonal (Morabito *et al.*, 2002).

Para explicar los efectos benéficos de los fitoestrógenos sobre el sistema óseo, se han propuesto dos mecanismos que explican estas observaciones. El primer mecanismo implica que los fitoestrógenos induzcan la activación de la apoptosis en los osteoclastos y disminuyan por lo tanto la cantidad de células destructoras de la masa ósea mientras que el segundo mecanismo implica la inhibición de la actividad de la tirosina cinasa, promovida por los receptores estrogénicos de membrana (Polkowski and Mazurek, 2000).

2.6.5. Fitoestrógenos y diversos tipos de cáncer

Históricamente, las mujeres de América han presentado un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con las mujeres asiáticas, debido a que estas últimas tienen una dieta rica en soya (Atkinson *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que las personas que llevan una dieta rica en alimentos que contienen fitoestrógenos tienen menor riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer como el de mama, de ovario, de próstata y de colon. Se ha propuesto que estos compuestos estrogénicos ejercen su efecto, uniéndose a los RE-α y RE-β y que tienen la capacidad de actuar como agonistas de estos receptores y en otros casos como antagonistas. Es importante por lo tanto determinar la relación que existe entre la concentración de fitoestrógenos y el rol que juegan éstos al interactuar con los receptores. Se ha establecido que a bajas concentraciones, los fitoestrógenos estimulan la proliferación de células de cáncer de mama dependientes de receptores del tipo alfa, mientras que a altas concentraciones producen un efecto citotóxico. Esto demuestra la importancia de llevar a cabo estudios que permitan determinar la dosis a la cual se produce el efecto deseado y con ello, poder elaborar productos que contengan las cantidades adecuadas que permitan utilizar estos compuestos para el tratamiento y prevención de enfermedades (Rishi, 2002). Los fitoestrógenos han demostrado también una importante actividad antioxidante, por lo que son doblemente valorados como compuestos bioactivos.

Por otro lado, se ha evaluado el efecto de la genisteína en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, donde se observó un efecto bifásico. A dosis

fisiológicas de 100 nM/L a 1 μM/L, la genisteína produjo una estimulación de la proliferación celular. Sin embargo, en presencia de dosis fisiológicas de estrógenos, la genisteína compitió por el sitio activo de los receptores a estrógenos e inhibió la proliferación. A dosis mayores a 10 μM/L, la genisteína inhibió la proliferación celular, debido probablemente a la inhibición de la actividad de los receptores tirosina cinasa del factor de crecimiento. Con esto se demuestra que la actividad de estos fitoestrógenos y de muchos otros depende en gran medida de la concentración (Messina *et al.*, 2006).

2.6.6. Fitoestrógenos en la prevención de enfermedades cardiovasculares

Varios estudios revelan que durante la menopausia, la disminución en la producción de estrógenos provoca una serie de cambios fisiológicos en el organismo, los cuales aumentan el riesgo de desarrollar diversas enfermedades como las cardiovasculares, donde los niveles de colesterol se encuentran por encima de los valores normales. Se ha observado que quienes consumen constantemente alimentos ricos en fitoestrógenos mantienen normales sus niveles de colesterol y en varios casos, la disminución en el nivel de colesterol es favorecida por el consumo de fitoestrógenos (Ososki and Kennelly, 2003).

Existen evidencias que demuestran que los fitoestrógenos ejercen ciertos efectos sobre el metabolismo de los lípidos. Los mecanismos por los que los fitoestrógenos influyen sobre éstos incluyen procesos tanto genómicos como no genómicos. Dentro de los mecanismos genómicos que explican al menos en parte los efectos observados en estudios experimentales, se incluye la activación de los RE nucleares y el subsecuente incremento de la expresión de la enzima oxido-nítrico sintetaza endotelial, el incremento de óxido nítrico biodisponible y la reducción del estrés oxidativo (Morabito *et al.*, 2002).

Gracias a todas las ventajas terapéuticas que muestran estos compuestos, el interés por los productos vegetales ricos en fitoestrógenos ha aumentado y hoy en día se buscan fuentes de estos compuestos que puedan ser útiles para tratar y prevenir diversas enfermedades.

2.7. Seguridad de los productos funcionales de origen naturales

En el desarrollo de productos funcionales y nutracéuticos, es importante considerar, además de la composición nutrimental y el potencial farmacológico, la seguridad e inocuidad de los productos. Diversos estudios han reportado efectos tóxicos producidos por el consumo de especies vegetales que contienen metabolitos secundarios tóxicos. Particularmente, plantas pertenecientes a la familia Fabaceae como la soya, el trébol y la alfalfa, han producido algunos desórdenes en la salud de los animales que se alimentan de estas plantas; éstos van desde infertilidad y otras alteraciones reproductivas, hasta efectos letales. Algunos estudios han mostrado que estos efectos son causados principalmente por el alto contenido de fitoestrógenos presentes en las plantas. Dado que estas especies son también de consumo humano, es preciso garantizar que estos efectos indeseables no se produzcan.

Otro aspecto a considerar es la importancia de elaborar productos a nivel industrial cuya composición sea conocida ya que se ha comprobado que productos que se encuentran en el mercado actualmente no contienen la cantidad de principios bioactivos (isoflavonas, por ejemplo) que se mencionan en sus etiquetas (Almeida *et al.*, 2015). Esto representa un gran problema para los consumidores, ya que corren el riesgo de sufrir efectos tóxicos o de consumir cantidades insuficientes de principios activos y empeorar su estado de salud.

Además de la cuantificación de los principios activos en los productos de origen natural, existen diversos estudios que permiten explorar su toxicidad. Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* permiten llevar a cabo dicho análisis. Experimentos de toxicidad aguda y crónica pueden llevarse a cabo en animales de laboratorio, mientras que diversas líneas celulares pueden utilizarse para estudios *in vitro* para determinar el potencial tóxico. Líneas celulares como las Caco-2 (del inglés: human Caucasian colon adenocarcinoma) son ampliamente utilizadas para estudios de citotoxicidad, así como para evaluar la capacidad de los productos naturales o cualquier principio activo de ser absorbidos (Elsayed *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, el estilo de vida de la población mexicana y de muchas partes del mundo ha sido fuertemente modificado debido a diversos factores, principalmente ambientales, económicos y sociales que han repercutido en la salud humana. Tales consecuencias se manifiestan generalmente a largo plazo a través de diversas enfermedades como la hipertensión, la diabetes, la desnutrición, entre otras. Todos estos padecimientos a su vez están relacionados con la mala alimentación. Debido a esto, en los últimos años, la industria alimentaria y la farmacéutica se han dedicado a idear nuevas alternativas que permitan tener una alimentación más adecuada que ayude a mejorar el estado nutricional para tener una vida saludable y de esta forma extender la esperanza y la calidad de vida de la población.

Hoy en día, además del gran empeño que se tiene por producir alimentos nutritivos, también se tiene cierto interés en aquellos alimentos y productos vegetales que además de su valor nutrimental, poseen otras bondades debido a que contienen compuestos capaces de producir efectos farmacológicos. Actualmente, se elaboran productos, que conjuntan estas dos cualidades: la nutritiva y la terapéutica.

Es importante considerar que a pesar de todo el desarrollo de medicamentos con el que actualmente contamos, las plantas siguen jugando un rol importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades, por lo que es importante llevar a cabo estudios que permitan conocer sus compuestos bioactivos para validar y sustentar su consumo.

La alfalfa es una de las plantas con alto potencial nutracéutico. Aunque existen antecedentes sobre estudios farmacológicos y químicos de la especie, éstos son aún limitados y se han realizado sobre plantas completas o extractos de éstas que se desarrollan y crecen en latitudes o regiones diferentes a las que se cultivan en nuestro país. Se desconoce por lo tanto la verdadera composición química y el potencial farmacológico de la especie cultivada en México. En el marco de su valorización económica y la expansión al mercado internacional, surge la necesidad de realizar estudios nutricionales, químicos y farmacológicos sobre los productos

para consumo humano que se elaboran con alfalfa cultivada en México. Dichos estudios servirán para conocer el potencial de estos productos comerciales como nutracéuticos, además de evaluar la variación en los parámetros estudiados durante diferentes etapas del año con el fin de garantizar que la calidad del producto sea siempre la óptima.

4. HIPÓTESIS

Dos productos elaborados a base de alfalfa (*Medicago sativa*) poseen un alto valor nutrimental y contienen diversos compuestos con capacidad estrogénica y antioxidante.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Evaluar el potencial nutricional, químico y farmacológico de dos productos alimenticios elaborados a base de alfalfa colectada en Guanajuato en cinco meses del año 2014.

5.2. Específicos

- Determinar la variación en el rendimiento de los dos productos elaborados a base de alfalfa.
- Determinar el contenido nutricional de los dos productos elaborados con alfalfa.
- Cuantificar los fenoles totales y flavonoides totales presentes en los dos productos de alfalfa cultivada en cinco diferentes etapas del año.
- Determinar la capacidad antioxidante de los dos productos elaborados con alfalfa colectada en diferentes etapas del año mediante los ensayos DPPH y FRAP.
- Obtener el perfil de compuestos fenólicos de los dos productos de alfalfa colectada en cinco diferentes etapas del año.
- Establecer el perfil de fitoestrógenos (isoflavonas) de los dos productos de alfalfa colectada en los cinco meses del año.
- Evaluar la citotoxicidad de los dos productos elaborados con alfalfa colectada en dos meses del año utilizando los ensayos MTT y LDH.
- Determinar la actividad estrogénica de los dos productos elaborados a base de alfalfa de dos diferentes colectas.

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales y equipos

6.1.1. Material de estudio

El material vegetal de partida fue amablemente proporcionado por la empresa Productora Sativa SPR de RL de CV ubicada en Apaseo el Alto, Guanajuato, México.

Muestras de las partes aéreas de alfalfa fueron colectadas en la etapa de prefloración durante cinco meses del año 2014. La alfalfa fresca fue colectada y procesada a pequeña escala utilizando el mismo procedimiento empleado a nivel industrial. De este procesamiento se obtuvieron los dos productos derivados de alfalfa: el jugo liofilizado y el polvo del material residual de la alfalfa deshidratada.

Todos los experimentos fueron conducidos sobre los dos productos finales obtenidos a partir de las cinco colectas de alfalfa a los que se les asignaron claves de identificación como se muestra en el Cuadro 1

Cuadro 1. Claves asignadas a los productos de alfalfa obtenidos de las cinco colectas realizadas en 2014.

Mes de colecta en 2014	Residuo deshidratado	Jugo liofilizado
Mayo	MSR-1	MSJ-1
Julio	MSR-2	MSJ-2
Agosto	MSR-3	MSJ-3
Septiembre	MSR-4	MSJ-4
Octubre	MSR-5	MSJ-5

Para la comparación del contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante, se utilizó una muestra del producto comercial “reservé” que es ampliamente conocido por su contenido de compuestos antioxidantes.

6.1.2. Estándares

- Estándares de ácido gálico y (+)-catequina fueron empleados en la elaboración de las curvas de calibración para determinar fenoles totales y flavonoides, respectivamente. Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) fue empleado como referencia para los dos ensayos de capacidad antioxidante.
- Para el análisis de compuestos fenólicos comunes individuales se utilizaron como referencias los siguientes 16 estándares: quercetina, apigenina, luteolina, catequina, kaempferol, ácido rosmarínico, miricetina, hesperetina, esperedina, ácido protocatéquico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, naringenina, ácido gálico, ácido cafeico y rutina.
- Para establecer el perfil de isoflavonas se utilizaron los estándares de siete isoflavonas comúnmente reportadas para especies de *Medicago*: genisteína, daidzeína, glyciteína, formononetina, biochanina A y los glucósidos genistina y daidzina.

6.1.3. Equipos

Para el análisis nutrimental de los productos derivado de alfalfa se utilizaron:

- Un analizador de humedad automático modelo MSO 01 (Scaltec instruments).
- Un digestor automático modelo 424 de la marca BUCHI y un destilador K-360 (BUCHI) para el análisis de proteínas.

Para los ensayos de capacidad antioxidante se utilizaron una centrífuga de la marca Hermle modelo 2323K, un espectofotómetro de la marca Jenway modelo 6320D y un lector de placas de la marca Benchmark Plus para la medición de la absorbancia de las muestras.

- Balanza analítica marca Ohaus (0.0001 g).

Para el análisis de compuestos fenólicos:

- Columnas analíticas (XDB-C18, 4.6 x 250 mm con tamaño de poro de 5 µm, Agilent Technologies; µPorasil, 3.9 y 19.0 x 300 mm, 125 Å, 10 µm, Waters; Symmetry C-18, 120 Å; 5 µm; YMC ODS, S5 µm, 120 Å).

- Columnas analíticas de fase reversa Luna C18 (4.60 mm X 150 mm, 176 Å, 5µm de tamaño de partícula) del proveedor Teknokroma (Barcelona, España).
- Un sistema cromatográfico de alta eficiencia (HPLC) marca Waters integrado por una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, acoplada a un sistema de detección. Como detector, se dispuso de un aparato de absorción en el ultravioleta-visible de arreglo de diodos, modelo 2998 (Waters) y un detector de índice de refracción 2414, marca Waters. El equipo estuvo provisto de un inyector manual Rheodyne 7725i y un degasificador electrónico de cuatro canales (Metachem Technologies Inc.). La adquisición y el procesamiento de datos se llevó a cabo utilizando el programa Empower2 (Waters).

Para el análisis de isoflavonas:

- Un sistema cromatográfico de alta eficiencia (HPLC) marca Jasco integrado por dos bombas de entrega de disolventes modelo PU-2080 Plus, acoplada a un sistema de detección. Como detector, se dispuso de un aparato de absorción en el ultravioleta-visible de arreglo de diodos, modelo MD-2010. El equipo estuvo provisto de un inyector automático modelo AS-950 CON LOOP DE 20 µl.

6.2. Métodos

6.2.1. Elaboración de los productos de alfalfa

Inicialmente el material vegetal fue lavado y limpiado retirando cualquier material extraño; después se sometió al proceso de extrusión utilizando un molino eléctrico (Lexen Products Healthy Juicer GP62 Electric Multi-Purpose Wheatgrass) de donde se obtuvo el jugo de alfalfa y el bagazo. El jugo se congeló a -70°C y posteriormente fue liofilizado. Por otra parte, el bagazo se secó a temperatura ambiente con ventilación constante y protegido de la luz y una vez seco se molió finamente. El procedimiento anterior se llevó a cabo para las cinco cosechas y se

calculó el rendimiento de cada una en función del peso de materia prima inicial antes de someterse a la limpieza.

6.2.2. Análisis nutricional

El análisis nutricional se realizó para los dos productos de alfalfa obtenidos de las cinco colectas realizadas. Todos los experimentos relacionados al macroanálisis fueron realizados por duplicado a menos que se especifique lo contrario.

6.2.2.1. Determinación de humedad

Para determinar el porcentaje de humedad se pesaron dos gramos de la muestra y se colocaron en un plato de aluminio formando una delgada capa lo más uniforme posible; posteriormente la muestra fue colocada en la lámpara de infrarrojo a una intensidad correspondiente a 100 °C, haciendo incidir la luz sobre la muestra. La lectura fue llevada a cabo de manera automática y fue expresada como % de humedad.

6.2.2.2. Determinación de cenizas

Para la determinación de cenizas, 1 gramo de cada muestra fue colocada en crisoles previamente puestos a peso constante y expuesto a 500 °C durante 12 horas. Los resultados fueron expresados en porcentaje.

6.2.2.3. Determinación de grasa total

Para conocer el contenido de grasas totales, las muestras de los dos productos de alfalfa fueron sometidas a una extracción por Soxhlet. El procedimiento consistió en pesar 3 gramos de cada muestra y mezclarlas con sulfato de sodio anhidro y arena de mar. La mezcla perfectamente homogenizada fue colocada en un cono de celulosa. Después, la preparación fue sometida a una extracción por Soxhlet durante 7 horas utilizando éter de petróleo como disolvente

extractor. El extracto etéreo formado se llevó a sequedad utilizando un balón de recuperación y el residuo formado (las grasas extraídas) fue llevado a peso constante en la estufa a 70 °C. Los resultados se expresaron como % de grasa.

6.2.2.4. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas fue analizado usando el método Kjendahl tal como indica la AOAC con pequeñas modificaciones (AOAC, 2009). El proceso de digestión se realizó usando ácido sulfúrico a temperatura elevada (410°C) utilizando un digestor automático. Posteriormente se llevó a cabo la destilación empleando un equipo de destilación K-360 automático y finalmente, el producto de la destilación se tituló manualmente. El porcentaje de nitrógeno fue convertido a contenido de proteína usando 6.25 como factor de conversión.

6.2.2.5. Carbohidratos

El contenido de carbohidratos fue calculado por diferencia. Para tal efecto, el porcentaje de grasa, cenizas, humedad y proteínas, fueron restados del 100% que representó la totalidad de la muestra.

6.2.3. Evaluación de la capacidad antioxidante

6.2.3.1. Extracción de compuestos fenólicos

Se pesó por triplicado 1 gramo de muestra seca y finamente molida. A cada una de ellas, se le adicionaron 10 ml de una solución de metanol: ácido fórmico: agua (80:2:18); estas suspensiones se homogenizaron en el Vortex durante 30 segundos. Posteriormente, los homogenizados se colocaron en un baño ultrasónico durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 12,300 g por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y el residuo sólido fue sometido al mismo procedimiento de extracción. Ambos sobrenadantes se juntaron y el volumen final fue registrado; cada sobrenadante se filtró a través de un acrodisco de nylon con tamaño de poro de 45 µm y diámetro de

25 mm (Agilent Technologies) y se almacenó en un tubo falcon protegido de la luz a -20 °C hasta su uso. Todo este procedimiento se llevó a cabo en la mayor obscuridad posible.

6.2.3.2. Estimación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteau

El método consistió en mezclar 30 µL de extracto con 150 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 (en agua) y 120 µL de Na_2CO_3 al 7.5%. La mezcla se dejó reposar en la oscuridad durante 2 horas al término de las cuales se leyó la absorbancia a 765 nm. Para realizar la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL), de la cual se tomaron volúmenes de 0 µL a 160 µL en intervalos de 20 µL. El procedimiento se llevó a cabo por triplicado con tres repeticiones para cada una. Los resultados obtenidos fueron expresados en mg EAG (equivalentes de ácido gálico)/ g ps (peso seco).

6.2.3.3. Determinación de flavonoides totales

Se realizó utilizando un método descrito previamente (Zhishen *et al.*, 1999). A 100 µl de muestra se agregaron 40 µl de agua destilada y 30 µl de $NaNO_2$ al 5%. Después de 5 minutos, se agregaron 30 µl de $AlCl_3$ al 10%; un minuto después, se adicionaron 200 µL de NaOH 1 M. La mezcla se diluyó con 240 µL de agua destilada. Para realizar la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de (+)-catequina (0.1 mg/mL), de la cual se tomaron volúmenes de 0 µL a 100 µL en intervalos de 20 µL. La absorbancia fue medida a 510 nm. El procedimiento se llevó a cabo por triplicado con tres repeticiones para cada una. Los resultados obtenidos fueron expresados en mg cat ((+)-catequina)/ g ps (peso seco).

6.2.3.4. Evaluación de la capacidad antioxidante (CAO)

La CAO de los extractos se evaluó utilizando los ensayos del radical libre 2,2′-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y de la capacidad de reducción del ion férrico (FRAP) de acuerdo a un método descrito previamente (Corral-Aguayo *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos fueron expresados en mg ET (equivalentes de Trolox)/ g ps (peso seco).

6.2.3.4.1. Ensayo con el radical libre DPPH

Este método consistió en calcular la disminución en la longitud de onda de máxima absorción de 517 nm a 428 nm, ocasionada por la reducción del radical libre DPPH debido a su reacción con los compuestos antioxidantes presentes en la muestra, dando lugar a la formación de DPPH estable (Moon and Shibamoto, 2009).

En una microplaca de 96 pozos, se colocaron 20 µl de cada extracto a evaluar y un blanco de metanol: ácido fórmico: agua (80:2:18) por triplicado. Se adicionaron 280 µl de solución de DPPH 100 µM en metanol preparada inmediatamente antes de iniciar el ensayo. La mezcla se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad y pasado este tiempo, se leyó la absorbancia a 480 nm en un lector de microplacas (Dynex Technology, Chantilly, VA). Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox en mg ET/g ps de muestra.

Para realizar la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) en metanol (1 mg/mL) de la cual se tomaron los volúmenes correspondientes para obtener un intervalo de concentraciones de 0.02 mg/mL a 0.2 mg/mL.

6.2.3.4.2. Ensayo FRAP (Poder de reducción antioxidante del ión férrico)

Este ensayo se basa en la capacidad que tiene la muestra para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+}. En este caso, la capacidad antioxidante se determina por la formación del complejo Fe^{2+}–TPTZ [2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina] en condiciones ácidas, el cual produce un intenso color azul con un máximo de absorción a 593 nm (Moon and Shibamoto, 2009).

El reactivo FRAP se preparó mezclando 50 mL de buffer de acetatos 300 mM (pH 3.6), 5 mL (10 mM) de 2,4,6-tripiridil-2-triazina (TPTZ) en HCl 40 mM y 5 mL de $FeCl_3$ 20 mM.

En una microplaca de 96 pozos de fondo plano, se colocaron 20 µL de las muestras a evaluar y el blanco (metanol: ácido fórmico: agua, 80:12:18) por triplicado; después se adicionaron 280 µL de reactivo FRAP. La placa se incubó por 30 minutos en la oscuridad y se leyó la absorbancia de las muestras utilizando un filtro de 630 nm en un lector de microplacas (Dynex Technology, Chantilly, VA). Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox en mg ET/g de peso seco.

Para realizar la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8–tetrametilcroman–2–carboxílico) en metanol (1 mg/mL); de esta solución, se tomaron los volúmenes correspondientes para obtener un intervalo de concentraciones de 0.025 mg/mL a 0.8 mg/mL.

6.2.4. Perfil de compuestos fenólicos individuales mediante HPLC

Para el análisis de compuestos fenólicos comunes, los dos productos de alfalfa fueron sometidos a diferentes procedimientos de extracción.

El primer método (Método A) consistió en suspender 0.5 gramos de muestra en 5 ml de agua desionizada. La suspensión formada fue sometida a agitación en un Vortex durante 5 minutos. Posteriormente, la muestra fue filtrada y analizada por HPLC utilizando las condiciones de análisis que se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones de análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC.

Tiempo (Min)	Ácido acético 0.0125 N (%)	Acetonitrilo (%)	Metanol (%)
0	95	5	0
2	95	5	0
5	85	15	0
30	50	50	0
35	95	5	0
40	0	0	100
55	0	0	100
60	95	5	0
Flujo: 0.7 mL/minuto			
Volumen de inyección: 20 µL			

En el segundo método (Método B), se siguió el mismo procedimiento que en el Método A, utilizando en este caso metanol como disolvente.

El tercer método de extracción (Método C) fue llevado a cabo bajo las mismas condiciones utilizadas para las pruebas de capacidad antioxidante. Para cada extracto preparado se hicieron diluciones 1:200.

Para el análisis por HPLC, se prepararon soluciones estándar de 1 mg/ml de cada uno de los compuestos fenólicos a analizar. Las soluciones se filtraron con acrodiscos de nylon. Todas las soluciones se almacenaron en frascos color ámbar a -20°C. Las muestras previamente preparadas fueron inyectadas en el HPLC para conocer su perfil cromatográfico.

Posteriormente, se inyectó cada uno de los estándares para determinar su tiempo de retención y obtener su espectro de UV. Los tiempos de retención y los espectros UV de los diferentes picos en las muestras fueron comparados con los de los estándares para encontrar aquellos picos de la muestra que coincidieran con los estándares. Los picos coincidentes fueron sometidos a una co-elución para confirmar la correspondencia de los compuestos.

6.2.5. Determinación del perfil de isoflavonas

Para la extracción de isoflavonas se emplearon cinco diferentes sistemas de disolvente (agua 100%, metanol 100%, metanol-agua 50:50 v/v, etanol 100% y agua:metanol:acido fórmico 18:80:2 v/v) para definir el mejor sistema extractor. Las muestras se suspendieron en el disolvente a 100 mg/mL y luego fueron homogenizadas en el Vortex durante un minuto; luego éstas fueron expuestas al ultrasonido a frecuencia media a 37°C durante cinco minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue filtrado usando un acrodisco de nylon y almacenado en viales color ámbar a -20 °C hasta su análisis. El residuo sólido procedente de la extracción se sometió al mismo procedimiento.

La detección de isoflavonas mediante HPLC se llevó a cabo empleando el método del estándar interno utilizando el protocolo (Ver condiciones de análisis en

el Cuadro 3) previamente desarrollado y validado con mínimas modificaciones (Almeida *et al.*, 2015).

La cuantificación de las isoflavonas detectadas se llevó a cabo mediante curvas de calibración siguiendo el método del estándar interno empleando 2-metoxiflavona para este fin. La linealidad, límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) del método fueron determinados para cada isoflavona.
Todo el procedimiento fue llevado a cabo por duplicado con dos replicas cada uno.

Cuadro 3. Condiciones de análisis de isoflavonas mediante HPLC.

Tiempo	Ácido fórmico 0.1%	Acetonitrilo
0	67	33
7	65	45
15	50	50
25	40	60
30	30	70
35	100	0
47	67	33
Flujo: 1.0 ml/min		
Volumen de inyección: 20 µL		
Temperatura de la columna: 40 °C		

6.2.6. Viabilidad celular, integridad de la membrana y recuperación celular

La línea celular Caco-2 (en inglés: human Caucasian colon adenocarcinoma) fue obtenida de European Collection of Cell Cultures y cultivada en medio DMEM (en inglés: Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor. Las células fueron incubadas en una atmosfera con 5% de CO_2 a 37 °C. Para llevar a cabo los experimentos, 10 000 células fueron sembradas en placas de 96 pozos e incubadas para permitir su adherencia durante una noche a 37 °C. Para los ensayos de viabilidad celular, integridad de la membrana y recuperación celular se emplearon sólo los dos productos de alfalfa procedentes de las colectas de Mayo y Julio. El tratamiento fue llevado a cabo

incubando las células durante 3 y 24 horas en presencia de los productos de alfalfa a cinco concentraciones diferentes en un intervalo de 1 a 100 mg/mL. Como control positivo se utilizó Triton X-100 al 1% y adicional al control negativo (solo medio de cultivo) se empleó un control de tratamiento.

6.2.6.1. Ensayo MTT

La viabilidad celular fue determinada utilizando el ensayo MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] (Mosmann, 1983). Pasado el tiempo (3 o 24 horas) de exposición a las muestras, las células fueron retiradas del tratamiento y lavadas con PBS. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de MTT (1:10 en medio) en cada pozo y se incubó durante 30 minutos en la oscuridad. Pasado este tiempo, se adicionaron 100 µL de DMSO y se homogenizó. Finalmente, se llevó a cabo la lectura de la absorbancia a 570 nm usando el lector de placas Cambrex ELX808.

6.2.6.2. Ensayo LDH (lactato deshidrogenasa)

La enzima lactato deshidrogenasa presente en el medio de cultivo fue medido usando un kit comercial de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La absorbancia fue medida a 490 nm con una longitud de onda de referencia de 655nm usando el lector de placas Cambrex ELx808. La liberación de LDH fue calculada de acuerdo a lo reportado (Valdiglesias *et al.*, 2013).

6.2.6.3. Ensayo de recuperación celular

En ensayo de recuperación celular se llevó a cabo para determinar si las células tratadas con los productos de alfalfa eran capaces de recuperar su capacidad proliferativa. Para ello, después de 3 y 24 horas de tratamiento con las muestras, el tratamiento fue sustituido por medio de cultivo nuevo; después de esto, las células fueron incubadas durante 24 horas. El grado de muerte celular fue determinado usando los ensayos MTT y LDH utilizando el procedimiento descrito en la sección anterior.

6.2.7. Evaluación de la actividad estrogénica

Para evaluar la actividad estrogénica de los productos de alfalfa, se utilizó un ensayo uterotrófico en ratas ovariectomizadas. Se utilizaron hembras adultas de la cepa Wistar (200 a 250 g), las cuales fueron ovariectomizadas bilateralmente dos semanas previas al tratamiento. Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en ocho grupos experimentales con 5 individuos en cada grupo.

Un primer grupo se trató con 30 µg/kg/día de estradiol vía subcutánea mientras un segundo se trató con 800 µg/kg/día de estradiol vía oral (PRIMOGIN, valerato de estradiol), ambos como controles positivos. Adicionalmente, un tercer grupo fue tratado únicamente con agua purificada (1 mL de vehículo por vía oral) como control negativo. Un cuarto grupo fue tratado con 2,000 mg/kg de jugo de alfalfa liofilizado (de la colecta de Julio). Los cuatro grupos restantes fueron tratados con los productos elaborados con alfalfa de la colecta de Mayo; dos grupos fueron tratados con polvo de alfalfa deshidratada (uno con 400 mg/kg y otro con 2,000 mg/kg) y los dos restantes se trataron con jugo de alfalfa liofilizado, el cual fue administrado en las mismas cantidades que el polvo del bagazo de alfalfa. Los productos fueron suspendidos en agua purificada (100 mg/mL) y administrados vía oral con ayuda de una sonda intragrástrica.

Las suspensiones fueron administradas cada 24 horas durante 3 días. Veinticuatro horas después de la última administración, las ratas fueron sacrificadas mediante una cámara de CO_2 y pesadas. Posteriormente, el útero fue disectado, limpiado (se retiró el líquido interno) y pesado. Finalmente, se comparó la proporción entre el peso del útero y el peso de cada rata. El incremento en el peso de este órgano reflejó la acción estrogénica.

6.2.8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del análisis nutricional, determinación de fenoles totales, flavonoides totales, capacidad antioxidante, perfil de isoflavonas y ensayo uterotrófico fueron analizados mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía para identificar diferencias entre los parámetros determinados para los dos

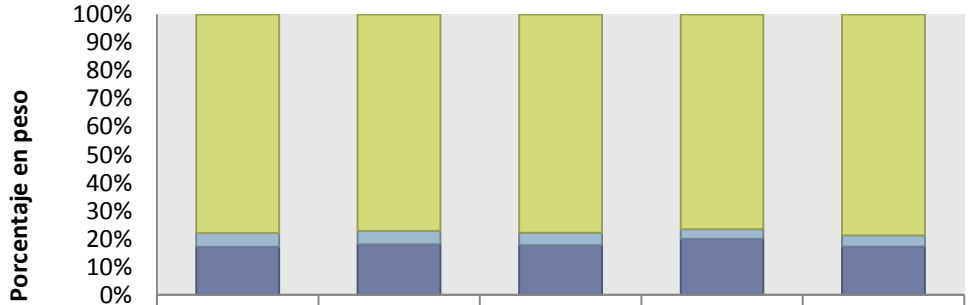
productos derivados de alfalfa. Para denotar significancia se consideró un intervalo de confianza de 95%. Los resultados que mostraron diferencia significativa se sometieron a un análisis post-hoc de Tukey.

El análisis estadístico de los resultados de los ensayos *in vitro* fue realizado usando el paquete estadístico SPSS. Se llevaron a cabo pruebas no paramétricas Mann-Whitney y correlación de Spearman.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Rendimiento de los productos elaborados con alfalfa cosechada en diferentes meses del año

Para determinar el rendimiento de los dos productos elaborados con alfalfa, se realizaron cinco colectas durante diferentes meses del año en las cuales se tuvieron variaciones climatológicas que pudieron influir en la calidad de la planta como la cantidad de agua y contenido de metabolitos secundarios. La Figura 13 muestra los rendimientos de las cinco colectas; en ésta se puede observar que el polvo de alfalfa deshidratada presentó un rendimiento de entre 17.1 y 18.1 % del peso de material vegetal inicial, mientras que el jugo liofilizado representa tan solo entre el 3.5 y 5 % del peso total. Aunque aparentemente esta variación es pequeña, a nivel industrial esto puede representar un problema a nivel económico y productivo.



	Mayo	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Agua (%)	77,9	77,1	77,8	76,5	78,7
Jugo liofilizado (%)	5,0	4,9	4,5	3,5	4,0
Alfalfa deshidratada (%)	17,1	18,1	17,7	20,0	17,3

Figura 13. Gráfica de barras que muestra los rendimientos de los dos productos de alfalfa colectada en cinco meses del año.

Es importante mencionar que durante las diferentes colectas realizadas, el contenido de agua en el material vegetal fue variable, por lo que en algunos casos, fue necesario recurrir a la hidratación previa de la planta para lograr la obtención del jugo.

Mediante el cálculo de los rendimientos, se determinó que no existe una variación importante, siendo esto una ventaja a nivel productivo. Esto también indica que la hidratación previa a la extrusión favorece la obtención de los dos productos con rendimientos constantes. Sin embargo, se debe considerar que el tiempo de hidratación pudo ser suficiente sólo para que el agua atravesara la pared celular, pero no para introducirse en los demás compartimientos celulares, como las vacuolas, donde se encuentra concentrada una gran cantidad de metabolitos secundarios.

Es importante que durante el proceso de elaboración de estos productos se tenga un control adecuado y estandarizado para el tiempo de lavado de la materia prima, que puede considerarse como el tiempo de hidratación de la misma.

Durante la elaboración de los productos de alfalfa, se obtuvieron algunos datos adicionales como el porcentaje de humedad del bagazo recién obtenido que resultó ser de entre 62.5 a 67.9% (teniendo variaciones entre colectas), así como el porcentaje en peso del agua contenida en el jugo que resultó ser de entre 88.8 y 91.7 %. Esta información resulta relevante, si se considera que los productos fueron elaborados utilizando el mismo procedimiento, ya que demuestra que el grado de hidratación de la planta tiene un efecto importante en la obtención del jugo y por consecuencia de la distribución de compuestos entre los dos productos de alfalfa. A pesar de llevar a cabo la elaboración de los productos de alfalfa de manera controlada, las características de los productos variaron ligeramente, principalmente en el color, lo que posiblemente se debe a las condiciones de cultivo, principalmente la temperatura y la humedad.

7.2. Análisis nutricional

Desde tiempos remotos, la alfalfa se ha destinado a la alimentación de ganado debido a su alto rendimiento, fácil producción y principalmente debido a su alto contenido de proteínas. Tomando ventaja de esto último, el uso de la alfalfa en la elaboración de productos alimenticios para consumo humano ha tomado un rol importante en la introducción de productos funcionales en la dieta mexicana. Dado que los dos productos estudiados en este trabajo están siendo destinados al

consumo humano, resulta indispensable el estudio de su composición nutricional, así como evaluar su posible variación a través de las diferentes cosechas realizadas durante el año con la finalidad de asegurar un aporte de nutrientes constante. El Cuadro 4 resume los resultados del macro análisis conducido en los dos productos de alfalfa. Como se puede observar, en la mayoría de los parámetros analizados, se obtuvieron valores mayores para las muestras de jugo liofilizado con respecto al polvo; esto es explicable si se considera el proceso de producción, ya que ambos productos se obtienen del mismo material vegetal inicial luego de ser sometido a un proceso de extrusión.

El rango de humedad para las muestras de polvo de alfalfa estuvo entre 7.26 y 8.69 g/100 g, teniéndose diferencia significativa entre las muestras MSR-3 y MSR-5. Los jugos liofilizados mostraron valores de humedad entre 5.68 y 6.81 g/100 g sin diferencia significativa entre las cinco muestras analizadas. Por el contrario, los valores encontrados para el contenido de cenizas fueron mayores en los jugos liofilizados (11.57 – 14.41 g/100g) que en los polvos de alfalfa (6.62 – 7.48 g/100 g). En ambos casos, hubo algunas diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 4). Este parámetro es importante dado que refleja el alto contenido de minerales presentes en los productos de alfalfa. Según datos de la literatura, esta planta contiene pequeñas cantidades de calcio, magnesio, hierro, zinc, fósforo y potasio (Caunii *et al.*, 2012). Sin embargo, el alto contenido de cenizas encontrado en los productos de alfalfa sugiere que éstos tienen una cantidad importante de minerales. En cuanto al contenido de grasas, no se tuvo diferencia significativa entre las muestras de polvo de alfalfa, mientras que el contenido de grasa de la muestra de jugo liofilizado MSJ-1 mostró diferencia significativa con respecto al obtenido para MSJ-3, MSJ-4 y MSJ-5.

Una de las determinaciones más importantes hasta este punto fue la de proteínas, ya que la calidad de la alfalfa está definida en parte por este parámetro. Los resultados obtenidos muestran que los jugos liofilizados contienen mayores cantidades de proteínas que los polvos, siendo este hecho concordante con lo reportado durante un experimento de extracción por extrusión, similar al empleado para elaborar los dos productos de alfalfa (Yari *et al.*, 2012). Aunque el contenido

de proteínas en las muestras de jugo liofilizado no mostró diferencia significativa entre colectas, algunas diferencias fueron encontradas en el contenido de proteínas en los polvos fibrosos de alfalfa. A pesar de estas variaciones, los contenidos de proteínas encontrados para ambos productos son comparables con los reportados previamente para las partes aéreas de alfalfa (14.56 a 16.90 %) y para los tallos (13.58 a 16-63 %), aunque no con los de las hojas, las cuales presentaron entre 34.18 y 37.38 % de proteína (Popovic, 2001). Este resultado es importante, ya que la tendencia actual en el consumo de proteínas se está inclinando hacia aquellas de origen vegetal que además de aportar proteínas, contienen otros nutrientes importantes como vitaminas, minerales, antioxidantes, además de fibra y, a diferencia de los alimentos de origen animal, contienen bajas cantidades de colesterol y grasas saturadas.

Finalmente, el contenido de carbohidratos fue determinado por diferencia, encontrando variaciones en las muestras de ambos productos. El contenido de carbohidratos resultó ser mayor para las muestras de polvo obtenido del bagazo.

Cuadro 4. Composición nutrimental de los dos productos de alfalfa colectada en diferentes meses del año (media ±DS).

Producto	Humedad g/100 g	Cenizas g/100 g	Grasas g/100 g	Proteínas g/100 g	Carbohidratos g/100 g
Residuo de alfalfa deshidratado					
MSR-1	$7.81 \pm 0.28^{a,b}$	7.48 ± 0.23^{a}	$1.40 \pm 0.07^{n.s}$	15.17 ± 0.03^{a}	68.14
MSR-2	$7.86 \pm 0.01^{a,b}$	6.62 ± 0.01^{b}	$1.40 \pm 0.04^{n.s}$	16.53 ± 0.40^{b}	67.59
MSR-3	7.26 ± 0.12^{a}	$7.12 \pm 0.00^{a,b}$	$2.1 \pm 0.45^{n.s}$	$15.88 \pm 0.05^{a,b}$	68.14
MSR-4	$7.93 \pm 0.14^{a,b}$	6.74 ± 0.03^{b}	$1.6 \pm 0.03^{n.s}$	$16.37 \pm 0.14^{a,b}$	67.56
MSR-5	8.60 ± 0.14^{b}	6.74 ± 0.01^{b}	$1.40 \pm 0.16^{n.s}$	13.09 ± 0.13^{c}	70.17
Jugo de alfalfa liofilizado					
MSJ-1	$6.81 \pm 0.18^{n.s}$	11.57 ± 0.03^{a}	3.3 ± 0.12^{b}	$26.97 \pm 0.09^{n.s}$	62.92
MSJ-2	$5.68 \pm 0.17^{n.s}$	11.94 ± 0.08^{a}	$2.80 \pm 0.03^{a,b}$	$27.81 \pm 0.20^{n.s}$	51.77
MSJ-3	$6.00 \pm 0.42^{n.s}$	14.41 ± 0.15^{c}	2.4 ± 0.35^{a}	$25.10 \pm 2.03^{n.s}$	52.09
MSJ-4	$5.87 \pm 0.10^{n.s}$	13.57 ± 0.08^{b}	2.1 ± 0.04^{a}	$29.52 \pm 0.9^{n.s}$	48.94
MSJ-5	$6.78 \pm 0.07^{n.s}$	13.10 ± 0.31^{b}	1.9 ± 0.01^{a}	$22.99 \pm 0.3^{n.s}$	55.92

El análisis de estos parámetros nutricionales demuestra que los dos productos de alfalfa aportan cantidades adecuadas de nutrientes a la dieta humana;

sin embargo, estudios adicionales serán requeridos para generar más información respecto al contenido de ácidos grasos, al tipo de aminoácidos, minerales específicos, fibra, así como el tipo de azúcares presentes en los productos de alfalfa analizados.

7.3. Cuantificación de fenoles totales (FT) en los productos de alfalfa

Los polifenoles, también llamados compuestos fenólicos o simplemente fenoles, son un amplio grupo de compuestos que están constituidos por anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos en diversas posiciones del anillo. Estos compuestos constituyen una de las clases más amplias de metabolitos secundarios en la naturaleza (Pietta, 2000).

Cuando se desea conocer el contenido de polifenoles en una especie vegetal o de cualquier muestra, es necesario llevar a cabo análisis específicos que permitan observar la presencia de estos analitos a través de parámetros fácilmente medibles. Con este fin, el método de Folin Ciocalteu ha sido ampliamente utilizado.

Este método consiste en hacer reaccionar en medio básico los compuestos presentes en la muestra con el reactivo de Folin Ciocalteu, el cual está compuesto por una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato. Al entrar en contacto, los compuestos fenólicos presentes en la muestra se oxidan, dando origen al producto del reactivo de Folin-Ciocalteu reducido, que adquiere una coloración azul que es proporcional al contenido de FT en la muestra. A pesar de ser un método accesible, presenta varias desventajas, ya que el reactivo también puede reaccionar con otras sustancias interferentes presentes en la muestra como azúcares, aminas aromáticas, dióxido de azufre y ácido ascórbico (Prior *et al.*, 2005).

La determinación de los FT contenidos en los productos de alfalfa se llevó a cabo en este trabajo utilizando este método. La Figura 14 muestra el contenido de FT para el polvo de alfalfa deshidratada de las cinco colectas analizadas, en equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de producto de alfalfa. En ésta, se puede observar que el rango de valores está entre 5 y 7 mg EAG/g ps de polvo, siendo las colectas MSR-1 (Mayo) y MSR-5 (Octubre) las que poseen el menor contenido. Se observa también que existe diferencia significativa (ANOVA con Tukey, $p<0.05$)

entre la muestra de Mayo (MSR-1) con respecto a las de Julio y Agosto (MSR-2 y MSR-3, respectivamente). Sin embargo, esta muestra no presenta diferencia significativa con el polvo de alfalfa deshidratada de las colectas posteriores MSR-4 y MSR-5 (septiembre y octubre, respectivamente) lo que muestra el efecto de las condiciones climatológicas sobre el contenido de compuestos fenólicos.

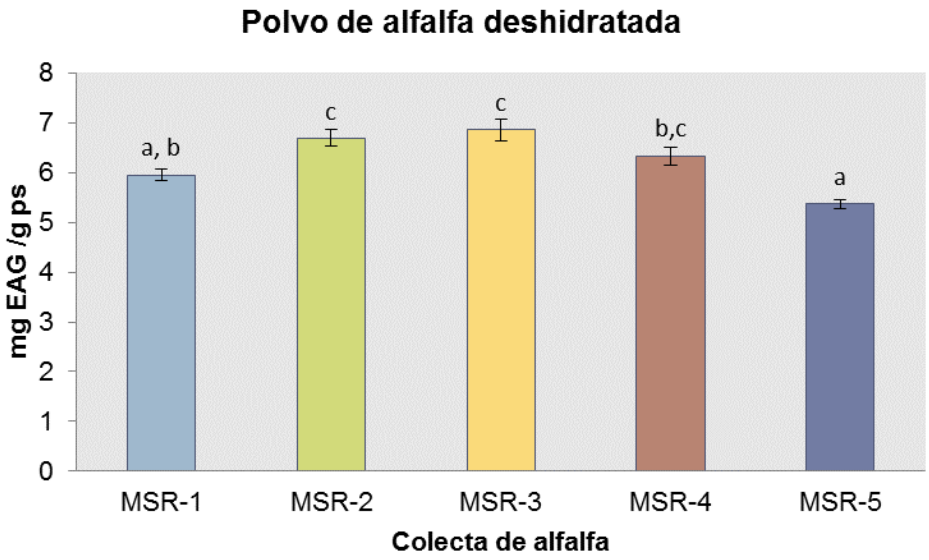
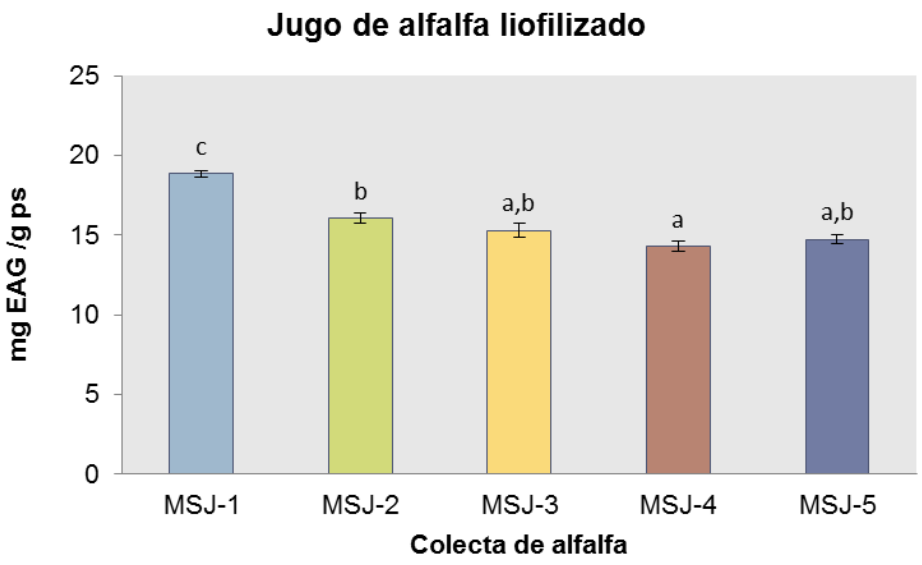


Figura 14. Contenido de FT en polvo de alfalfa deshidratada colectada en diferentes meses del año. Diferentes letras sobre las barras indican diferencia significativa $p<0.05$.

Por su parte, la Figura 15 muestra los resultados obtenidos para el contenido de FT en las muestras de jugo liofilizado, donde se puede observar que la variación de FT en las diferentes muestras no es igual al comportamiento observado con los polvos de alfalfa, a pesar de que ambos productos fueron elaborados a partir del mismo material inicial. Se observa también que el contenido de FT es considerablemente mayor en el jugo, pues el rango del contenido estuvo entre 14 y 19 mg EAG/g ps de jugo liofilizado.

Particularmente, el jugo liofilizado de alfalfa colectada en mayo (MSJ-1) fue el que presentó mayor cantidad de FT mientras que las demás muestras tuvieron un contenido muy similar (sin diferencia significativa en algunas de ellas) lo que resulta favorable ya que esto contribuye a la estandarización del producto.



Gráfica 15. Contenido de FT en jugo liofilizado de alfalfa colectada en diferentes meses del año. Diferentes letras sobre las barras indican diferencia significativa $p<0.05$.

Estos resultados indican que el mayor contenido de FT se concentra en el jugo liofilizado. Asimismo, la variación en el comportamiento durante los diferentes meses del año se debe posiblemente al grado de hidratación de la muestra, ya que a mayor contenido de agua, la cantidad de compuestos extraídos durante el proceso de extrusión fue mayor, además de que las condiciones ambientales y climatológicas de cultivo de la planta también modifican sus características. Este contenido de FT en el polvo es comparable al reportado para el producto comercial tomado como referencia, el cual se situó en 5.9 ± 0.38 mg EAG/g muestra. Sin embargo, el jugo resultó tener 2.7 veces más FT que el producto comercial utilizado como referencia (reservé).

Un trabajo reportado previamente describe el contenido de FT en extractos hidroalcohólicos procedentes de diversas especies de *Medicago*, siendo *M. sativa* una de las analizadas. Dichos resultados demuestran que el contenido de FT para esta especie es de 24 mg EAG/g muestra (Rodrigues *et al.*, 2013). La cantidad de FT encontrada en los productos de alfalfa resulta inferior al reportado para la planta completa siendo un resultado lógico, ya que el contenido de FT está dividido entre los dos productos. Sin embargo, esta diferencia no resulta tan drástica si se

consideran las diferencias de cultivo, dado que los productos de alfalfa analizados fueron elaborados con la planta cultivada en México, mientras que lo reportado anteriormente corresponde a la planta cosechada en Europa.

Tomando en cuenta que el contenido de compuestos fenólicos depende en gran medida de las condiciones de cultivo de la planta, se estableció una comparación entre los FT de ambos productos juntos. En este caso, su contenido en los productos de alfalfa mostró un comportamiento decreciente siendo la colecta de Mayo la que presentó el mayor valor (24.81 mg EAG/g ps), mientras que la colecta de Octubre, mostró el más bajo (20.12 mg EAG/g muestra). Este hecho se puede justificar con base en la variación de las condiciones climatológicas. En Guanajuato, la temperatura registrada durante el año va desde los 30ºC, en los meses de Mayo y Junio, hasta los 5 ºC durante el invierno. Además, Mayo es el mes donde se observa la mayor cantidad de días lluviosos.

7.4. Cuantificación de flavonoides totales en productos de alfalfa

Como ya se ha mencionado anteriormente, los flavonoides son compuestos de gran interés farmacológico. Estos son capaces de actuar como poderosos agentes antioxidantes ya que tienen una estructura química que les permite neutralizar radicales libres y convertirse ellos en radicales estables, manteniendo estable el electrón desapareado debido al sistema aromático.

Para llevar a cabo una cuantificación apropiada del contenido de flavonoides totales presentes en los dos productos de alfalfa, se utilizó un método descrito previamente, que consiste en la formación de un complejo aluminio-flavonoide en medio básico que presenta una coloración rosa salmón (Zhishen *et al.*, 1999).

En la Figura 16, se muestra el contenido de flavonoides, en mg equivalentes de catequina (cat), presente en las diferentes muestras de polvo de alfalfa deshidratada. Como puede apreciarse, el polvo de la alfalfa colectada en mayo (MSR-1) contiene una cantidad de flavonoides igual al de la colecta de septiembre (MSR-4). Sin embargo, se observa una diferencia significativa entre las demás colectas. El contenido de flavonoides durante los diferentes meses del año no muestra una tendencia constante a disminuir o aumentar, lo que pone nuevamente

de manifiesto la influencia de las variaciones climatológicas sobre la biosíntesis de productos naturales.

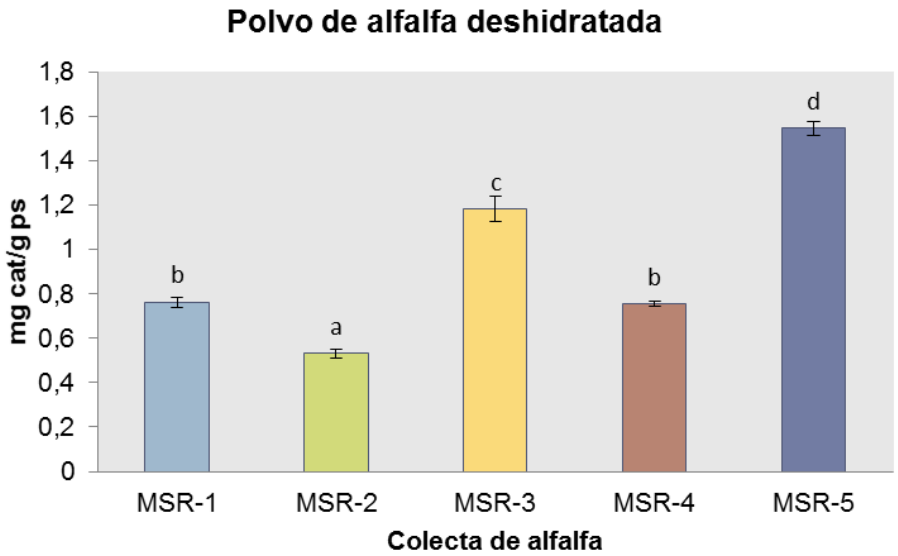


Figura 16. Contenido de flavonoides en polvo de alfalfa deshidratada colectada en diferentes meses del año.

Los niveles de flavonoides en las diferentes muestras de polvo se situaron entre 0.5 mg cat/g y 1.5 mg cat/g de peso seco, siendo el polvo de la colecta de Julio (MSR-2) el que presentó el menor contenido de flavonoides, mientras que el polvo MSR-5 mostró los valores más altos.

Además de analizar las muestras de polvo de alfalfa, se determinó el contenido de flavonoides en el jugo liofilizado. La Figura 17 muestra los resultados obtenidos para estos ensayos, donde se puede observar un comportamiento similar al de los polvos, aunque con valores mayores. Para el jugo liofilizado, el contenido de flavonoides estuvo entre 1.25 mg cat/g y 3.6 mg cat/g de ps. Estos valores mayores para el jugo liofilizado con respecto a los obtenidos para el polvo resultan consistentes con los observados para el contenido de fenoles totales en los dos productos de alfalfa.

Las dos figuras anteriores muestran que el contenido de flavonoides en los dos productos fue considerablemente mayor en la colecta realizada en Octubre, donde se registraron días de lluvia previos al día de la cosecha de la muestra.

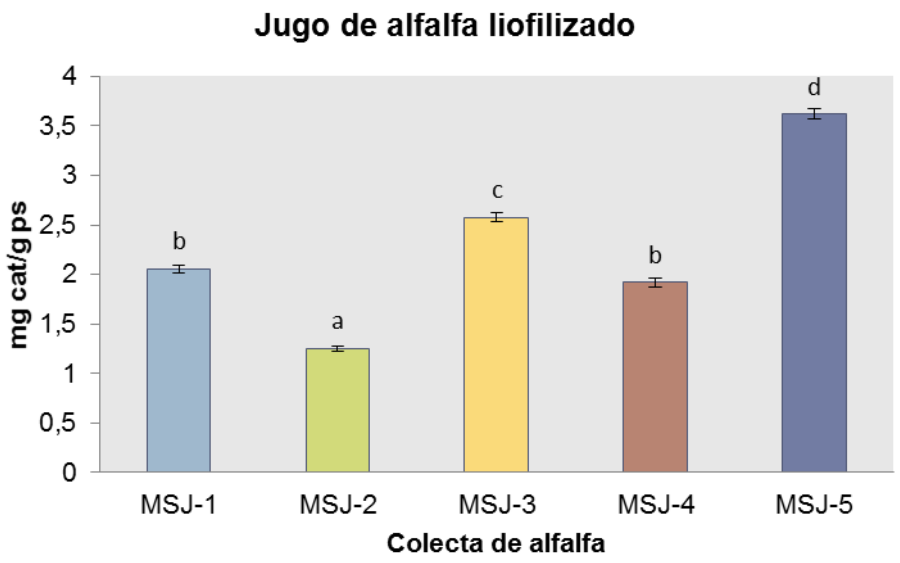


Figura 17. Contenido de flavonoides en jugo liofilizado de alfalfa colectada en diferentes etapas del año.

Relacionado con esto, se registró también la presencia de pequeños puntos negros en las hojas de la alfalfa (Figura 18), lo cual sugirió el ataque al vegetal por algún microorganismo, posiblemente algún patógeno. Como ya ha sido mencionado anteriormente (Gholami *et al.*, 2014), los flavonoides cumplen con diversas funciones dentro del metabolismo de la planta. Estos compuestos son agentes importantes en los procesos de defensa. Adicionalmente, dentro del procesamiento de la alfalfa colectada en Octubre, se observó una menor producción de espuma, lo que sugiere que el contenido o tipo de saponinas producida fue menor, sugiriendo que bajo un estado no óptimo, las plantas activan mecanismos de defensa. Especies de *Medicago* y de muchas otras especies vegetales aumentan la expresión de los genes responsables de la producción de flavonoides, los cuales actúan como fitoalexinas en la planta que es atacada por algún agente patógeno. Diversos factores tanto bióticos como abióticos también pudieron influir en este aumento en el contenido de flavonoides.

Figura 18. Izquierda: hojas de alfalfa frescas; Derecha: hojas de la colecta realizada en octubre.

Adicionalmente, se llevó a cabo la determinación de flavonoides en el producto comercial de referencia (reservé) que resultó ser de 1.31 mg cat/g de producto. Al comparar este valor con el contenido promedio de flavonoides en los dos productos de alfalfa, se observó que el polvo contiene menor cantidad de flavonoides que el producto comercial (teniendo una proporción de 0.7), mientras que el valor promedio de flavonoides en las muestras de jugo resultó ser de 1.7 veces más que el producto comercial. Esto indica que el jugo de alfalfa liofilizado aporta casi el doble de flavonoides que el producto comercial, mientras que el polvo de alfalfa no alcanza a ser igual que éste.

Al comparar el contenido de flavonoides con el contenido de FT, se observó que los valores obtenidos para flavonoides resulta ser más pequeño que el obtenido para FT, lo que indica que la mayoría de compuestos fenólicos en las muestras no es de tipo flavonoide. Al respecto, se puede pensar que los valores mayores de FT se deben a la presencia de vitaminas y otros compuestos capaces de reaccionar con el reactivo utilizado.

Los flavonoides, junto con las saponinas, son las principales clases de metabolitos secundarios biosintetizados por especies de *Medicago*. Como ya se ha reportado anteriormente, la producción de estos compuestos varía considerablemente en función de las condiciones de cultivo de la planta, como la cantidad de agua, la temperatura, la exposición a agentes patógenos, entre otras (Seguin and Zheng, 2006). Esto podría explicar en parte por qué el contenido de flavonoides varía de forma significativa durante los meses del año donde las temperaturas fueron variadas.

Adicionalmente, se ha reportado que el contenido de flavonoides en un extracto hidroalcohólico de la planta completa de *Medicago sativa* es de 5.8 mg cat/g (Rodrigues *et al.*, 2013). Este valor resulta superior al encontrado para ambos productos de alfalfa. Sin embargo, se debe considerar que el contenido de flavonoides de la planta completa fue distribuido entre los dos productos, por lo que necesariamente, éstos tendrían que mostrar valores inferiores a los de la planta completa. Además, es necesario considerar que la alfalfa utilizada en el estudio antes mencionado fue cultivada en Europa y por lo tanto, las diferencias climatológicas y composición del suelo influyeron sobre el contenido de metabolitos secundarios de la planta.

7.5. Determinación de la capacidad antioxidante

La CAO está definida como la capacidad de un compuesto para proteger un sistema biológico contra el efecto potencialmente dañino derivado de procesos oxidativos. Los antioxidantes son esenciales para proteger el organismo del daño producido por los radicales libres y otras EROs que pueden llegar a dañar las macromoléculas de la célula mediante reacciones en cadena que producen daños celulares graves (Mishra *et al.*, 2010).

Existen diversos mecanismos a través de los cuales los antioxidantes pueden ejercer sus efectos protectores dentro de los que destacan: a) la eliminación de especies reactivas que inician la peroxidación, b) la quelación de iones metálicos para evitar que éstos generen especies reactivas, o que descompongan los peróxidos lipídicos, c) la eliminación de $^{\bullet}O_2^{-}$, previniendo de esta forma la formación de peróxidos, d) la detención de reacciones de autoxidación en cadena y e) la reducción del O2 del medio (Brewer, 2011).

En este estudio, la evaluación de la CAO de los dos tipos de productos elaborados con alfalfa se realizó mediante dos técnicas diferentes: por inhibición del radical libre DPPH y por la evaluación del poder reductor del ion férrico FRAP.

7.5.1 Evaluación de la CAO por el método del DPPH

El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es un radical libre ampliamente utilizado para la determinación de la actividad antioxidante primaria, es decir, la capacidad de estabilizar radicales libres mediante compuestos antioxidantes presentes en extractos de plantas, frutos o cualquier alimento (Wong *et al.*, 2006).

Este ensayo está basado en la reducción del radical DPPH en metanol con lo cual se promueve una disminución de la absorbancia (Figura 19).

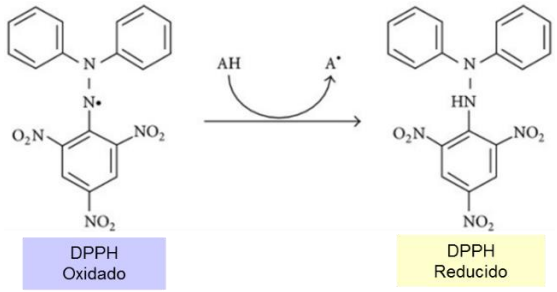


Figura 19. Esquema que muestra la reacción durante el ensayo con el radical libre DPPH (AH: antioxidante) (Teixeira *et al.*, 2013).

Para poder expresar la capacidad antioxidante de forma cuantitativa, se utiliza una curva de calibración obtenida con diferentes concentraciones de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8–tetrametilcroman–2–carboxílico) y los resultados se expresan como equivalentes de Trolox (ET) por gramo de peso seco.

Este método resulta factible debido a su sencillez y rapidez. Sin embargo, presenta algunas limitantes, ya que otros compuestos que absorban luz ultravioleta en la misma longitud de onda que el reactivo DPPH pueden causar interferencias. Un ejemplo de estos compuestos interferentes son los carotenoides.

La Figura 20 muestra la CAO de las cinco muestras de polvo de alfalfa deshidratada donde se puede observar que MSR-1 y MSR-2 no presentan diferencia estadísticamente significativa, mientras que MSR-3 resultó ser igual a la primera pero diferente de la segunda. Por su parte, las muestras MSR-4 y MSR-5 no mostraron diferencia significativa entre sí, pero éstas fueron estadísticamente diferentes que las tres anteriores. El valor promedio de la CAO por este método para las muestras de polvo fue de 2.7 mg ET/g ps, siendo la muestra MSR-4 la que presentó una mayor CAO.

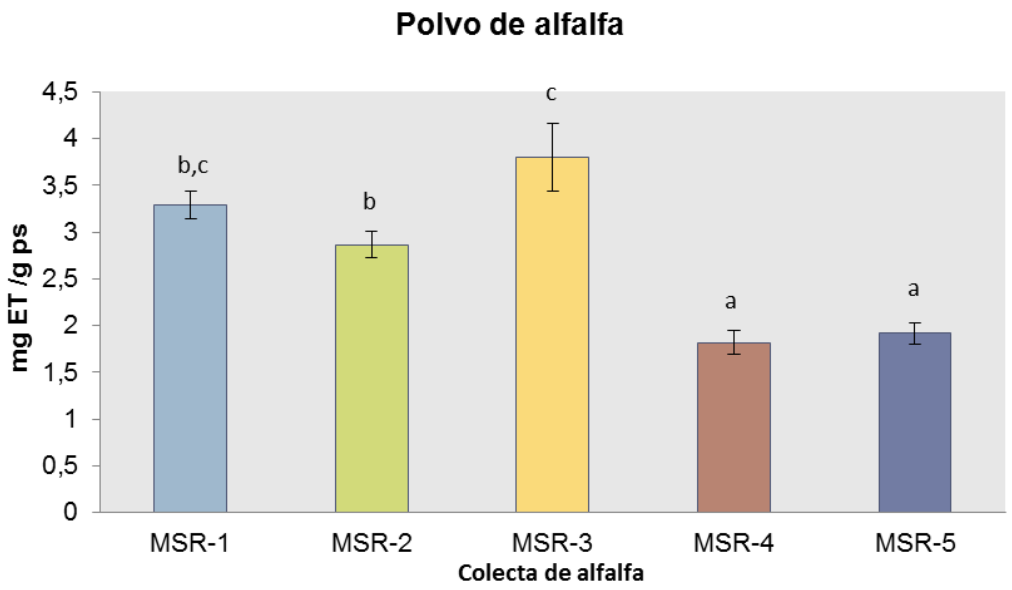


Figura 20. Resultados de la evaluación de la CAO por el método DPPH para polvo de alfalfa deshidratada colectada en diferentes meses del año.

Por su parte, las muestras de jugo liofilizado tuvieron un comportamiento distinto al observado para el polvo. En la Figura 21, se observa que la muestra MSJ-5 tuvo la mayor CAO, que fue estadísticamente diferente de las demás. Las muestras MSJ-2, MSJ-3 y MSJ-4 no presentaron diferencia significativa entre ellas. El valor promedio de CAO para las muestras de jugo liofilizado fue de 10.74 mg ET /g ps, siendo mayor que el encontrado para el polvo y reafirmando que el mayor contenido de compuestos antioxidantes se encuentra en el jugo.

Considerando la CAO de los dos productos de alfalfa juntos, es posible observar cómo los productos de la colecta de Mayo produjeron los valores más altos mediante el ensayo DPPH. Esto es concordante con los resultados obtenidos en la cuantificación de FT, donde la misma muestra presentó los valores más altos.

Por otro lado, los productos obtenidos de la colecta de Octubre mostraron los valores menores para CAO mediante el mismo ensayo. Sin embargo, en esta muestra fue donde se encontró el mayor contenido de flavonoides. Estos dos hechos muestran que la CAO observada mediante el ensayo DPPH es producida por diversos compuestos de naturaleza fenólica, pero que éstos no necesariamente son flavonoides.

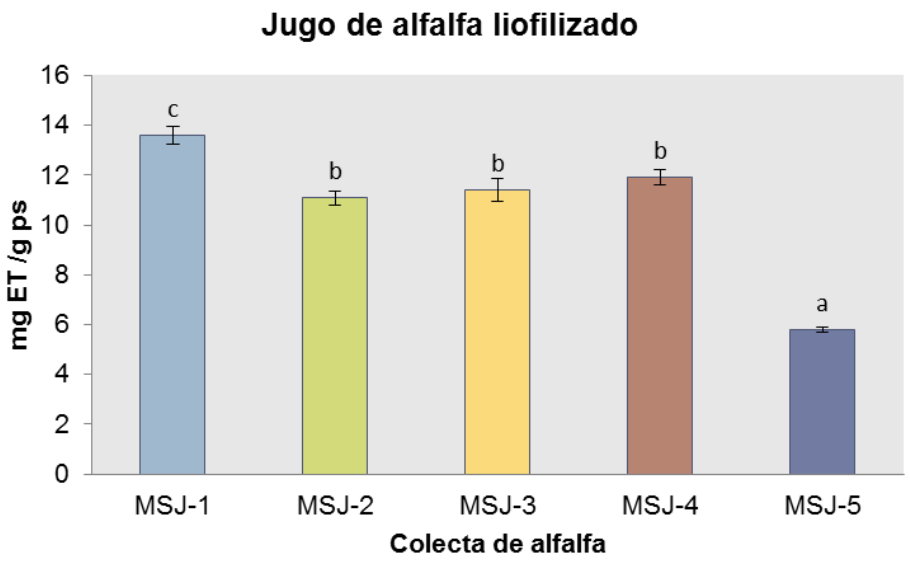


Figura 21. Resultados de la evaluación de la CAO por el método DPPH para jugo liofilizado de alfalfa colectada en diferentes meses del año.

Adicionalmente, la CAO de los dos tipos de productos de alfalfa fue comparada con la obtenida para el producto comercial de referencia donde se observó que el polvo produce la misma CAO, mientras que el jugo presentó una CAO 4.4 veces mayor que el producto comercial, el cual mostró una CAO de 2.44 ± 0.472 mg ET/g de producto. Aunque se desconoce la composición del producto de referencia, es posible notar que aunque es comercializado como un potente antioxidante, su CAO real no es superior a la encontrada por los productos de alfalfa.

7.5.2. Evaluación de la CAO por el ensayo FRAP

La reacción química relevante en la prueba de FRAP involucra una reacción de transferencia de un solo electrón entre el $Fe(TPTZ)_2$ (III) y un donador de electrones, el fenol ArOH. La reacción sigue su curso de la siguiente manera:

$$Fe(TPTZ)_2\ (III) + ArOH \rightarrow Fe(TPTZ)_2\ (II) + ArOH^+$$

Este método es utilizado para determinar la capacidad de los compuestos presentes en las muestras para reducir los iones férricos. En este ensayo, se

obtiene el poder antioxidante de la muestra midiendo la reducción del hierro férrico (de Fe^{3+} a Fe^{2+}) en presencia de antioxidantes que actúan como agentes reductores (Benzie and Strain, 1996).

En la Figura 22, se pueden observar los resultados de CAO obtenidos mediante este método para las diferentes muestras de polvo de alfalfa. MSR-1 y MSR-2 mostraron valores estadísticamente diferentes entre sí, pero no con el de la muestra MSR-3. Por otro lado, la muestra MSR-4 tuvo una CAO diferente a la de MSR-2, pero no diferente de las dos muestras antes mencionadas. Adicionalmente, MSR-5 presentó el valor más pequeño de CAO siendo estadísticamente diferente a los valores obtenidos para las demás muestras.

El valor promedio de CAO obtenido por el método FRAP para las muestras de polvo representa tan solo el 30% de la CAO encontrada para el producto comercial “reservé” mediante el mismo método, el cual resultó ser de 7.57 ±1.03 mg ET/g producto.

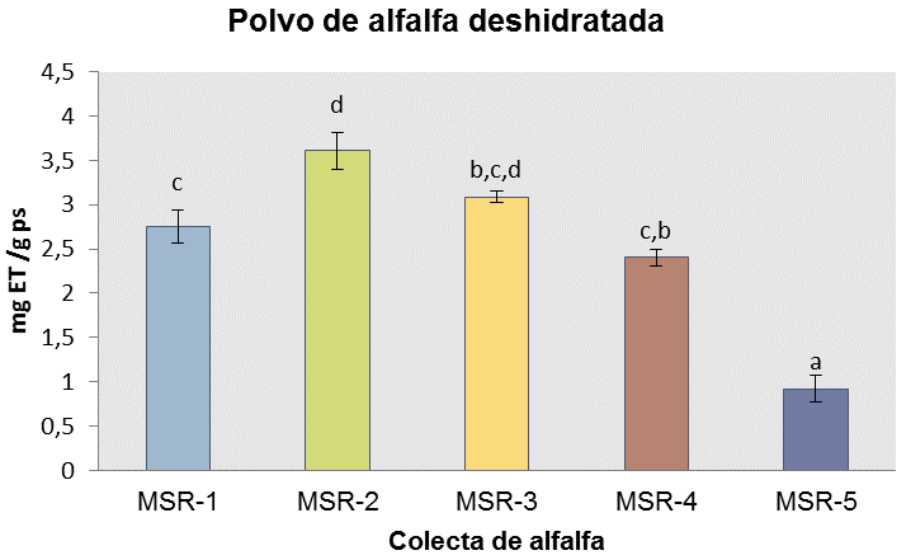


Figura 22. Evaluación de la CAO por el método FRAP para polvo de alfalfa colectada en diferentes meses del año.

La Figura 23 muestra los resultados obtenidos por el mismo método para los jugos liofilizados. En ésta, se observa que a diferencia de los polvos, la muestra MSJ-5 presentó el mayor valor de CAO, siendo éste diferente del obtenido para las

demás muestras de jugo. Se observó también que las CAO de las muestras MSJ-3 y MSJ-4 son diferentes entre ellas y también con respecto a las demás, mientras que las muestras MSJ-1 y MSJ-2 no presentaron CAO con diferencia significativa entre sí.

Al comparar el valor promedio obtenido por las muestras de jugo contra el producto comercial, se obtuvo que éste fue 1.5 veces mayor. Mediante el método FRAP, los productos de alfalfa colectada en octubre (considerando sus valores juntos) tuvieron la mayor CAO (15.22 mg/ET g ps), lo cual fue concordante con lo observado en la cuantificación de FT, donde esta misma muestra presentó el mayor contenido de éstos.

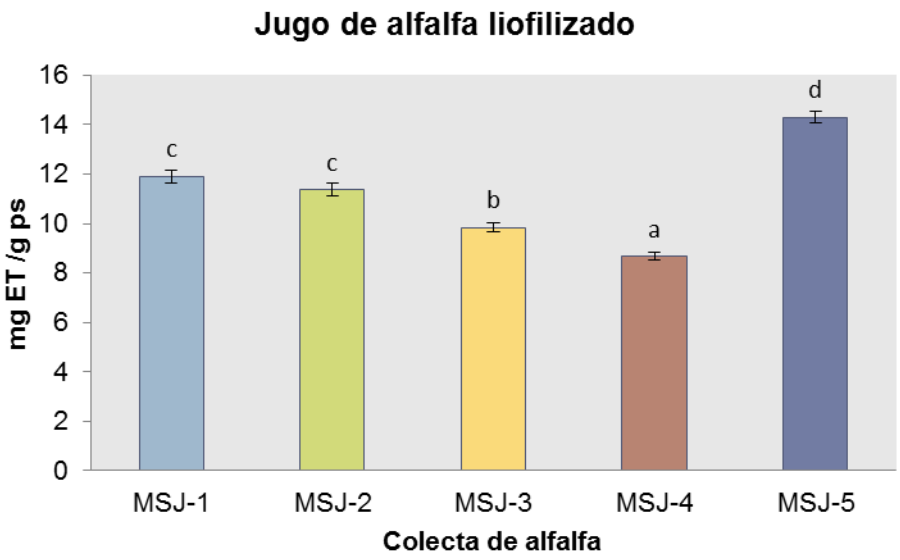


Figura 23. Evaluación de la CAO por el método FRAP para jugo liofilizado de alfalfa colectada en diferentes meses del año.

Es importante mencionar que los valores obtenidos de CAO mediante los dos métodos varían entre las mismas muestras debido a que el fundamento de cada método es distinto.

El ensayo del poder reductor del ion férrico es una técnica frecuentemente utilizada para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, bebidas, suplementos alimenticios o cualquier muestra que contenga polifenoles. Por tanto, este ensayo resultó adecuado para evaluar la CAO de los productos de alfalfa, los

cuales poseen un alto contenido de compuestos fenólicos. Esta técnica se caracteriza por su alta reproducibilidad y por ser relativamente simple y rápida. Además, el ensayo de FRAP muestra una alta correlación con el contenido de fenoles totales, lo cual resulta favorable ya que es posible estimar la contribución de estos compuestos sobre la CAO.

7.6. Correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la CAO

Dado que los compuestos fenólicos han sido ampliamente reportados como compuestos capaces de producir CAO, es posible esperar una correlación entre el contenido de compuestos fenólicos en las muestras estudiadas y su respectiva CAO. Sin embargo, los resultados obtenidos en el análisis de regresión lineal mostraron que no existe correlación entre estas dos variables. Esto indica que la CAO encontrada depende de compuestos que no necesariamente son de naturaleza fenólica. Como se mencionó anteriormente, el método empleado para la cuantificación de compuestos fenólicos presenta algunas interferencias además de que el reactivo de Folin-Ciocalteu es capaz de reaccionar con otros constituyentes de la muestra como los carbohidratos.

7.7. Correlación entre el contenido de flavonoides y la CAO

Al igual que en el caso anterior, se estableció una correlación lineal entre el contenido de flavonoides y la CAO encontrada mediante los ensayos FRAP y DPPH. El análisis de regresión lineal tampoco mostró dependencia entre el contenido de flavonoides y la CAO observada para los polvos de alfalfa deshidratada; sin embargo, las muestras de jugo liofilizado presentaron una baja correlación entre su contenido de flavonoides y la CAO por el método de DPPH; incluso, los jugos liofilizados de las colectas de Mayo y Septiembre presentaron una alta correlación negativa ($r= -0.86$ y $r= -0.78$, respectivamente) lo que sugiere que el contenido de flavonoides está influenciando los resultados observados mediante el ensayo DPPH.

7.8. Comparación de la CAO de los dos productos elaborados con alfalfa y la de dos frutos comunes (ciruela y uva)

Actualmente, el consumo de alimentos funcionales y nutracéuticos se está incrementando debido a la necesidad de proteger al organismo de diversos agentes ambientales que desencadenan enfermedades relacionadas con procesos oxidativos. El consumo de productos ricos en antioxidantes es una de las alternativas actuales más utilizadas para protegerse contra diversos padecimientos de este tipo.

Diversos vegetales y frutas que se consumen tradicionalmente han revelado ser buenas fuentes de compuestos antioxidantes. Dentro de estos alimentos, encontramos los arándanos, la granada, la manzana, la ciruela, las uvas, el jitomate; incluso algunos de estos alimentos son procesados para obtener alimentos funcionales y bebidas con alto contenido de antioxidantes.

Los valores encontrados de fenoles totales, flavonoides totales y CAO de los dos productos de alfalfa, fueron comparados con los resultados descritos anteriormente para la ciruela y la uva (Luna-Vazquez *et al*., 2013). El cuadro 5 muestra los resultados de las comparaciones de ambos estudios. El polvo de alfalfa deshidratada contiene mayor cantidad de compuestos fenólicos que la ciruela (casi tres veces más) y la uva (casi 4 veces más). El jugo liofilizado de alfalfa contiene cantidades aún mayores de FT que los frutos de referencia. Sin embargo, sólo el jugo contiene mayor cantidad de flavonoides que las referencias (1,9 veces más que la uva y 1,3 más que la ciruela) ya que el polvo de alfalfa ni siquiera llegó a tener el mismo contenido de flavonoides que los frutos de referencia.

Por otro lado, el polvo de alfalfa posee una CAO considerablemente inferior a la demostrada por los frutos de referencia. Sin embargo, el jugo liofilizado demostró ejercer una CAO comparable, incluso superior al de los frutos de referencia cuando se evaluó mediante el método DPPH.

Cuadro 5. Comparación de los contenidos de fenoles y flavonoides totales y las CAO de los dos productos de alfalfa con dos frutos altamente antioxidantes.

	POLVO DE ALFALFA DESHIDRATADA		JUGO LIOFILIZADO DE ALFALFA	
Parámetro*	**Ciruela**	**Uva**	**Ciruela**	**Uva**
Fenoles	2.9	3.9	7.3	9.9
Flavonoides	0.5	0.8	1.3	1.9
FRAP	0.2	0.2	1.0	1.0
DPPH	0.4	0.5	1.5	1.8

*Los valores reportados para ciruela y uva se tomaron como unidad y de ahí se obtuvo la proporción para cada producto de alfalfa.

Esta comparación permite ver que el jugo de alfalfa liofilizado posee mayores ventajas (en términos de antioxidantes) sobre el polvo de alfalfa e incluso sobre los dos frutos de referencia, aunque se debe considerar que los frutos son la parte aérea de las plantas donde se concentran mayormente los compuestos fenólicos como los flavonoides. Este último punto explica, al menos en parte, por qué los dos productos de alfalfa no producen una CAO mucho mayor que la de los frutos de referencia a pesar de tener cantidades más elevadas de compuestos fenólicos.

7.9. Determinación del perfil de compuestos fenólicos individuales

Para el análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC, se llevaron a cabo tres procedimientos de extracción con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas para extraer la mayor cantidad de compuestos, debido a que ambos productos son mezclas muy complejas.

La Figura 24 presenta el perfil cromatográfico de la muestra de polvo de alfalfa deshidratada (MSR-1) donde se observan picos desde los primeros minutos de elución hasta el final de la corrida, mostrando la gran cantidad de compuestos presentes en la muestra. Es importante notar que durante los primeros cinco minutos de la inyección, eluyeron algunos compuestos con absorbancias considerablemente altas. Aunque no fue posible identificar algunos de ellos, es probable que se trate de procianidinas, las cuales consisten en agregados de

moléculas de flavonoides (principalmente catequinas) unidas mediante enlaces C-C. Esos compuestos, al tener en su estructura una mayor cantidad de grupos –OH, poseen una mayor polaridad, lo cual hace posible que sean eluidos primero, ya que tienen mayor afinidad pon la fase móvil (fase muy polar) que por la fase estacionaria (fase poco polar).

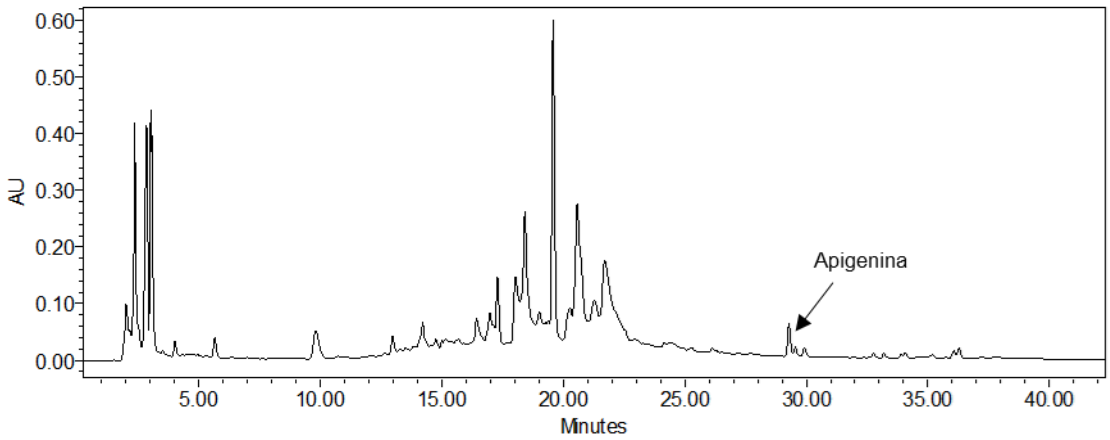


Figura 24. Perfil cromatográfico de una muestra de polvo de alfalfa deshidratada extraída con el método 1.

En el cromatograma de la Figura 24, es apreciable también el número de picos superpuestos que aparecen entre 15 y 25 minutos a pesar de que las condiciones de elución fueron las que mostraron mejores resultados luego de probar diversas metodologías. Aunque los picos del cromatograma de la muestra no fueron bien definidos, éstos fueron comparados (en tiempos de retención y espectros de UV) con los diferentes estándares que se analizaron. De dicho análisis, se determinó que el único estándar presente en las muestras de alfalfa fue la apigenina con el tiempo de retención de 29.5 minutos bajo estas condiciones.

Para corroborar la presencia de la apigenina, se llevó a cabo una co-elución. La Figura 25 muestra los cromatogramas comparativos de los picos de la muestra, el estándar y la co-elución, así como los espectros de UV de la muestra y de la apigenina. En dicha imagen, se observa que los tiempos de retención coinciden y que el pico de la mezcla se conserva simétrico, lo cual es indicativo de que es un mismo compuesto. Por su parte, los espectros de ultravioleta presentaron dos

máximos de absorción. El primero a 266.6 nm es común a ambos espectros. Sin embargo, el segundo máximo de absorción mostrado por la apigenina (337.0 nm), que corresponde a una transición π→π* se vio desplazado a una mayor longitud de onda (344.1 nm en el espectro de la muestra) debido a la diferente polaridad de los disolventes empleados, ya que el estándar fue disuelto en metanol mientras que la muestra fue disuelta en agua. Este corrimiento se debe a las fuerzas de polarización atractivas entre el solvente y la especie absorbente (la muestra) lo cual disminuye la energía de los niveles excitado y basal.

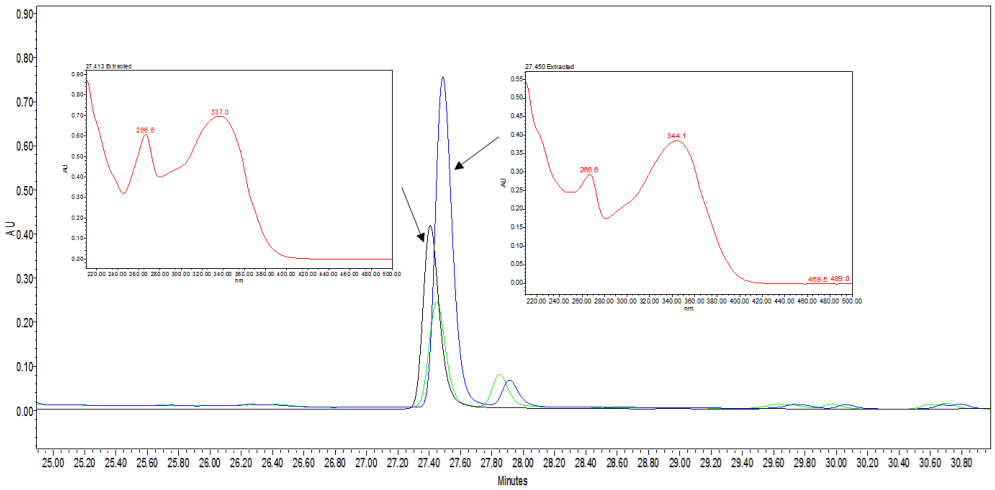


Figura 25. Identificación de la apigenina. Cromatograma verde: muestra de producto de alfalfa; negro, estándar de apigenina; azul, co-elución.

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de los productos de alfalfa utilizando un segundo método de extracción. La Figura 26 muestra el cromatograma del polvo de alfalfa deshidratada MSR-1. La apigenina fue nuevamente detectada con el tiempo de retención de 29.5 min.

Es importante mencionar que aunque el metanol es uno de los disolventes más polares, sólo se logró extraer una pequeña cantidad de compuestos. En el cromatograma aparecen varios picos en los primeros minutos que pueden ser procianidinas, como se ha mencionado con el método anterior.

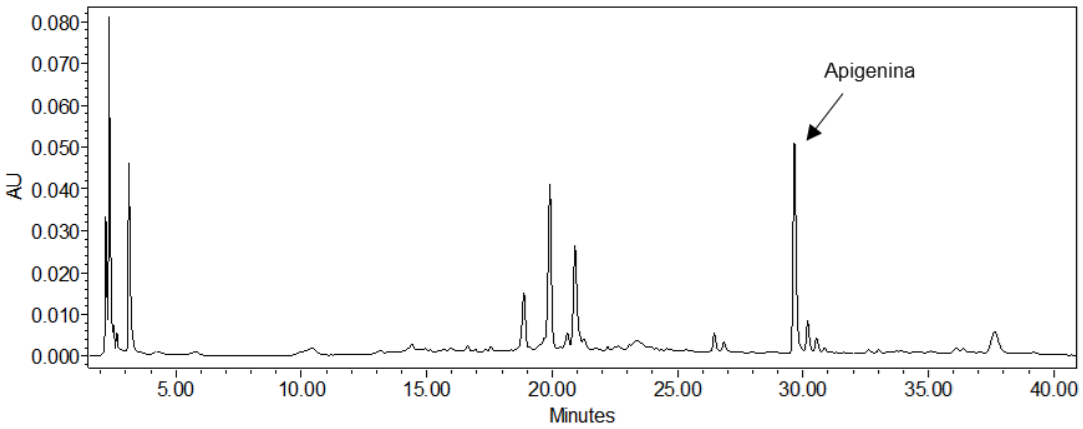


Figura 26. Cromatograma de polvo de alfalfa deshidratada utilizando el segundo método de extracción.

Los compuestos fenólicos tienen una gran cantidad de grupos hidroxilos en su estructura y también poseen varios sistemas conjugados. Ambas características hacen que dichos compuestos tengan un grado de polaridad intermedia, por lo que un buen sistema de extracción consiste en utilizar una mezcla de metanol y agua. Adicionalmente, es conveniente añadir pequeñas cantidades de algún ácido débil como el ácido acético o ácido fórmico para que la solución contenga un poco de protones que ayuden a estabilizar los compuestos fenólicos, manteniendo los grupos hidroxilos estables.

El tercer método consistió en utilizar una mezcla de metanol-agua-ácido acético para llevar a cabo la extracción de los compuestos fenólicos. El cromatograma de la Figura 27 corresponde a la muestra de polvo de alfalfa de la colecta MSR-1 procesada con este método. En dicho cromatograma, se observa que a pesar de la poca eficiencia de extracción con este sistema, este extracto sigue siendo muy complejo.

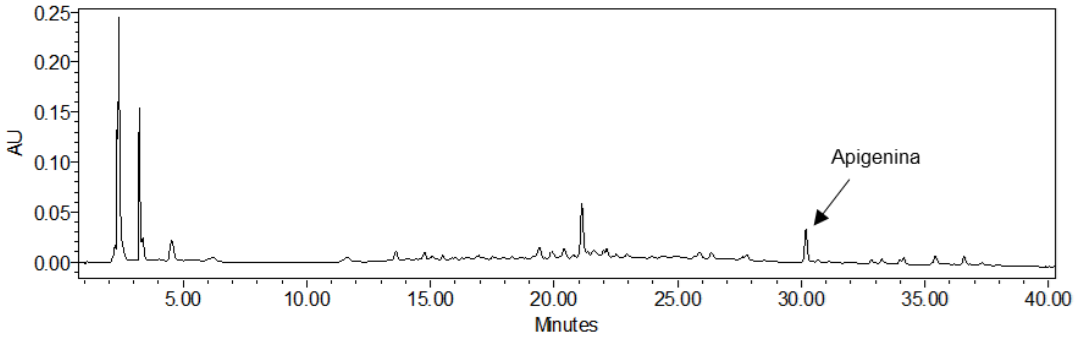


Figura 27. Cromatograma de una muestra de polvo de alfalfa deshidratada extraída con el tercer método.

Por otro lado, cuando se llevó a cabo el análisis de todas las muestras de jugo liofilizado, los perfiles cromatográficos obtenidos fueron muy similares a los del polvo, sugiriendo así que ambos productos poseen el mismo tipo de compuestos fenólicos (Figura 28). A pesar de emplear cantidades iguales de producto para el análisis, las intensidades de los picos en los cromatogramas de ambos productos fueron diferentes, siendo más intensos en el jugo que en el polvo. Este resultado es consistente, ya que durante el proceso de elaboración de los productos, la mayor cantidad de agua se quedó en el jugo y es en éste donde se concentró la mayor cantidad de compuestos fenólicos.

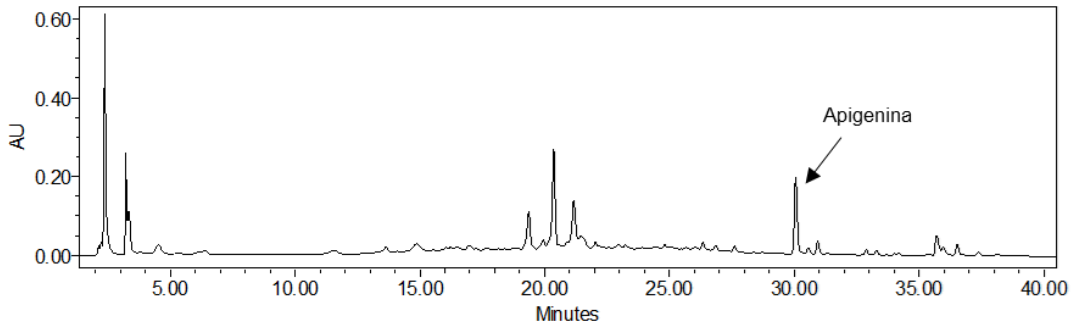


Figura 28. Cromatograma de una muestra de jugo de alfalfa liofilizado extraída con el tercer método.

A pesar de que se utilizó un amplio panel de compuestos fenólicos, sólo fue posible identificar la apigenina, ya que los demás estándares no coincidieron con

ningún pico de la muestra. Este resultado parece contrario a lo ya reportado (Gholami *et al.*, 2014), donde diversos flavonoides (quercetina, kaempferol, naringenina, luteolina, apigenina, entre otras) fueron identificados en las partes aéreas de diversas especies de *Medicago*, incluyendo la especie *sativa*. En nuestro caso, posiblemente, los compuestos no fueron detectados porque la concentración a la cual se encuentran es muy pequeña ya que el contenido de compuestos fenólicos varía considerablemente entre las especies del mismo género (Visnevschi-Necrasov *et al.*, 2015).

Adicionalmente, se ha reportado que *Medicago sativa* es una especie vegetal que produce cantidades importantes de polifenoles como la quercetina, luteolina, apigenina y coumestrol (Seguin *et al.*, 2004). Sin embargo, en ese estudio, también se reportó que el contenido de compuestos fenólicos disminuye de manera considerable durante la etapa previa al florecimiento de la planta, lo cual justifica perfectamente el hecho de que los productos de alfalfa contengan tan solo cantidades pequeñas de apigenina, puesto que es en esta etapa cuando la planta es cosechada para la elaboración de los productos de alfalfa.

Por otro lado, las partes aéreas de la alfalfa biosintetizan algunos compuestos fenólicos importantes siendo la flor la que posee el mayor contenido de flavonoides (Seguin and Zheng, 2006). Esto también justifica la ausencia de los diversos flavonoides analizados, ya que los productos fueron elaborados con alfalfa que es cosechada justo antes de su florecimiento.

Existen otros factores importantes que influyen en el desarrollo óptimo de una planta y que afectan el contenido de metabolitos secundarios. Se ha reportado que las condiciones de cultivo son determinantes para el contenido de compuestos fenólicos en *Medicago sativa;* condiciones inadecuadas de temperatura y porcentaje de CO_2 pueden provocar desde un 65 hasta un 90% de variación en la producción de estos metabolitos secundarios. De igual forma, se ha reportado que cuando la alfalfa es sometida a condiciones de estrés por sequía, ésta aumenta la biosíntesis de flavonoides como un mecanismo de defensa, dado que los flavonoides juegan un papel importante en los procesos de captación de nutrientes y agua durante el crecimiento de la planta (Seguin and Zheng, 2006).

La apigenina es una flavona biosintetizada por diversas plantas medicinales, por lo que se han caracterizado algunos de sus efectos farmacológicos. En ese marco, se ha considerado como un compuesto con gran potencial para el tratamiento del cáncer. Existen estudios que demuestran que la apigenina es capaz de inhibir la proliferación celular en un cultivo de células MCF-7 (células de cáncer de mama) de una manera dependiente de la dosis. De igual forma, se demostró que la apigenina es capaz de producir apoptosis en las mismas células tratadas con apigenina a 80 µM (Bai *et al.*, 2014).

Se ha descrito también que la apiganina inhibe la osteoclastogenesis *in vitro* y además evita la disminución de la densidad mineral ósea en ratones hembra ovariectomizados con lo cual se sustenta en parte el potencial de este flavonoide como un agente osteoprotector (Goto *et al.*, 2015).

7.10. Determinación del perfil de isoflavonas

Al igual que otras especies de la familia Fabaceae, la alfalfa es considerada una importante fuente de fitoestrógenos. Dentro de los principales compuestos reportados para *Medicago sativa* se encuentran las isoflavonas, que como ya se ha mencionado son los fitoestrógenos más comunes en las plantas.

Debido a su naturaleza fenólica, las isoflavonas son capaces de producir actividad antioxidante y por su particular estructura química, son capaces de unirse a los RE, promoviendo su activación. Las potencialidades farmacológicas de las isoflavonas dependen en gran medida de su concentración, por lo que fue considerado su estudio en esta investigación.

Para conducir el análisis, se seleccionaron siete isoflavonas (genisteína, daidzeína, genistina, daidzina, gliciteína, formononetina y biochanina A) que han sido previamente reportadas como constituyentes de diversas especies de *Medicago* (Rodrigues *et al.*, 2014). Debido a reportes anteriores y con base en los resultados obtenidos en el análisis de compuestos fenólicos individuales, fue preciso llevar a cabo el análisis de isoflavonas utilizando diferentes solventes extractores. Se utilizó 100% agua para obtener un perfil lo más cercano posible a lo que se obtiene en la preparación de los productos de alfalfa para su ingesta.

Independientemente, se utilizó metanol, así como una mezcla de agua-metanol (1:1 v/v) para evaluar el efecto de la polaridad y lograr una extracción más eficiente. También se utilizó la mezcla de agua:metanol:ácido fórmico en las proporciones empleadas para los ensayos de CAO para poder correlacionar los resultados obtenidos con los encontrados para los ensayos de flavonoides totales y capacidad antioxidante. Adicionalmente, se empleó etanol como disolvente extractor ya que éste es frecuentemente usado para la preparación de extractos estandarizados para consumo humano.

Para la extracción de las isoflavonas, las muestras se re-suspendieron en los diferentes disolventes y luego se expusieron a ultrasonido a 37 °C, ésto de acuerdo con estudios donde se muestra cómo la extracción de compuestos es mejorada tras llevar a cabo este tratamiento que promueve la permeabilidad de la pared celular mediante el proceso llamado cavitación, favoreciendo la salida de compuestos de los compartimentos intracelulares (Rostagno *et al.*, 2003).

El análisis mediante HPLC fue conducido empleando el método del estándar interno. El Cuadro 6 muestra los tiempos de retención (t_R), la ecuación de regresión, la linealidad, el LD y LC obtenidos mediante las curvas de calibración realizadas.

Cuadro 6. Linealidad, LD y LC del método empleado para cuantificación de isoflavonas.

Isoflavona	t_R (min)	Ecuación de la recta[a]	Rango de linealidad (mg/mL)	r	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
Daidzina	9.25	Y=192.53X–0.977	0.025–0.125	0.998	0.43	1.29
Genistina	12.20	Y=181.81X–0.1468	0.006–0.075	0.993	0.11	0.34
Daidzeína	16.6	Y=300.91X–0.2414	0.025–0.125	0.999	0.03	0.10
Glyciteína	16.80	Y=236.2X–0.1226	0.003–0.025	0.999	0.04	0.13
Genisteína	20.40	Y=333.1X–0.4223	0.003–0.025	0.996	0.03	0.09
Formononetina	22.26	Y=17.74X–0.0081	0.02–0.10	0.999	3.72	11.27
Biochanina A	25.5	Y=467.65X–2.675	0.005–0.05	0.987	0.07	0.21

[a] y: área de pico del estándar/área de pico del estándar interno; x: concentración (mg/mL de solución inyectada).

Los análisis revelaron que sólo la genisteína, la daidzeína y sus respectivos glucósidos (genistina y daidzina) están presentes en los productos analizados. Los cuadros 7 (A – D) muestran los resultados del estudio.

El Cuadro 7 A muestra los resultados obtenidos para el extracto acuoso. La daidzina y la genistina fueron encontradas sólo en dos diferentes muestras de jugo liofilizado (MSJ-2 y MSJ-4, respectivamente), mientras que la genisteína se presentó en el jugo liofilizado de las colectas de Mayo, Septiembre y Octubre (MSJ-1, MSJ-4 y MSJ-5, respectivamente). La daidzeína estuvo en todas las muestras, aunque con mayor abundancia en los jugos (13.33 – 36.00 mg/100 g) que en los polvos del material fibroso (43.3 – 163.33 mg/100 g).

Cuadro 7A. Concentración de isoflavonas (media ± DS) extraídas con Agua 100%.

Polvo de alfalfa (mg/100 g de muestra)							
Mes de cosecha	Muestra	Daidzina	Genistina	Daidzeína[B]	Gliciteina	Genisteína[A]	Total
Mayo	**MSR-1**	n.d.	n.d.	36.0±14.0	n.d.	n.d.	36.0[a]
Julio	**MSR-2**	n.d.	n.d.	28.3±0.00	n.d.	n.d.	28.3[a]
Agosto	**MSR-3**	n.d.	n.d.	31.3±0.00	n.d.	n.d.	31.3[a]
Septiembre	**MSR-4**	n.d.	n.d.	13.3±7.00	n.d.	n.d.	13.3[b]
Octubre	**MSR-5**	n.d.	n.d.	14.3±0.00	n.d.	n.d.	14.3[b]
Jugo de alfalfa liofilizado							
Mes de cosecha	Muestra	Daidzina	Genistina	Daidzeína[B]	Gliciteina	Genisteína[A]	Total
Mayo	**MSJ-1**	n.d.	n.d.	43.3±3.00	n.d.	4.6 ± 0.00	48[a]
Julio	**MSJ-2**	27.3±1.00	n.d.	117.3±14.0	n.d.	n.d.	147.6[c]
Agosto	**MSJ-3**	n.d.	n.d.	90.0±2.00	n.d.	n.d.	90.00[b]
Septiembre	**MSJ-4**	n.d.	28.0±0.33	163.33±10.7	n.d.	7.66±8.0	199.0[d]
Octubre	**MSJ-5**	n.d.	n.d.	60.3±24.0	n.d.	5.66±0.00	66.0[a]

Por otro lado, cuando las muestras fueron extraídas con metanol (Cuadro 7 B), se observó la presencia de genisteína en todas las muestras, pero sólo los jugos liofilizados de las colectas de Mayo y Octubre tuvieron presencia de genistina. Es importante mencionar que en este caso, la genisteína fue bien extraída con metanol, aunque este disolvente no fue capaz de extraer la daidzeína, la cual fue bien extraída con agua.

Cuadro 7B. Concentración de isoflavonas (media ± DS) extraídas con Metanol 100%.

Polvo de alfalfa (mg/100 g de muestra)							
Mes de cosecha	Muestra	Daidzina	Genistina	Daidzeína[B]	Gliciteina	Genisteína[A]	Total
Mayo	**MSR-1**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.6±1.00	4.6[a]
Julio	**MSR-2**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.3±0.00	7.3[b]
Agosto	**MSR-3**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.6±0.00	4.6[a]
Septiembre	**MSR-4**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.3±1.00	7.3[b]
Octubre	**MSR-5**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.0±2.00	6.0[a,b]
Jugo de alfalfa liofilizado							
Mes de cosecha	Muestra	Daidzina	Genistina	Daidzeína[B]	Gliciteina	Genisteína[A]	Total
Mayo	**MSJ-1**	n.d.	23.6±1.0	n.d.	n.d.	12.6±5.00	36.3[a]
Julio	**MSJ-2**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.3±0.00	3.3[b]
Agosto	**MSJ-3**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.33±0.00	4.33[b]
Septiembre	**MSJ-4**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.33±0.00	3.33[b]
Octubre	**MSJ-5**	n.d.	11.1 ± 0.00	n.d.	n.d.	6.33±0.00	17.33[c]

En el Cuadro 7 C, se muestran los resultados obtenidos para las muestras que fueron sometidas a extracción con metanol-agua (1:1 v/v). En éste, se observa que dicha mezcla de disolventes fue capaz de extraer genisteína y daidzeína al mismo tiempo, demostrando que la modificación en la polaridad de los disolventes

(agua y metanol en este caso) influye considerablemente en la extracción de los compuestos de interés. Adicionalmente, se observó la presencia de daidzina en muestras de jugo liofilizado de las colectas de julio y septiembre, así como genisteína en la muestra de jugo liofilizado de la colecta de octubre.

Cuadro 7C. Concentración de isoflavonas (media ± DS) extraídas con Agua-Metanol.

Polvo de alfalfa (mg/100 g de muestra)							
Mes de cosecha	Muestra	Daidzina	Genistina	Daidzeína[B]	Gliciteina	Genisteína[A]	Total
Mayo	**MSR-1**	n.d.	n.d.	19.3±9.00	n.d.	5.66±0.00	25[a,c]
Julio	**MSR-2**	n.d.	n.d.	27.6±2.00	n.d.	12.3±0.00	40[b]
Agosto	**MSR-3**	n.d.	n.d.	20.0±4.00	n.d.	5.0±0.00	25[a,c]
Septiembre	**MSR-4**	n.d.	n.d.	21.6±7.00	n.d.	11.33±1.00	31.3[a,b]
Octubre	**MSR-5**	n.d.	n.d.	13.3±1.00	n.d.	6.66±0.00	20.0[c]
Jugo de alfalfa liofilizado							
Mes de cosecha	Muestra	Daidzina	Genistina	Daidzeína[B]	Gliciteina	Genisteína[A]	Total
Mayo	**MSJ-1**	n.d.	n.d.	39.0±2.00	n.d.	15.6±0.00	54.6[a]
Julio	**MSJ-2**	23.3±7.00	n.d.	50.0±11.0	n.d.	n.d.	73.3[a,b]
Agosto	**MSJ-3**	n.d.	n.d.	60.0±12.00	n.d.	5.0±0.00	65.0[a]
Septiembre	**MSJ-4**	38.0±4.00	n.d.	50.0±9.00	n.d.	3.66±1.00	91.6[b,c]
Octubre	**MSJ-5**	n.d.	21.0±0.02	76.0±7.00	n.d.	9.0±0.00	106.0[c]

La extracción con etanol (Cuadro 7 D) mostró resultados similares a los obtenidos con metanol, ya que sólo la genisteína fue detectada y cuantificada en todas las muestras analizadas encontrando valores muy similares. El último sistema de extracción consistió en utilizar una mezcla de agua:metanol:ácido fórmico

(18:80:2 v/v) encontrando resultados similares a los obtenidos al utilizar la mezcla agua:metanol en cuanto al tipo de isoflavonas extraídas (Cuadro 7 E).

Cuadro 7D. Concentración de isoflavonas (media ± DS) extraídas en Etanol 100 %.

Polvo de alfalfa (mg/100 g de muestra)							
Mes de cosecha	Muestra	Daidzina	Genistina	Daidzeína[B]	Gliciteina	Genisteína[A]	Total
Mayo	**MSR-1**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.33±0.00	3.330[a]
Julio	**MSR-2**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.66±0.20.0	5.66[b]
Agosto	**MSR-3**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.0±0.00	4.0[a,b]
Septiembre	**MSR-4**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.66±0.00	5.66[b]
Octubre	**MSR-5**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.66±0.00	4.66[a,b]
Jugo liofilizado de alfalfa							
Mes de cosecha	Muestra	Daidzina	Genistina	Daidzeína[B]	Gliciteina	Genisteína[A]	Total
Mayo	**MSJ-1**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.66±2.0	7.66[a]
Julio	**MSJ-2**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.0±0.00	3.0[b]
Agosto	**MSJ-3**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.0±0.10	3.0[b]
Septiembre	**MSJ-4**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.0±0.2	3.0[b]
Octubre	**MSJ-5**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.33±0.00	4.33[b]

La utilización de estos cinco sistemas de disolventes pone en evidencia la importancia de llevar a cabo una buena selección de los disolventes a emplear para este propósito. La polaridad de los disolvente es decisiva en la extracción de las isoflavonas y resulta interesante ver que la genisteína y la daidzeína, a pesar de ser isoflavonas estructuralmente similares, son extraídas en diferentes disolventes. En la mayoría de las muestras, el contenido de estos dos compuestos fue mayor utilizando la mezcla de agua:metanol:ácido fórmico con respecto a la mezcla agua-metanol, demostrando una influencia de la proporción en la que estos disolventes

se mezclan y también el posible rol del ácido fórmico en la extracción y estabilización de las isoflavonas en el medio.

Cuadro 7E. Concentración de isoflavonas (media ± DS) extraídas con agua:metanol:ácido fórmico.

Polvo de alfalfa (mg/100 g de muestra)							
Mes de cosecha	Muestra	Daidzina	Genistina	Daidzeína[B]	Gliciteina	Genisteína[A]	Total
Mayo	**MSR-1**	n.d.	n.d.	16.6±0.04	n.d.	6.33±0.01	22.93[a]
Julio	**MSR-2**	n.d.	n.d.	20.0±0.00	n.d.	14.33±0.01	34.33[b]
Agosto	**MSR-3**	n.d.	n.d.	15.3±0.02	n.d.	6.66±0.01	22.0[a]
Septiembre	**MSR-4**	n.d.	n.d.	15.0 ± 0.01	n.d.	14.0±0.03	29.0[a,b]
Octubre	**MSR-5**	n.d.	4.0±0.1	8.66±0.03	n.d.	9.33±0.03	22.0[a]
Jugo de alfalfa liofilizado							
Mes de cosecha	Muestra	Daidzina	Genistina	Daidzeína[B]	Gliciteina	Genisteína[A]	Total
Mayo	**MSJ-1**	n.d.	n.d.	39.66±0.13	n.d.	24.0±0.00	63.6[a,c]
Julio	**MSJ-2**	n.d.	n.d.	30.33±0.05	n.d.	5.0±0.00	35.33[a]
Agosto	**MSJ-3**	n.d.	n.d.	43.0±0.11	n.d.	7.0±0.03	50.0[a,c]
Septiembre	**MSJ-4**	n.d.	n.d.	31.33±0.01	n.d.	5.0±0.02	36.3[a]
Octubre	**MSJ-5**	n.d.	29.33±0.32	62.6±0.39	n.d.	13.0±0.03	105.0[c]

El polvo de la colecta de mayo (extraída con agua) presentó un mayor contenido de daidzeína (36.00 ± 0.14 mg/100 g), mientras su respectivo jugo liofilizado presentó el valor más pequeño (43.33 mg/100 g), comparado con el resto de las colectas. Inversamente, el polvo obtenido con alfalfa colectada en septiembre presentó el valor más pequeño (13.33 ± 0.07 mg/100g) comparado con el resto de polvos, mientras que el jugo obtenido de esta misma colecta presentó los valores mayores (163.33 ± 1.77 mg/100 g). Una tendencia similar fue observada con

respecto a la genisteína, donde el polvo obtenido de la colecta de mayo tuvo el valor más pequeño, mientras que el jugo liofilizado presentó el valor mayor (6.33 ± 0.01 mg/100 g y 24.00 ± 0.0 mg/100 g, respectivamente). En este contexto, los productos de la colecta de julio también mostraron este comportamiento.

Con la mezcla de extracción formada por agua:metanol:ácido fórmico, se obtuvo un mayor contenido de isoflavonas en la colecta de octubre, lo que resulta concordante con lo observado en el análisis de flavonoides totales. Este mismo resultado puede observarse en las muestras extraídas con la mezcla de agua: metanol, aunque no con el resto de extracciones, lo cual refleja nuevamente la importancia de explorar el comportamiento de las matrices frente a diferentes sistemas de solventes para la extracción óptima de los compuestos de interés.

Por otro lado, las isoflavonas gliciteína, formononetina y biochanina A no fueron detectadas en ninguna de las muestras analizadas. Aunque la formononetina y la gliciteína han sido reportadas previamente en extractos hidroalcohólicos de *Medicago sativa* cultivada en Europa, la cantidad de isoflavonas en esas muestras fue pequeña (0.45 ± 0.01 mg/kg de extracto y 2.40 ± 0.06 mg /kg de extracto, respectivamente). Además, es posible que la diferencia en las condiciones de cultivo y ambiente en México influyen en la biosíntesis de estos compuestos (Visnevschi-Necrasov *et al.*, 2015). Es posible también que durante el procesamiento de la planta para la elaboración de los dos productos, el contenido de metabolitos se vea modificado.

Uno de los principales retos a vencer cuando se desea estandarizar un producto elaborado con especies vegetales, es la variación en el contenido de compuestos bioactivos en plantas crecidas a diferentes latitudes, e incluso durante distintas épocas del año. Estas condiciones constantemente influyen sobre la concentración de compuestos marcadores e ingredientes activos de las plantas, por lo que la exploración de estas variaciones es indispensable.

En este estudio, la variación del contenido de isoflavonas presentes en los dos productos elaborados con alfalfa cultivada en cinco meses del año fue analizada. Para llevar a cabo esta comparación, se consideró el contenido total de isoflavonas, el cual se obtuvo sumando el contenido individual de las isoflavonas en

los dos productos de cada cosecha. El contenido total de isoflavonas en los distintos lotes analizados no mostró una tendencia contante. Sin embargo, en todos los casos, el contenido total de isoflavonas fue mayor en las muestras de jugo liofilizado que en el polvo. Este hecho pudo deberse a que los compuestos mayormente solubles en agua son extraídos en el jugo, dejando apenas una parte de éstos retenidos en el material sólido residual del que se obtiene el polvo.

Por otro lado, la variación encontrada en el contenido total de isoflavonas en las diferentes colectas es totalmente inteligible si se considera que la producción de estos compuestos depende en gran medida de las condiciones de cultivo como la temperatura, la luz, de la calidad del suelo y de la cantidad de agua suministrada (Seguin and Zheng, 2006). Estos aspectos deberán ser considerados en la elaboración industrial de los productos, en conjunto con los resultados encontrados en los demás estudios para poder garantizar que los productos mantienen su composición.

Otros factores para tomar en cuenta cuando se analiza la variación en el contenido de fitoestrógenos es el grado de maduración de la planta, así como las partes de ésta que están siendo analizadas. Este parámetro varía considerablemente durante los diferentes grados de maduración, presentando un bajo contenido de estos compuestos durante la etapa previa a la floración. Una vez que la planta florece, el mayor contenido de fitoestrógenos se concentra en las flores (Seguin *et al.*, 2004). Los productos de alfalfa analizados en este trabajo fueron elaborados con las partes aéreas de alfalfa colectada justo en la etapa previa al brote de flores, lo que justifica que el contenido de isoflavonas sea bajo. Al respecto, es importante llevar a cabo estudios adicionales donde se analice el contenido de isoflavonas en los dos productos elaborados con alfalfa colectada en diferentes etapas de maduración. En conjunto con estudios farmacológicos se podría definir la etapa de maduración óptima para lograr un producto con mayor cantidad de compuestos bioactivos, que tenga la capacidad de ejercer acciones farmacológicas positivas que promuevan la salud de quien consuma estos productos, o bien, definir si los productos elaborados con alfalfa colectada en etapas de maduración tardía podrían tener algún efecto toxico en humanos.

7.11. Viabilidad celular, integridad de la membrana y recuperación celular

Con el objetivo de obtener información acerca de los posibles efectos tóxicos de los productos de alfalfa, se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad en células Caco-2. Para esto, los dos ensayos MTT (que determina la actividad mitocondrial) y LDH (que mide la integridad de la membrana) fueron empleados. En esta parte del trabajo, sólo los productos elaborados con alfalfa colectada en mayo y julio fueron analizados.

El ensayo MTT es ampliamente utilizado para determinar el posible efecto citotóxico de una muestra, midiendo el daño ocasionado a la mitocondria. Dicho método se basa en la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol por acción de enzimas mitocondriales, dando como producto el formazán (un compuesto de color azul). La formación de este compuesto es indicativo de la actividad metabólica de células viables.

En la Figura 29, se muestran los resultados obtenidos para este ensayo a 3 y 24 h de exposición para las cuatro muestras analizadas (dos polvos y dos jugos liofilizados). En ésta, se observa que el efecto producido fue dependiente de la concentración. Las células tratadas con 100 mg/mL de los productos de alfalfa mostraron una disminución en la viabilidad celular (del orden de 60 %), siendo ésta comparable a la observada con el control positivo. A esta concentración, también se observó una baja sobrevivencia con la exposición de las células durante 24 h, siendo ésta más marcada en el caso de los polvos (Figura 30).

Por otro lado, la medición de la liberación de la LDH permitió conocer el grado de integridad de la membrana celular. La LDH es una enzima citosólica presente en diversos tipos celulares. Cuando la membrana celular es dañada, dicha enzima es liberada al exterior, donde es capaz de catalizar la transformación de un sustrato que, al adicionarse al medio, da origen a un producto colorido, el cual puede ser cuantificado por espectrofotometría. Las Figuras 31 y 32 muestran los resultados obtenidos mediante este ensayo. Al igual que en el experimento anterior, el efecto producido por los diferentes tratamientos también fue dependiente de la concentración. La liberación de la LDH fue considerablemente mayor a

concentraciones de 50 y 100 mg/mL, siendo más evidente para las muestras de jugo liofilizado. Esto muestra claramente la diferencia en el efecto citotóxico de los constituyentes químicos presentes en los dos productos de alfalfa. Contrario a lo que se observó en el ensayo MTT, los resultados de la liberación de la LDH a los dos tiempos de incubación no presentaron diferencias, demostrando que el daño causado en la membrana celular es dependiente únicamente de la concentración y no del tiempo.

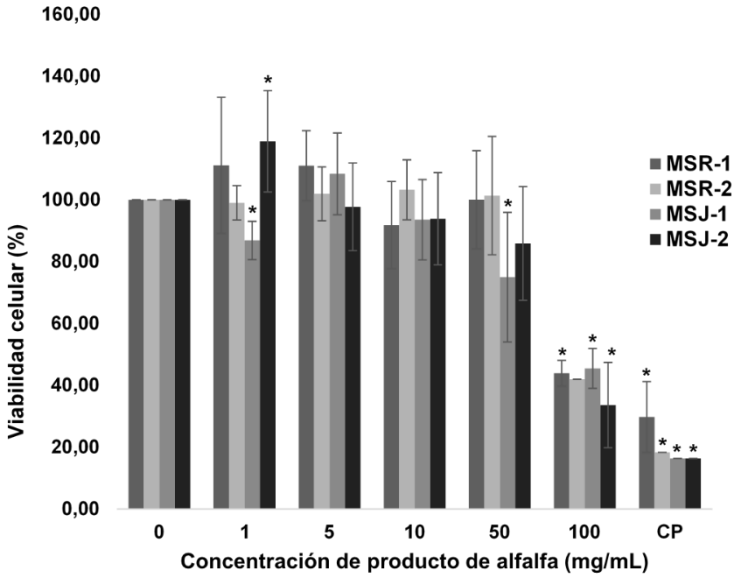


Figura 29. Resultados del ensayo MTT a 3 horas de incubación. CP, Control Positivo.

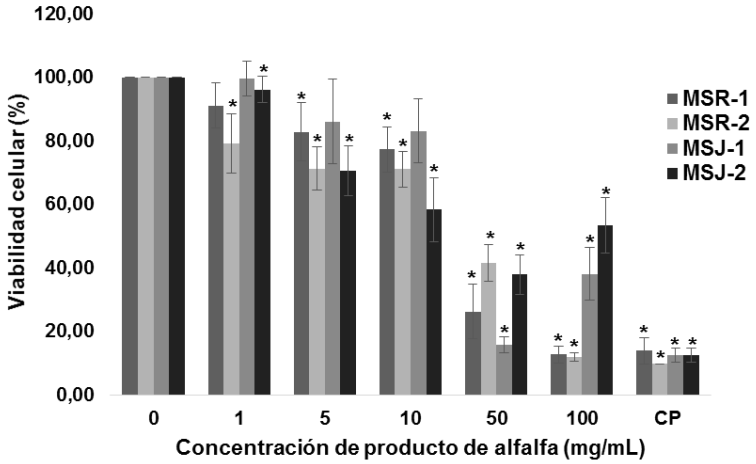


Figura 30. Resultados del ensayo MTT a 24 horas de incubación. CP, Control Positivo.

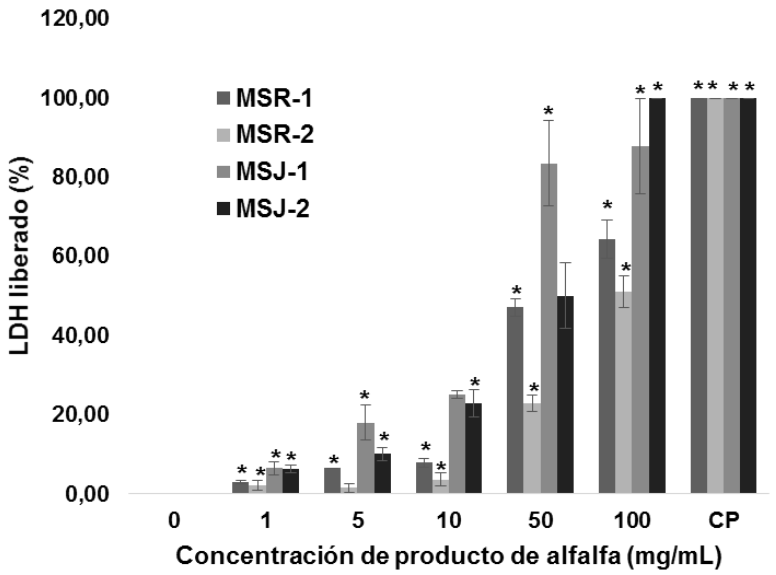


Figura 31. Resultados del ensayo LDH a 3 horas de incubación. CP, Control Positivo.

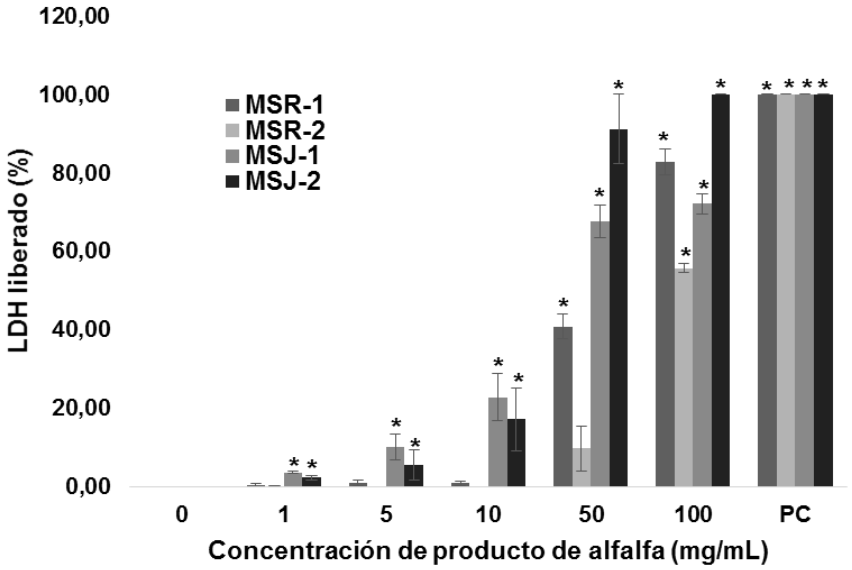


Figura 32. Resultados del ensayo LDH a 24 horas de incubación. CP, Control Positivo.

Adicionalmente, las células Caco-2 fueron sometidas a un ensayo de recuperación. Éste consistió en un tratamiento con los productos de alfalfa durante 3 y 24 horas de forma independiente. Pasado el tiempo de exposición, el tratamiento fue sustituido por medio fresco y las células fueron incubadas durante 24 horas más

para después llevar a cabo los ensayos MTT y LDH. Los resultados obtenidos durante el ensayo de recuperación sugieren que el daño ocasionado por los productos de alfalfa fue irreversible en ambos tiempos de incubación, ya que las células no consiguieron recuperar su capacidad proliferativa luego de remover las muestras e incubar las células en el medio fresco.

Los resultados obtenidos en los ensayos MTT y LDH fueron analizados mediante una correlación de Spearman (Cuadro 8). Los análisis mostraron una correlación positiva en los resultados de viabilidad celular determinada mediante el ensayo LDH. Por otro lado, los resultados del ensayo MTT mostraron una baja correlación negativa luego de un periodo de exposición de 3 horas, mientras que hubo una alta correlación negativa luego de 24 horas de exposición. Esta correlación expresa la dependencia entre el efecto observado y la concentración de las muestras analizadas.

El cuadro 8 muestra los valores encontrados para la concentración inhibitoria media (IC_{50}), que indica la concentración en la que se observa la muerte del 50% de las células tratadas. Para el ensayo MTT se observó que la IC_{50} varió considerablemente dependiendo del tiempo de exposición, ya que fue necesaria una mayor concentración durante tres horas para obtener el mismo efecto que el producido con menor concentración a 24 horas de incubación. Sin embargo, la IC_{50} encontrada para el ensayo LDH no muestra una variación drástica dependiente del tiempo de exposición. Estos resultados confirman que el daño ocasionado a la membrana sólo es dependiente de la concentración, pero independiente del tiempo, mientras que el daño a la mitocondria es dependiente de ambos factores. Además, las IC_{50} varían considerablemente para cada uno de los experimentos, dependiendo de la muestra. Esto refleja la importancia de evaluar la variación entre productos elaborados con distintas colectas de alfalfa.

Los resultados obtenidos en estos experimentos constituyen el primer acercamiento a los posibles efectos citotóxicos de los productos de alfalfa analizados y los convierten en potenciales candidatos para el tratamiento del cáncer, en particular el de colon. Sin embargo, estos resultados sólo reflejan el

efecto de los constituyentes químicos naturales presentes en las muestras, pero no tienen en cuenta el de sus posibles metabolitos en un organismo íntegro.

Cuadro 8. Correlación de Spearman e IC_{50} encontrada para los productos de alfalfa.

Muestra	Ensayo	Periodo de exposición	Correlación de Spearman r : p<0.05	IC_{50} (mg/mL) [intervalo de confianza]
MSR-1	MTT	3 h	-0.347	202.00 [50.86–802.6)]
		24 h	-0.873	23.26 [15.07–35.91]
	LDH	3 h	0.975	59.85 [50.07–71.53]
		24 h	0.856	54.95 [36.68–82.33]
MSR-2	MTT	3 h	0.031	308.00 [52.65-1801]
		24 h	-0.891	20.38 [12.01–34.59]
	LDH	3 h	0.883	123.70 [99.91–153.1]
		24 h	0.695	144.2 [92.58–224.6]
MSJ-1	MTT	3 h	-0.414	114.10 [48.39–269.0]
		24 h	-0.679	30.1 [15.53–58.34]
	LDH	3 h	0.947	17.84 [11.09–28.70]
		24 h	0.964	31.13 [24.88–38.95]
MSJ-2	MTT	3 h	-0.478	106.6 [36.84–308.61]
		24 h	-0.846	24.21 [11.65–50.30]
	LDH	3 h	0.984	27.31 [17.11–43.60]
		24 h	0.949	19.64 [10.91–35.34]

7.12. Actividad estrogénica de los productos elaborados con alfalfa

Para evaluar la capacidad de los productos de alfalfa de producir un efecto estrogénico, se llevó a cabo un ensayo uterotrófico en ratas adultas ovariectomizadas. En este ensayo, se administraron concentraciones bajas (400 mg/kg) y concentraciones elevadas (2,000 mg/kg) de cada uno de los productos de alfalfa.

La Figura 33 muestra los resultados obtenidos mediante estos tratamientos. Como se puede observar, el grupo tratado con estradiol vía subcutánea aumentó tres veces el peso del tejido uterino con respecto al grupo tratado únicamente con el vehículo, siendo concordante con el resultado esperado.

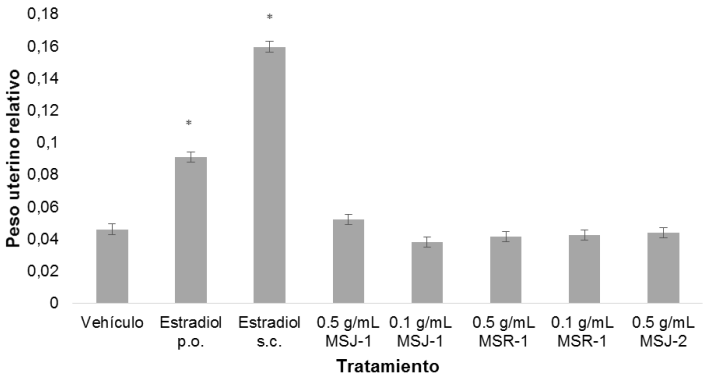


Figura 33. Gráfica de resultados del ensayo uterotrófico. *Indica diferencia significativa $p<0.05$ contra el control negativo; p.o., vía oral; s.c., vía subcutánea.

Para establecer una mejor comparación entre los tratamientos y el control positivo, se utilizó un segundo grupo control que fue tratado con estradiol vía oral (p.o.). En este caso, se observó un aumento de dos veces el peso uterino relativo. Esta variación entre los dos controles positivos puede atribuirse a las diferencias en los procesos farmacocinéticos de las dos formas farmacéuticas utilizadas.

La Figura 34 muestra el tejido uterino de un sujeto por cada grupo experimental. El tejido uterino en condiciones normales de una rata tratada únicamente con el vehículo (A) no sufrió alteración, contrariamente al del control positivo (estradiol) (Figura 34B), el cual presentó un tejido uterino considerablemente más grande que el resto de los grupos analizados. Este aumento en el tejido uterino es el resultado de la activación de los receptores estrogénicos, los cuales son abundantes en dicho tejido. Al ser activados por su agonista (el estradiol), los RE desencadenaron el mecanismo genómico que concluyó en la proliferación de las células que constituyen el útero, así como una mayor concentración de líquido en el interior del tejido.

Los resultados del ensayo uterotrófico demostraron que ninguno de los dos productos de alfalfa (de la colecta de Mayo) produce un efecto estrogénico a pesar de ser administrados a cantidades elevadas (2,000 mg/kg). Lo que pone de manifiesto que la concentración de compuestos estrogénicos es importante y que la matriz en la que éstos se encuentran, así como el metabolismo in vivo son aspectos importantes a considerar. Relacionado a esto, un estudio demostró que concentraciones de 100 mg/kg y 300 mg/kg de un extracto estandarizado de

Angelica sinensis (planta conocida por su efecto estrogénico) eran suficientes para producir un efecto estrogénico en ratas ovariectomizadas (Circosta *et al.*, 2006).

Para corroborar que las variaciones en la constitución química de los productos no modifican Por otro lado, el grupo tratado con jugo liofilizado (de la colectada en Julio) a una concentración elevada no mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo. Este resultado corrobora que el jugo liofilizado de alfalfa colectada en diferentes etapas del año no produce actividad estrogénica mediante el ensayo uterotrófico.

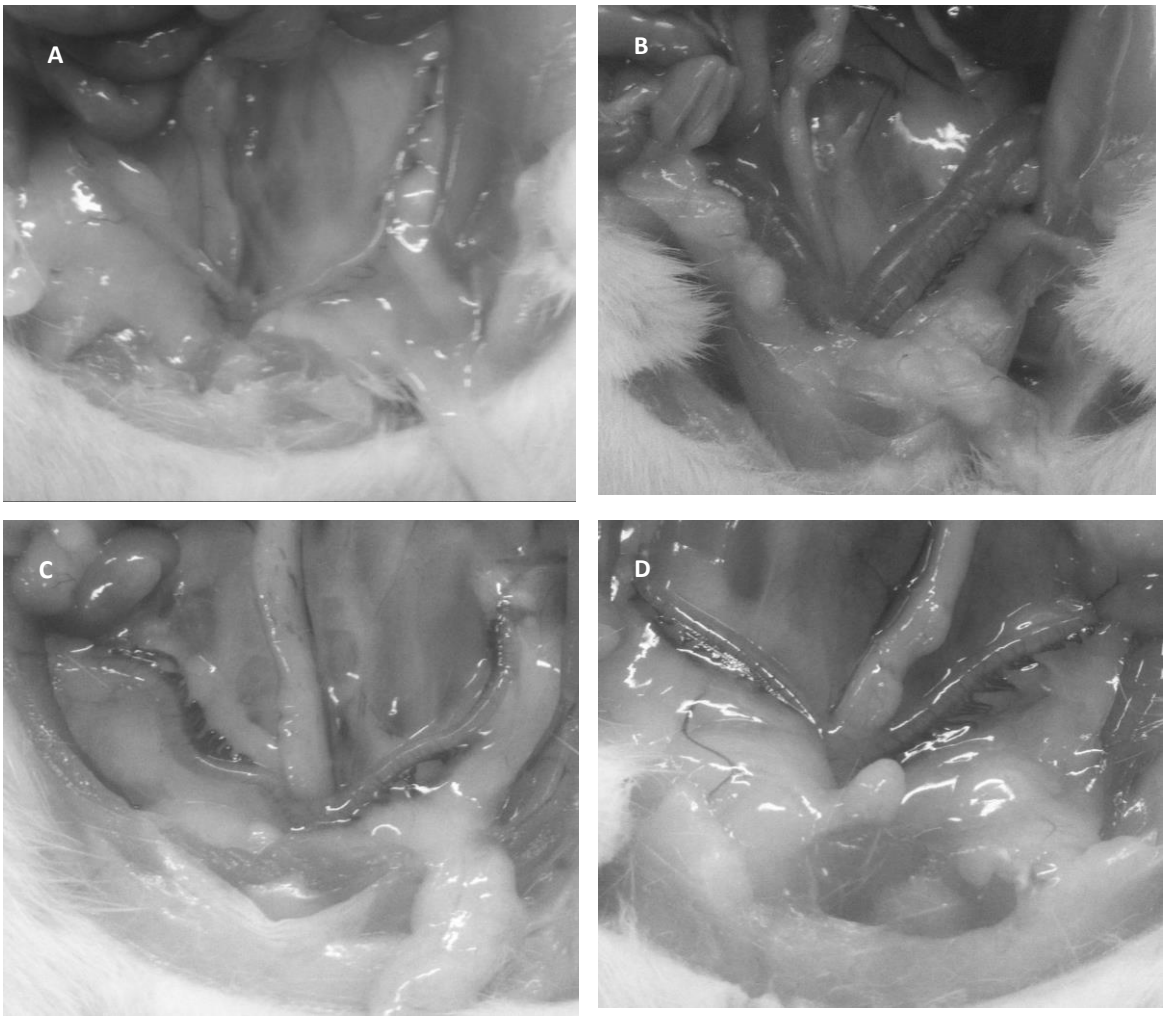


Figura 34. Tejido uterino luego de la administración de los productos de alfalfa. A: Control negativo; B: Control positivo, C: Con polvo de alfalfa deshidratada; D: Con jugo de alfalfa liofilizado.

La ausencia de actividad estrogénica mediante el ensayo uterotrófico no descarta del todo la posibilidad de que los productos de alfalfa contengan compuestos capaces de ejercer efectos estrogénicos en otros tejidos. Este resultado es consistente con estudios previamente descritos donde se evaluó el efecto estrogénico de *Herba epimedii*, encontrando que ésta no estimulaba hiperplasia celular en el útero de ratas ovariectomizadas, sin embargo sí producía un efecto osteoprotector (Xiao *et al.*, 2014), aunque este último aspecto no se evaluó en este trabajo.

Es importante mencionar que el efecto negativo observado en la actividad estrogénica se debió a las bajas concentraciones de los compuestos bioactivos presentes en los productos, ya que se ha demostrado que se requieren concentraciones superiores a los 100 mg/kg de fitoestrógenos individuales (apigenina, floretina y miricetina) para observar un efecto estrogénico mediante el ensayo uterotrófico (Barlas *et al.*, 2014). Al respecto, podemos observar que la cantidad de isoflavonas administradas, tomando en consideración las concentraciones encontradas en el análisis químico, resulta inferior a las antes mencionadas por lo que se justifica la falta de actividad estrogénica en el ensayo uterotrófico. Adicionalmente, es importante considerar el metabolismo *in vivo* de los metabolitos secundarios en cuestión, ya que, como se ha mencionado al inicio, los fitoestrógenos sufren un metabolismo previo a su llegada a los tejidos donde ejercen sus efectos; además, muchos de estos son eliminados sin siquiera llegar a actuar. Finalmente, la ausencia de actividad estrogénica encontrada *in vivo*, contrasta con los resultados obtenidos para la citotoxicidad *in vitro*, lo cual confirma plenamente la importancia del metabolismo, como factor decisivo en el efecto farmacológico de los productos elaborados a base de plantas.

8. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo soportan el potencial funcional de los dos productos de alfalfa estudiados. Ambos tipos de productos (polvo y liofilizado) tienen un alto valor nutricional determinado por su alto contenido de proteínas y minerales y su bajo contenido de grasa. Además, contienen concentraciones importantes de compuestos fenólicos, algunos de ellos flavonoides, capaces de promover una actividad antioxidante comparable o incluso superior al de un producto comercial y al de dos frutos tomados como referencia por su alto contenido de antioxidantes. Adicionalmente, los dos productos de alfalfa demostraron contener cuatro isoflavonas que han sido ampliamente reportadas como fitoestrógenos, aunque debido a su baja abundancia, éstos no fueron suficientes para producir actividad estrogénica *in vivo*. Todos estos resultados, en conjunto con los estudios de citotoxicidad donde se dan indicios su potencial en la terapéutica del cáncer de colon por su citotoxicidad en esa línea celular, muestran las ventajas que tienen estos productos para ser consumidos como nutracéuticos capaces de aportar nutrientes e ingredientes funcionales a la dieta humana. Tanto el desarrollo de nuevos productos funcionales, como la obtención de información científica para validar su efectividad y seguridad, son ejercicios que permiten no sólo la generación de nuevas opciones para el cuidado de la salud, sino también una forma de aprovechar los recursos locales con los que se cuenta, para seguir impulsando el desarrollo de una sociedad sustentable.

9. REFERENCIAS

Adams, N R, 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. Journal of animal science 73, 1509-1515.

Almeida, I M C, Rodrigues, F, Sarmento, B, Alves, R C, Oliveira, M B P P, 2015. Isoflavones in food supplements: chemical profile, label accordance and permeability study in Caco-2 cells. Food & function 6, 938-946.

Alvídrez-Morales, A, B.E. González-Martínez, Z. Jiménez-Salas, 2002. Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. Revista salud pública y nutrición 3.

AOAC, A o O A C, 2009.

Argentieri, M, D'Addabbo, T, Tava, A, Agostinelli, A, Jurzysta, M, Avato, P, 2008. Evaluation of nematicidal properties of saponins from Medicago spp. Eur J Plant Pathol 120, 189-197.

Atkinson, C, Warren, R M, Sala, E, Dowsett, M, Dunning, A M, Healey, C S, Runswick, S, Day, N E, Bingham, S A, 2004. Red-clover-derived isoflavones and mammographic breast density: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial [ISRCTN42940165]. Breast cancer research : BCR 6, R170-179.

Atteritano, M, Mazzaferro, S, Bitto, A, Cannata, M L, D'Anna, R, Squadrito, F, Macrì, I, Frisina, A, Frisina, N, Bagnato, G, 2014. Genistein effects on quality of life and depression symptoms in osteopenic postmenopausal women: a 2-year randomized, double-blind, controlled study. Osteoporos Int 25, 1123-1129.

Bagchi, D, Das, D K, Tosaki, A, Bagchi, M, Kothari, S C, 2001. Benefits of resveratrol in women's health. Drugs under experimental and clinical research 27, 233-248.

Bai, H, Jin, H, Yang, F, Zhu, H, Cai, J, 2014. Apigenin induced MCF-7 cell apoptosis-associated reactive oxygen species. Scanning 36, 622-631.

Barlas, N, Özer, S, Karabulut, G, 2014. The estrogenic effects of apigenin, phloretin and myricetin based on uterotrophic assay in immature Wistar albino rats. Toxicology Letters 226, 35-42.

Benassayag, C, Perrot-Applanat, M, Ferre, F, 2002. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 777, 233-248.

Bennetts, H W, Uuderwood, E J, Shier, F L, 1946. A SPECIFIC BREEDING PROBLEM OF SHEEP ON SUBTERRANEAN CLOVER PASTURES IN WESTERN AUSTRALIA. Australian Veterinary Journal 22, 2-12.

Benzie, I F, Strain, J J, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry 239, 70-76.

Beral, V, 2003. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. Lancet 362, 419-427.

Bickoff, E M, Booth, A N, Lyman, R L, Livingston, A L, Thompson, C R, Deeds, F, 1957. Coumestrol, a new estrogen isolated from forage crops. Science (New York, NY) 126, 969-970.

Blumel, J E, Castelo-Branco, C, Binfa, L, Gramegna, G, Tacla, X, Aracena, B, Cumsille, M A, Sanjuan, A, 2000. Quality of life after the menopause: a population study. Maturitas 34, 17-23.

Bora, K S, Sharma, A, 2011. Phytochemical and pharmacological potential of Medicago sativa: a review. Pharmaceutical biology 49, 211-220.

Brewer, M S, 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 10, 221-247.

Cabrera, G V, Meza, J.S, 1999. Epidemiología de la osteoporosis. 28, 1-2.

Carocho, M, Barros, L, Calhelha, R C, Ciric, A, Sokovic, M, Santos-Buelga, C, Morales, P, Ferreira, I C F R, 2015. Melissa officinalis L. decoctions as functional beverages: a bioactive approach and chemical characterization. Food & function 6, 2240-2248.

Caunii, A, Pribac, G, Grozea, I, Gaitin, D, Samfira, I, 2012. Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from six varieties of Medicago sativa. Chemistry Central journal 6, 123.

Circosta, C, Pasquale, R D, Palumbo, D R, Samperi, S, Occhiuto, F, 2006. Estrogenic activity of standardized extract of Angelica sinensis. Phytotherapy Research 20, 665-669.

Cornwell, T, Cohick, W, Raskin, I, 2004. Dietary phytoestrogens and health. Phytochemistry 65, 995-1016.

Corral-Aguayo, R D, Yahia, E M, Carrillo-Lopez, A, Gonzalez-Aguilar, G, 2008. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. Journal of agricultural and food chemistry 56, 10498-10504.

Crowe, K M, Francis, C, 2013. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics 113, 1096-1103.

D´Attellis, R A, 2005. Alfalfa (Medicago sativa L. Producción de semilla tinogasta, Catamarca. Dirección provincial de programación de desarrollo.

de Groot, H, Rauen, U, 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. Fundamental & clinical pharmacology 12, 249-255.

Drummond, A E, Fuller, P J, 2010. The importance of ERβ signalling in the ovary. Journal of Endocrinology 205, 15-23.

Elsayed, E A, Sharaf-Eldin, M A, Wadaan, M, 2015. In vitro Evaluation of Cytotoxic Activities of Essential Oil from Moringa oleifera Seeds on HeLa, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 Cell Lines. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP 16, 4671-4675.

Fantini, M, Benvenuto, M, Masuelli, L, Frajese, G V, Tresoldi, I, Modesti, A, Bei, R, 2015. In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment. International Journal of Molecular Sciences 16, 9236-9282.

Gawel, E, 2012. Chemical composition of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria 11, 303-310.

Gholami, A, De Geyter, N, Pollier, J, Goormachtig, S, Goossens, A, 2014. Natural product biosynthesis in Medicago species. Natural product reports 31, 356-380.

Goto, T, Hagiwara, K, Shirai, N, Yoshida, K, Hagiwara, H, 2015. Apigenin inhibits osteoblastogenesis and osteoclastogenesis and prevents bone loss in ovariectomized mice. Cytotechnology 67, 357-365.

Guyton, 2011. Tratado de fisiología médica. Elsevier.

Heldring, N, Pike, A, Andersson, S, Matthews, J, Cheng, G, Hartman, J, Tujague, M, Strom, A, Treuter, E, Warner, M, Gustafsson, J A, 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiological reviews 87, 905-931.

Hong, Y H, Wang, S C, Hsu, C, Lin, B F, Kuo, Y H, Huang, C J, 2011. Phytoestrogenic compounds in alfalfa sprout (Medicago sativa) beyond coumestrol. Journal of agricultural and food chemistry 59, 131-137.

Hu, J-Y, Aizawa, T, 2003. Quantitative structure–activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals. Water Research 37, 1213-1222.

Ibarreta, D, Daxenberger, A, Meyer, H H, 2001. Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 109, 161-184.

Ichikawa, D, Matsui, A, Imai, M, Sonoda, Y, Kasahara, T, 2004. Effect of various catechins on the IL-12p40 production by murine peritoneal macrophages and a macrophage cell line, J774.1. Biological & pharmaceutical bulletin 27, 1353-1358.

Kim, J K, Levin, E R, 2006. Estrogen signaling in the cardiovascular system. Nuclear Receptor Signaling 4, e013.

Klein-Hitpass, L, Schorpp, M, Wagner, U, Ryffel, G U, 1986. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. Cell 46, 1053-1061.

Krishnaiah, D, Sarbatly, R, Nithyanandam, R, 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioproducts Processing 89, 217-233.

Kuijsten, A, Arts, I C, van't Veer, P, Hollman, P C, 2005. The relative bioavailability of enterolignans in humans is enhanced by milling and crushing of flaxseed. The Journal of nutrition 135, 2812-2816.

Liang, J, Yang, Z, Cao, X, Wu, B, Wu, S, 2011. Preparative isolation of novel antioxidant flavonoids of alfalfa by stop-and-go counter-current chromatography and following on-line liquid chromatography desalination. Journal of chromatography A 1218, 6191-6199.

López, L T, 2014. Flavonoides. Fitoterapia 21, 108-114.

Lorand, T, Vigh, E, Garai, J, 2010. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. Current medicinal chemistry 17, 3542-3574.

Luna-Vazquez, F J, Ibarra-Alvarado, C, Rojas-Molina, A, Rojas-Molina, J I, Yahia, E M, Rivera-Pastrana, D M, Rojas-Molina, A, Zavala-Sanchez, M A, 2013. Nutraceutical value of black cherry Prunus serotina Ehrh. fruits: antioxidant and antihypertensive properties. Molecules (Basel, Switzerland) 18, 14597-14612.

Maddaloni, J, Ferrari, L., 2001. Descripción botánica y rados de latencia. Sitio Argentino de Producción Animal.

Marquéz, D C, 2000. Receptor de estrógeno:Bases moleculares aplicadas a medicina. Medicina molecular.

Martin-Cordero, C, Leon-Gonzalez, A J, Calderon-Montano, J M, Burgos-Moron, E, Lopez-Lazaro, M, 2012. Pro-oxidant natural products as anticancer agents. Current drug targets 13, 1006-1028.

Messina, M, McCaskill-Stevens, W, Lampe, J W, 2006. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. Journal of the National Cancer Institute 98, 1275-1284.

Mishra, N, Dubey, A, Mishra, R, Barik, N, 2010. Study on antioxidant activity of common dry fruits. Food and Chemical Toxicology 48, 3316-3320.

Moon, J K, Shibamoto, T, 2009. Antioxidant assays for plant and food components. Journal of agricultural and food chemistry 57, 1655-1666.

Morabito, N, Crisafulli, A, Vergara, C, Gaudio, A, Lasco, A, Frisina, N, D'Anna, R, Corrado, F, Pizzoleo, M A, Cincotta, M, Altavilla, D, Ientile, R, Squadrito, F, 2002. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 17, 1904-1912.

Moravcová, J, Kleinová, T, Loučka, R, Tyrolová, I, Kvasnička, F, Dušek, M, Čeřovský, M, Matucha, P, 2004. Coumestrol content of alfalfa following ensilage. Animal Feed Science and Technology 115, 159-167.

Mosmann, T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods 65, 55-63.

Murkies, A L, Wilcox, G, Davis, S R, 1998. Phytoestrogens. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 83, 297-303.

Nguyen, T H, Lin, M, Mustapha, A, 2015. Toxicity of graphene oxide on intestinal bacteria and Caco-2 cells. Journal of food protection 78, 996-1002.

OPPTS, 2009. OPPTS 890.1600: Uterotrophic Assay. Endocrine Distruptor Screening Program Test Guidelines.

Osbourn, A, Goss, R J, Field, R A, 2011. The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities. Natural product reports 28, 1261-1268.

Ososki, A L, Kennelly, E J, 2003. Phytoestrogens: a review of the present state of research. Phytotherapy research : PTR 17, 845-869.

Pan, M H, Lai, C S, Ho, C T, 2010. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. Food & function 1, 15-31.

Patisaul, H B, Jefferson, W, 2010. The pros and cons of phytoestrogens. Frontiers in neuroendocrinology 31, 400-419.

Pietta, P G, 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products 63, 1035-1042.

Pilsakova, L, Riecansky, I, Jagla, F, 2010. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca 59, 651-664.

Polkowski, K, Mazurek, A P, 2000. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. Acta poloniae pharmaceutica 57, 135-155.

Poluzzi, E, Piccinni, C, Raschi, E, Rampa, A, Recanatini, M, De Ponti, F, 2014. Phytoestrogens in postmenopause: the state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective. Current medicinal chemistry 21, 417-436.

Popovic, S, Grljusic, S., Cupic, T., Tucak, M., Stjepanovic, M., 2001. Protein and fiber contents in alfalfa leaves and stems. CIHEAM Options Méditerranéennes, 215-218.

Prior, R L, Wu, X, Schaich, K, 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of agricultural and food chemistry 53, 4290-4302.

Rezzani, R, Tengattini, S, Bonomini, F, Filippini, F, Pechanova, O, Bianchi, R, Andriantsitohaina, R, 2009. Red wine polyphenols prevent cyclosporine-induced nephrotoxicity at the level of the intrinsic apoptotic pathway. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca 58, 511-519.

Rishi, R K, 2002. Phyotestrogens in health and illness. Indian Journal of Pharmacology 34, 311-320.

Rodrigues, F, Almeida, I, Sarmento, B, Amaral, M H, Oliveira, M B P P, 2014. Study of the isoflavone content of different extracts of Medicago spp. as potential active ingredient. Industrial Crops and Products 57, 110-115.

Rodrigues, F, Palmeira-de-Oliveira, A, das Neves, J, Sarmento, B, Amaral, M H, Oliveira, M B, 2013. Medicago spp. extracts as promising ingredients for skin care products. Industrial Crops and Products 49, 634-644.

Rostagno, M A, Palma, M, Barroso, C G, 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. Journal of Chromatography A 1012, 119-128.

Sahoimy, S A E, 2012. Functional foods and nutraceuticals-modern approach to food science. World Applied Science Journal 20(5), 691-708.

Saloniemi, H, Kallela K., Saastamoieen, I. , 1993. Study of the phytoestrogen content of goat's rue (Galega orientalis), alfalfa (Medicago sativa) and white clover (Trifolium repens). Agricultural Science 2, 517-524.

Scholtz, G D J, van der Merwe, H J, Tylutki, T P, 2009. The nutritive value of South African Medicago sativa L. hay. South African Journal of Animal Science 39, 179-182.

Seguin, P, Zheng, W, 2006. Phytoestrogen content of alfalfa cultivars grown in eastern Canada. Journal of the Science of Food and Agriculture 86, 765-771.

Seguin, P, Zheng, W, Souleimanov, A, 2004. Alfalfa Phytoestrogen Content: Impact of Plant Maturity and Herbage Components. Journal of Agronomy and Crop Science 190, 211-217.

Siró, I, Kápolna, E, Kápolna, B, Lugasi, A, 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. Appetite 51, 456-467.

Su, Y, Ma, L, Wen, Y, Wang, H, Zhang, S, 2014. Studies of the in Vitro Antibacterial Activities of Several Polyphenols against Clinical Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Molecules (Basel, Switzerland) 19, 12630.

Sudheesh, S, Sandhya, C, Sarah Koshy, A, Vijayalakshmi, N R, 1999. Antioxidant activity of flavonoids from Solanum melongena. Phytotherapy research : PTR 13, 393-396.

Tava, A, Scotti, C, Avato, P, 2011. Biosynthesis of saponins in the genus Medicago. Phytochem Rev 10, 459-469.

Terao, J, 2009. Dietary flavonoids as antioxidants. Forum of nutrition 61, 87-94.

Turhan, N, Bolkan F., Iltemir D., Ardicoglu Y, 2008. The effect of isoflavones on bone mass and bone remodeling markers in postmenopausal women. Turkish Journal of Medical Sciences 38, 145-152.

Upadhyay, S, Dixit, M, 2015. Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2015, 504253.

Valdiglesias, V, Costa, C, Sharma, V, Kilic, G, Pasaro, E, Teixeira, J P, Dhawan, A, Laffon, B, 2013. Comparative study on effects of two different types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 57, 352-361.

Visnevschi-Necrasov, T, Barreira, J C, Cunha, S C, Pereira, G, Nunes, E, Oliveira, M B, 2015. Advances in isoflavone profile characterisation using matrix solid-phase dispersion coupled to HPLC/DAD in Medicago species. Phytochemical analysis : PCA 26, 40-46.

Wang, S, Moustaid-Moussa, N, Chen, L, Mo, H, Shastri, A, Su, R, Bapat, P, Kwun, I, Shen, C-L, 2014. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. The Journal of nutritional biochemistry 25, 1-18.

Wong, S P, Leong, L P, William Koh, J H, 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chemistry 99, 775-783.

Xiao, H-H, Fung, C-Y, Mok, S-K, Wong, K-C, Ho, M-X, Wang, X-L, Yao, X-S, Wong, M-S, 2014. Flavonoids from Herba epimedii selectively activate estrogen receptor alpha (ERα) and stimulate ER-dependent osteoblastic functions in UMR-106 cells. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 143, 141-151.

Yari, M, Valizadeh, R, Naserian, A A, Jonker, A, Yu, P, 2012. Modeling nutrient availability of alfalfa hay harvested at three stages of maturity and in the afternoon and morning in dairy cows. Animal Feed Science and Technology 178, 12-19.

Zhishen, J, Mengcheng, T, Jianming, W, 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 64, 555-559.