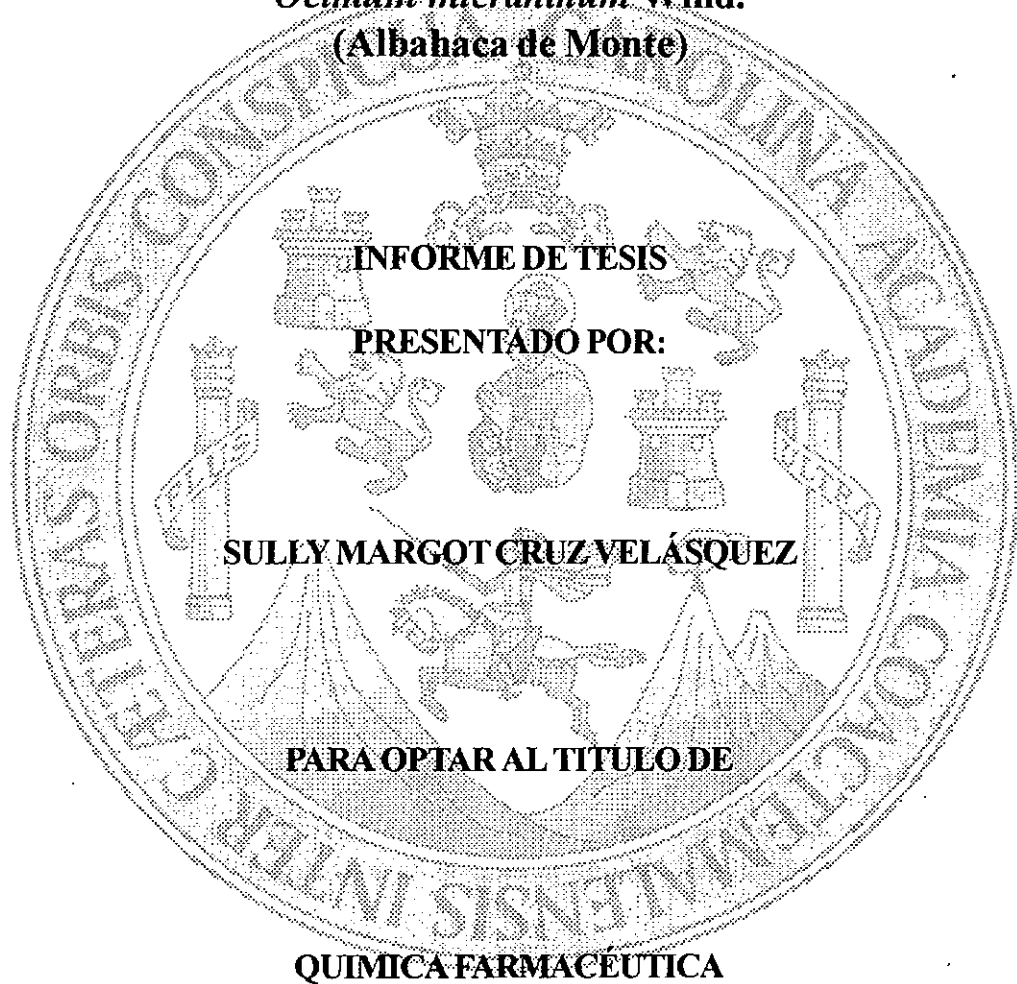


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**Fraccionamiento Bioguiado y Tamizaje Fitoquímico  
del Extracto Etanólico con actividad antiartemia de  
*Ocimum micranthum* Willd.  
(Albahaca de Monte)**



**GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2001.**

**PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central**

D2  
06  
+(2146)

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANA LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA

SECRETARIO LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA

VOCAL I DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO

VOCAL II DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA

VOCAL III DR. FEDERICO ADOLFO RICHTER MARTINEZ

VOCAL IV BR. CESAR ALFREDO FLORES LOPEZ

VOCAL V BR. MANUEL ANIBAL LEAL GOMEZ

## DEDICATORIA

A Dios

Fuente infinita de sabiduría y amor; por ser esa luz que guía mi camino y ser la fortaleza de mi vida.

A mis padres

César Cruz y Margot Velasquez

Por su apoyo constante e incondicional y por brindarme su amor y comprensión.

A mis hermanos

Por su cariño y su apoyo.

A mis familiares

Por su cariño fraternal y ayuda incondicional.  
En especial a mi abuelita Conchita.

A mi pastor y congregación

Por su ayuda espiritual y amistad sincera.

A mis asesores y amigos

Lic. Armando Cáceres, Msc. Ingeborg Berger, Lic. William Tally,  
Licda. Claudia Morales, Licda. Julieta Ortiz, Licda Beatriz Medinilla.

A mis amigos y compañeros en general por brindarme su amistad y compartir momentos especiales en mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A los Licenciados Armando Cáceres, William Tally y Msc. Ingeborg Berger por su asesoría y apoyo en el presente trabajo de investigación.

A las Licenciadas Claudia Morales, Julieta Ortiz y Beatriz Medinilla por su amistad y colaboración en el presente trabajo de investigación.

A la Dirección General de Investigación (DIGI), Organización de Estados Americanos (OEA), Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Laboratorio Farmaya, Unidad de Análisis Instrumental, Departamentos de Citohistología y Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala por el apoyo financiero proporcionado para la realización del presente trabajo de investigación

## INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	4
4. Justificación	10
5. Objetivos	11
6. Hipótesis	12
7. Materiales y Métodos	13
8. Resultados	31
9. Discusión de Resultados	42
10. Conclusiones	45
11. Recomendaciones	46
12. Referencias	47
13. Anexos	51

## 1. RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó con el propósito de contribuir al estudio fitoquímico y biológico de las plantas medicinales de uso popular en Guatemala, por lo que resultó de interés seleccionar la planta *Ocimum micranthum* Willd. (albahaca de monte). Dicha especie ha sido conocida desde la antigüedad como nativa de Guatemala, y entre sus principales componentes contiene un aceite esencial fuertemente aromático, al que popularmente se le atribuyen propiedades medicinales.

La planta se recolectó en su lugar de crecimiento silvestre bajo manejo, Chiguaxte, Samayac, Suchitepéquez. Se secó en secadores solares a la sombra. Se obtuvieron los extractos hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, etanólico y acuoso mediante partición líquido-líquido y maceración exhaustiva.

En el estudio se evaluó la actividad citotóxica, contra *Artemia salina* se caracterizaron los metabolitos secundarios de *O. micranthum* e identificaron los componentes presentes en el aceite esencial.

El bioensayo contra *A. salina* es un método que se utiliza para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y simple, resulta una prueba útil aunque no es selectiva para ninguna molécula química y su correlación con otras actividades no ha sido bien estudiada. *A. salina* es un crustáceo cuyas larvas (nauplios) son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas, por lo que se evalúa fácilmente la citotoxicidad. El ensayo *in vitro* contra *A. salina* permitió evaluar la actividad citotóxica del aceite esencial y de extractos con un gradiente de polaridad creciente (hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, etanólico y acuoso) de las hojas *O. micranthum*.

Al efectuar el bioensayo se encontró que el responsable de la acción citotóxica es el aceite esencial, el cual presentó una concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de 328.2689  $\mu\text{g/ml}$ , concentración inhibitoria 90 ( $IC_{90}$ ) de 690.2805  $\mu\text{g/ml}$  y una concentración inhibitoria 95 ( $IC_{95}$ ) de 852.1769  $\mu\text{g/ml}$ .

Los componentes del aceite esencial de las hojas de *O. micranthum* se identificaron a través de cromatografía de gases, utilizando una muestra recién destilada por arrastre con vapor, empleando un destilador de aceites esenciales modificado según la Farmacopea Europea. Se analizó una muestra de 0.22  $\mu\text{l}$  de aceite, en el cual se identificaron nueve compuestos, entre ellos los de mayor porcentaje encontrados fueron: eugenol (26.6206 %), 1,8 cineol (12.1061 %),  $\alpha$ -terpineol (7.1054 %),  $\beta$ -cariofileno (6.4555 %) y linalool (2.6533 %).

A través de ensayos macro y semimicro y cromatografía en capa fina se realizó la caracterización fitoquímica preliminar, en la cual se identificaron los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *O. micranthum*, estos fueron: antraquinonas, saponinas, cardenólidos, flavonoides y aceite esencial.

## 2. INTRODUCCION

Guatemala es un país que posee una gran riqueza natural de especies vegetales, lo cual ha dado lugar al uso de plantas en diferentes grupos étnicos de la población, por su accesibilidad y bajo costo. Desde épocas prehispánicas, a un sin número de plantas de la flora guatemalteca se les atribuyen propiedades medicinales, las cuales han sido adjudicadas en base a experiencias y uso tradicional, sin poseer ningún tipo de estudio científico que fundamente y valide su empleo como plantas farmacológicamente activas.

*Ocimum micranthum* (albahaca de monte) es una planta originaria de Centroamérica, conocida desde la antigüedad. Se le atribuye propiedad antiséptica, antiinflamatoria, astringente, diurética y se usa para tratar afecciones gastrointestinales, respiratorias, dérmicas y nerviosas (1-4).

Con el presente trabajo se espera brindar un respaldo científico al uso popularmente atribuido a la planta, que permita un mejor aprovechamiento de este recurso natural, así como realizar la caracterización fitoquímica.

La posibilidad de comprobar la actividad biocida de la planta evaluada podría representar una oportunidad para la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos fármacos seguros, efectivos y económicos, los cuales beneficiarán a toda la población guatemalteca.



### 3. ANTECEDENTES

3.1 **Nombre científico:** *Ocimum micranthum* Willd (1).

3.2 **Nombres comunes:**

Albahaca, albahaca de gallina, albahaca de monte, albahaca silvestre, albahaca cimarrona, albafoque, guie-nocuana, kajaltun, xkakaltun, hierba de toro (Huehuetenango), albaac (Petén, Maya), cacaltún (Yucatán), barsley, baisley (Belice) (1-3).

3.3 **Habitat y distribución:**

Originaria de Centroamérica. Crece silvestre en climas cálidos y terrenos fértiles, muy raras veces en lugares frescos. La especie es nativa de Guatemala, encontrada en matorrales secos o húmedos o en sembrados; a menudo en laderas rocosas o en las orillas a lo largo de corrientes (1,3).

Se localiza en los departamentos de El Progreso, Zacapa, Chiquimula, El Petén, Alta Verapaz, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, Huehuetenango; probablemente en los departamentos de las tierras bajas. Es nativa de América tropical por lo que se localiza en Florida, México, Belice a El Salvador y Panamá. Asimismo en las Islas del Caribe y en América del Sur (1-6).

3.4 **Composición química y actividad biológica:**

La hoja contiene aceite esencial, taninos y saponinas. El aceite esencial contiene metilcinamato, timol, iso-eugenol, linalcol, mirceno, nerolidol,  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -salineno,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -humuleno, trans-ocimeno, aronmadendreno, citral,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$  y  $\beta$ -elemeno, spiro- y azulensesquiterpenos (3,6,8).

Del género *Ocimum* se reporta en las hojas esteroides, terpenoides, flavonoides y compuestos fenólicos (6).

El extracto etanólico de las hojas, administrado a ratas, por intubación gástrica en dosis de 40 ml/kg mostró un efecto cronotrópico negativo y un efecto hipotensor (6).

### 3.5 Usos Etnomédicos:

*O. micranthum* y *O. basilicum* se han utilizado por la población como analgésico, antihelmíntico, antitusivo, antituberculoso, diurético, carminativo, galactagogo, rubefaciente, sudorífico, vermífugo, febrífugo, estomáquico, espasmolítico, estornutatorio, calmante y astringente. Los indígenas la utilizan para el dolor de oídos, inflamación, "aires", resfriados, catarros, tos, estreñimiento, dolor de cabeza, nervios, indigestión, diarrea, vómitos, cólicos, lombrices, y parásitos. La decocción de la planta es utilizada para matar las larvas, para el dolor de estómago, mal de ojo, reumatismo, gota, fiebre, presión alta, dolor de muelas, llagas, úlceras y granos, insomnio, como regulador menstrual y baños posparto. El olor de la planta es un buen repelente contra los mosquitos (1-7,22). El aceite de la planta inhibe el movimiento de la musculatura intestinal y uterina (16).

### 3.6 Farmacología Experimental:

El extracto etanólico de *O. micranthum* no tiene actividad diurética medida por cateterización de la vejiga de ratas, no es antihipertensiva ni aumenta la frecuencia cardíaca en ratas espontáneamente hipertensas. El extracto acuoso de hojas produce bradicardia en ratas y gatos (10-20 mg/kg). El aceite esencial tiene actividad espermaticida y relajante del músculo liso (tráquea de cobayo  $DE_{50}$  19.0 mg/l; tráquea de cerdo  $DE_{50}$  32.0 mg/l) (22).

### 3.7. Estudios realizados:

En 1941 Peckolt realizó una destilación del aceite esencial de las hojas de *O. micranthum* procedente del Brasil, reportando un rendimiento del 0.14 por ciento y una densidad a 23 °C de 0.982 (37).

En 1981 se informa sobre las propiedades y efectos de *O. micranthum* incluyendo la toxicidad. Se menciona que el aceite esencial es repelente de mosquitos (3,39). En 1989 se publica que el extracto acuoso de hojas de la planta es activo contra *S. aureus*. Los extractos acuosos y etanólicos de toda la planta y de las hojas prácticamente fueron inocuos para los peces (16).

En 1990 se publica un artículo sobre los constituyentes del aceite esencial, y en 1991 se publica un Resumen Etnobotánico de la flora medicinal usada en el Caribe y Guatemala en el cual se menciona que la decocción de las hojas de la planta se utiliza para dolores estomacales, enfermedades de la piel, dolor de oído, parásitos intestinales, flemas y tos (8,15).

En 1995 se amplía la información etnomédica, química, y farmacológica, encontrándose que el extracto etanólico de las hojas, administrado a ratas por intubación gástrica, en dosis de 40 ml/kg, induce efecto cronotrópico negativo e hipotensor (6,38).

En 1997 NAPRALERT resume los estudios realizados sobre la composición del aceite esencial y actividad biológica de los extractos de *O. micranthum* (18).

Durante 1996 a 1998 se evalúa la actividad antimicrobiana de *O. micranthum*, encontrándose que el extracto hexánico de las hojas tiene actividad contra *A. salina* a una concentración de 288 ppm (Cáceres, datos no publicados).

### 3.8 Bioensayo para evaluar citotoxicidad contra *Artemia salina*:

Los investigadores han utilizado los términos citotóxico, antitumoral y anticáncer, para describir las actividades de los compuestos aislados, de acuerdo con las siguientes definiciones. Un agente citotóxico es tóxico para las células tumorales *in vitro* y si esta toxicidad es transferible a células tumorales *in vivo*, se dice que dicho agente posee actividad antitumoral. El término anticáncer o anticanceroso se reserva a productos que son tóxicos para las células tumorales, en experimentación clínica. El aislamiento de componentes menores, biológicamente activos, a partir de un extracto bruto de planta, implica el empleo de técnicas que difieren de las convencionales en fitoquímica. Las pruebas preliminares de selección cambiaron, en el sentido de evitar la detección de sustancias de débil actividad y presencia habitual en las plantas (20).

La experimentación de las fracciones de extractos respecto a su actividad antitumoral, se realiza frecuentemente mediante el ensayo de la citotoxicidad *in vitro*, aunque este tipo de citotoxicidad no siempre representa un medio eficaz o relacionable de predicción de la actividad antitumoral *in vivo*. Pese a ello, como el bioensayo es rápido, económico y requiere tan sólo pequeñas cantidades del extracto, constituye un método popular para los ensayos iniciales. Los extractos que revelan actividad en estos sistemas son candidatos para los estudios de fraccionamiento, conducentes a la purificación de los principios activos. La realización del bioensayo a lo largo del fraccionamiento, asegura que todo el esfuerzo se orienta hacia los compuestos activos, que frecuentemente están presentes en concentraciones de menos de un miligramo por kilogramo de planta seca (20).

*A. salina* es un crustáceo cuyas larvas (nauplios) son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas por lo que puede medirse fácilmente la citotoxicidad y se utiliza para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y simple, es una prueba útil aunque no es selectiva para ninguna molécula química y su correlación con otras actividades no ha sido bien estudiada. El procedimiento fue originalmente descrito por Michael *et al.* y ha sido adaptado por Meyer *et al.* como un útil bioensayo en la investigación química y biológica de productos naturales (22).

Solís y colaboradores diseñaron un nuevo ensayo en microplacas para evaluar citotoxicidad contra *A. salina*, el cual mostró resultados comparables al método de tubo de ensayo publicado previamente, así se elimina la desventaja de tener que utilizar cantidades relativamente grandes de material (20 mg de extracto crudo y 4 mg de compuesto puro), así como el hecho de que la preparación de diluciones consumen mucho tiempo, limitando el número de muestras que puede ensayarse por experimento. Dicho ensayo requiere pequeñas cantidades del extracto y facilita el ensayo de gran número de muestras y diluciones (30,33).

Como prueba de pretamizaje resulta idónea principalmente en lo referente a la búsqueda de posibles sustancias antibióticas, citotóxicas, antimicrobianas y/o plaguicidas (28-31):

El ensayo usando *A. salina* es aplicable para detectar fototoxicidad en plantas que contienen cumarinas, ya que detecta la presencia de compuestos bioactivos en extractos, guía el fraccionamiento químico y se inicia con la caracterización biológica de un compuesto aislado (41).

El método tiene importante correlación con la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* ya que sirve como un ensayo de pre-tamizaje por su simplicidad y la facilidad de evaluar gran número de plantas, así también por la sensibilidad que demuestra la *A. salina* ante cantidades pequeñas de extractos vegetales (42).

#### 4. JUSTIFICACION

La tradición en la población guatemalteca de recurrir a las plantas medicinales con el propósito de aliviar diversas afecciones está sumamente arraigada. En nuestro país no se cuenta con estudios que respalden y validen su uso, por lo que resulta de interés evaluar a través de estudios fitoquímicos y biológicos la actividad que se les atribuye a dichas plantas, para poder brindar en esta forma un tratamiento accesible a la población mayoritaria del país.

Se espera que la caracterización de los constituyentes del aceite de *O. micranthum* y la identificación de los metabolitos secundarios de la planta brinde un aporte para el descubrimiento de nuevas moléculas de interés.

Es importante que se realice investigación que contribuya al estudio de las plantas utilizadas popularmente en Guatemala y proveer de esta manera otras formas de tratamiento menos costoso. Por otro lado el conocimiento de las propiedades de la flora facilitará una explotación racional de los recursos naturales que posee el país, ofreciendo así una alternativa a la población, no solo terapéutica, sino también productiva.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 GENERAL:

5.1.1 Contribuir al estudio fitoquímico y biológico de las plantas medicinales de uso popular en Guatemala.

### 5.2 ESPECIFICOS:

- 5.2.1 Evaluar la actividad citotóxica del aceite esencial y extractos hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, etanólico y acuoso de *O. micranthum*.
- 5.2.2 Obtener fracciones de diferente polaridad del extracto responsable de la actividad citotóxica.
- 5.2.3 Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la planta a través del tamizaje fitoquímico.
- 5.2.4 Identificar constituyentes presentes en el aceite esencial de *O. micranthum*.



## 6. HIPOTESIS

El aceite esencial o la fracción hexánica de *O. micranthum* son los responsables de la actividad citotóxica.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Muestreo:

#### 7.1.1 Universo:

Extractos con disolventes de diferente polaridad de *O. micranthum*.

#### 7.1.2 Muestra:

Aceite esencial y extracto hexánico de *O. micranthum*.

### 7.2 Recursos Humanos:

Br. Sully Cruz V., estudiante de la carrera de Química Farmacéutica.  
Asesores: Lic. Armando Cáceres y Mc. Ingeborg Berger.

### 7.3 Recursos Materiales:

#### 7.3.1 Institucionales:

Laboratorio de los Departamentos de Citohistología y Farmacología y Fisiología, Unidad de Análisis Instrumental, Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y Laboratorio FARMAYA S.A.

#### 7.3.2 Materiales y Equipo:

Destilador de aceites esenciales Ph. Eur.

Rotavapor BUCHI.

Cromatógrafo de gases PERKIN ELMER 8500.

Balanza analítica.

Bomba de aire.

Fuente de luz artificial.

Microplacas de 96 pozos, fondo plano.

Pipetas automáticas (100, 1000 ml).

Puntas amarillas y azules (Tips).

Viales de 3 ml.

Pecera pequeña, con doble división sin llegar al fondo (área cerrada y área abierta).

Espátulas pequeñas.

Beakers (250, 1000 ml).

Probeta (1000 ml).

Estereoscopio.

Computadora con programa Finney (DOS).

Cromatofolios de silicagel 60 F<sub>254</sub>.

### 7.3.3 Reactivos:

Sal marina (biocristales de mezcla marina).

Agua destilada.

Huevecillos de *A. salina*.

Reactivos para tamizaje fitoquímico.

Disolventes orgánicos: cloroformo, hexano, etanol, acetato de etilo y metanol.

## 7.4 Procedimiento:

7.4.1 Selección de la planta.

7.4.2 Revisión bibliográfica.

### 7.4.3 Obtención del material seco:

La planta se recolectó en su lugar de crecimiento silvestre bajo manejo (Chiguaxte, Samayac, Suchitepéquez). La planta se lavó, escurrió y se secó en secadores solares a la sombra.

### 7.4.4 Molienda de la planta.

7.4.5 Obtención del extracto hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, etanólico y acuoso a partir de partición líquido-líquido.

7.4.6 Obtención del aceite esencial de *O. micranthum* a través de destilación por arrastre con vapor y análisis de los constituyentes del aceite obtenido a través de cromatografía de gases.

#### 7.4.6.1 Procedimiento de la obtención del aceite: (8-14, 23-27).

Moler 100 g de materia seca vegetal. Pesar 50 g del material molido. Introducir los 50 g de material molido en un balón de destilación de 1,000 ml.

Agregar agua destilada hasta cubrir los 50 g del material.

Instalar el destilador de aceites esenciales (ver anexos esquema 2, página 56). Conectar el balón de destilación con el recipiente colector, llenar de agua y conectar el refrigerante, agregar 2 ml de hexano.

Destilar a temperatura constante, aproximadamente durante 3 horas, al final de las cuales el agua y el aceite esencial se condensan. Medir la capa superior de aceite esencial recogido en el recipiente graduado. Abrir la llave, dejar caer el agua y descartarla. Recibir la parte hexánica en un vaso de precipitar de 25 ml.

Agregar 0.5 g de sulfato de sodio anhidro, filtrar y agregar al filtrado 1 ml de hexano.

Evaporar a sequedad en una desecadora con cloruro de calcio.

Pesar el aceite obtenido, verterlo en vial color ámbar y almacenar a 4 °C.

#### 7.4.6.2 Cromatografía de gases: (8-14, 20).

Para realizar el análisis de los aceites esenciales la temperatura de operación de la columna debe encontrarse entre 150-300 °C. La fase móvil es un gas inerte, la elección del gas depende del sistema detector y comúnmente se emplean hidrógeno, nitrógeno, aire, helio y argón. La velocidad de flujo del gas es de 10-50 ml/min.

Por medio de un dispositivo de inyección, introducir 0.1-5.0 µl muestra a analizar en la parte superior de la columna. La muestra se volatiliza al entrar en contacto con la fase estacionaria. El sistema detector analiza el gas que fluye en la columna y da una señal eléctrica que es registrada gráficamente por un dispositivo adecuado.

Utilizar sustancias de referencia para contribuir a la identificación de los componentes del aceite.

#### 7.4.7 Ensayo *in vitro* para evaluar la actividad citotóxica contra *A. salina* (28-31).

El bioensayo contra *A. salina* permite determinar citotoxicidad en la larva de este crustáceo, el cual es

altamente sensible a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas. La citotoxicidad se expresa como concentración letal media ( $CL_{50}$ ), es decir la concentración que mata el 50 por ciento de los nauplios.

Preparación del agua de mar: disolver 35 g de sal marina (biocristales de mezcla marina) en un litro de agua destilada, marcar el beaker para indicar el volumen de agua, hervir por 30 minutos y completar el volumen que se evaporó según la marca. Filtrar, refrigerar hasta el momento de su uso. El agua es estable por un mes a temperatura de 6–8°C.

Cultivo de *A. salina*: se obtiene colocando en un vaso de precipitar 200 ml de agua de mar y aireándola por 30 minutos. Colocar el agua en una pecera y agregar aproximadamente 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro). Incubar por 48 horas, a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar los nauplios (larvas) pasan al área abierta de la pecera (lado con luz).

Determinación de la citotoxicidad: Pesar 0.002 g de extracto vegetal y disolverlo con 2 ml de agua de mar. Si no se disuelve en agua, agregar 40  $\mu$ l de DMSO (dimetilsulfóxido) y 1.96 ml de agua. En la microplaca agregar por triplicado:

100  $\mu$ l del extracto disuelto (concentración final 1 mg/ml).

100  $\mu$ l de agua de mar con 10 – 15 nauplios.

Control negativo:

100  $\mu$ l de agua de mar.

100  $\mu$ l de agua de mar con 10 – 15 nauplios.

Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas, contar en el estereóscopo el número de nauplios muertos. Agregar metanol a los pozos, esperar 15 minutos y contar de nuevo todos los nauplios. Si se observan nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.

Si el porcentaje es mayor del 50 por ciento, la citotoxicidad es menor de 1 mg/ml, por lo que se debe realizar la prueba nuevamente utilizando diferentes concentraciones de 1, 0.500, 0.250, 0.125, 0.0625 y 0.031 mg/ml.

#### Interpretación:

Sumar el número de camarones muertos en los tres pozos (X).

Sumar el número total de camarones en los tres pozos (Y).

Determinar el valor de  $CL_{50}$  con el programa de computadora Finney (DOS). Los extractos que no muestran toxicidad a una concentración de 1 mg/ml se consideran como no tóxicos.

#### 7.4.8 Tamizaje fitoquímico a través de ensayos macro y semimicro (20, 23-27).

Se realizan ensayos macro y semimicro en los que se evalúa la formación de precipitado y complejos coloreados. Se utilizan técnicas de cromatografía en capa fina (CCF) convencionales para la caracterización fitoquímica.

#### 7.4.8.1 Investigación de alcaloides:

Ensayos macro y semimicro: pesar 1 g de material vegetal. Agregar 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v), luego añadir 25 ml de metanol a 60°C. Filtrar con papel filtro Whatman 1 y acidificar el filtrado con ácido clorhídrico 2 N. La solución resultante dividirla en 4 tubos y evaluar de la siguiente manera:

Tubo 1: agregar 5 gotas del reactivo de Mayer's.

Tubo 2: agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff.

Tubo 3: agregar 5 gotas del reactivo de Wagner.

Tubo 4: testigo.

Usar como estándar soluciones al 1 por ciento de atropina y papaverina. Observar durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.

Cromatografía en capa fina: pesar 1 g de material vegetal seco y molido, agregar 1 ml de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v) y extraer con 5 ml de metanol. Colocar en baño maría a 60°C durante 5 minutos. Filtrar y concentrar. Aplicar en una placa de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1 por ciento en metanol (10 µl).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10), n-butanol-ácido acético-agua (4:1:1).



Detección: reactivo de Dragendorff.

#### 7.4.8.2 Investigación de flavonoides y antocianinas:

Ensayos macro y semimicro: extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 ml de etanol o metanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar. Enfriar a temperatura ambiente y triturar el residuo con 15 ml de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30 ml de metanol al 80 por ciento, filtrar y dividir en 5 tubos:

Tubo 1: agregar 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Tubo 2: agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Tubo 3: agregar 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: agregar magnesio metálico y 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: testigo.

Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

Cromatografía en capa fina: extraer 1 g de material vegetal seco pulverizado con 10 ml de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60°C. Filtrar la solución y aplicar sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Como

estándar emplear solución de flavonoides al 0.05 por ciento en metanol (10 µl).

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50).

Detección: reactivo de Productos Naturales (NP/PEG).

Fluorescencia intensa en UV-365 nm.

Solución 1: solución metanólica al 1 por ciento de difenilboriloxietilamina (NP).

Solución 2: solución etanólica al 5 por ciento de polietilenglicol 4000 (PEG).

#### 7.4.8.3 Investigación de antraquinonas:

Prueba de Bornträger: extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 ml de etanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar en baño de maría (60°C). Disolver el residuo con 30 ml de agua destilada y filtrar. Extraer con 10 ml de benceno. A la fase bencénica añadir 5 ml de solución de test de amonio y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

Prueba de Bortränger modificado: calentar 0.3 g de material vegetal pulverizado con 10 ml de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N y 1 ml de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento y calentar 10 minutos en baño de maría a 60°C. Añadir 10 gotas de ácido acético glacial para acidificar. Extraer con 10 ml de benceno. A la capa

bencénica adicionar 5 ml de solución de prueba de amonio y agitar. Observar cambios de color en fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

Cromatografía en capa fina: extraer 0.5 g de material vegetal seco pulverizado con 5 ml de metanol en baño maría (60°C) por 5 minutos. Filtrar y aplicar 10 µl en la cromatoplaca de silicagel 60 F<sub>254</sub>.

Estándar: solución al 0.1 por ciento en metanol de antraquinonas (10 µl).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13).

Acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10).

Detección: solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento.

Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV-365 nm.

Antronas y antranolas: zona amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365 nm.

#### 7.4.8.4 Investigación de cumarinas:

Ensayos macro y semimicro: medir 5 ml de extracto vegetal metanólico. Agregar 1 ml de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro. A una mancha agregar 1 gota de hidróxido de potasio 0.5N. Observar bajo luz ultravioleta de 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

Cromatografía en capa fina: A un 1 g de material vegetal adicionar 10 ml de metanol y calentar 30 minutos en baño de maría. Filtrar y evaporar hasta 1 ml. Aplicar 20  $\mu$ l en una cromatoplaca de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Utilizar como estándar canela en metanol al 1 por ciento. Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección: solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento. UV-365 nm fluorescencia azul o verde.

#### 7.4.8.5 Investigación de cardenólicos y bufadienólicos:

Presencia de lactonas insaturadas: extraer 10 g de material vegetal con 30 ml de etanol o metanol al 80 por ciento y filtrar. Colocar tres manchas del extracto (0.1, 0.2, 0.3 ml) sobre un papel filtro. Secar y agregar unas gotas del reactivo Kedde. Secar el papel filtro y observar cambio de color (mancha o anillo púrpura: positivo). Usar como estándar un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80 por ciento.

Presencia de azúcares 2-desoxigenadas: evaporar 10 ml del extracto etanólico o metanólico, eliminar los pigmentos coloreados con éter de petróleo. Secar el residuo y agregar 3 ml de reactivo Keller-Killiani. Pasar a un tubo, mezclar y resbalar 1-2 ml de ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo. Observar la formación de un anillo en la interfase (anillo púrpura: positivo).

Cromatografía en capa fina: a 1 g de material vegetal agregar 20 ml de etanol al 50 por ciento y mantener en reflujo durante 15 minutos. Dejar enfriar y filtrar, el filtrado se trata con ácido acético glacial. Extraer en 3 porciones de 15 ml de diclorometano. Los extractos se filtran sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporan. Disolver con 1 ml de diclorometano/etanol (1:1) y aplicar 30-50  $\mu$ l en la cromatoplaque de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Estándar digoxina 5 mg/2 ml de metanol (20  $\mu$ l).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10)  
acetato de etilo-metanol-agua (81:11:8), acetato de etilo-metanol-etanol-agua (81:11:4:8).

#### 7.4.8.6 Investigación de saponinas:

Prueba de espuma:

Tubo 1: 100 mg de material vegetal pulverizado y seco.

Tubo 2: 2 ml de control de saponinas (0.5 %).

Tubo 3: 2 ml de agua.

A cada tubo se le adiciona 10 ml de agua destilada. Calentar en baño de maría (60°C) durante 30 minutos. Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30 a 40 segundos. Dejar reposar los tubos durante 30 minutos, observar la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persiste en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

Cromatografía en capa fina: 2 g de material vegetal seco, se extraen con 10 ml de etanol al 70 por ciento con reflujo por 10 minutos. Evaporar a 5 ml y proceder a aplicar 25-40  $\mu$ l en una cromatoplaca de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Estándar de saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10  $\mu$ l).

Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40).

Detección: reactivo de sangre. Zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.

(Reactivo de Liebermann-Burchard: UV-365 o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides).

(Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas).

(Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillentas).

#### 7.4.8.7 Investigación de principios amargos:

Cromatografía en capa fina: calentar 1 g de material vegetal con 10 ml de metanol en baño de maría a 60°C por 10 minutos. Evaporar y filtrar a 2 ml. Aplicar en la cromatoplaca. Estándar: artemisina al 1 por ciento en metanol (20  $\mu$ l).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8) y cloroformo-metanol (95:5).

Detección: vainillina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico. Zonas rojas-violetas, cafes-rojas, azules-verdes.

(Reactivo de Liebermann-Buchard: UV-365 nm: gris, café;  
VIS: café oscuro, gris).

#### 7.4.8.8 Investigación de taninos:

Ensayos macro y semimicro: extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 ml de etanol o metanol al 80 por ciento, filtrar y evaporar a sequedad. Añadir 25 ml de agua caliente al residuo y agitar con varilla y dejar enfriar. Agregar 1 ml de solución de cloruro de sodio al 10 por ciento y filtrar. Adicionar 3 ml del filtrado a 4 tubos de ensayo:

Tubo 1: testigo.

Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1 por ciento (p/v).

Tubo 3: Agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1 por ciento de gelatina y cloruro de sodio al 10 por ciento).

Tubo 4: Agregar 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Observar la formación de precipitado y/o cambio de coloración.

Con cloruro férrico: grisáceo-negro: catecol; negro-azulado: pirogalol)

#### 7.4.8.9 Investigación de glicósidos cianogénicos:

Prueba de Guignard: colocar 2 a 5 g de material vegetal pulverizado en un erlenmeyer de 125 ml y humedecer con agua; adicionar 1 ml de cloroformo. Aparte, introducir una

tira de papel Whatman No.1 en picrato de sodio (recién preparado) y posteriormente secar. La tira de papel húmedo insertarla en el erlenmeyer que contiene el material vegetal evitando que toque las paredes y dejar a una distancia de 1 cm de la muestra. Doblar el papel y tapar el erlenmeyer con un corcho. Calentar en baño de maría a 37°C durante 3 horas o más. Observar cualquier cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo o rojo-café).

#### 7.4.8.10 Investigación de aceites volátiles:

Cromatografía en capa fina:

Método A: extraer 1 g de material vegetal pulverizado con 10 ml de diclorometano agitando por 15 minutos. Filtrar y evaporar en baño maría (60°C) a sequedad.

Disolver en 1 ml de tolueno y aplicar 20-50  $\mu$ l en cromatoplaça de silicagel 60 F<sub>254</sub>.

Método B: pesar 10-50 g (dependiendo del tipo de droga) de material vegetal y destilar con arrastre de vapor por 1 hora. Recolectar el aceite esencial en xileno. Diluir la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 o si es muy concentrada 1:10 y aplicar 5  $\mu$ l (1:10) en cromatoplaça de silicagel 60 F<sub>254</sub>.

Estándar: solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3  $\mu$ l).

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico, vanillina-ácido sulfúrico. Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible.



#### 7.4.8.11 Investigación de esteroides insaturados:

Ensayo macro y semimicro: extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 ml de etanol o metanol al 80 por ciento. Filtrar y concentrar a sequedad. Remover pigmentos vegetales con porciones de 10 ml de éter de petróleo hasta que el éter salga incoloro. Adicionar 10 ml de benceno y agitar durante unos minutos. Decantar en un tubo y secar con sulfato de sodio anhidro. Filtrar y evaporar a sequedad. Agregar 10 ml de cloroformo, secar con sulfato de sodio anhidro, filtrar y dividir el filtrado en 3 tubos:

Tubo 1: agregar 3 gotas de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado (Liebermann-Buchard).

Tubo 2: ensayo de anillo agregar ácido sulfúrico concentrado (Prueba de Salkowski).

Tubo 3: testigo.

Usar como estándar una solución de colesterol en cloroformo 0.1 por ciento. Observar cambios de colores inmediatos y/o graduales (rojo, rosado, violeta para esteroides insaturados) durante un período de una hora.

Prueba de anillo: en presencia de esteroides insaturados, formación de un anillo rojo cereza en la interfase.

## 7.5 Diseño de Investigación:

Se realizó un estudio no probabilístico a conveniencia ya que resulta de interés seleccionar la planta *O. micranthum* por las referencias de estudios anteriores, en las cuales se menciona que el extracto hexánico de las hojas presenta actividad contra *A. salina* a una concentración de 288 ppm (Cáceres, datos no publicados).

Se determinó la actividad citotóxica contra *A. salina* de los extractos con polaridad creciente: hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, etanólico, acuoso y del aceite esencial de las hojas de *O. micranthum*, las cuales fueron evaluadas por triplicado agregando 100  $\mu$ l del extracto disuelto y 100  $\mu$ l del agua de mar con 10-15 nauplios (concentración final de 1 mg/ml), utilizando como control negativo 100  $\mu$ l de agua de mar y 100  $\mu$ l de agua de mar con 10-15 nauplios.

El diseño de investigación a utilizar se llevó a cabo mediante la toma de una muestra de la planta *O. micranthum* a la cual se le aplicó 6 tratamientos por polaridad creciente utilizando 3 dosis (1, 0.5 y 0.25 mg/ml).

La citotoxicidad se expresa como concentración letal media ( $CL_{50}$ ) es decir la concentración que mata el 50 por ciento de los nauplios.

Se calculó el porcentaje de nauplios muertos de la siguiente manera:

Sumar el número de camarones muertos en los tres pozos (X)

Sumar el número total de camarones en los tres pozos (Y)

Se determinó el valor de  $CL_{50}$  con el programa de computadora Finney (DOS).

Si el porcentaje fue mayor del 50 por ciento la citotoxicidad era menor de 1 mg/ml, por lo que se realizó la prueba nuevamente utilizando concentraciones decrecientes (1.0, 0.5, 0.250, 0.125, 0.0625 y 0.031 mg/ml).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Rendimiento de la extracción:

Se utilizaron 19.60 g del extracto etanólico para obtener los diferentes extractos, empleando disolventes con polaridad creciente, mediante la técnica de partición líquido-líquido.

Tabla No. 1

Extracto	Peso en gramos	Porcentaje
Hexánico	3.0252	15.43
Clorofórmico	1.9400	9.90
Acetato de etilo	1.3343	6.81
Acuoso	7.6000	38.77

### 8.2 Rendimiento del aceite esencial :

El aceite esencial se obtuvo a partir de destilación por arrastre con vapor. Se utilizaron 620 g de la muestra original obteniendo 1.6235 g de aceite, lo que equivale a 0.2618 por ciento.

Tabla No. 2

Muestra (peso en gramos)	Aceite obtenido (peso en gramos)	Porcentaje
620.00	1.6235	0.2618

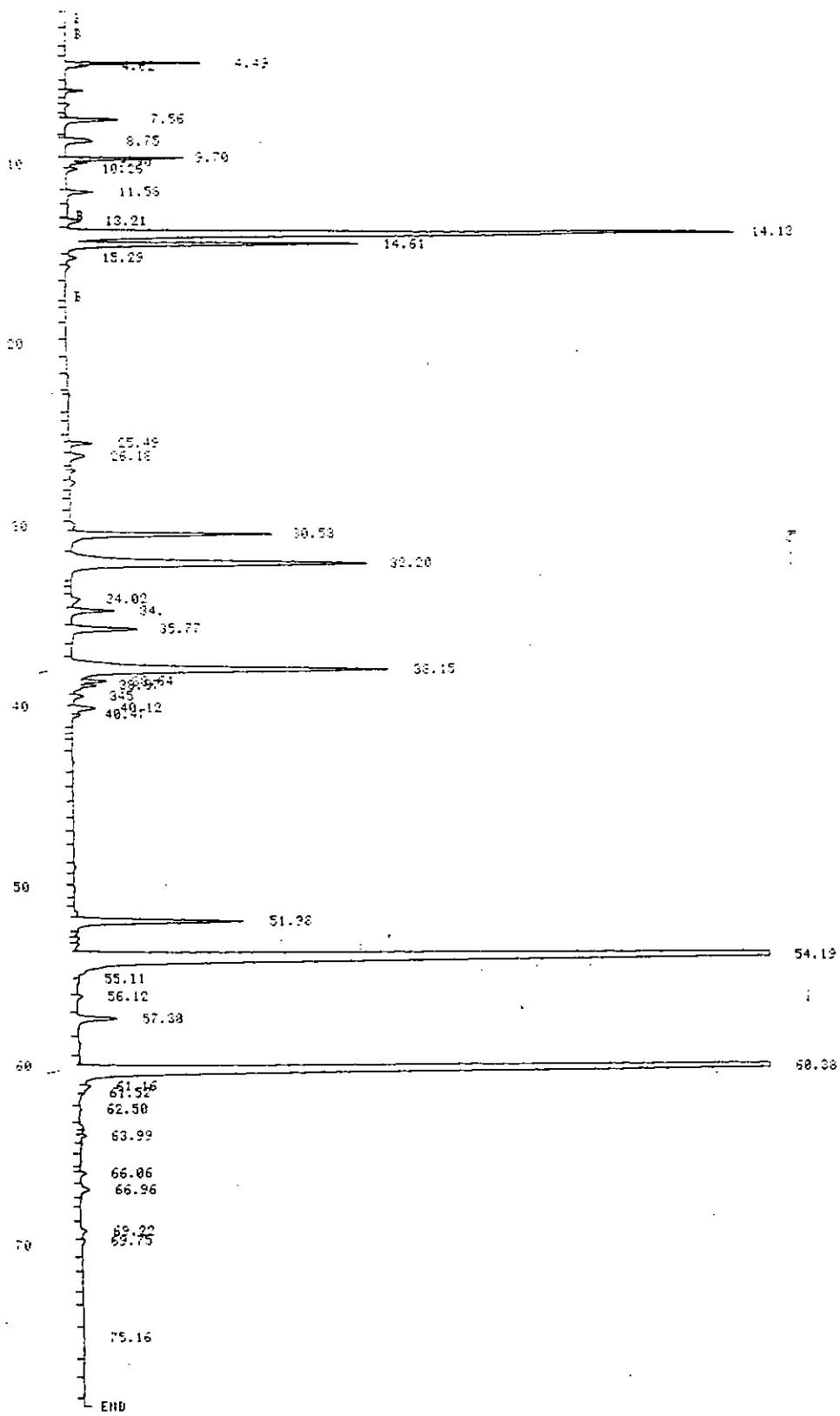
### 8.3 Constituyentes del aceite esencial de *O. micranthum*:

Se efectuó el análisis por medio de cromatografía de gases inyectando una muestra 0.22  $\mu$ l de aceite obtenido a través de destilación.

Se observaron 15 picos en el cromatograma, de los cuales 10 fue posible identificar. El compuesto mayoritario presente en el aceite esencial es el eugenol con un porcentaje del 27.6211 por ciento.

Tabla No. 3

Tiempo de Retención (min)	Compuesto	Area Porcentaje
7.56	$\alpha$ - pineno	0.6319
8.75	Canfeno	0.4597
9.70	$\beta$ - pineno	0.9880
11.58	Mirceno	0.3083
14.13	1,8 cineol	12.1061
30.53	Linalool	2.6533
32.20	$\beta$ - cariofileno	6.4555
38.15	$\alpha$ - terpineol	7.1054
54.19	Eugenol	27.6211
60.38	Iso-eugenol	26.6206



**Comparación de los constituyentes del Aceite esencial  
de *O. micranthum***

<b>Compuesto</b>	<b>Guatemala Area Porcentaje</b>	<b>Brasil (18) Area Porcentaje</b>	<b>Indiana (8) Area Porcentaje</b>
$\alpha$ - pineno	0.6319	2.97	0.24
Canfeno	0.4597	0.15	0.04
$\beta$ - pineno	0.9880	2.97	1.33
Mirceno	0.3083	1.86	0.13
1,8 cineol	12.1061	3.86	20.02
Linalool	2.6533	-----	2.71
$\beta$ - cariofileno	6.4555	22.98	19.26
$\alpha$ - terpineol	7.1054	2.88	1.10
Eugenol	27.6211	-----	20.50
Iso-eugenol	26.6206	15.93	-----
$\beta$ -elemeno	-----	23.11	4.18
Total	84.9499	76.71	69.51

#### 8.4 Ensayo de la actividad citotóxica contra *Artemia salina*:

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en el bioensayo contra *A. salina* de los diferentes extractos con polaridad creciente: hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, acuoso y del aceite esencial de *O. micranthum*.

Se observó que los extractos hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, etanólico y acuoso no fueron tóxicos a más del 50 por ciento de los nauplios, por lo que no presenta actividad citotóxica. Al realizar la prueba en el aceite esencial se observó toxicidad en más del 50 por ciento de los nauplios, por lo que la citotoxicidad es menor a 1 mg/ml, se realizó nuevamente la prueba utilizando diferentes concentraciones de 1.0, 0.500, 0.250, 0.125 mg/ml, para obtener a través del programa Finney la concentración letal media ( $CL_{50}$ ).

N: Número de animales para cada nivel de dosis.

P: Número de animales que respondieron.

D: Dosis aritmética ( $\mu\text{g/ml}$ ).

#### Extracto hexánico

Tabla No. 5

N	P	D
12	0	1000
13	1	1000
11	2	1000



**Extracto clorofórmico**

**Tabla No. 6**

<b>N</b>	<b>P</b>	<b>D</b>
10	0	1000
9	0	1000
8	1	1000

**Extracto de acetato de etilo**

**Tabla No. 7**

<b>N</b>	<b>P</b>	<b>D</b>
8	1	1000
10	0	1000
12	0	1000

**Extracto etanólico**

**Tabla No. 8**

<b>N</b>	<b>P</b>	<b>D</b>
10	0	1000
9	0	1000
14	2	1000

**Extracto acuoso**

**Tabla No. 9**

<b>N</b>	<b>P</b>	<b>D</b>
8	0	1000
8	0	1000
9	0	1000

**Aceite esencial**

**Tabla No. 10**

<b>N</b>	<b>P</b>	<b>D</b>
11	10	1000
10	10	1000
9	9	1000

**Aceite esencial**

**Tabla No. 11**

<b>N</b>	<b>P</b>	<b>D</b>
11	10	1000
10	10	1000
9	9	1000
12	9	500
9	8	500
9	7	500
10	3	250
11	5	250
12	2	250
8	0	125
10	1	125
7	0	125

#### 8.4.1 Concentración letal media ( $CL_{50}$ ):

Se obtuvo los valores de concentración letal media de los diferentes extractos de *O. micranthum* a partir de los resultados analizados en un programa de computadora Finney.

Únicamente el aceite esencial presentó actividad citotóxica contra *A. salina*, con una concentración letal media de 328.2689  $\mu\text{g/ml}$

#### Concentración letal media

Tabla No. 12

Extracto	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Hexánico	> 1000
Clorofórmico	> 1000
Acetato de etilo	> 1000
Etanólico	> 1000
Acuoso	> 1000
Aceite esencial	328.2689

#### 8.5 Análisis Estadístico:

Ji cuadrada para 7 grado(s) de libertad = 4.6108

- Concentración letal media del aceite esencial de *O. micranthum*:

$$CL_{50} = 328.2689 \mu\text{g/ml}$$

$$G = 0.1401$$

- Concentración inhibitoria 90 del aceite esencial de *O. micranthum*:

$$IC_{90} = 690.2805 \mu\text{g/ml}$$

$$G = 0.1401$$

- Concentración inhibitoria 95 del aceite esencial de *O. micranthum*:

$$IC_{95} = 852.1769 \mu\text{g/ml}$$

$$G = 0.1401$$

Límite de confianza superior = 392.5933

Límite de confianza inferior = 259.8465

### 8.6 Tamizaje Fitoquímico:

A través de los ensayos macro y semimicro y la técnica de cromatografía en capa fina se encontraron los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *O. micranthum*, así como también al ensayar con diferentes fases móviles y métodos de detección se presentan los que mostraron mejor resolución en la identificación de los compuestos:

- Antraquinonas

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13).

Detección: solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 por ciento.

- Saponinas

Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (64:50:10).

Detección: reactivo de Liebermann-Buchard UV-365 nm o VIS.

- Cardenólidos

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (81:11:8).

Detección: ácido sulfúrico al 5 por ciento UV-365 nm.

- Flavonoides

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (100:11:11:27).

Detección: reactivo de productos naturales UV-365 nm.

- Aceite esencial

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico VIS.

Tabla No. 13

Metabolitos Secundarios	Ensayo	Reacción	Resultado
Antraquinonas	Prueba de Bornträger	Coloración rojo	Positivo
	Prueba de Bornträger modificado	Coloración rojo	Positivo
	Cromatografía en capa fina	Fluorescencia rojo	Rf (cm) 0.970
Saponinas	Prueba de espuma	Presencia de espuma	Positivo
	Cromatografía en capa fina • Saponinas esteroidales • Saponinas triterpenoides	Fluorescencia	Rf (cm)
		Verde	0.726
		Violeta	0.452
Cardenólidos	Cromatografía en capa fina	Fluorescencia	Rf (cm)
		Azul	0.4
		Amarillo	0.92
	Estándar de digoxina	Azul	0.64
Flavonoides	Cromatografía en capa fina • Flavonoles  • Flavonas	Fluorescencia	Rf (cm)
		Amarillo-verde	0.94, 0.49
		Anaranjado-amarillo	0.49, 0.88
		Anaranjado	0.44

<b>Metabolitos Secundarios</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Reacción</b>	<b>Resultado</b>
<b>Aceites volátiles</b>	Cromatografía en capa fina	Fluorescencia	Rf (cm)
	Método B	Rojo-café	0.26, 0.38 0.50, 0.62 0.95
	Estándares	Fluorescencia	Rf (cm)
	• Farnesol	Rojo-café	0.30
	• Limoneno	Rojo-café	0.18,0.31
	• Eugenol	Rojo-café	0.51
	• Mezcla de aceites	Rojo-café	0.51,0.31

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

La obtención de aceite esencial de las hojas de *O. micranthum* se realizó a través de destilación por arrastre con vapor, empleando el destilador de aceites esenciales modificado por la Farmacopea europea, presentándose un rendimiento del 0.3 por ciento. De acuerdo con la literatura se menciona que se obtiene un porcentaje de 0.04-1.0 por ciento (8). El rendimiento del aceite esencial dependerá de varios factores como lo son: la parte de la planta utilizada, condiciones climáticas del lugar, cultivo, época del año y grado de humedad de la planta (9).

Al analizar los constituyentes del aceite esencial de *O. micranthum* por medio de cromatografía de gases, se identificaron los siguientes componentes mayoritarios: eugenol (26.6206 %), 1,8 cineol (12.1061 %),  $\alpha$ -terpineol (7.1054 %),  $\beta$ -cariofileno (6.4555 %) y linalool (2.6533 %). Al comparar con publicaciones anteriores se observa que el aceite obtenido de las hojas de *O. micranthum* procedente del Brasil presenta como componentes mayoritarios a los siguientes:  $\beta$ -elemeno (23.11 %),  $\beta$ -cariofileno (22.98 %), eugenol (15.93 %) (18). El aceite obtenido de las hojas de *O. micranthum* procedente de la Universidad Purdue Indiana, presenta entre los constituyentes mayoritarios: eugenol (20.50 %), 1,8 cineol (20.02 %),  $\beta$ -cariofileno (19.26 %),  $\gamma$ -elemeno (14.44 %) (8). En base a lo anterior se puede deducir que el aceite de *O. micranthum* procedente de Chiguaxte, Samayac, Suchitepéquez presenta mayor cantidad de eugenol que las especies del Brasil y de Indiana.

El ensayo *in vitro* para evaluar la actividad citotóxica contra *A. salina* determinó que la fracción responsable de dicha actividad es la hexánica, por lo que se evidenció que la actividad estaba presente en el aceite esencial, ya que los extractos obtenidos mediante disolventes con gradiente de polaridad creciente

(hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, etanólico y acuoso) no fueron tóxicos a más del 50 por ciento de los nauplios por lo que no presentan actividad citotóxica.

El aceite esencial de *O. micranthum* es el responsable de la acción citotóxica, presentando una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 328.2689 µg/ml, concentración inhibitoria 90 (IC<sub>90</sub>) de 690.2805 µg/ml, y una concentración inhibitoria 95 (IC<sub>95</sub>) de 852.1769 µg/ml.

El análisis cromatográfico en capa fina permitió caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la planta, entre los cuales se encontraron: antraquinonas, saponinas, cardenólidos, flavonoides, aceite esencial, los cuales son ampliamente conocidos por sus propiedades. Se ha reportado la composición química de *O. micranthum* el cual presenta flavonoides, compuestos fenólicos, terpenoides, saponinas, esteroides, taninos y aceite esencial (6), lo que indica que no existe variación significativa en la química de *O. micranthum* procedente de otras regiones, presentando la mayoría de los metabolitos secundarios reportados.

Las antraquinonas son el grupo más numeroso de las quinonas, poseen acciones catárticas, antifúngicas y antibacteriales. Los flavonoides poseen acción insecticida, edulcorante, espasmolítica, antimicrobiana y antifúngica. Actualmente se emplean en la conservación de grasas o jugos de frutas, debido a sus propiedades antioxidantes. Los aceites esenciales derivan del isopreno, están formados por monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos. Tienen amplia aplicación en perfumería, se usan como saborizantes, carminativos, analgésicos dentales, desinfectantes, expectorantes, sedantes y antiespasmódicos. Las saponinas constituyen un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial, poseen un efecto hemolítico, son de gran importancia por su relación con compuestos como



hormonas sexuales, cortisona, esteroides, diuréticos, vitamina D y heterósidos cardiacos (24,35).

Los heterósidos cardiacos más comunes y abundantes presentes en las plantas son los cardenólidos, los cuales tienen un efecto beneficioso sobre el miocardio ya que actúan en el funcionamiento cardíaco (20, 24, 35).

Se emplearon diferentes fases móviles y reactivos para la detección de los metabolitos secundarios, encontrándose que las fases que permiten mejores resultados en el tamizaje fitoquímico fueron las siguientes:

- Antraquinonas

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13).

Detección: solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 por ciento.

- Saponinas

Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (64:50:10).

Detección: reactivo de Liebermann-Buchard UV-365 nm o VIS.

- Cardenólidos

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (81:11:8).

Detección: ácido sulfúrico al 5 por ciento UV-365 nm.

- Flavonoides

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (100:11:11:27).

Detección: reactivo de productos naturales UV-365 nm.

- Aceite esencial

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico VIS.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 Únicamente el aceite esencial de *O. micranthum* es el responsable de la acción citotóxica contra *A. salina*, el cual presentó una concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de 328.2689  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , mientras que todas las demás fracciones evaluadas carecen de actividad.
- 10.2 Los componentes mayoritarios del aceite esencial de las hojas de *O. micranthum* son eugenol (26.6206 %), 1,8 cineol (12.1061 %),  $\alpha$ -terpineol (7.1054 %),  $\beta$ -cariofileno (6.4555 %), linalool (2.6533 %).
- 10.3 El aceite de *O. micranthum* procedente de Chiguaxte, Samayac, Suchitepéquez presenta mayor cantidad de eugenol comparado con otras especies reportadas en la literatura.
- 10.4 Los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *O. micranthum* son: antraquinonas, saponinas, cardenólidos, flavonoides, aceite esencial.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Continuar los estudios de citotoxicidad in vitro y realizar ensayos in vivo con el aceite esencial a efecto de conocer el potencial real de la planta como agente antitumoral o agente antiprotozoario.
- 11.2 Realizar el tamizaje antibacteriano con la finalidad de evaluar la actividad que presenta la planta, ya que posee metabolitos secundarios importantes como las antraquinonas y flavonoides los cuales se caracterizan por poseer acciones antifúngicas y antibacteriales.
- 11.3 Evaluar la actividad farmacológica de los extractos de la planta y el aceite esencial con el propósito de validar las propiedades medicinales que se le atribuyen popularmente.

## 12. REFERENCIAS

- 12.1 Standley, P.C. & Williams, L.O. 1970. Flora of Guatemala. Chicago, Field Museum of Natural History. v. 24, part IX, Nos. 1 y 2. pp. 268-271.
- 12.2 Alcorn, B.J. 1984. Huastec Mayan Ethnobotany. Austin, University of Texas Press. pp. 715-716.
- 12.3 Morton, J.F. 1981. Atlas of Medicinal: Plants of Middle America, Bahamas to Yucatan. Springfield. Charles C.Thomas Publisher. pp. 776-777.
- 12.4 House, P.R. *et al.* 1995. Plantas Medicinales Comunes de Honduras. Tegucigalpa, Litografía López. pp. 313.
- 12.5 Mendieta, R. & Del Amo, S. 1981. Plantas Medicinales del Estado de Yucatán. México, Compañía Editorial Continental S.A. pp. 233.
- 12.6 Gupta, M.P. 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Bogotá, Talleres de Editorial Presencia. pp. 320-321.
- 12.7 Nelson, C.H. & Sutherland, N. 1986. Plantas comunes de Honduras. Tegucigalpa, Editorial Universitaria. Tomo I. pp. 73.
- 12.8 Charles, D.J. *et al.* 1990. Essential Oil Constituents of *Ocimum micranthum* Willd. J. Agric. Food Chem. 38 (1): 120-122.
- 12.9 Simon, J.E. *et al.* 1990. Basil: A source of essential oils. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), Advances in new crops. Timber Press. Portland. OR. pp. 484-489.
- 12.10 Guenther, E. 1949. The essential oils. VIII. Robert E. Krieger Publ. Co. Malabar, Florida. pp. 399-433.
- 12.11 Heath, H.B. 1981. Source book of flavors. AVI. Westport, CT. pp. 222-223.

- 12.12 Lawrence, B.M., J.W. Hogg, S.J. Terhune & N. Pichitakul. 1972. Essential oils and their constituents. IX. The oils of *Ocimum sanctum* and *Ocimum basilicum* from Thailand. Flavor Ind Jan. 47-49.
- 12.13 Charles, D.J. & J.E. Simon. 1990. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil (*Ocimum* spp.) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:458-462.
- 12.14 Morales, M.R. *et al.* 1993. New aromatic lemon basil germplasm. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), New crops. Wiley, New York. 632-635.
- 12.15 Girón, L.M. *et al.* 1991. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. Journal of Ethnopharmacology. 34: 173-187.
- 12.16 PLANTER. 1989. Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña. San Salvador, Universitaria S.A. v. 1. 309.
- 12.17 Ronquillo, F.A. 1988. Especies Vegetales de uso actual y Potencial en alimentación y medicina de las zonas semiáridas del Nororiente de Guatemala. Guatemala, Editorial Llerena S.A. pp. 190.
- 12.18 Maia, J.G.S *et al.* 1988. Uncommon Brazilian Essential Oils of the Labiatae and Compositae. Dev Food SCI 18 : 177-188.
- 12.19 Lawless, J. 1992. The Encyclopaedia of Essential Oils. The complete guide to the Use of Aromatics in Aromatherapy, Herbalism, Health & Well- Being. Massachusetts. Element Books Inc. pp. 226.
- 12.20 Trease Evans. 1991. Farmacognosia. 13a. ed. México. Interamericana Mc Graw Hill. pp. 261-280.
- 12.21 Colegio Oficial de Farmacéuticos de Bizkaia. Asociación Española de Médicos Naturistas. 1998. Fitoterapia. Vadamecum de Prescripción. Plantas Medicinales. 3a. ed. Barcelona. Masson, S.A. pp. 30.

- 12.22 Cáceres, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala. Edit. Universitaria. pp. 67-70.
- 12.23 Wagner, H. *et al.* 1984. Plant Drug Analysis. Berlin. Springer-Verlag. Heidelberg. pp. 320.
- 12.24 Medinilla B. 1993. Manual de Laboratorio de Fitoquímica. USAC. Guatemala pp. 29.
- 12.25 Santa Cruz L. 1986. Manual: Selección Fitoquímica: Guía Práctica para los Laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. USAC. Guatemala. pp. 92.
- 12.26 Sharpin N. 1998. Screening Fitoquímico. Taller Manejo de Planta de aceites esenciales. CONCYT, USAC. Guatemala. pp. 4.
- 12.27 Berger, I. 1999. Seminario Taller Mesoamericano: Metabolitos de interés Nutricional en plantas de la región de Guatemala. USAC, CONCYT y MENUPLAM. Guatemala.
- 12.28 Anderson, J.E. *et al.* 1991. A blind comparison of simple benchtop Biossay and human tumor cell citotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*. 2: 107-111.
- 12.29 Meyer, B.N. *et al.* 1982. Brine shrimp: A convenient general biossay for active plant constituents. *Planta médica* 45: 31-34.
- 12.30 Solis, P.N. *et al.* 1993. A microwell citotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Medica* 59:250-252.
- 12.31 Michael, A. *et al.* 1956. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science* 123:464.
- 12.32 Cronquist, A. 1988. The Evolution and Clasification of Flowering Plants. 2a. ed. New York. Columbia University Press. pp. 140.
- 12.33 Folgar, S. 1998. Fraccionamiento fitoquímico bioguiado de la corteza de *Simarouba glauca*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala

- Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (tesis de graduación: Químico Farmacéutico). pp. 15.
- 12.34 Stahl, E. & W, Scheld. 1981. Pharmazeutische Biologie Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart. pp. 20.
- 12.35 Dominguez, X. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. México. Edit. Limusa. pp. 281.
- 12.36 Agustín, L. 1998. Tamizaje Fitoquímico de la Inflorescencia de *Spathiphyllum phrynifolium* (gunshnay). Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (tesis de graduación: Químico Farmacéutico). pp. 8-11.
- 12.37 Guenther, E. 1949. The Essential Oils: Individual Essential Oils of the Plant Families Rutaceae and Labiatae. III New York. D. Van Nostrand Company Inc. pp. 654.
- 12.38 Anzaldo, F.E. 1986. Ethnobotany and ethnopharmacology of some Labiate species. Acta Hort. 188: 59-69.
- 12.39 Interstate Pubs., IL. Chokechaijaroenporn, O. N. Bunyapraphatsara, and S. Kongchuensin. 1994. Mosquito repellent activities of *Ocimum* volatile oils. Phytomed. 1: 135-139.
- 12.40 Lachowicz, K.J., et al. 1996. Characteristics of essential oil from basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. J. Agric. Food Chem. 44: 877-881.
- 12.41 Ojala, T., et al. 1999. A Bioassay Using *Artemia salina* for Detecting Phototoxicity of Plant Coumarins. Planta Medica 65: 715-718.

12.42 Zani, C.L., *et al.* 1995. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine* Vol 2 (1): 47-50.



### 13. ANEXOS

#### 13.1 Clasificación Botánica de *Ocimum micranthum* (Albahaca de Monte):

Reino:	Plantae
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Sympetalae
Orden:	Tubiflorae
Familia:	Labiatae
Género:	Ocimum
Especie:	<i>Ocimum micranthum</i> Willd (32).

#### 13.2 Descripción botánica:

Familia : Labiatae o Lamiaceae (1-3)

Planta silvestre, hierba anual erecta, pequeña de 50 cm de altura o menos, ramificada, de olor agradable, tallos erectos, ramosos, cuadrados y oblongo, 2 a 7 cm de largo, pubescentes con pelos cortos, el margen es dentado. Hojas: delgadas, en delgados peciolo, ampliamente ovaladas a oblongo-ovaladas, de 2-7 cms. de largo, agudas, redondeadas o agudas en la base, aserradas o sub-enteras, casi glabras, densa y finamente glandular punteadas, pálidas en el envés, opuestas, ovadas, y frecuentemente en tonalidades moradas. Flores: cáliz de 7-8 mm de largo, verdes, puberulentos o glabros, el labio superior amplio, cóncavo, el de abajo de 4 angostos lóbulos subulados, corola blanca, cerca de 4 mm de largo, filamentos desnudos; los frutos de 1 mm de largo,

bilabiadas, blancas o lilas, semillas negras. Inflorescencia: verticilios florales numerosos, separados, formando una alargada panícula racimosa, los pedicelos de 4-7 mm de largo, en verticilos puestos en espigas de 3 a 10 cm, recurvados (1-3,38).

### 13.3 Zona de Vida:

Bosque seco subtropical (16).

### 13.4 Agricultura:

*O. micranthum* se obtiene por recolección en las regiones de crecimiento silvestre. Se recomienda iniciar actividades de manejo, domesticación y cultivo para garantizar su disponibilidad. Empíricamente se multiplica por esquejes que se enraízan en suelo cernido y se trasplantan a filas de 40 cm. Las hojas se secan a la sombra (22).

### 13.5 Usos terapéuticos populares en Centroamérica:

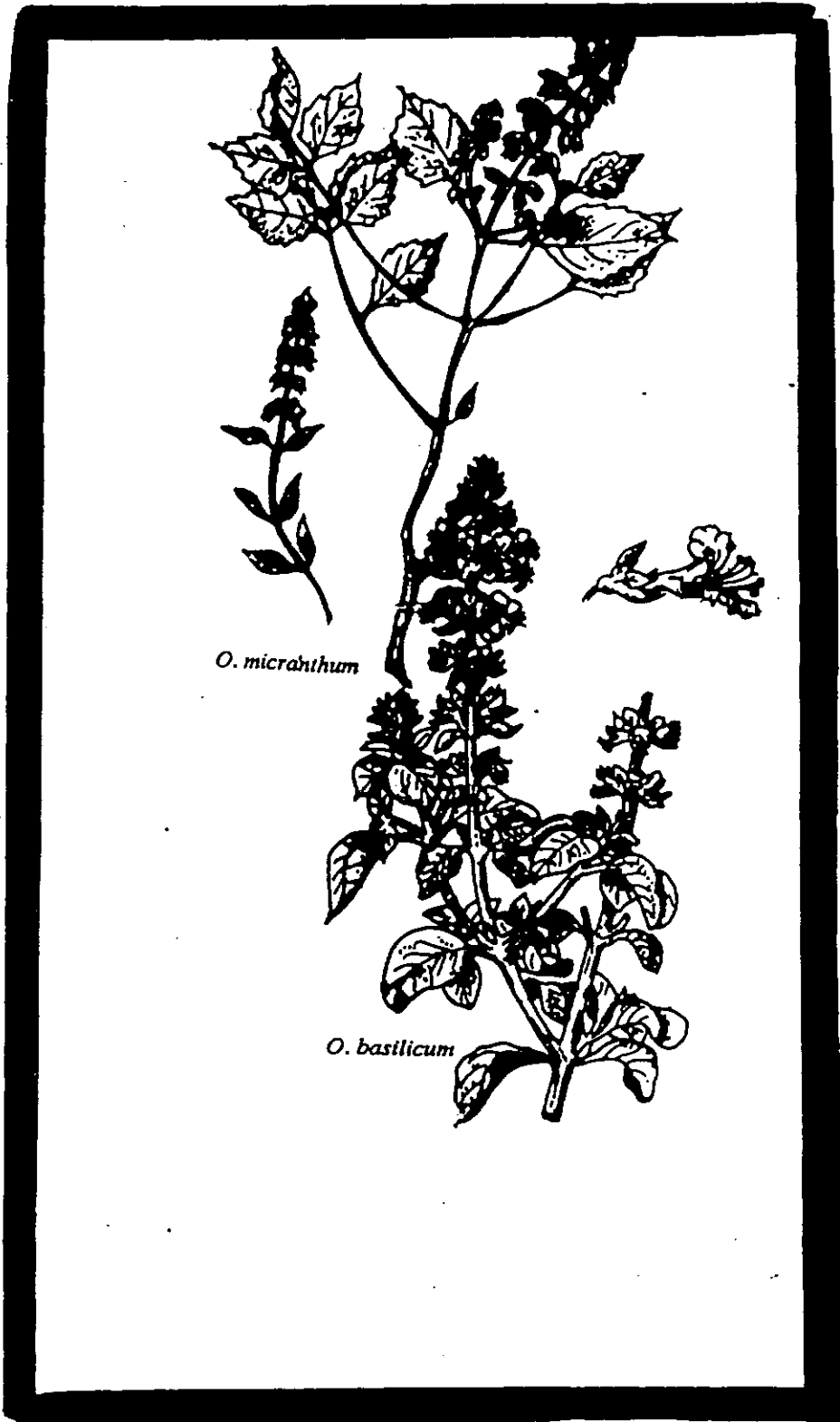
En Guatemala la hoja fresca machacada se aplica para eliminar miasis nasal del género *Lucila*, el polvo de hojas secas se aspira para congestión nasal y el jugo de hojas frescas para lavado de ojos. El cocimiento de la raíz se usa para tratar la malaria, la corteza es cianogénica y se usa en problemas digestivos (cólera). Las semillas son mucilaginosas, diuréticas y nutritivas, por vía oral se usan para tratar afecciones digestivas y tópicamente para tratar llagas y úlceras (22,38).

En El Salvador se usa para dolores de cabeza, calmante de nervios, contra dolores de oídos, para entonar el estómago y como

antituberculoso. Se prepara horchata machacando hojas y se les pone un poquito de agua, se toma una copita 3 veces al día (6).

En Honduras se usa la raíz, hoja, flores y la planta entera para el dolor de cabeza, muelas y cuerpo, se cocinan 5 hojas en un vaso de agua, se toman 3 vasos al día. Para aliviar el dolor de cabeza también se cocinan las hojas y se hacen baños en la cabeza durante dos días, la hoja de esta planta se fríe en manteca de gallina con alcanfor, se coloca la mezcla en un lienzo pequeño y se soban las sienes hacia atrás. Contra el paludismo se cocinan en agua 7 raíces y se cuele, dándose baños durante 9 días (6).

En Nicaragua, se usa para el dolor de oídos, aires, resfriados, catarros, tos, estreñimiento, dolor de cabeza, nervios, indigestión, diarrea, dolor de estómago, mal de ojo, reumatismo y calentura. Se prepara una infusión de una cucharada de la hierba picada por taza de agua hirviendo. Se toma una taza 3 veces al día (6).



*O. micranthum*

*O. basilicum*

# Destillationsapparat

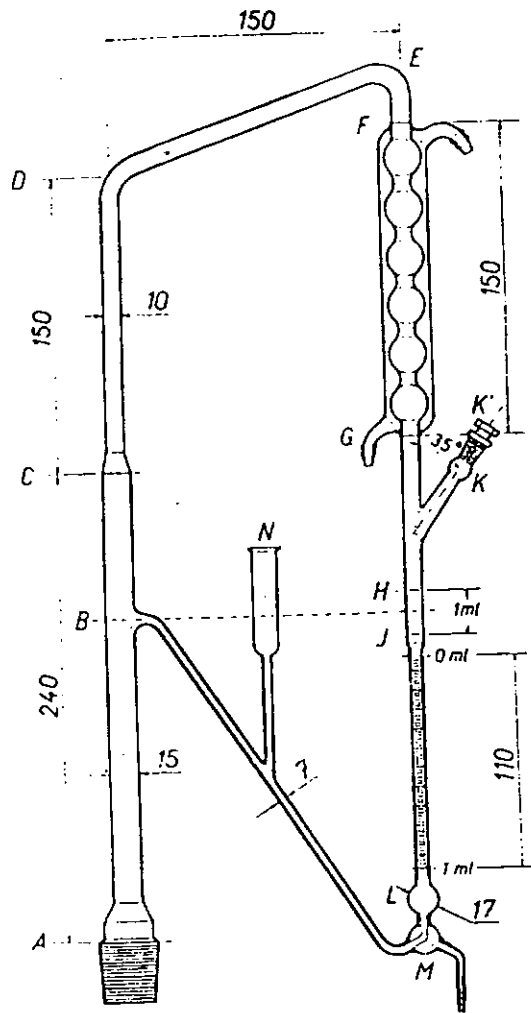

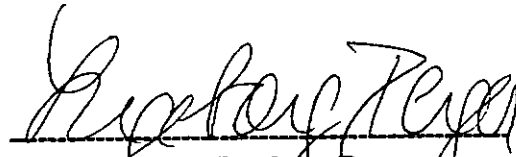

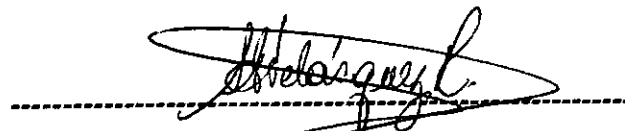


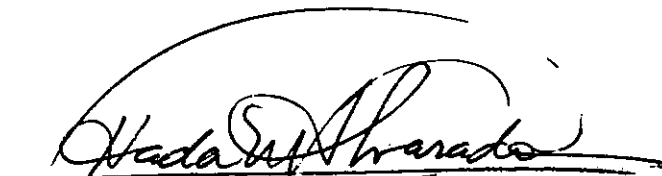
Abb. 7: Destillationsaufsatz nach Ph. Eur. 2. Ausg. (in Vorbereitung) zur volumetrischen und gravimetrischen Bestimmung des Gehalts an ätherischem Öl. Einzelheiten im Text. Die Maße sind in mm angegeben.

  
Sully Margoth Cruz Velásquez  
AUTORA

  
Mc. Ingeborg Berger  
ASESORA

  
Lic. Armando Cáceres  
CO-ASESOR

  
Licda. Smirna Velásquez Rodríguez  
DIRECTORA

  
Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta  
DECANA