

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



“Comparación de los caracteres de identidad y grado de toxicidad de dos especies del género *Ocimum* cultivadas en Guatemala”

Ilse Margoth Fernández Paz

Miguel Ángel Pontaza Tello

Edson Omar Sabán Culajay

QUÍMICOS BIÓLOGOS

Guatemala, Julio 2015

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



PRESENTADO POR

Ilse Margoth Fernández Paz

Miguel Ángel Pontaza Tello

Edson Omar Sabán Culajay

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICOS BIÓLOGOS**

Guatemala, Julio 2015

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

Decano

Licda. Elsa Julieta Salazar Menéndez de Ariza, M.A.

Secretaria

MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo

Vocal I

Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares

Vocal II

Br. Michael Javier Mó Leal

Vocal IV

Br. Blanqui Eunice Flores de León

Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Nuestro Padre Celestial, por darnos la oportunidad de culminar esta carrera.

A Nuestros Padres

Por ser guías en cada momento de nuestras vidas y por siempre brindarnos apoyo en los momentos difíciles

A La Universidad de San Carlos de Guatemala

Nuestra alma mater, por abrirnos las puertas para poder adquirir conocimientos.

A La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Por brindarnos conocimiento, y formarnos como profesionales.

A MSc. María Eugenia Paredes, MSc. Ana Margarita Paz, Licda. María Isabel Gaitán

Por sus asesorías, paciencia y compartir sus conocimientos con nosotros para que este trabajo de investigación se pudiera llevar a cabo

Al Departamento de Citohistología, al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), a la Facultad de Agronomía

Por ser parte fundamental en el desarrollo durante el proceso de investigación.

DEDICATORIAS

A Dios

Por nunca desampararnos, por bendecirnos con sabiduría y salud, por siempre darnos los medios para poder salir adelante y ser personas de bien.

A Nuestros Padres

Por ser nuestra inspiración y nuestra luz a lo largo de nuestras vidas, este logro es tanto nuestro como de ustedes.

A Nuestros Hermanos

Por ser nuestros amigos, y por siempre darnos el empuje para seguir adelante.

A Nuestras Familias

Por apoyarnos en todo momento, por nunca dejarnos solos en las etapas más difíciles.

A nuestros Amigos

Por todos los momentos compartidos, por su apoyo incondicional, y por siempre estar en las buenas y en las malas.

INDICE

I. RESUMEN	03
II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	05
III. ANTECEDENTES	06
A. Plantas medicinales	06
1. Plantas medicinales en Guatemala	08
2. Componentes de las plantas y su acción	09
B. Estudio de los medicamentos herbarios	17
C. Control de calidad de los medicamentos herbarios	18
1. Control de Calidad de la Materia Prima	19
D. Descripción botánica y morfología vegetal	24
E. Clasificación de plantas	25
1. <i>Ocimum micranthum</i> W.	26
2. <i>Ocimum basilicum</i> L.	26
F. Material vegetal a estudio	27
1. <i>Ocimum micranthum</i> W.	27
2. <i>Ocimum basilicum</i> L.	31

IV.	JUSTIFICACIÓN	37
V.	OBJETIVOS	39
VI.	HIPÓTESIS	40
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
VIII.	RESULTADOS	66
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	104
X.	CONCLUSIONES	111
XI.	RECOMENDACIONES	112
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	113

I. RESUMEN

El uso de plantas medicinales se ha visto aumentado a causa de los efectos secundarios que producen los medicamentos sintéticos, así como de su uso inadecuado que conlleva serios inconvenientes, tales como las múltiples resistencias a los antimicrobianos. En Guatemala, especialmente en el área rural, se ha tenido un extenso uso tradicional de las plantas medicinales, situación que se mantiene hasta hoy en día.

La albahaca es una de las plantas que se clasifica como aromática por la composición química de su aceite. Es muy conocida por sus propiedades medicinales y culinarias, por lo que es usada para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, respiratorias y nerviosas, así como condimento.

Tomando en cuenta que desde la antigüedad el género *Ocimum* ha provocado controversia en cuanto a sus propiedades beneficiosas, este estudio propone establecer diferencias entre dos especies de ese género cultivadas en Guatemala: *O. basilicum* L., especie domesticada (tres variedades, morada, blanca y genovese) y la especie nativa *O. micranthum* W., en su grado de toxicidad y características micro morfológicas e histológicas, para documentar características diagnósticas que permitan su correcta identificación, especialmente cuando se obtenga seca y/o fragmentada.

Se realizó la identificación y caracterización macroscópica y micromorfológica de tres variedades (morada, blanca y genovese) de la especie *Ocimum basilicum* por medio de cortes a mano alzada, disociado débil de hoja y tallo, diafanizado de hoja y determinación del índice de empalizada; también se realizó la identificación de metabolitos secundarios a través de pruebas histoquímicas y cromatografía en capa fina. Estos resultados se compararon

con los resultados registrados para *O. micranthum* por Castillo & Pérez (2011) para evaluar las diferencias. Y por último se realizaron estudios de citotoxicidad y actividad larvicida a las 3 variedades de *O. basilicum* y a *O. micranthum* y estos resultados al igual que los anteriores fueron comparados para evaluar las diferencias.

De los resultados obtenidos se pudo concluir, que aunque existen pequeñas variaciones en la distribución de los tejidos, especialmente a nivel de tejidos vasculares entre todas las variedades de albahaca estudiadas y aunque el número de tricomas es ligeramente diferente, la diferenciación microscópico entre las mismas, solo es posible si se cuentan con hojas enteras o fragmentos que contengan el nervio medio. Por otro lado si se cuenta con drogas pulverizadas es muy difícil realizar una clasificación. Se pudieron hacer algunas diferencias utilizando el valor de cenizas, ya que *O. micranthum* y *O. basilicum* var *genovese*, no presentan cenizas ácidas.

Todas las plantas estudiadas a excepción de *O. basilicum* var *genovese*, presentan los mismos metabolitos y en cantidades similares, lo cual podría indicar que no es importante diferenciarlas en su uso. Sin embargo es importante realizar estudios que garanticen la actividad farmacológica atribuida a esta especie.

II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio forma parte de las investigaciones que se realizan en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por medio del Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología en colaboración con la Facultad de Agronomía y el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales (LIPRONAT), impulsando el desarrollo de estudios en plantas medicinales de uso popular en Guatemala.

Este al igual que estudios anteriores se enfoca en la diversidad de la flora medicinal guatemalteca y en el reciente interés a nivel nacional e internacional del uso de plantas como alternativas medicinales para el tratamiento de diversas patologías. Considerando que las características de las drogas vegetales se ven alteradas por el entorno en el que las plantas se desarrollan, se desea contribuir al establecimiento de aquellos caracteres farmacobotánicos que permitan establecer la identidad de las especies *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum micranthum* W., cultivadas en Guatemala.

Los resultados contribuirán a la elaboración una monografía farmacopeica de control de calidad de las especies antes mencionadas y al establecimiento de los caracteres diagnósticos que debe cumplir el material vegetal ya sea para el consumo dela población o para la elaboración de productos fitofarmacéuticos.

III. ANTECEDENTES

A. Plantas medicinales

Todas las plantas elaboran, almacenan y metabolizan productos propios durante el crecimiento, y algunas poseen un valor medicinal aprovechable. De esta forma una planta medicinal se define como cualquier especie vegetal que contenga por lo menos en uno de sus órganos principios activos con actividad farmacológica, los cuales pueden ser utilizados con fines terapéuticos o emplearse como prototipo para obtener nuevos fármacos por medio de hemisíntesis, su función principal es entonces disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que produce la enfermedad. Éstas constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies de plantas existentes (Muñoz, 2002).

El aprovechamiento de las plantas medicinales se remonta a mucho tiempo atrás, por ejemplo los conocimientos que se tienen acerca del uso de las mismas en Egipto es a través de los papiros Hieráticos relativos a la medicina. El más valioso de estos papiros es el de Smith que data de la primera mitad del siglo XVII A.C., también llamado papiro quirúrgico. Algunas de las recetas egipcias empleaban una gran diversidad de plantas medicinales como el anís, cebolla, ajo, trigo, cebada, comino, eneldo, cilantro, lechuga, loto, pepinillo, entre otras. Los preparados eran absorbidos en forma de polvos, píldoras, supositorios, terrones y tortas, para las aplicaciones externas se preparaban ungüentos, pastas o purés (Pahlow, 1985).

Por su parte la medicina babilónica resulta conocida gracias a las tablillas, con listas de drogas que dejaron redactadas en escritura cuneiforme. Las sustancias que se empleaban eran principalmente de origen vegetal. A diferencia de las recetas del antiguo Egipto las formulas babilónicas no indican ni peso ni medidas, pero se daba gran importancia al momento en que se preparaba el remedio o se consumía. El más propicio se localizaba en la noche o en el alba, poco antes de la salida del sol. El suelo de la India proporciona un número incalculable de plantas medicinales, constituyendo hasta nuestros días un almacén para las mismas. El objetivo principal de la medicina de la antigua India era prolongar la vida

humana; y una de las partes más importantes de la ciencia médica consistía en el conocimiento de los productos medicinales. Los remedios basados en las plantas podían ser de dos tipos: unos eran purgativos y los otros eran calmantes (Volák & Stodola, 1988).

Tanto la riqueza como la variabilidad de la flora silvestre de Guatemala corresponden al de todos los países situados en el cinturón intertropical de la tierra. Es necesario reconocer que muchos de los linajes botánicos que conforman tales ecosistemas, y que hoy crecen como vegetales nativos, han tenido su origen en otras partes del mundo. Es fácil pensar que los países vecinos pudieron haber funcionado como proveedoras de simientes; más difícil resulta imaginar que tales orígenes pudieron haberse encontrado más allá de los mares pero esta segunda posibilidad no solo, no es en extremo remota, si no que de hecho se ha demostrado que desde muy lejanas tierras también pudo haber arribado un cumulo insospechado de germoplasmas (Anléu, 1998).

El valor medicinal de las plantas se debe a sus principios activos, los cuales pueden ser aislados, purificados y sintetizados. Las plantas actúan de diversas formas. Unas pueden ejercer una actividad carminativa o sedante, otras pueden actuar sobre el sistema nervioso o muscular. También son utilizadas como antibióticos para matar o inhibir el crecimiento de microorganismos (Sánchez, Leal, Fuentes & Rodríguez, 2000).

El uso de plantas medicinales se ha visto aumentado debido a los efectos secundarios que producen los medicamentos sintéticos, así como el uso inadecuado de estos, lo cual conlleva serios inconvenientes, tales como las múltiples resistencias antimicrobianas (Dreser, Wirtz, Corbett & Echániz, 2008).

El estudio y uso de plantas medicinales se vuelve cada vez más popular por lo que es necesario mantener datos actualizados que sean utilizados como herramientas eficaces para solucionar problemas de salud, así como ser fuente útil para posteriores estudios de tamizaje (Ara, 1997).

1. Plantas medicinales en Guatemala

En Guatemala, especialmente en el área rural, se ha tenido un extenso uso tradicional de las plantas medicinales, situación que se mantiene hasta hoy en día. Sin embargo, hasta 1976 los estudios científicos sobre el tema eran escasos. Fue en los años siguientes en los que se realizaron encuestas etnobotánicas para conocer la flora medicinal del país y de esta forma establecer un sistema de validación y uso de este recurso agrícola y terapéutico. La información obtenida demostró que 1400 plantas eran utilizadas para tratar diversas sintomatologías (Castañeda & Aceituno, 1981). En la década de los ochenta y principio de los noventa se establecieron los procedimientos y se realizaron las investigaciones necesarias para determinar la actividad de algunas plantas (Cáceres, 2001). Hasta 1996 se había tamizado la actividad de 1022 extractos de 243 plantas, de las cuales 19.5 % mostró tener actividad contra las bacterias patógenas ensayadas (Cáceres, 1996). En años recientes el departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica en conjunto con el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales y la facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala han contribuido con el enriquecimiento de los trabajos de investigación al brindar el apoyo necesario para realizar la correcta caracterización de especies botánicas (Polanco & Pérez, 2012; Garrido & Polanco 2012), la obtención de extractos vegetales así como aceites esenciales, estudios de toxicidad (Yoc, Soto, Gutiérrez & Arriola, 2012; Alvarado, 2011) y aplicación de bioensayo para determinar la actividad biocida de plantas de uso etnomédico frente a diferentes agentes microbianos como bacterias, hongos y protozoarios (Samol & Santizo, 2012; Orozco, Leal, Rivera & Monterroso, 2012; Quintana & Yax, 2012; Arana & Ortiz, 2012).

Actualmente se comercializan alrededor de 200 plantas medicinales, su presentación es diversa y se distribuyen en ventas ambulantes, mercados cantonales, laboratorios, droguerías, centros naturistas, supermercados y clínicas. En la región funcionan ocho laboratorios que producen alrededor de 115 productos fitofarmacéuticos, los cuales satisfacen únicamente el 5% de la demanda (Orellana, 1995).

2. Componentes de las plantas y su acción

a. Metabolitos primarios

Son los productos químicos necesarios para la vida, resultantes del metabolismo vital de todo ser vivo dentro de los cuales se encuentran los glúcidos. Comúnmente conocidos como carbohidratos, los cuales son las moléculas orgánicas más abundantes en la naturaleza. Su estructura primaria está formada de monosacáridos. Las plantas sintetizan los glúcidos por medio del pigmento llamado clorofila y de su capacidad de captación osmótica, produciendo monosacáridos a partir de la energía solar (Osuna & Pérez, 2003).

Dentro de la planta los glúcidos desempeñan distintas funciones, por ejemplo los azúcares, que son los glúcidos más comunes como la glucosa y la fructosa, son utilizados como combustible en el metabolismo celular. Mientras que la celulosa el cual es un polímero lineal de miles de glucosas, origina fibras compactas que constituyen el principal componente de la pared celular de los vegetales. Se puede considerar como la molécula orgánica más abundante en la naturaleza. Tiene una estructura lineal impenetrable al agua (Campbell, Mitchell & Reece, 2001).

Por otro lado el almidón el cual es un polímero de glucosa es considerado el principal carbohidrato de reserva ya que constituye el tejido de almacenamiento más importante de las plantas. Existe como reserva alimenticia permanente en la planta, en las semillas, los frutos, los rayos medulares y en la corteza de los troncos y raíces de las plantas perennes. Otro de los carbohidratos importantes en la reserva alimenticia de la planta es la inulina la cual es considerada como un fructooligosacárido prebiótico el cual puede ser extraído de la raíz de la planta. Se ha demostrado también que la ingesta diaria de este carbohidrato reduce el colesterol y triglicéridos (Balcázar, Martínez & González, 2003).

Por último otro de los glúcidos más importantes a mencionar son los mucilagos los cuales son un tipo de fibra soluble de naturaleza viscosa, es producido por las semillas de

algunas plantas. Tienen distintas funciones como protección de las heridas actúan en la germinación y dispersión de la semilla. Algunas raíces los utilizan para favorecer su introducción a la tierra (Campbell, et al., 2001).

Por otra parte los lípidos son sustancias naturales de característica hidrófoba y a veces anfifílica, son solubles en disolventes orgánicos apolares o poco polares, no volátiles. Son sustancias de reserva de energía, ampliamente distribuidos, tanto en estructuras vegetativas como reproductivas. Frecuentemente se pueden encontrar en semillas como reserva nutricional de la planta. Los extractos lipofílicos de origen vegetal son ricos en fitosteroles, los cuales han demostrado tener actividad sobre mecanismos relacionados con la hipertrofia prostática benigna. En la industria se utilizan para la manufacturación de medicinas y productos alimentarios (Hernández, Conde, Salomón & Gonzales, 2009). Otros metabolitos primarios que son menos utilizados por las plantas son las proteínas y los ácidos nucleicos.

b. Metabolitos secundarios

Son subproductos de rutas metabólicas normales que se dan en ciertas especies, siendo particulares dentro de un grupo taxonómico, estado de vida de la planta o los tejidos que la conforman. Su presencia depende de las condiciones externas tales como los cambios térmicos o lumínicos, las deficiencias nutricionales, la competencia por el espacio de suelo, ataques de patógenos, predadores, o presencia de otros organismos intra o interespecíficos (García, 2004). Se diferencian de los metabolitos primarios, en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas (Avalos & Pérez, 2009).

Debido a su complejidad, se hace necesaria una correcta clasificación. La rama de la ciencia que utiliza las características químicas de los llamados metabolitos secundarios para determinar su posición en una clase jerarquizada evolutiva de los seres vivos se denomina Quimiotaxonomía (Campbell, et al., 2001).

La presencia de diferentes compuestos como marcadores biosintéticos es empleada por los investigadores en sus estudios de taxonomía; pero también sirve como herramienta en la selección exitosa de familias, subfamilias y géneros para ser investigados en función de los metabolitos que se prevé producen. Es por ello que se pueden seleccionar especies bien relacionadas filogenéticamente de plantas con actividad conocida o plantas que contienen el mismo tipo de entidad química conocidas por su actividad (García, 2004).

En este caso los metabolitos secundarios son una característica fundamental de la especialización, que no solamente tienen una gran importancia ecológica ya que participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el caso del establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también se da una síntesis activa de los metabolitos secundarios cuando las plantas son expuestas a situaciones adversas funcionando de defensa en las plantas, restringiendo la invasión y/o matando directamente al microorganismo patógeno, también por su capacidad antioxidante contribuyen al mantenimiento del estado de óxido-reducción de la célula vegetal (Campbell, et al., 2001). Los constituyentes químicos de los metabolitos secundarios se agrupan según su origen biosintético común. Con pocas excepciones, pueden ser clasificados dentro de cinco grupos, de acuerdo con su base biosintética en fenilpropanos, acetogeninas, terpenoides, esteroides y alcaloides. Estos metabolitos secundarios son responsables de la actividad biológica atribuida al género-especie de planta medicinal y constituyen los marcadores fitoquímicos.

i. Fenilpropanos

Se derivan de la fenilalanina, aminoácido aromático que se forma por la vía del ácido shikímico, se caracterizan por contener al menos un grupo fenol en su estructura molecular. Son un grupo heterogéneo de productos, algunos son solubles en disolventes orgánicos, otros en agua como los glucósidos o ácidos carboxílicos y algunos son polímeros muy grandes e insolubles. Tienen diversas funciones dentro de la planta entre ellas sirven de defensa ante herbívoros y patógenos (Díaz & Salas, 2008); otros proveen soporte mecánico a la planta,

otros atraen polinizadores y algunas especies reducen el crecimiento de plantas competidoras que están cerca (García, 2004).

Los ácidos cafeico y el cinámico son representantes de este grupo, ambos con acción antimicrobiana, antiviral y antifúngica. También se puede mencionar a los fenoles simples y ácidos fenólicos, catecoles y eugenoles. La actividad antimicrobiana del catecol y del pirogalol está directamente relacionada con el número de grupos hidroxilo que tienen derivado fenólico. Algunas formas insolubles de fenilpropanoides aunados a otros compuestos como la cutina, suberina, lignina y polisacáridos, refuerzan la pared celular como respuesta de las plantas a la herida y al ataque de microorganismos patógenos (Jiménez, Porta & Rocha, 2003).

ii. Acetogeninas

También conocidas como poliacétidos, son formadas por enzimas de un precursor que comúnmente es la acetil CoA, pero también interviene la malonil CoA, entre otros precursores, comprenden más de 1,000 compuestos cuya biosíntesis es similar a la de las grasas, aunque en la cadena en la medida que se alarga alternan un grupo metilo con un carbonilo en su parte terminal (Anaya, 2003).

Entre las acetogeninas también se encuentran las quinonas que se dividen en bezoquinonas, antraquinonas (pigmentos comunes de plantas y hongos), naftaquinonas y quinonas complejas. Al parecer, las quinonas existen en todos los órganos de todos los vegetales excepto en musgos y helechos, también se han aislado de hongos y bacterias (Jiménez, et al., 2003).

Se ha descubierto que las acetogeninas presentan un amplio rango de actividad biológica, como la antiparasitaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica y antitumoral, lo cual ha dado un impulso importante a las investigaciones bioquímicas y farmacológicas de estas moléculas. Son consideradas como el grupo más potente de inhibidores del complejo I

mitocondrial. Estas moléculas muestran un efecto anti proliferativo sobre líneas celulares cancerosas, aún en aquellas con multirresistencia a las drogas, por lo que son relevantes en el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos (Schilie, Gonzales & Luna, 2009).

iii. Terpenoides

También conocidos como isoprenoides, se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos llamada isopreno y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman por ejemplo los monoterpenos, constituyen un importante grupo de hidrocarburos, alcoholes y cetonas que son los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales obtenidos de las hojas, raíces, corteza y flores de diversas plantas. Otro grupo es el de los sesquiterpenos que son sustancias amargas que se encuentran en todas partes de las plantas, en concentraciones que varían entre 0.01 y 8% del peso seco, encontrándose en mayor proporción en las hojas; son bastante solubles en cloroformo y éter etílico presentando gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado (Lock, 2002). Por su parte los diterpenos comprenden un grupo de compuestos que pueden presentarse en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas y ácidos carboxílicos, a estos últimos se les atribuye función protectora en la planta así como estimulantes del crecimiento vegetal. Por último encontramos a los triterpenoides que son de estructura relativamente compleja generalmente tetracíclicos o pentacíclicos y pueden contener grupos hidroxilo, cetona o aldehído y ácido carboxílico. Muchos se encuentran como glicósidos formando las llamadas saponinas triterpenoides. Respecto a su síntesis, los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos y las saponinastriterpenoides se originan en los plástidos (Jiménez, et al., 2003).

Los terpenoides son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios. Se ha reportado que los terpenoides actúan contra *Listeria monocytogenes*, se cree que esta actividad antimicrobiana se debe a una perturbación de la estructura de la membrana celular, por su naturaleza lipofílica (Rojas, Sánchez, Abreu, Espinosa, Correa & Pino, 2012). La capsaicina tiene actividad bactericida sobre *Helicobacter pylori*; aunque tiene un poder muy

irritante sobre la mucosa gástrica, se ha demostrado que afecta el sistema nervioso, el cardiovascular y el sistema digestivo (Castillo & Romero, 2007). El ácido betunílico es un triterpenoide que muestra actividad inhibitoria del VIH. El petalostemumol presenta actividad excelente contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, aunque tiene una menor actividad sobre bacterias gram negativas y *Candida albicans* (Díaz& Salas, 2008).

iv. Esteroides

Biogenéticamente se encuentran muy relacionados a los triterpenoides, pueden ser clasificados como esteroides se caracterizan por su alto punto de fusión diferenciándose de los triterpenoides en que estos últimos tienen un punto de fusión mayor que 200°C. Otro de los grupos más importante es el de las saponinas esteroidales que se caracterizan por sus soluciones jabonosas, propiedad que ha sido utilizada para su detección en extractos de plantas. Los glicósidos cardíacos derivan su nombre de la capacidad que tienen para ejercer una específica y fuerte acción sobre el músculo cardíaco. Por último encontramos las llamadas hormonas esteroidales, las que eran consideradas exclusivas de origen animal pero que a partir de la década de los 60 han sido aisladas en tejidos de plantas aunque en concentraciones muy pequeñas (Lock, 2002). La presencia de esteroides en una planta permite una buena acción antiinflamatoria, antiséptica, antibacteriana, antiespasmódica y antiulcerosa, pudiendo utilizarse para problemas digestivos, dolor estomacal y evitar infecciones intestinales y úlceras (Pino, Prieto, Pérez, & Molina, 2004).

v. Alcaloides

Son compuestos orgánicos nitrogenados, generalmente de origen vegetal, se derivan de los aminoácidos; son de carácter más o menos básico, responden a reacciones comunes de precipitación, su distribución es restringida pero con propiedades farmacológicas importantes ya que poseen propiedades tóxicas por su capacidad de bloquear neuro receptores, intermediarios de la transducción de la señal neuronal y canales iónicos que le sirve de protección a la planta en contra de vertebrados e insectos (Jiménez, et al., 2003).

Otra característica de los alcaloides es su capacidad de intercalarse con el ADN, restringiendo el crecimiento de microorganismos patógenos al inhibir la síntesis de proteínas, las enzimas del metabolismo de los carbohidratos e induciendo la apoptosis (Osorio, Montoya & Arango, 2006). De acuerdo a estas características se han dividido en cuatro grupos dentro de los que se encuentran los alcaloides verdaderos que son formados generalmente a partir de aminoácidos y poseen estrictamente un nitrógeno intracíclico, esto los diferencia de los protoalcaloides que son aminas simples derivadas del metabolismo de los aminoácidos pero que poseen un nitrógeno extracíclico. Por otro lado los pseudoalcaloides poseen algunas características similares a los alcaloides verdaderos, pero no son derivados de aminoácidos y por último, los alcaloides imperfectos son derivados de bases púricas pero estos no precipitan con reactivos específicos de los alcaloides (Jiménez, et al., 2003).

Las plantas con presencia de alcaloides son útiles en problemas de infección local, gárgaras, vías respiratorias altas, piel, lavado de heridas, infecciones vaginales y lavados vaginales (Galindo, M., Contreras, J., & Palacios, E., 2006). También se recomiendan para disminuir los problemas digestivos, acción antiespasmódica, y antiinflamatoria en procesos gripales (Pino, et al., 2004).

En la gama de alcaloides se encuentra la reserpina que posee valor antihipertensivo, y los alcaloides de la *Vinca roseae* utilizados en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (Laza, Rodríguez & Sardiña, 2003).

Ciertos glicoalcaloides podrían ser útiles contra la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), contra infecciones intestinales relacionadas con parásitos, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*. La berberina es un alcaloide representativo por su actividad potencialmente efectiva contra *Trypanosoma* y *Plasmodium* (Díaz & Salas, 2008)

c. Aceites esenciales

Son componentes vegetales, líquidos, volátiles, generalmente insolubles en agua y están formados por distintas sustancias responsables del aroma intenso de las plantas provocando la atracción de agentes polinizantes, que a su vez pueden actuar como elementos defensivos frente a parásitos vegetales, animales e insectos; además desempeñan un papel muy importante en la adaptación del vegetal en momentos de escasez hídrica formando parte de las sustancias de reserva, como proveedor de iones hidrógeno en los procesos redox. La mayoría son de olor agradable, sin embargo existen unos de olor no muy agradable como por ejemplo los contenidos en el ajo y la cebolla, esto se debe a que poseen compuestos azufrados que dan el olor característico (Martínez, 2003).

Son mezclas complejas que pueden incluir en su composición compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilterpenos (Heinz, 2010).

De acuerdo a la naturaleza química se clasifican respecto a sus componentes mayoritarios; los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides, aceites esenciales sesquiterpenoides y aceites esenciales fenilpropanoides. Otra clasificación que se les da es según su consistencia clasificándose en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos poseen una consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, mientras que las oleorresinas poseen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (Martínez, 2003).

De acuerdo al origen, los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. La gran mayoría de los aceites esenciales son producidos a partir de material vegetal en el que se producen por diferentes tipos de destilación o por prensado en frío en el caso de los aceites de cáscara de frutas cítricas. Los artificiales se obtienen a través de

procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes (Heinz, 2010).

Entre las propiedades medicinales de los aceites esenciales están, antiinflamatorio de las vías respiratorias altas, antiséptico en garganta, estómago y piel, así como efectivo contra el estrés. En su estado oxidado cuando se toma en exceso este componente ocasiona malestares. Algunos aceites esenciales de plantas muestran diferentes actividades desde efecto contra algunos microorganismos hasta efectos antinociceptivos. Se ha demostrado que los aceites esenciales de algunas plantas como *Chenopodium ambrosioides* presentan efecto contra, *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas vaginalis* (Monzote, et al., 2003). Otro estudio ha demostrado que el aceite esencial de *Mentha villosa* bloquea el acoplamiento excitación contracción en el musculo esquelético y causa la contracción por la liberación del ion calcio (Ca^{2+}) desde el retículo sarcoplásmico (Sousa, Linard, Acevedo, Oliveira, Cohelo & Leal, 2009).

B. Estudio de los medicamentos herbarios

La Farmacología es una ciencia descriptiva que estudia la acción y el efecto de las sustancias que interactúan con sistemas vivientes por medio de procesos químicos, en especial cuando se unen con moléculas reguladoras activando o inhibiendo procesos corporales normales (Katzung, 2005). Estas sustancias se pueden administrar para alcanzar un efecto terapéutico benéfico sobre algún proceso en el paciente, pero dichas sustancias deben ser analizadas y reguladas por lo cual la Farmacognosia se constituye como el estudio de las materias primas y de las sustancias de origen biológico con fines terapéuticos (Kuklinski, 2000). Sin embargo al estudiar las materias primas de los medicamentos herbarios es necesario apoyarse en otras ciencias por lo cual la Farmacobotánica es la rama de la Farmacología, que comprende la citología, histología, morfología, anatomía, fisiología y taxonomía vegetal; tiene como base a la Farmacología y la Botánica. Además estudia a las plantas como elementos productores de metabolitos secundarios de reconocido valor terapéutico (Nuñez, et al., 2004).

C. Control de calidad de los medicamentos herbarios

El análisis y control de la calidad de los medicamentos constituyen uno de los pasos imprescindibles que deben efectuarse previo a su utilización en un proceso de elaboración industrial o magistral para asegurar la calidad de los medicamentos, usando técnicas modernas y aplicando métodos adecuados. Su realización manifiesta la necesidad de asegurar la identidad, de garantizar su pureza (descubrir eventuales adulteraciones, falsificaciones o contaminaciones), de certificar su estado de conservación así como identificar y valorar su contenido en principios activos (Enriquez & Frati, 2005).

Las plantas medicinales hoy en día constituyen una gran fuente de materia prima, tanto para el sistema tradicional de la medicina como el de actualidad, estos materiales vegetales son empleados tanto en el mundo industrializado, como en los países en vías de desarrollo, tal es el caso de remedios caseros, medicamentos de venta libre e ingredientes para la industria farmacéutica (World Health Organization, 1999).

Estos representan una proporción sustancial en el mercado mundial de las drogas; la mayoría de las poblaciones rurales, especialmente en los países en vías de desarrollo, dependen de las hierbas medicinales como fuente primaria de atención en salud, aunque la mayoría de las hierbas medicinales no son en su estado natural aptas para la administración, distintas preparaciones que son adecuadas para su administración, se realizan de acuerdo con la farmacopea; el potencial terapéutico de los fármacos a base de plantas depende en sí de su forma; como por ejemplo si este parte del material vegetal, o de extractos simples, o principios activos aislados de los constituyentes, por lo que todos los remedios herbarios consisten en partes de plantas o extractos purificados de plantas que poseen distintos constituyentes, que a menudo trabajan juntos sinérgicamente (Bandaranayake, 2003).

En general, todos los medicamentos, ya sean sintéticos o de origen vegetal, deberán cumplir los requisitos básicos de ser seguros y eficaces (US Food and Drug Administration, 2011). Una composición definida y constante del fármaco es uno de los prerrequisitos más

importantes para cualquier tipo de experimento clínico. Es necesario saber que los fitofármacos son siempre mezclas de muchos constituyentes, y por lo tanto son muy variables y difíciles de caracterizar, por lo que el principio o principios activos en los fitofármacos no siempre se conocen. Los criterios de calidad de los medicamentos a base de plantas, se basan en una clara definición científica de la materia prima; dependiendo del tipo de preparación, propiedades sensoriales, constantes físicas, humedad, cenizas, residuos de disolventes, y adulteraciones, los mismos tienen que ser controlados para probar su identidad y pureza. La contaminación microbiológica y los materiales extraños, tales como metales pesados, residuos de plaguicidas, aflatoxinas, y la radioactividad, deben de ser detectados por medio de pruebas para la identificación de estos. Entonces para poder demostrar la constante composición de las preparaciones herbarias, tienen que aplicarse métodos analíticos apropiados; con el fin de establecer criterios pertinentes para la uniformidad del producto herbario (Bandaranayake, 2003).

1. Control de calidad de la materia prima

a. Determinación de materia extraña

Los materiales a base de plantas deben ser completamente libres de signos visibles de contaminación por mohos o insectos, así como la contaminación de otras fuentes, como los excrementos de animales. No deben poseer un olor anormal; la decoloración, el limo o signos de deterioro deben ser detectados. Rara vez es posible obtener materiales vegetales que son totalmente libres de algún tipo de materia extraña. Sin embargo, no deben ser permitidos materiales extraños que sean peligrosos o dañinos (World Health Organization, 2011).

Durante el almacenamiento, los productos deben guardarse en un lugar limpio e higiénico, de modo que no haya contaminación. Especialmente se debe tomar precauciones para evitar la formación de mohos, ya que pueden producir aflatoxinas. El examen macroscópico es convenientemente, porque se puede emplear para la determinación de la presencia de materia extraña en los materiales vegetales enteros o cortados. Sin embargo, la

microscopía es indispensable para materiales pulverizados. Tierra, piedras, arena, polvo y otros materiales inorgánicos ajenos, deben ser removidos antes de que los materiales a base de hierbas se corten o sean molidos para hacer pruebas. Para algunos materiales a base de hierbas, donde la materia extraña puede parecerse mucho al material en sí mismo, puede ser necesario tomar una muestra conjunta de material y aplicar una prueba crítica, ya sea química, física o por microscopía (US Food and Drug Administration, 2011).

b. Examen macroscópico y microscópico

Los materiales a base de plantas se clasifican de acuerdo a las características sensoriales, macroscópicas y microscópicas. Un examen para determinar estas características es el primer paso hacia el establecimiento de la identidad y el grado de pureza de dichos materiales. Para el examen macroscópico es necesario tomar como referencia muestras auténticas de la materia que se trate y muestras de la farmacopea. La inspección visual proporciona el medio más sencillo y más rápido para establecer la identidad, pureza y posiblemente calidad del producto. La identidad macroscópica de los materiales a base de hierbas se basa en la forma, tamaño, color, características de la superficie, textura, características de fractura y la apariencia al cortar la superficie. Sin embargo, ya que estas características son juzgadas subjetivamente, sustitutos o adulterantes pueden parecerse mucho al material auténtico, por lo que es a menudo necesario para corroborar los hallazgos, la microscopía y/o análisis fisicoquímicos. La inspección microscópica de los materiales a base de hierbas es indispensable para la identificación de los materiales rotos o en polvo; en ocasiones la muestra podría necesitar algún tratamiento químico para su observación. Un examen por microscopía no siempre puede proporcionar la completa identificación, aunque con frecuencia cuando se utiliza en asociación con otros métodos analíticos se puede proporcionar evidencia invaluable. La comparación con un material de referencia a menudo revela características que no se describen en los requisitos, que de otro modo podrían haber sido atribuidas a la materia extraña, en lugar de los componentes normales (World Health Organization, 2011; US Food and Drug Administration, 2011).

c. Cromatografía en capa fina

La cromatografía de capa fina es particularmente valiosa para la determinación cualitativa de pequeñas cantidades de impurezas. Es eficaz y fácil de realizar, y el equipo requerido es de bajo costo. La técnica se utiliza con frecuencia para evaluar materiales a base de hierbas y sus preparados. Los siguientes parámetros deben controlarse con el fin de obtener los resultados deseados para el análisis de cada material herbario individual: Tipo de adsorbente y de activación; método de preparación y concentración de la prueba y las soluciones de referencia; volumen de las soluciones que han de aplicarse en la placa; fase móvil y la distancia de la migración; condiciones de secado (incluyendo la temperatura) y el método de detección; para las manchas obtenidas: Número y posición aproximada (o los valores de RF si es necesario), la fluorescencia y el color (World Health Organization, 2011).

Como es eficaz y rápido de realizar, los siguientes parámetros deben determinarse sobre la base de lo publicado en monografías de la farmacopea o establecido experimentalmente.

d. Determinación de las cenizas

La ceniza que queda luego de haber sido incinerados los materiales a base de hierbas está determinada por tres diferentes métodos que miden el contenido total de cenizas, cenizas insolubles en ácido y cenizas solubles en agua. El método de cenizas totales está diseñado para medir la cantidad total de material que queda después de la ignición. Esto incluye tanto ceniza fisiológica, que se deriva del tejido de la planta en sí, como ceniza no fisiológica, que es el residuo de la materia extraña que se adhiere a la superficie de la planta (por ejemplo, arena y tierra). Las cenizas insolubles en ácido es el residuo obtenido después de hervir el contenido total de cenizas con ácido clorhídrico diluido, y encendiendo la materia insoluble restante. Esto mide la cantidad de sílice presente, sobre todo como arena y tierra de diatomeas. Las cenizas solubles en agua es la diferencia del peso entre el contenido total de

cenizas y el residuo después del tratamiento de las cenizas totales con agua (World Health Organization, 2011).

e. Determinación de materia extraíble

Este método determina la cantidad de componentes activos extraídos con disolventes a partir de una cantidad dada de material a base de hierbas. Es empleado para materiales herbarios para los que todavía no hay químicos adecuados o ensayos biológicos existentes (World Health Organization, 2011).

f. Determinación de aceites volátiles

Los aceites volátiles se caracterizan por su olor, el aspecto y la capacidad de volatilizarse a temperatura ambiente. Los compuestos aromáticos predominan en ciertos aceites volátiles. Debido a que se considera que la esencia del material a base de hierbas, está a menudo biológicamente activo, también se conocen como aceites esenciales. El término aceite volátil se prefiere debido a que es más específico y describe las propiedades físicas (World Health Organization, 1999; US Food and Drug Administration, 2011).

g. Estudios de toxicidad

Toxicidad se define como la capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un órgano. Los estudios toxicológicos ofrecen a los investigadores información sobre la dosis a partir de la cual los efectos tóxicos comienzan a aparecer. Es imprescindible establecer los efectos tóxicos de las drogas y sus principios activos y para ello se realizan estudios de toxicidad aguda, toxicidad subaguda, y toxicidad crónica sobre animales de experimentación o pruebas in vitro como la utilización de nauplios del crustáceo *Artemia salina* para evaluar la DL_{50} (dosis letal media), estas pruebas ayudan a determinar la diferencia entre la dosis terapéutica (dosis a la que se desarrolla una acción eficaz) y dosis tóxica (dosis a la que aparecen manifestaciones nocivas) (Kukliski, 2003).

La DL₅₀ es la dosis que produce una mortalidad del 50% en una población animal. La DL₅₀ solía considerarse en la bibliografía más antigua como una medida de la toxicidad aguda de las sustancias químicas; a mayor DL₅₀ menor toxicidad aguda, de una sustancia química muy tóxica (Silbergeld, 2003).

De lo anterior, se deduce la importancia de incluir pruebas de toxicidad en los estudios de plantas medicinales, previo a la validación de su uso popular, ya que de ello puede depender la dosis recomendada medicinalmente o sus usos medicinales, como por ejemplo en estudios realizados con *A. salina*, en donde se evaluó la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción, se encontró que del total de extractos evaluados, las plantas *Artemisia absinthium*, *Luffa cylindrica*, *Melia azedarach*, *Melaleuca leucadendron* y *Simarouba glauca* resultaron extremadamente tóxicos o muy tóxicos, trece resultaron moderadamente tóxicos, mientras que diecisiete extractos se clasificaron como no tóxicos al exhibir valores de DL₅₀ superiores a 1,000 µg/mL, por lo que los autores concluyeron que la mayoría de los extractos evaluados mostraron baja toxicidad, siendo esto favorable, y que los cinco extractos de mayor toxicidad no serían incluidos en estudios posteriores (Fernández, et al., 2009). En otro estudio, el extracto de la planta *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb se sometió a experimentación demostrando que la DL₅₀ para *A. salina*, *I. marginipennis* y la rata Wistar fue de 1.3, 2 mg/mL y >2,000 mg/Kg, respectivamente (Raya, et al., 2008). Así mismo en otra publicación se muestra que la actividad biológica del extracto hidroalcohólico de *Bromelia pinguin* L frente a *A. salina* es baja ya que a la concentración más alta, 1,000 µg/mL no alcanzó la DL₅₀ (Abreu, Miranda, Toledo & Castillo, 2001). En el Acta Farmacológica Bonaerense se publicó un artículo que indica la determinación de la citotoxicidad de extractos de *Erythroxylum confusum* Britt mediante el método de *A. salina*, encontrándose que el valor promedio de la CL₅₀ (concentración letal media) se comportó por debajo de 640 µg/mL, de manera que las preparaciones obtenidas de la especie en estudio se pueden considerar como no tóxicas según el método de *A. salina* (Martínez, Quintero, Márquez, González, Álvarez & Zarragoitia, 2006). Un estudio realizado en Colombia, indica que las especies con cardiotónicos (*Digitalis purpurea*) y cumarinas (*Critoniella acuminata*) presentaron letalidades moderadas sobre *A. salina* (Sanabria, López & Gualdrón, 1997).

D. Descripción botánica y morfología vegetal

La planta se encuentra constituida en su mayoría por tejidos permanentes, los cuales se encuentran formados de células que ya no sufren división y se encuentran modificadas en cuanto a su forma, engrosamiento o composición del material de las paredes (Müller, 2000). Estos tejidos permanentes pueden ser simples o complejos.

El tejido permanente simple constituye la mayor parte de la masa celular de la planta, está formado por células adultas de paredes delgadas, adosadas entre sí. Se clasifica en parénquima, colénquima y esclerénquima. Las células parenquimáticas tienen muchas funciones, se relacionan con su posición en la planta y su participación en las funciones de otros tipos celulares (Flores, 1999). La función del colénquima es ser un tejido de sostén de órganos de crecimiento primario o de órganos adultos, herbáceos, ligeramente modificados por el crecimiento secundario; su posición es usualmente periférica y con frecuencia se encuentra debajo de la epidermis; el contenido celular es semejante al de una célula parenquimática. En algunas plantas estas células también poseen taninos. Por último, el esclerénquima es un tejido de sostén de algunas plantas formado por células de paredes gruesas, secundarias, duras, elásticas y lignificadas las cuales proporcionan resistencia a los órganos de la planta frente a tensiones, pesos y presiones. Se pueden clasificar en esclereidas y fibras; las primeras son células muy cortas, mientras que las segundas son más alargadas, en ambas categorías se encuentran grandes diferencias de tamaño (Flores, 1999).

A los tejidos permanentes complejos también se les conoce como el conjunto de tejidos permanentes sencillos mixtos. Se encuentra dividido en tejido dérmico y el tejido vascular. El tejido dérmico forma la capa protectora de la planta, está conformado por la epidermis y la peridermis el primer tejido cubre a la planta durante el crecimiento primario y se encuentra en contacto directo con el ambiente, consta de una sola capa de células, en tanto que el segundo tejido reemplaza a los tejidos externos del tallo y raíces durante el crecimiento secundario (Müller, 2000).

Por su parte el tejido vascular el cual comprende todo el sistema de transporte de la planta se encuentra conformado por el xilema y el floema, el primero es un tejido complejo compuesto de elementos traqueales, fibras y parénquima, en tanto que el segundo constituye un sistema de transporte intercelular a larga distancia, moviliza los carbohidratos producidos en la fotosíntesis, moléculas mensajeras, así como otras sustancias, hacia las zonas de crecimiento y diferenciación (Flores, 1999).

E. Clasificación de las plantas

A lo largo del tiempo, los conocimientos de sistemática de las plantas han ido creciendo, y junto con ellos la necesidad de modificar la circunscripción de taxones existentes, además de agregar algunos nuevos con el fin de reflejar los nuevos conocimientos de diversidad y filogenia. Cabe destacar que luego de Darwin muchos de los sistemas de clasificación intentaron reflejar la filogenia de las plantas, con las limitaciones y algunos conocimientos de la época. A continuación se hará una breve descripción de dos sistemas en los cuales se ha apoyará esta investigación.

El sistema de clasificación de Cronquist fue publicado por Arthur Cronquist en 1981 en sus textos *An integrated System of Classification of Flowering Plants*, y *The Evolution and Classification of Flowering Plants* publicado en 1988 y se centra en las angiospermas (plantas con flor). Este sistema llama a las angiospermas Magnoliophyta, que divide al taxón en dos extensas clases: Liliopsida y Magnoliopsida (Cronquist, 1981).

El sistema de clasificación de angiospermas de APG fue publicado por primera vez por el grupo de botánicos Angiosperm Phylogeny Group (APG) en 1998, una segunda vez en el 2003 y por tercera vez como APG III en el 2009. Esta clasificación fue creada por la necesidad de ver los avances en la filogenia derivados de los análisis moleculares de ADN reflejados en un sistema de clasificación de plantas con flores (Angiosperm Phylogeny Group (APG), 2008).

1. *Ocimum micranthum* W.

a. Descripción taxonómica según sistema de Cronquist

Plantae > Viridaeplantae > Tracheophyta > Euphyllophytina > Spermatophyta > Magnoliophyta > Magnoliopsida > Asteridae > Lamiids > Lamiales > Lamiaceae > Nepetoideae > Ocimeae > Ocimum > micranthum > Ocimum micranthum.

b. Descripción taxonómica según sistema APG III

Eukaryota > Viridiplantae > Streptophyta > Embryophyta > Tracheophyta > Spermatophyta > Magnoliophyta > eudicotyledons > core eudicotyledons > asterids > lamiids > Lamiales > Lamiaceae > Nepetoideae > Ocimeae > Ocimum micranthum

2. *Ocimum basilicum* L.

a. Descripción taxonómica según sistema de Cronquist

Plantae > Viridaeplantae > Tracheophyta > Euphyllophytina > Spermatophyta > Magnoliophyta > Magnoliopsida > Asteridae > Lamiids > Lamiales > Lamiaceae > Nepetoideae > Ocimeae > Ocimum > micranthum > Ocimum basilicum

b. Descripción taxonómica según sistema APG III

Eukaryota > Viridiplantae > Streptophyta > Embryophyta > Tracheophyta > Spermatophyta > Magnoliophyta > eudicotyledons > core eudicotyledons > asterids > lamiids > Lamiales > Lamiaceae > Nepetoideae > Ocimeae > Ocimum basilicum

Respecto a la clasificación del género *Ocimum* según el sistema de clasificación APGIII, los cambios se presentan en los productores principales del alcaloide 1-

benzyltetrahydroisoquinolina, Magnoliales y Laurales con un taxón totalmente independiente que ha separado las monocotiledóneas de las eucotiledóneas. Por otra parte, por medio de estudios de ADN se sugiere que el metabolito secundario iridoide es un componente mayoritario de la línea de *asterids*, siendo la subclase de la familia de Lamiales que incluye al género *Ocimum*, los cuales son productores del metabolito secundario mencionado anteriormente (Whaterman, 2007).

F. Material vegetal de estudio

1. *Ocimum micranthum* W.

a. Sinonimias

Ocimum americanum L., *O. canum* Sims, *O. campechianum* Mill, *O. guatemalense* Gandoger (Cáceres, 1996).

b. Nombres vulgares

Albaca, Albacar, Albacon, Albahaca, Albahaca Cimarrona, Albahaca de Hoja Ancha, Albahaca de Tierra, Albahaca de Gallina, Albahaca de Monte, Albahaca Silvestre, Chiripitillo, Albajoque, Barsley, Baisley, Guinocuana, X-cacaltun, Albajak, Xkakaltuum, Kakaltum (Cáceres, 1996).

c. Descripción botánica

Es una hierba anual o perenne, de 10-60cm de alto, erecta, ramificada, tallos puberulentos o glabros de sección cuadrangular, sus hojas son delgadas, ampliamente ovaladas, 2-7 cm de largo, agudas, redondeadas a la base, aserradas, casi glabras, densa y finamente glandular, pálidas al envés. Inflorescencia con numerosos verticilos florales, separados, en alargada panícula racimosas, pedicelos 4-7 mm de largo, recurvados; el cáliz

mide alrededor de 7-8 mm de largo, son verdes, puberulentos o glabros, y la corola es blanca (Standley & Williams, 1970).

La actividad tónica se atribuye al alcanfor que tiene propiedad cardíaca y es un analéptico respiratorio. La actividad insecticida se explica en parte por la presencia del juvecimiento que tienen una actividad que mimifica una potente hormona juvenil que inhibe en forma dosis-dependientemente la metamorfosis de *Oncopeltus fasciatus*. El eugenol es un aceite, con un olor a especie (clavo), presenta actividad antibacteriana y anticándida, se disuelve 1:2 en alcohol al 70%, ampliamente usado como aroma, saborizante y especialmente como analgésico y antiséptico en odontología (Cáceres, 1996).

d. Distribución y hábitat

Es nativa de la América tropical. Es de crecimiento silvestre en regiones de clima cálido y húmedo, en Guatemala se ha descrito particularmente en Alta Verapaz, Izabal, Petén y Suchitepéquez. Se obtiene por recolección en las regiones de crecimiento silvestre. Se han iniciado actividades de domesticación y cultivo para garantizar su disponibilidad, se cultiva en clima templado con suelo rico de fertilidad media, ligera, silíceo-arcillosa, franca y permeable la multiplicación se hace por semilla o esqueje. Es muy susceptible de infecciones fúngicas. Las hojas se colectan en el momento de máxima floración y se secan a la sombra (Cáceres, 2009).

Es una especie silvestre y se utiliza en forma similar a *O. basilicum* que es cultivada, de acuerdo al acceso que la población tenga de cada una de ellas. Se le atribuye propiedad antiséptica, aromática, calmante, carminativa, colagoga, diurética, emenagoga, espasmolítica, estomáquica, febrífuga, galactogoga, rubefaciente, sudorífica y vermífuga (Cáceres, 1996).

e. Usos etnomédicos o tradicionales

La infusión de las hojas suele utilizarse en trastornos de tipo gastrointestinal dentro de los que se encuentran: la inflamación intestinal, úlceras, gastritis, fiebre intestinal, disentería, empacho, vómito, inflamación y dolor de estómago, como vermífugo y antiemético. Tópicamente se usa en baños y cataplasmas para algunos trastornos de la piel, ya sea en infecciones cutáneas, como secante de llagas, granos o enfermedades del cuero cabelludo. De igual forma se hace referencia de su utilidad como analgésico en el dolor de oídos, de cabeza, de huesos, y dolores reumáticos (Cáceres, 2009).

La indicación terapéutica no se encuentra en ninguna farmacopea, pero por su uso tradicional como condimento y su falta de toxicidad demostrada se considera de uso seguro. Como digestiva y analgésica, está indicado su uso por vía oral en el tratamiento de inapetencia, digestión lenta, meteorismo, tos convulsiva y jaqueca. La aplicación tópica se usa en el tratamiento de heridas, eczema y como vermífugo (Cáceres, 2009).

f. Composición química

Su composición química indica que contiene triterpenos y aceite esencial, el cual está presente en toda la planta, contiene más de 20 compuestos, aunque hay gran variabilidad por sus quemitipos, los componentes mayoritarios son: en las hojas, eugenol (20-40%), metilcinamato (34-56%), 1,8-cineol (20-62%), beta-cariofileno (19-78%), gamma-elemeno (16%); en las flores, gamma-elemeno (41%), beta-cariofileno (19%), beta-selineno; en los tallos, gamma-elemeno (32%), beta-cariofileno (20%), beta-salineno (11%) y 1,8-cineol (10%), y sus hojas contienen alcaloides (Cáceres, 1996).

En un aceite esencial de *O. micranthum* originaria del Perú se encontró que el 1,8-cineol era el compuesto principal, junto con el eugenol. El contenido de 1,8-cineol fue más alto en el aceite de las hojas (20%) que en el de la flor (7,0%) y el del tallo (10,9%) (Charles, Simon & Wood, 1990).

g. Descripción microscópica

Los caracteres microscópicos descriptivos son propios de las familia Lamiaceae en la cual se puede encontrar en las hojas células grandes dispuestas en empalizada por debajo de la epidermis superior, estomas diacíticos se encuentran en la parte inferior, además se producen abundantes tricomas glandulares, tricomas uniseriados tipo tector de dos o más células, tricomas cónicos pluricelulares y en mayor cantidad tricomas papilares unicelulares. La epidermis del tallo en un corte transversal está compuesta de remanentes de floema y xilema primario, así como el floema secundario, con tricomas glandulares y dispersos, de forma similar a los de la hoja. Tiene un cáliz florífero de 24 mm; cáliz fructífero de 6.5-10 mm, formando un ala erecta marcadamente cóncava adaxialmente, corola de 3-4 mm, blanco-purpurea. Estambres con los filamentos adaxiales glabros, sin apéndices (Albuquerque & Laise, 1998).

h. Farmacología experimental

Respecto a estudios realizados de farmacología experimental, podemos mencionar que el extracto metanólico de *O. micranthum* presento un amplio espectro de actividad, siendo capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. Además el extracto de las raíces presentó una considerable cantidad de metabolitos con actividad captadora de radicales libres lo que le confiere una buena actividad antioxidante, así como inhibición de la β glucosidasa que ha sido asociada a una actividad anti VIH (Sánchez-Medina, García, May & Peña, 2001). El extracto acuoso de hojas produce bradicardia en ratas y gatos (10-20 mg/Kg). El aceite esencial es espermaticida y relajante del músculo liso (tráquea de cobayo, DE₅₀ 19 mg/L; tráquea de cerdo DE₅₀ 32 mg/L) (Cáceres, 1996). Ha demostrado un efecto analgésico sin participación del sistema opiode, pero si del óxido nítrico en modelos de ratones (Lino, et al., 2005).

i. Datos de seguridad

Según estudios toxicológicos, el jugo de la hoja es ligeramente narcótico, algunos de sus compuestos como safrol y estragol tiene potencial procarcinogénico. El eugenol tiene una DL₅₀ de 2,680 mg/Kg en ratas por vía oral y 3,000 mg/Kg en ratones (Lagarto, Tillán, Bueno, Chávez, Guerra & Vega, 2005).

2. *Ocimum basilicum* L.

a. Sinonimias

Ocimum mentafolium L. (Cáceres, 1996).

b. Nombres vulgares

Albahaca de Castilla, Cacaltun, Albahaca, Alhabega, Alfábega, Basílico, Hierba Real, Hierba de los Reyes, Alfavaca, Albahaca de Limón, Albahaca Francesa, Albahaca Mondonguera, Albahaca Moruna, Albahaquita, Albahaca blanca (Cambie & Ash, 1994).

c. Descripción botánica

Es una hierba anual de 30-100 cm de alto, de base leñosa, aromática. Tallos erectos ascendentes, de sección cuadrangular, glabros o puberulentos con pelos concentrados sobre dos caras opuestas del tallo, algunas veces con pelos relativamente más largos en los nudos, de color verde o purpúreos. Ramas robustas o delgadas, abiertas o cerradas, subleñosas o no, glabras o pelosas, ascendentes, que terminan algunas veces a la misma altura. Hojas de 1,4-5,8 X 0,9-3,0 cm, ovadas o elípticas, aserradas en la mitad superior, agudas o acuminadas, punteado-glandulosas, la mayoría con pelos retrorsos sobre los bordes de coloración verde o morada; peciolo de 0,2-1,5 cm, canaliculados o no, ligeramente pelosos. Inflorescencias de

6-30 cm de longitud reunidas en una espiga en la punta de las ramas, de color blanco tendiendo a púrpura. Sus frutos son como pequeñas nueces (Ryding, 1994).

d. Distribución y hábitat

Esta planta es nativa de Asia tropical, en Guatemala se cultiva en huertos familiares en todo el país (Cáceres, 1996). Existen múltiples variedades de la especie. La multiplicación se hace por semilla o esqueje y se localiza en áreas con climas cálido, semicálido, semiseco, seco, muy seco y templado, entre el nivel del mar y los 2300 m, y está asociada a bosques tropicales caducifolios, matorral xerófilo, pastizal, bosques de encino y de pino (Albuquerque & Laise, 1998).

e. Usos etnomédicos o tradicionales

Es conocida desde la antigüedad, sus virtudes han sido motivo de controversia, unos la defienden y otros desconfían de ella. Ampliamente usada con fines culinarios, medicinales y aromáticos. La infusión es utilizada oralmente para tratar afecciones digestivas, respiratorias y nerviosas, otalgia y cefalea, halitosis, vértigo y reumatismo. Tópicamente se usa en baño y cataplasma para tratar afecciones dérmicas, tumores y parásitos; la tintura se usa para hacer fricciones en gota y reumatismo; la hoja fresca machacada se aplica para eliminar miasis nasal; el polvo seco se aspira para congestión nasal y el jugo de hojas frescas para lavado de ojos. Se le atribuye propiedad antiséptica, aromática, astringente, calmante, carminativa, colagoga, diurética, emenagoga, espasmolítica, estomáquica, febrífuga, galactogoga, sudorífica y vermífuga. Las hojas frescas y secas se usan para sazonar comidas. Es repelente para larvas de insectos y mosquitos; tiene uso aromático, ornamental y cosmético (Cáceres, 1996; Sánchez, et al., 2000).

f. Composición química

El aceite esencial es extraído por destilación de las partes aéreas de la planta, es un líquido de color ligeramente amarillento, con un intenso olor alcanforado característico que se usa en la industria de perfumes alimentos y medicamentos (Marotti, Piccaglia & Giovanelli, 1996). El rendimiento de aceite esencial varía entre 0.15 - 1.59% y su composición química depende del factor estacional, la localidad y las características genéticas (Khatri, Nasir, Saleem & Noor, 1995). Keita y colaboradores reportaron que el aceite de *O. basilicum* contenía: linalool (69%), eugenol (10%), (E) α bergamotene (3%) y timol (2%) (Keita, Vincent, Schmit & Belangera, 2000). En un estudio anterior, metil chavicol (87,3%), linalool (5,4%), metil eugenol (1,5%), β -cariofileno (2,4%), α -pineno (1,0%), β -pineno (0,8%), limoneno (0,5%) y canfeno (0,2%) fueron reportados como los principales componentes del aceite esencial (Khatri, et al., 1995). Por su parte Marotti y Lachowicz informaron de la presencia de linalol, metil chavicol y eugenol como componentes principales de *O. basilicum* (Marotti, et al., 1996; Lachowicz, Jones, Briggs, Bienvenu, Palmer, Tin & Hunter, 1996).

g. Descripción microscópica

Por lo general la planta se comercializa en estado seco, con piezas de hojas rotas y dispersas, tallos delgados y unas pocas flores y frutos de color marrón. Los caracteres microscópicos reportados en algunos estudios son: en las hojas, se encuentran células grandes onduladas a ambos lados de la epidermis, estomas diacíticos pueden encontrarse en ambas superficies, pero son más numerosos en la epidermis inferior. En la epidermis superior se encuentran grandes células en empalizada. Se producen abundantes tricomas glandulares de color marrón amarillento y son de dos tipos: los de mayor tamaño son sésiles o tienen un tallo corto, unicelulares y se encuentran en depresiones en la epidermis, cada uno tiene una cabeza glandular compuesta por cuatro células que irradian con una cutícula común para formar una forma esférica. Los de segundo tipo son más pequeños con una cabeza redondeada u ovoide compuesta de una o dos células y con un tallo unicelular. Algunos tricomas uniseriados, de

forma cónica, compuestos de dos o tres y en ocasiones hasta seis células, con paredes ligeramente engrosadas y verrugosas, pueden encontrarse a lo largo de las venas en la epidermis inferior. La epidermis del tallo en un corte transversal está compuesta de paredes delgadas, con células alargadas dispersas longitudinalmente, con estomas ocasionales, tricomas glandulares y dispersos, de forma similar a los de la hoja. El cáliz tiene abundantes tricomas, en particular en la epidermis externa y en los lóbulos, que son similares a los de la hoja, pero las paredes son lisas o tienen estrías longitudinales débiles, y generalmente no son verrugosas. Los granos de polen son bastante grandes, esféricos con seis poros y surcos; áreas redondeadas elevadas se producen en la exina que tienen una apariencia muy característica (Albuquerque & Laise, 1998; Jackson & Snowdon, 1990).

h. Farmacología experimental

Diversos estudios farmacológicos revelan que el extracto acuoso obtenido de *Ocimum basilicum*, tienen actividad antibacteriana, inclusive en bacterias multirresistentes como *Staphylococcus* y *Pseudomonas* (Acosta, et al., 2003). Además efectos antifúngicos en aceites esenciales (Oxenham, Svoboda & Walters, 2005.), anti-*Giardia*, antivirales (Chiang, Cheng, Chiang & Linn, 2005) y antioxidantes (Politeo, Jukic & Milos, 2007; Dorman, Peltoketo, Hiltunen, & Tikkanen, 2003). La planta también ha mostrado actividad antiinflamatoria (Selvakkumar, Balakrishnan & Lakshmi, 2007), anticancerígena (Beric, Biljana, Stanojevic & Vukcevic, 2008), antitrombótica (Singh, 1999) y disminución del índice de ulceración gástrica en ratas con úlceras inducidas por aspirina (Sánchez, et al., 2000).

La actividad biológica se atribuye al aceite esencial que le confiere propiedad aromática, antiséptica, aperitiva, antioxidante, digestiva, carminativa, espasmolítica, insecticida y sedante. La actividad tónica se atribuye al alcanfor con propiedad cardíaca y es un analéptico respiratorio. La actividad antioxidante se atribuye a eugenol (Cáceres 1996). Como se menciona anteriormente el linalol es frecuente en los aceites esenciales, tiene actividad contra *C. albicans* y citotóxica, se usa en la industria de licores y perfumes. El

estragol es soluble en alcohol y cloroformo, usado en perfumes y saborizantes de bebidas y alimentos. El eugenol es un aceite, olor a especie (clavo), con actividad antibacteriana y anticáncida, se disuelve 1:2 en alcohol al 70%, ampliamente usado como aroma, saborizante y especialmente como analgésico y antiséptico en odontología (Muñoz, 2002).

En una investigación reciente realizada por la Universidad Industrial de Santander donde compararon los metabolitos secundarios volátiles de dos especies de *Ocimum* sp. (Labiatae) en función del método de su extracción y el estudio de las actividades antioxidante, citotóxica y antifúngica, se encontró que las dos especies se caracterizan por su alto contenido de fenilpropanoides en cantidades relativamente superiores al 50% representados por sus compuestos mayoritarios cinamato de metilo y estragol, y por la presencia de monoterpenos oxigenados principalmente por el linalool y eucaliptol; respecto a la toxicidad, el aceite esencial de *Ocimum* sp. (sigueme blanco) presentó un valor de DL₅₀ de 20.41 µg/mL después de 24 horas de exposición, lo cual lo clasifica como un aceite de toxicidad baja; y la actividad antifúngica de los aceites esenciales no es comparable con la actividad de la sustancia de referencia (itraconazol) (Reyes, & Patiño, 2007).

i. Datos de seguridad

Respecto a la toxicología, se han realizado estudios de toxicidad aguda en ratón, en donde la DL₅₀ del polvo de planta en rata fue superior a 6 g/kg (Akhtar & Munir, 1989). En otro estudio La DL₅₀ del extracto metanólico (80%) de partes aéreas frescas por vía oral a ratón fue mayor de 2 g/kg (García, Vizoso, Ramos & Piloto, 2000). De igual modo se reporta que el aceite esencial de albahaca no es tóxico (Hussain, Poveda, Pezzuto, Sojearto & Kinghorn, 1990), aunque se ha demostrado que el estragol, uno de los mayores componentes en algunas variedades, produce tumores en ratón ya que administrado por vía oral, se metaboliza parcialmente en 1'-hidroxi-estragol, considerado carcinogénico. En el humano, solo una pequeña parte se hidroliza por lo que no se han establecido límites para su ingesta. Debido al posible riesgo derivado de su contenido en estragol, se desaconseja su uso

terapéutico durante el embarazo, la lactancia, en niños y en cualquier caso, se recomienda prescribir durante breves períodos de tiempo (Canigual, et al., 2002)

IV. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala se han llevado a cabo muchos esfuerzos para lograr la sistematización del conocimiento, uso y producción de las plantas medicinales. Para contribuir en ello el Departamento de Citohistología cuenta con una base de datos sobre las plantas medicinales que están siendo investigadas para validar su uso popular, una parte importante de este esfuerzo consiste en establecer las características de identidad que permitan sentar las bases para un adecuado control de calidad de las drogas vegetales frescas y secas.

La albahaca es una especie muy conocida, debido a sus propiedades medicinales y culinarias, y es utilizada para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, respiratorias y nerviosas, así como condimento. En Guatemala dos especies son utilizadas, *O. basilicum* (Albahaca morada) y *O. micranthum* (Albahaca de monte); la primera es nativa de Asia tropical, es naturalizada y crece en varias regiones del país, principalmente en huertos familiares, por su parte *O. micranthum* es nativa de América tropical, que crece de manera silvestre en regiones de clima cálido y húmedo del país.

Aun cuando la variedad con nervadura central morada y flor morada de *O. basilicum* es a la que se le atribuyen propiedades medicinales, las tres variedades presentes en Guatemala son utilizadas indistintamente por la población.

Las drogas vegetales pulverizadas no presentan ninguna característica visible que permita establecer con facilidad su identidad y pureza, lo cual favorece las adulteraciones y falsificaciones, tanto entre especies de un mismo género, como con otras especies de diferentes géneros. En muchos estudios internacionales se ha establecido, que especies de un mismo género e inclusive de una misma especie difieren en sus propiedades medicinales y en su grado de toxicidad (Nuñez, et al., 2004). Tomando en cuenta que desde la antigüedad el género *Ocimum* ha provocado controversia en cuanto a sus propiedades beneficiosas, este estudio propone establecer diferencias entre dos especies de ese género cultivadas en Guatemala: *O. basilicum* L., especie domesticada (tres variedades) y la especie nativa *O.*

micranthum W., en su grado de toxicidad y características micro morfológicas e histológicas, para documentar características diagnósticas que permitan su correcta identificación, especialmente cuando se obtenga seca y/o fragmentada.

V. OBJETIVOS

A. General

Establecer los caracteres de identidad y grado de toxicidad de dos especies del género *Ocimum* cultivadas en Guatemala.

B. Específicos

- Describir las características de identidad macro y microscópicas de *O. micranthum* W.
- Describir las características de identidad macro y microscópicas de tres variedades de *O. basilicum* L.
- Determinar el grado de toxicidad de los extractos etanólicos y aceites esenciales de las especies en estudio.
- Comparar el grado de toxicidad de los extractos etanólicos y aceites esenciales de las especies en estudio.

VI. HIPÓTESIS

Existen diferencias entre los caracteres de identidad y grado de toxicidad de los aceites esenciales y extractos etanólicos de ambas especies.

Existen diferencias en el grado de toxicidad de los aceites esenciales y extractos etanólicos entre las tres variedades de *O. basilicum* L.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Especies de albahaca cultivada en distintas regiones de Guatemala.

B. Muestra

Tres variedades de *O. basilicum* L. (Albahaca morada), y *O. micranthum* W. (Albahaca de monte) en etapa de floración.

C. Recursos

1. Humanos

- Estudiantes: Br. Ilse Margoth Fernández Paz; Br. Miguel Angel Pontaza Tello; Br. Edson Omar Saban Culajay.
- Asesora: MA. María Eugenia Paredes.
- Co-asesora: MA. Margarita Paz de Ramírez.
- Revisor: Lic. Armando Cáceres y MA. Isabel Gaitán.

2. Institucionales

- Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Ecología, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Herbario de la Escuela de Biología (BIGU), Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Biblioteca de Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA.

3. Físicos

a. Materiales

- Agitador magnético
- Agua de chorro
- Algodón
- Bisturí
- Bolsas de plástico
- Bulbos de cebolla
- Caja de petri
- Cartón corrugado
- Cartulina
- Duroport
- Etiquetas
- Fólderes
- Frascos ámbar de 200 mL
- Gelatina
- Goma
- Guantes de látex
- Hojas de afeitar Gillet
- Lámpara de luz blanca
- Lápiz
- Lupa
- Marcador indeleble
- Papel kraft
- Papel periódico

- Papel secante
- Pecera para cultivo
- Pincel
- Platos desechables
- Programa de computadora Finney (DOS)
- Silicón
- Tijeras de podar
- Viales color ámbar

b. Cristalería y utensilios de laboratorio

- Balón de destilación de 250 mL
- Cubreobjetos
- Desecadora
- Embudo
- Erlenmeyer de 50 y 500 mL
- Gradilla para sesenta tubos
- Microplaca de fondo plano de 96 pozos
- Papel filtro Whatman No.1
- Pera de separación
- Percolador
- Pipetas automáticas de 10, 50 y 100 μ L
- Pipetas pasteur de vidrio
- Placa de silicagel 60 F254
- Portaobjetos
- Probeta de 100 mL
- Puntas amarillas de 200 μ L
- Tubos de ensayo de 10 x 1.5
- Varilla de vidrio

- Vasos de precipitado de 30, 50, 100 y 250 mL
- Vidrio de reloj

c. Equipo

- Analizador (balanza) de humedad
- Balanza analítica
- Balanza semi-analítica
- Baño de María
- Destilador Neoclevenger
- Estereoscopio
- Estufa eléctrica
- Microscopio óptico
- Refrigerador
- Rotavapor
- Vaporizador

d. Biológico

- Bulbos de *Allium cepa*
- Huevos de *Artemia salina*
- Larvas de *Aedes aegypti*
- Larvas de *Anopheles albimanus*
- Material vegetal de *O. micranthum* W.
- Material vegetal de tres variedades de *O. basilicum* L. (Morada, blanca y genovese)

e. Reactivos

- 1,8-cineol

- Aceite de inmersión
- Aceites esenciales
- Acetato
- Acetato de etilo
- Acetona
- Ácido acético
- Ácido acético glacial
- Ácido fórmico
- Ácido sulfúrico concentrado
- Agua destilada
- Amonio concentrado
- Anetol
- Anisaldehído
- Azul de cresil al 1%
- Cloroformo
- Diclorometano
- Dietilamina
- Difenilboriloxietilamina
- Estándar de saponinas
- Etanol al 50%
- Etanol al 70%
- Etanol al 96%
- Etilmetilcetona
- Extractos etanólicos
- Gelatina-glicerina
- Hidrato de cloral (5:2)
- Hidróxido de amonio al 10%
- Hidróxido de potasio al 10%
- Hidróxido de potasio al 5%

- Hidróxido de sodio al 5%
- Hipoclorito de sodio al 50%
- Lugol
- Metanol
- N-butanol
- N-Pentano
- Orceina
- Polietilenglicol
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo Sudan III ó IV
- Safranina al 1%
- Safranina Fast Green
- Sal de mar (Cloruro de sodio sin iodo)
- Solución de atropina y papaverina al 1% (en metanol)
- Solución de flavonoides al 0.05% (en metanol)
- Sulfato férrico
- Tolueno
- Vanillina
- Xileno Timol

D. Métodos

1. Pruebas de identidad

a. Características macroscópicas y descripción botánica

Se revisó a simple vista todos los caracteres que permitieron una correcta identificación de la materia fresca y seca. Se elaboró una descripción botánica en base a obras florísticas y monográficas, que permitieron la identificación de las plantas en estudio.

i. Herborización de ejemplares frescos

- Colecta y secado de muestras

Se recolectaron tres ejemplares de cada una de las plantas a estudio. Luego se procedió a identificar claramente los ejemplares en el Herbario de Biología de Guatemala (BIGU). Al colectarlos, se procedió a guardarlos en la secadora del BIGU durante 48 horas.

- Montaje de muestras y etiquetas

Se colocada muestra seca junto con una etiqueta de identificación con una breve descripción botánica y otros requerimientos establecidos por el BIGU.

b. Caracteres micro morfológicos e histológicos

Para obtener información micromorfológica e histológica de materia vegetal fresca, se utilizaron las siguientes técnicas:

i. Cortes a mano alzada

El estudio de una droga vegetal incluye observar la disposición de los tejidos que la conforman, revelando detalles significativos que ayudan a confirmar la identidad de la planta; permite además identificar y localizar los metabolitos presentes en la misma. Esta técnica puede utilizarse en el estudio de drogas constituidas por hojas, tallos herbáceos, raíces o rizomas, frutos y semillas. Elaborar cortes del material en sección transversal, para luego poder procesarlos según la técnica elegida (Solis, Gattuso, & Cáceres, s.f.; Gattuso & Gattuso, 1999).

- Se colocó un trozo de hoja o tallo entre dos trozos de duroport.
- Se sostuvo fuertemente con una mano el material a cortar, ya acondicionado y con la otra mano se deslizó de manera perpendicular una hoja de afeitar nueva.
- Se recibieron los cortes obtenidos en un vidrio de reloj con agua destilada.
- Se seleccionaron los cortes más delgados y parejos.

- Unos se tiñeron con safranina y otros se utilizaron para el tamizaje fitoquímico siendo fijados con gelatina-glicerina.
- Se observaron al microscopio con aumentos de 100 y 400.

ii. Técnica de diafanizado (Decoloración)

Este método es el resultado de la aclaración o eliminación completa de cualquier tipo de plastidio para poder observar de manera más clara las estructuras epidérmicas que presentan las hojas, tal como células normales, estomas, tricomas, entre otros elementos propios y característicos que permiten la identificación de las especies vegetales (Solís, et al., s.f.; Gattuso & Gattuso, 1999).

- Se colocaron las hojas de la especie vegetal en estudio, *O. basilicum*, en un vaso de precipitado con alcohol al 96%, se llevó a ebullición durante treinta minutos, hasta que ya no se observara coloración verde en la hoja.
- Las hojas se pasaron a una solución de partes iguales de alcohol al 96% e hidróxido de sodio al 5% y se llevaron a ebullición por diez minutos.
- Se lavó el material con agua destilada tibia varias veces hasta que el agua quedará totalmente limpia.
- Se pasó el material a una caja de Petri con una solución de hipoclorito de sodio al 50% hasta que las hojas quedarán blanco-transparentes.
- Se lavó el material tratado con agua destilada cinco veces para eliminar el hipoclorito de sodio.
- Con mucho cuidado se trasladó el material a una caja de Petri con safranina al 1% en agua y se tiñó por cinco minutos.
- Estas hojas se trasladaron a un portaobjetos y se les agregó gelatina-glicerina.
- Se procedió a cubrir suavemente con un cubreobjetos procurando no originar burbujas.
- Se observaron al microscopio con aumentos de 100, 400 y 1000.

iii. Determinación de índice de estomas

El índice de estomas es una constante dentro de ciertos límites, que permite la caracterización de hojas por comparación con testigos o valores tabulados (Solís, et al., s.f.).

- Se transfirió una muestra de material vegetal diafanizado a un portaobjetos, cuidando que la epidermis inferior quede orientada hacia arriba. Luego se montó con una gota de gelatina-glicerina y se procedió a observar al microscopio, utilizando el objetivo de 40.
- Para calcular el resultado se utilizó la siguiente fórmula

$$I = \frac{S \times 100}{E + S}$$

I = Índice de estomas.

S = Número de estomas en una superficie determinada de la hoja.

E = El número total de células epidérmicas en la misma área (incluyendo los tricomas que pudieran aparecer).

iv. Coloración con safranina y fast Green

Realizar coloración de los tejidos vegetales para así diferenciarlos; con safranina las partes lignificadas y la cutícula se tiñen de color rojo intenso y las paredes celulósicas se tornan de color rosado. Por su parte fast green pertenece al grupo de los colorantes de triarilmetano, y se caracteriza por teñir citoplasmas de color verde y las demás estructuras de color rojizo. El estudio microscópico de una droga vegetal por medio de distintas coloraciones permitirá identificar las estructuras que la conforman (Solis, et al., s.f.; Gattuso & Gatuso, 1999).

- Se escogieron los cortes más delgados y se trasladaron a un vidrio de reloj con safranina al 1% en agua y se dejaron colorear por 5 minutos.
- Se trasladaron estos cortes a otro vidrio de reloj con agua destilada y colocó cada corte con ayuda de un pincel sobre un portaobjeto.
- Se agregó 1 gota de gelatina-glicerina y luego se cubrió suavemente con un cubreobjetos procurando no originar burbujas.

- Se procedió a la observación en microscopio con aumentos de 100 y 400.

v. Disociado débil

El disociado débil se utiliza principalmente para hojas, tallos herbáceos y cortezas comerciales. La finalidad es disgregar o separar los tejidos de un órgano vegetal específico y así poder observar por separado las células y estructuras que lo conforman que junto con otras técnicas microscópicas especializadas brinda un medio valioso que asegura la calidad de la droga (Solis, et al., s.f.; Gattuso & Gatuso, 1999).

- Se colocó el material cortado finamente en una solución de hidróxido de sodio al 5% y se hirvió durante 5 minutos.
- Se lavó con agua destilada hasta que el líquido quede limpio.
- Luego se trasladó el material a un vidrio de reloj con una solución de safranina al 1% en agua.
- Con la ayuda de una aguja histológica se colocó una porción del material sobre el portaobjetos y se agregó gelatina-glicerina para cubrirlo con un cubreobjetos.
- Se observó al microscopio con aumentos de 100 y 400.

vi. Elaboración de cartillas de identificación

En base en los diferentes cortes transversales tanto de hoja como de tallo se elaboran cartillas micrográficas. Estas cartillas muestran la información necesaria para su caracterización e identificación en estudios posteriores (Gattuso & Gatuso, 1999).

c. Tamizaje fitoquímico

i. Identificación histoquímica

Los métodos histoquímicos determinan cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta, tal como algunos metabolitos secundarios,

estos pueden evidenciarse en tejidos vegetales con la preparación de infusiones de la droga cruda o a través de cortes transversales del tejido a mano alzada aplicando algunas reacciones de coloración. Los métodos pueden aplicarse tanto a materia fresca como seca, siendo preferible en estado fresco (Solis, et al., s.f.; Gattuso & Gattuso, 1999).

Alcaloides

- Se colocó el corte delgado sobre el portaobjetos y se agregó 1 gota de reactivo de Dragendorff.
- Luego se dejó actuar durante 1 minuto y se observó al microscopio. La presencia de un precipitado rojo ladrillo se consideró como positivo.

Almidón

- Se colocó el corte delgado en el portaobjetos y se agregó 1 gota de lugol.
- Se observó al microscopio, la presencia de gránulos color azul o azul violáceo en el citoplasma de las células se consideró como positivo.

Grasas y aceites

- Se colocó el corte delgado en el portaobjetos y se agregó 1 gota de reactivo Sudán IV.
- Se dejó actuar por 6 minutos y se lavó con alcohol al 70%.
- Luego se observó al microscopio. Una coloración roja o rosada se consideró como positivo.

Mucílagos

- Se colocó el corte delgado en un vidrio de reloj con Azul de cresil al 1%.
- Luego se trasladó a un portaobjetos.

- Se observó al microscopio. La presencia de una coloración azul Francia se consideró como positivo.

Saponinas

- Se colocó el corte delgado sobre el portaobjetos y se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado.
- Se observó al microscopio. La aparición de una coloración amarilla inmediatamente que a los 30 minutos cambio a rojo y finalmente a azul verdoso o lila se consideró como positivo.

Taninos

- Se colocó el corte delgado sobre el portaobjetos y se agregó 1 gota de sulfato férrico.
- Luego se dejó actuar 2 minutos.
- Se observó al microscopio. La presencia de una coloración azul verdosa se consideró como positivo.

ii. Cromatografía en capa fina

Esta técnica consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana, de esta forma permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Se realizó una cromatografía en capa fina de los siguientes metabolitos: alcaloides, saponinas, aceites volátiles, flavonoides y antocianinas con los extractos del material vegetal de *O. basilicum*, colocándolo en una cromatoplaque, donde se detectó posteriormente por tratamiento químico y luz ultravioleta (Sharapin, 2000; Kuklinski, 2000; Real Farmacopea Española, 2002).

Investigación de alcaloides

- Ensayos macro y semimicro: Se pesó 1g de material vegetal. Se agregó 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10% (p/v), luego añadió 25mL de metanol a 60°C. Se filtró con papel filtro Whatman 1 y acidificó el filtrado con ácido clorhídrico 2N. La solución resultante se dividió en 4 tubos y se evaluó de la siguiente manera:
- Tubo 1: 5 gotas del reactivo de Mayer's (color blanco a crema).
- Tubo 2: 5 gotas del reactivo de Dragendorff (color rojo a naranja).
- Tubo 3: 5 gotas del reactivo de Wagner (color marrón).
- Se utilizó como estándar soluciones al 1% de atropina y papaverina. Durante 2 horas se observó la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.
- Cromatografía en capa fina: Se pesó 1g de material vegetal seco molido, se agregó 1mL de hidróxido de amonio al 10% (p/v) y se extrajo con 5mL de metanol.
- Se colocó en baño maría a 60°C durante 5 minutos. Se filtró y concentró.
- Se aplicó en una placa de sílica gel 60 F₂₅₄, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1% en metanol.
- Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10); acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), cloroformo-dietilamina (90:10); acetona-agua-amonio concentrado (90:7:3).
- Detección sin tratamiento químico: UV 254 nm fluorescencia, UV 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo.
- Detección con Reactivo de Dragendorff: Zonas cafés o naranjas en vis, los colores no son estables.

Investigación de flavonoides y antocianinas

- Ensayos macro y semimicro: Se extrajo 3g de material vegetal pulverizado con 10mL de etanol o metanol al 80%, filtrar y concentrar. Se enfrió a temperatura ambiente y se trituró el residuo con 15mL de éter de petróleo hasta que la extracción fue incolora. Se disolvió el residuo en 30mL de metanol al 80%, se filtró y dividió en 5 tubos:

- Tubo 1: 0.5mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Tubo 2: Se agregaron 5 gotas de cloruro férrico al 10% (p/v).
- Tubo 3: Se agregó 0.5mL de ácido clorhídrico concentrado y se calentó en baño de maría por 5 minutos (prueba de leucoantocianinas).
- Tubo 4: Se agregó magnesio metálico y 0.5mL de ácido clorhídrico concentrado.
- Tubo 5: Se agregó un álcali a un extracto acuoso.
- Tubo 6: Se agregó una solución de ácido bórico en anhídrido acético.
- Tubo 7: Testigo.
- Se evaluaron las reacciones de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. Desarrollo inmediato de color flavonas y flavanoles (amarillo a rojo), flavonoides (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auroras no dan coloración.
- Cromatografía en capa fina: Se extrajo 1g de material vegetal seco pulverizado con 10mL de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60°C.
- Se filtró la solución y se aplicó sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄. Como estándar se empleó una solución de flavonoides al 0.05% en metanol (10µL).
- Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol-ácido acético-agua (40:7:3:30:10).
- Detección sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.
- Detección con Productos Naturales (NP/PEG): Fluorescencia intensa enUV-365nm.
- Solución 1: Solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP).
- Solución 2: Solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000 (PEG).

Investigación de saponinas

- Prueba de espuma:
- Tubo 1: 100mg de material vegetal pulverizado y seco.
- Tubo 2: 2mL de control de saponinas (0.5%).
- Tubo 3: 2mL de agua.

- A cada tubo se le adicionó 10mL de agua destilada. Se calentó en baño de maría a 60°C durante 30 minutos. Al tapar y enfriar, se agitaron vigorosamente 30 a 40 segundos.
- Se reposaron los tubos durante 30 minutos, y observó la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3cm persistía en la superficie líquida después de 30 minutos se asumía la presencia de saponinas.
- Cromatografía en capa fina: 2g de material vegetal seco, se extrajo con 10mL de etanol al 70% con reflujo por 10 minutos. Se evaporó a 5mL y se procedió a aplicar 25-40µL en una cromatoplaca de silica gel 60 F₂₅₄.
- Estándar de saponinas al 0.1% en metanol (10µL).
- Fase móvil: Cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido acético (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 anisaldehido-ácido sulfúrico, zonas azules, violetas, amarillentas.

Investigación de aceites volátiles

- Cromatografía en capa fina
- Método A: Se extrajo 1g de material vegetal pulverizado con 10mL de diclorometano agitando por 15 minutos. Se filtró y evaporó en baño de maría a 60°C a sequedad.
- Se disolvió en 1mL de tolueno y aplicar 20-50µL en cromatoplaca de silica gel 60 F₂₅₄.
- Estándar: Solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehido, anetol, 1,8-cineol.
- Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7).
- Detección: Anisaldehido-ácido sulfúrico, vainillina-ácido sulfúrico. Se observan Zonas azules, verdes, rojas y cafés en visible.

iii. Extracción continua por percolación

Para la obtención de los extractos, se tamizaron los materiales vegetales secos en floración de las tres variedades de *O.basilicum* L. y *O. micranthum*W., y se extrajo por percolación con el disolvente orgánico etanol. La capa de droga debe ser cinco veces el diámetro medio del equipo según la Farmacopea Alemana (Sharapin, 2000; Kuklinski, 2000).

- En un percolador previamente limpio y seco, se colocó un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador.
- Se pesó la cantidad de materia vegetal a utilizar de acuerdo al tamaño del percolador.
- Se humedeció el material vegetal con el disolvente adecuado para la extracción, utilizando un vaso de precipitado.
- Se transfirió todo el material al percolador y se agregó el disolvente hasta cubrir el material vegetal.
- Se dejó reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, esto dependía del material vegetal (18 a 24 horas).
- Se abrió la llave de la parte inferior y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada.
- Se recogió el líquido en un erlenmeyer y se añadió suficiente disolvente extra según se requería, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- El material sólido que ha quedado, se presiona fuertemente y el líquido obtenido se añade al percolado obtenido anteriormente.
- La solución obtenida puede utilizarse para producir extractos o tinturas. Para preparar los primeros, el líquido obtenido (menstruo) se concentró en rotavapor o y se repitió la operación hasta que se agotó la droga con el disolvente recuperado; las tinturas solo se ajustan a volumen en función de la concentración deseada (1:5, 1:8 o 1:10).

iv. Concentración usando rotavapor

Luego de extraer el material vegetal por percolación, se concentró este por medio de un rotavapor. El proceso de concentración busca aumentar el contenido de sólidos totales en el extracto con la finalidad de alcanzar residuo seco, y producir extractos blandos como etapa

preliminar en la producción de extractos duros, y luego colocarlo en una desecadora (Kuklinski, 2000).

- Se verifico que estuvieran conectadas todas las conexiones eléctricas.
- Se colocó el balón colector y se fijó con la llave respectiva.
- Se revisó el nivel de agua del baño de calentamiento.
- Se encendió el baño y se mantuvo la temperatura entre 50-60°C, dependiendo del equipo puede haber pérdidas de 10-20°C entre el baño de calentamiento y el interior del balón de evaporación, en todo caso el balón de evaporación no deberá tener una temperatura mayor de 40°C.
- Se revisó que la llave de alimentación del refrigerante estuviera cerrada.
- Se colocó el balón con la muestra y se sujetó al vástago con la llave correspondiente.
- Se encendió el botón, que permite girar el balón que contiene la muestra, a una revolución adecuada.
- Se conectó un sistema de enfriamiento o por lo menos de circulación de agua del chorro.
- Se encendió la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación.
- Cuando iniciaba la destilación, se apagaba la bomba de vacío.
- Se encendió la bomba de vacío cuantas veces era necesario hasta que se agotó el disolvente del balón de evaporación o ya no destilaba ningún líquido, lo que quería decir que el vacío de la bomba no era suficiente para evaporar la mezcla de disolventes contenida en el balón de evaporación.

v. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa encontradas prácticamente en todos los vegetales; son muy numerosos y están ampliamente distribuidos en distintas partes del mismo vegetal: en las raíces, tallos, flores y frutos (Kuklinski, 2000).

- Se lavó el aparato clevenger con metanol y agua destilada para eliminar cualquier contaminante.
- Se pesó 40g de la muestra.

- Se colocó la muestra pesada en un balón de 1000mL.
- Se agregó agua destilada al balón hasta humedecer la muestra de forma uniforme, de tal manera que todas las partículas de la muestra estuvieran húmedas.
- Se armó el equipo de extracción de aceites esenciales clevenger.
- Se colocó agua en las secciones de descarga del clevenger.
- Se agregó de 2-4mL de n-pentano sobre la sección de descarga, que sirve como trampa para el aceite extraído.
- Se encendió la bomba neumática para recircular el agua del condensador, la cual debe de mantenerse a una temperatura entre 10-15°C.
- Se enciende la plancha de calentamiento para iniciar la ebullición.
- Se destiló durante 4 horas.
- Se apagó la plancha de calentamiento y se esperó a que terminara de producir condensación.
- Se recolectó el destilado de la región de descarga en un balón aforado de 100mL.
- Se colocó el destilador en el rotavapor a 60rpm con una temperatura de baño de maría de 40-45°C y un vacío de 350mmHg para eliminar el hexano.
- Se transfirió el aceite recuperado a un vial pesado y determinar la masa del mismo.
- Se guardó la muestra de aceite recolectado a baja temperatura.

2. Pruebas de pureza

a. Cenizas totales

Esta prueba se realizó sobre el material pulverizado para obtener el contenido de minerales que contenía el material en estudio. El método se basa en la destrucción por calcinación de la materia orgánica presente en la muestra y su respectiva determinación gravimétrica del residuo (Sharapin, 2000).

- Se calentó un crisol por cada variedad durante dos horas en una mufla a una temperatura de 625°C, posteriormente se apagó y se sacaron los crisoles de la misma al día siguiente.

- Se pesaron e identificaron.
- Se distribuyó de 2g del material en estudio sobre cada crisol.
- Se incineraron las muestras contenidas en los crisoles, durante 2 horas en la mufla, a una temperatura de 625°C; se sacaron los crisoles de la misma al día siguiente.
- Se pesaron los crisoles con la materia incinerada. Los crisoles se manipularon con pinzas especiales.
- Se calculó el contenido total de cenizas, utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de cenizas: } \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial del crisol vacío} * 100}{\text{Peso exacto de la droga}}$$

b. Determinación de humedad

Para determinar el porcentaje de humedad del material vegetal se seleccionó una parte representativa de la cantidad total, como muestra, asegurando su homogeneidad. Se molió la muestra y distribuyó en un platillo para luego introducirlo en la balanza que determinó el contenido de humedad (Real Farmacopea Española, 2002).

- Se seleccionó una parte representativa de la cantidad total como muestra.
- Se homogenizó la muestra mezclando o agitando.
- Se evitó toda influencia de calor al moler la muestra.
- Se molió la muestra con mortero; utilizando los platillos de muestra desechables y se distribuyó la muestra fina y homogéneamente (5 a 15g).
- Se encendió la balanza de humedad y se seleccionó programa de secado.
- Se obtuvo resultado pasado el tiempo de espera.

3. Citotoxicidad contra *A. salina*

El ensayo de letalidad de *A. salina* se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio. En este método se determinó el valor de la concentración letal media de compuestos y extractos en medio salino (Solís, et al., 1993; Jaki, et al., 1999).

- En un vaso de precipitar, se disolvieron 35g de la sal de mar en litro de agua destilada. Se hizo una marca en el vaso para indicar el volumen de agua.
- Se hirvió por treinta minutos y se completó el volumen que se evaporó según la marca.
- Se filtró y refrigeró hasta el momento de usar, la solución es estable por 1 mes a temperatura de 6-8°C.
- Se forró la mitad de una pecera con plástico oscuro.
- Se colocó en un vaso de precipitar 200 mL del agua de mar y se aireó por treinta minutos.
- Se colocó el agua en la pecera y se agregaron 40mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro).
- Se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar los nauplios (larvas) se trasladaron al área abierta de la pecera (lado con luz).
- No se movió la pecera después de agregados los huevos, ya que pasan estos al área cerrada y esto no permite el conteo de nauplios.
- Se pesaron 4mg del extracto a ensayar y se disolvieron con 2mL de agua de mar en vortex.
- Luego se agregó por triplicado en una microplaca: 100µL del extracto disuelto + 100µL de agua de mar con 10 a 15 nauplios.
- Control negativo: 100µL de agua de mar, 100µL de agua de mar con 10 a 15 nauplios.
- Se incubó a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.
- Se contó en el estereoscopio el número de nauplios muertos. Seguidamente se agregó metanol a los pozos, se esperó 15 minutos y se contó de nuevo todos los nauplios.
- En el caso de aceites esenciales, se midieron 25µL del aceite esencial y se disolvieron con 1mL de agua destilada. Se añadió 0.1% de dimetilsulfóxido.
- Se sonificó la solución para optimizar la solubilidad.
- Se colocó por triplicado en cada pocillo de una microplaca 100µL de agua de mar conteniendo los nauplios con la ayuda de una pipeta automática. Se pescaron los nauplios de dos en dos por 5 veces con un tip amarillo, se cortó la punta del tip, utilizando una pipeta automática de 20µL para asegurarse de que quedaran 10 nauplios/100µL.

- Se emplearon distintas concentraciones crecientes para la solución ensayada (12µL, 5µL, 2µL). Al final cada pocillo contuvo: la cantidad de µL de la solución de aceite según su dilución y 100µL de agua de mar con 10 nauplios y los µL suficientes para completar un volumen de 200µL por pozo. Se realizó por triplicado.
- Control negativo para cada tratamiento: 100µL de agua de mar y 100µL de agua de mar con 10 nauplios.
- Control positivo para extractos: 100µL de alguna sustancia de actividad citotóxica reconocida. Puede utilizarse algún extracto que haya mostrado actividad en estudios previos u otros y 100µL de agua de mar con 10 nauplios.
- Control de disolventes utilizados en la elaboración de las soluciones de extractos realizar controles con los solventes utilizados para disolver las muestras analizadas.
- Se calculó:
$$\% \text{ nauplios muertos} = \frac{\# \text{ nauplios muertos en los tres pozos (X)}}{\# \text{ nauplios de los tres pozos (Y)}} * 100$$
- Si el porcentaje de nauplios muertos es mayor del 50%, se repetía la prueba utilizando dosis de 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL.
- Se obtuvieron los valores de X y Y en cada dosis y se determinó el valor de DL₅₀ con el programa de computadora Finney (DOS).
- Si el porcentaje es menor del 50% la citotoxicidad es mayor de 1mg/dL (Solis, et al., 1993; Jaki, et al., 1999).

4. Tamizaje de la actividad larvicida

Los mosquitos constituyen un grupo de insectos de gran importancia, debido a que muchas de sus especies son vectores de agentes causales de enfermedades humanas con gran importancia en la salud pública, como por ejemplo la malaria y el dengue (Álvarez, 2002). Desde hace algún tiempo diversos estudios (Pérez, Rodríguez, Lara, Montes & Ramírez, 2004) han evaluado el efecto larvicida en una gran cantidad de extractos acuosos y etanólicos provenientes de una gran cantidad de plantas en búsqueda de alternativas con menos riesgos que los insecticidas órganos sintéticos y con bajo costo económico y ambiental.

- Se colocó en un vaso de precipitar 200mL del agua del chorro y se dejó reposar por 48 horas.
- Se agregaron unos 40mg de huevecillos de *A. aegyptiy A. albimanus*.
- Se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente.
- Se pesó 1mg del extracto a ensayar y se disolvió con 1mL de agua de chorro reposada. En la microplaca se agregó por triplicado: 100µL del extracto disuelto y 100µL de agua del chorro reposada con 10 a 15 larvas.
- Control negativo: 100µL de agua del chorro reposada con 10 a 15 larvas.
- Se incubó a temperatura ambiente (25-28°C) en un lugar oscuro durante 24 horas.
- Se contó en el estereoscopio el número de larvas muertas y se determinó la CL₁₀₀ (concentración letal al 100%) (Thangam & Kathiresan, 1997; Zarroug, et al., 1988; Chariandy, et al., 1999).
- Se calculó:
$$\frac{\% \text{ larvas muertas} = \# \text{ larvas muertas en los tres pozos}}{\# \text{ larvas de los tres pozos}} * 100$$

E. Diseño experimental

1. Diseño de la investigación

El diseño de la investigación se dividió en dos partes:

a. Estudio descriptivo observacional de corte transversal

i. Muestras: por conveniencia

ii. Variables

Cualitativas

- Características macroscópicas
- Características microscópicas

- Tamizaje fitoquímico

Cuantitativas

- Cenizas totales
- Índice de estomas
- Porcentaje de humedad
- Rendimiento de aceites esenciales
- Rendimiento de extractos etanólicos

iii. Análisis descriptivo

- Se recolectaron 5 ejemplares frescos de cada una de las variedades de *O. basilicum* en etapa de floración, y se tomaron 5 hojas maduras de similar estructura a las cuales se les realizaron cortes a mano alzada de la parte del ápice, limbo superior, limbo inferior y pecíolo de la hoja. En total se realizaron 100 cortes a mano alzada para cada una de las secciones de la hoja, en los cuales se contabilizaron el número de tricomas, estomas y glándulas de aceites.
- Para el tamizaje fitoquímico se tomó un total de 10 hojas maduras de similar estructura, a las cuales se les realizó por triplicado las pruebas histoquímicas, y la prueba confirmatoria en tubo por triplicado, para evidenciar claramente las reacciones o características propias de cada espécimen.
- Para confirmar la presencia de metabolitos secundarios se realizó por triplicado la técnica de cromatografía en capa fina para cada una de las variedades de *O. basilicum*.
- Se recolectó 5 ejemplares frescos de cada una de las variedades de *O. basilicum* en etapa de floración, de las cuales se tomaron 5 hojas maduras de similar estructura a las cuales se les realizó la técnica del diafanizado para contabilizar el número de estomas, y calcular el índice de estomas y tricomas según variedad.

- Se obtuvieron aproximadamente 250 gramos de material seco de *O. micranthum* y de las tres variedades de *O. basilicum*, para los ensayos de cenizas totales y porcentajes de humedad que se realizaron por triplicado. De los aceites esenciales y extractos etanólicos al 50% obtenido de material seco de dichas plantas se calculó el porcentaje de rendimiento obtenido.
- Para las variables cualitativas se realizó un cuadro comparativo de presencia/ausencia de estructuras y metabolitos.
- Las variables cuantitativas se evaluaron con medidas de tendencia central (media, mediana, desviación estándar y rango).
- A fin de detectar si hay o no diferencia entre las 4 variedades, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para cada variable. Si se comprueba que hay diferencia se realizará la prueba de comparaciones múltiples pareada. Se realizará la prueba de Mann-Whitney si hubiera 2 variedades que presenten un mismo tipo de estructura, en caso de que una variedad presente un solo tipo de estructura se describirá por medio de las medidas de tendencia central ya indicadas.
- En el caso de las variables semicuantitativas se calculó la mediana y el rango.

b. Estudio experimental

Extracción etanólica al 50% y de aceites esenciales de cada planta para evaluar la citotoxicidad.

i. Actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*.

Ensayo cuantil, donde se comparó el número de nauplios de *A. salina* inicial (de 10 a 15 nauplios por cada dosis) con el número de nauplios muertos después del contacto por 24 horas con los extractos etanólicos al 50% y aceites esenciales en las siguientes concentraciones: 1.0, 0.5, y 0.25 mg/dL

Variables de interés

- Variable dependiente: Muertes de nauplios de *A. salina*.

- Variable independiente: 4 extractos etanólicos al 50% y 4 aceites esenciales de las plantas de estudio.

Análisis: Regresión no lineal, no paramétrica por medio de transformación probit, calculando en cada caso la DL_{50} con un intervalo de confianza del 95% (5 réplicas) por medio del método de Finney.

ii. Actividad larvicida

Ensayo cuantil, donde se comparó el número de larvas inicial de tercer estadio de *A. albimanus* y *A. aegypti* (1 larva por cada dosis) con el número de larvas muertas después del contacto por 24 horas con los extractos etanólicos al 50% y aceites esenciales en las siguientes concentraciones: 1.0, 0.5, y 0.25 mg/dL.

Variables de interés

- Variable dependiente: Muertes de larvas de primer estadio de *A. albimanus* y *A. aegypti*.
- Variable independiente: 4 extractos etanólicos al 50% y 4 aceites esenciales de las plantas de estudio.

Análisis: Regresión no lineal, no paramétrica por medio de transformación probit, calculando en cada caso la DL_{50} con un intervalo de confianza del 95% (5 réplicas) por medio del método de Finney.

VIII. RESULTADOS

A. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

1. Descripción diagnóstica

Para una rápida identificación de las plantas se proponen las siguientes descripciones diagnósticas de las tres distintas variedades

a. *Ocimum basilicum* L. (Variedad morada)

Planta herbácea de aproximadamente 50 cm de altura, tallo cuadrangular pubescente, hoja delgada, peciolada, opuesta, de forma aovada, aserrada y algo veloso en los nervios, ápice agudo y la base redondeada, de color morado en la nervadura central. Las flores se presentan en largos ramilletes terminales, con corola rosácea a violeta de aproximadamente 4 mm de largo (Figura 1). La droga seca está constituida por hojas, flores y pedúnculos, es de color café verdoso oscuro, con presencia de olor similar al clavo



Figura 1. *Ocimum basilicum* var morada
Material vegetal fresco

b. *Ocimum basilicum* L. (Variedad blanca)

Planta herbácea de aproximadamente 50 cm de altura, tallo cuadrangular pubescente; hoja delgada, peciolada, opuesta, de forma aovada, aserrada y algo vellosa en los nervios, ápice agudo y la base redondeada. Las flores se presentan en largos ramilletes terminales, de color blanco o tenuemente rosadas (Figura 2). Tienen los cuatro estambres y el pistilo apoyados sobre el labio inferior de la corola. La droga seca está constituida por hojas, flores y pedúnculos, de color café verdoso, con presencia de olor similar al clavo.



Figura 2. *Ocimum basilicum* var blanca
Material vegetal fresco

c. *Ocimum basilicum* L. (Variedad genovese)

Planta herbácea de máximo 45 cm de altura, tallo pubescente, hojas glabras de coloración verde brillante, aovadas, pecioladas con bordes lisos, base redondeada. Las flores se presentan en largas vainas terminales con corola blanca de aproximadamente 4mm de

largo. La muestra seca constituida por hojas, es de color verde opaco, con presencia de leve olor similar al clavo.



Figura 3. *Ocimum basilicum* var genovese
Material vegetal fresco

2. Recolección y herborización de ejemplares frescos

Se recolectaron ejemplares frescos de tres variedades cultivadas en Guatemala de *O. basilicum*: blanca, morada y genovese. La variedad blanca y morada fueron recolectadas en el jardín de plantas medicinales y ornamentales Campos del CEDA de la Facultad de Agronomía, y la variedad genovese fue recolectada en vivero comercial de plantas. Estas muestras fueron llevadas al Herbario Biología Guatemala (BIGU) donde se identificaron como dicha especie según la Flora de Guatemala. Además se herborizaron y depositaron en este herbario tres ejemplares de cada variedad de *O. basilicum* los cuales fueron registrados e incorporados a las colecciones con los números (60601).

B. CARACTERES MICROMORFOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DE LAS TRES VARIETADES DE *O. basilicum*

1. Hoja

a. *Ocimum basilicum* var morada

En el corte transversal del mesófilo se observa una hoja dorsiventral. La epidermis adaxial es uniestratificada con células heterogéneas, de paredes periclinares delgadas y convexas con cutícula delgada. El parénquima en empalizada presenta células altas que ocupan aproximadamente dos terceras partes del grosor del mesófilo y en el parénquima esponjoso se presenta aerenquima. Ambos parénquimas son del tipo clorenquimático.

La epidermis abaxial posee células ligeramente más pequeñas que las de la epidermis adaxial pero con las mismas características. Se observa una coloración morada característica en las células epidérmicas, mayormente en la epidermis abaxial (Figura 4 A).

El indumento está formado por pelos glandulares y no glandulares. Los pelos glandulares se presentan de dos tipos, las glándulas de aceite que en ambos lados (abaxial y adaxial) se encuentran sobre depresiones epidérmicas formadas por un pie corto unicelular y una cabeza unicelular con cuatro cabezas secretoras en su interior (Figura 5 A) y tricomas glandulares con pie unicelular y cabeza unicelular (Figura 7 A). Los pelos no glandulares se

observan sobre elevados en la epidermis, pluricelulares, algunos agudos y curvos, uniseriado, 3-5 celular con paredes engrosadas y levemente verrucosas (Figura 6 A).

A nivel del nervio medio se observa un haz colateral en forma de abanico, rodeado por parénquima, dentro del floema se observan pequeños grupos de esclereidas. Bajo la epidermis se observa en ambos lados de la nervadura, colénquima angular 1-2 celular (Figura 7 A).

En el diafanizado, en la cara adaxial se observan células epidérmicas grandes y alargadas de paredes anticlinales sinuosas, numerosos estomas diacíticos y a lo largo de la nervadura central se pueden observar tricomas alargados (Figura 8). En la cara abaxial se observa la epidermis formada por células de menor tamaño con paredes anticlinales marcadamente sinuosas y numerosos estomas diacíticos (Figura 9). En ambas caras se observan dos tipos de pelos glandulares, los unicelulares pequeños y las glándulas de aceite de distintos tamaños, así como tricomas simples uniseriados pluricelulares de 3-4 células (Figuras 8 y 9).

En el disociado se pudo observar células epidérmicas en láminas, glándulas secretoras, esclereidas, traqueidas, colénquima, tricomas globosos y tricomas verrucosos, segmentos de xilema helicoidal, gotas de aceite (Figura 10).

b. *Ocimum basilicum* var blanca

En el CT del mesófilo se observa una hoja dorsiventral. La epidermis adaxial es uniestratificada con células heterogéneas, de paredes periclinales delgadas y convexas con cutícula delgada. El parénquima en empalizada presenta células altas que ocupan aproximadamente dos terceras partes del grosor del mesófilo, y el parénquima esponjoso presenta aerenquima. Ambos parénquima son del tipo clorenquimático.

La epidermis abaxial posee células ligeramente más pequeñas que las de la epidermis adaxial presentando las mismas características (Figura 4 B).

El indumento está formado por pelos glandulares y no glandulares. Los pelos glandulares se presentan de dos tipos, las glándulas de aceite que en ambos lados (abaxial y adaxial) se encuentran sobre depresiones epidérmicas formadas por un pie corto unicelular y una cabeza unicelular con cuatro cabezas secretoras en su interior (Figura 5 B) y tricomas glandulares con pie unicelular y cabeza unicelular (Figura 7 B). Los pelos no glandulares se observan sobre elevados en la epidermis, pluricelulares, algunos agudos y curvos, otros un poco más engrosados y no curvados, uniseriado, 3-5 celular con paredes engrosadas y levemente verrucosas (Figura 7 B), otros son de superficie, aduncados, uniseriados, de 3-4 células en donde se observa a la última célula aguda y ligeramente verrucosa (Figura. 6 B).

A nivel del nervio medio se observa un haz colateral en forma de abanico, rodeado por parénquima; dentro del floema se observan pequeños grupos de esclereidas. Bajo la

epidermis se observa en ambos lados de la nervadura, colénquima angular 1-2 celular (Figura 7 B).

En el diafanizado, en la cara adaxial se observan células epidérmicas grandes y alargadas de paredes anticlinales sinuosas, numerosos estomas diacíticos (Figura 11). En la cara abaxial se observa la epidermis formada por células de menor tamaño con paredes anticlinales marcadamente sinuosas y numerosos estomas diacíticos (Figura 12). En ambas caras se observan dos tipos de pelos glandulares, los unicelulares pequeños y las glándulas de aceite de distintos tamaños, así como tricomas simples uniseriados pluricelulares de 3-4 células y tricomas de superficie unicelulares y bicelulares del margen de la hoja de y xilema helicoidal (Figuras 11 y 12).

En el disociado se pudo observar células epidérmicas en láminas, glándulas secretoras, esclereidas, traqueidas, segmento de la epidermis papilosa de la nervadura central con tricomas de dos células con paredes engrosadas, tricomas globosos segmentos de xilema helicoidal, gotas de aceite (Figura 13).

c. *Ocimum basilicum* var *genovese*

En el CT del mesófilo se observa una hoja dorsiventral. La epidermis adaxial es uniestratificada con células heterogéneas, de paredes periclinales delgadas y convexas con cutícula delgada. El parénquima en empalizada presenta células de regular tamaño que ocupan aproximadamente un poco más de la mitad del grosor del mesófilo, y el parénquima

esponjoso presenta aerénquima. Ambos parénquima son del tipo clorenquimático (Figura 4 C).

El indumento está formado por pelos glandulares y no glandulares. Los pelos glandulares (glándulas de aceite) se presentan en ambos lados (abaxial y adaxial) y se encuentran sobre depresiones epidérmicas formadas por un pie corto unicelular y una cabeza unicelular con cuatro cabezas secretoras en su interior (Figura 5 C). Los pelos no glandulares se observan mayormente bicelulares, curvos, uniseriados, de paredes delgadas, sobre elevado en la epidermis, con cristales en su interior y el extremo curvado (Figura 6 C).

A nivel del nervio medio se observa un haz colateral en forma de arco, rodeado por parénquima; dentro del floema se observan pequeños grupos de esclereidas. Bajo la epidermis se observa en ambos lados de la nervadura, colénquima angular 1-2 celular (Figura 7 C).

En el diafanizado, en la cara adaxial se observan células epidérmicas grandes y alargadas de paredes anticlinales, estomas diacíticos (Figura 14). En la cara abaxial se observa la epidermis formada por células de menor tamaño con paredes anticlinales y estomas diacíticos (Figura 15). En ambas caras se observan dos tipos de pelos glandulares, los unicelulares pequeños y las glándulas de aceite de distintos tamaños, así como tricomas simples uniseriados pluricelulares de 2-3 células y xilema helicoidal (Figuras 14 y 15).

En el disociado se pudo observar, células epidérmicas, células parenquimáticas, glándulas secretoras, esclereidas, traqueidas, segmento de la nervadura central, tricomas de dos células con paredes engrosadas, tricomas globosos, segmentos de xilema helicoidal, gotas de aceite (Figura 16).

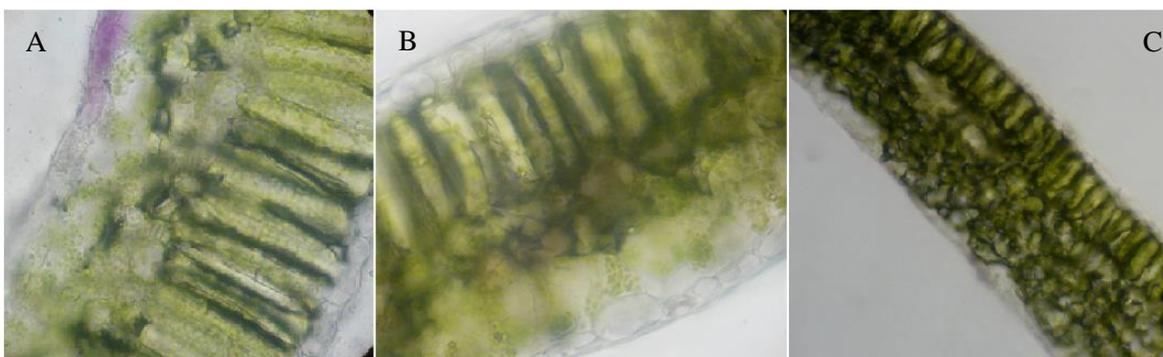


Figura 4. Corte transversal de hoja. (A) *Ocimum basilicum* var morada (B) *Ocimum basilicum* var blanca (C) *Ocimum basilicum* var genovese. (A), (B) y (C) Sin teñir. 400X.

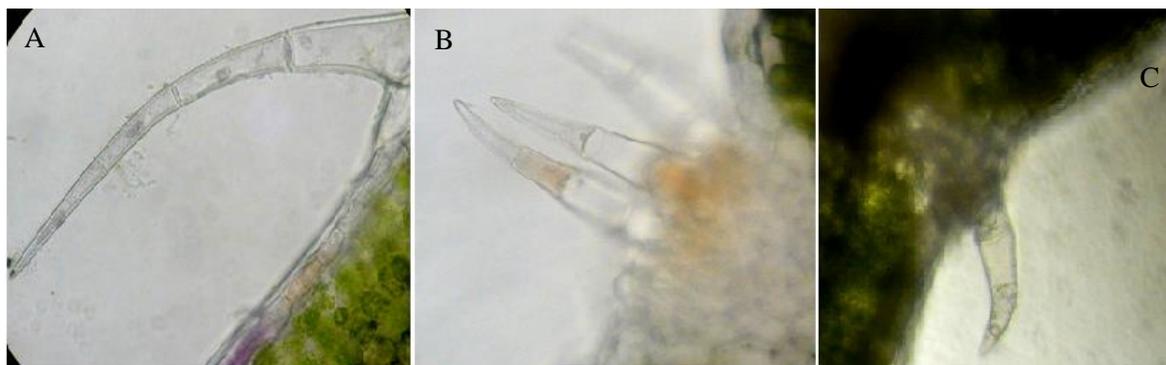


Figura 5. Corte transversal de hoja. (A) *Ocimum basilicum* var morada (B) *Ocimum basilicum* var blanca (C) *Ocimum basilicum* var genovese. (A), (B) y (C) Sin teñir. 400X.

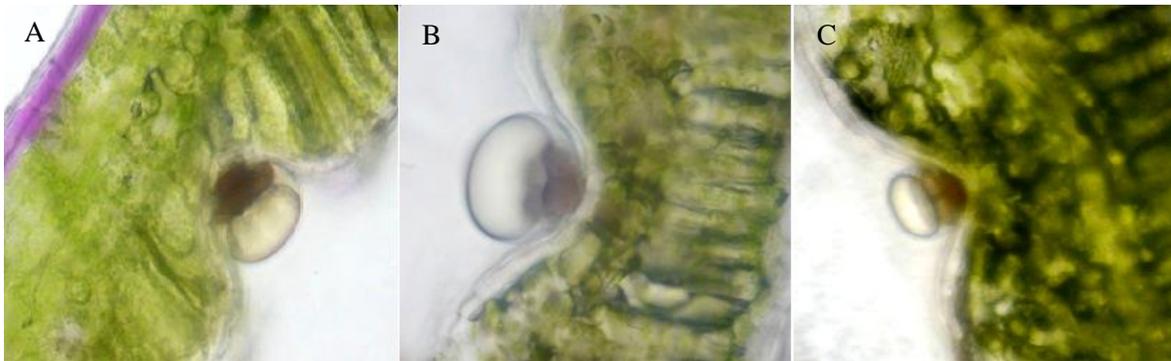


Figura 6. Corte transversal de hoja. (A) *Ocimum basilicum* var morada (B) *Ocimum basilicum* var blanca (C) *Ocimum basilicum* var genovese. (A), (B) y (C) Sin teñir. 400X.



Figura 7. Corte transversal de hoja. (A) *Ocimum basilicum* var morada (B) *Ocimum basilicum* var blanca (C) *Ocimum basilicum* var genovese. 400X. (A) Tinción: Safranina 1%, (B) Sin teñir, (C) Tinción: Azul de cresil.

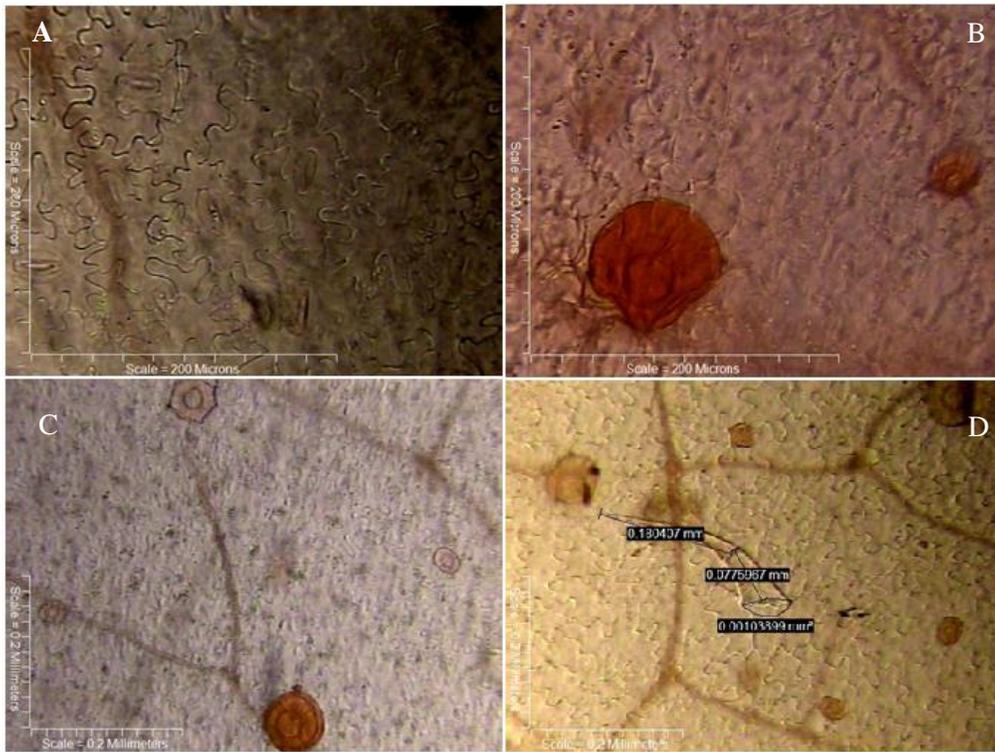


Figura 8. Diafanizado. Cara abaxial *Ocimum basilicum* var morada. (A) Celulas epidérmicas y estomas diacíticos (B) Glandulas de aceite (C) Glandulas de aceite (D) Tricomas alargados 400X.



Figura 9. Diafanizado. Cara adaxial *Ocimum basilicum* var morada. (A) Pelos glandulares unicelulares pequeños y tricoma (B) Glandula de aceite (C) Tricomas en nervadura central (D) Celulas epidérmicas y estomas diacíticos 400X.

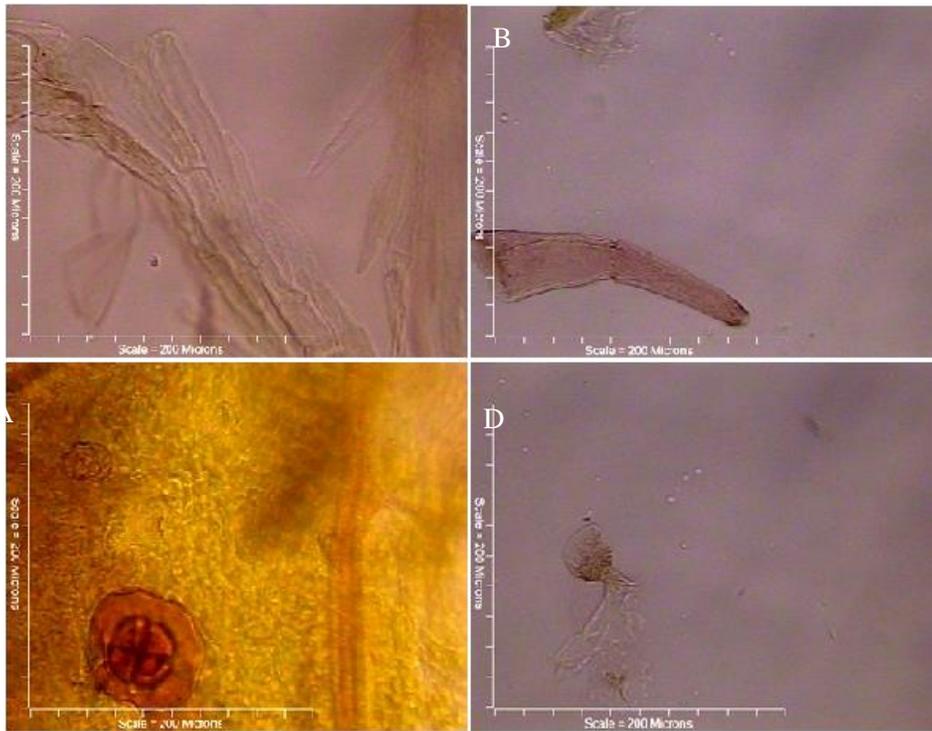


Figura 10. Disociado. *Ocimum basilicum* var morada. (A) Esclereidas y traqueidas (B) Tricoma bicelular (C) Tricoma globoso (D) Tricoma unicelular 400X.

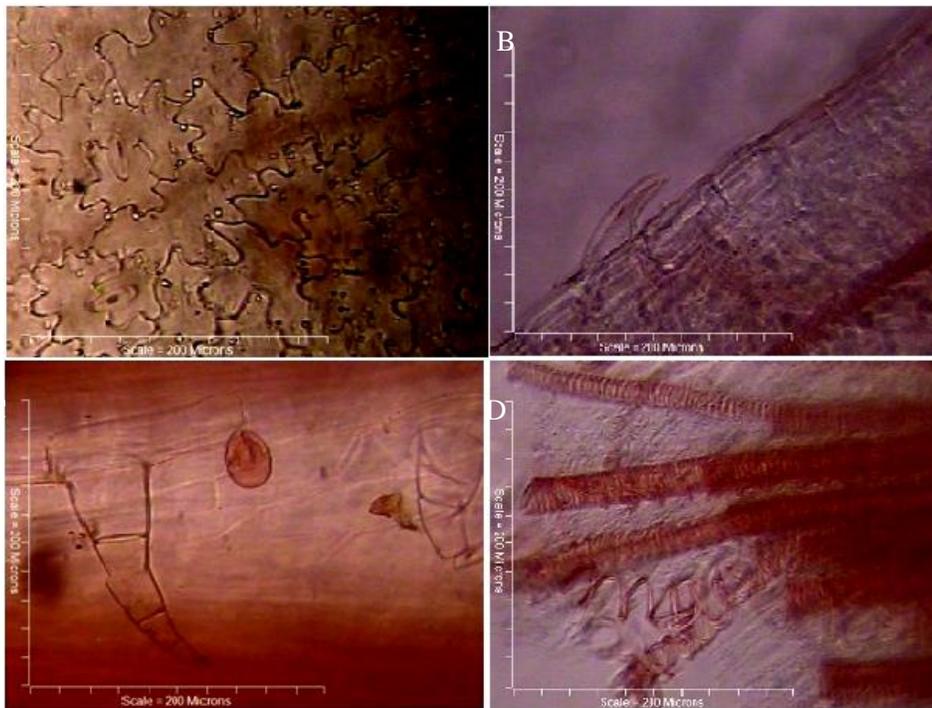


Figura 11. Diafanizado. Cara adaxial *Ocimum basilicum* var blanca. (A) Celulas epidérmicas y estomas diacíticos (B) Tricoma unicelular (C) Tricoma uniseriado y pelo glandular (D) Xilema helicoidal 400X.

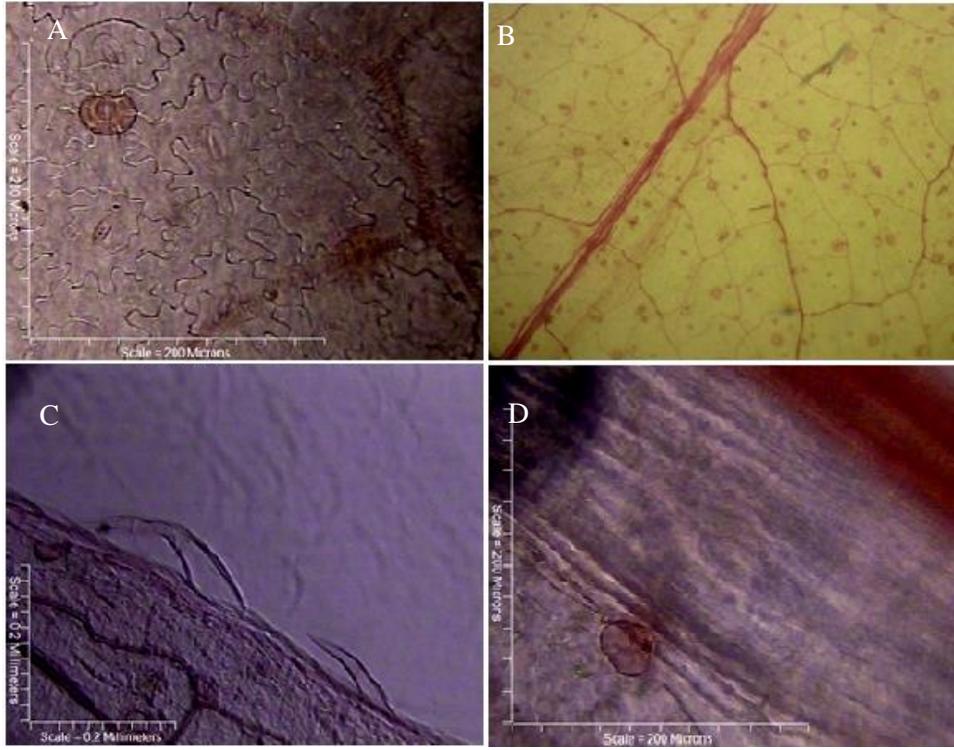


Figura 12. Diafanizado. Cara abaxial *Ocimum basilicum* var blanca. (A) Células epidérmicas (B) glándulas de aceite (C) Tricoma unicelular (D) Glándula de aceite 400X.

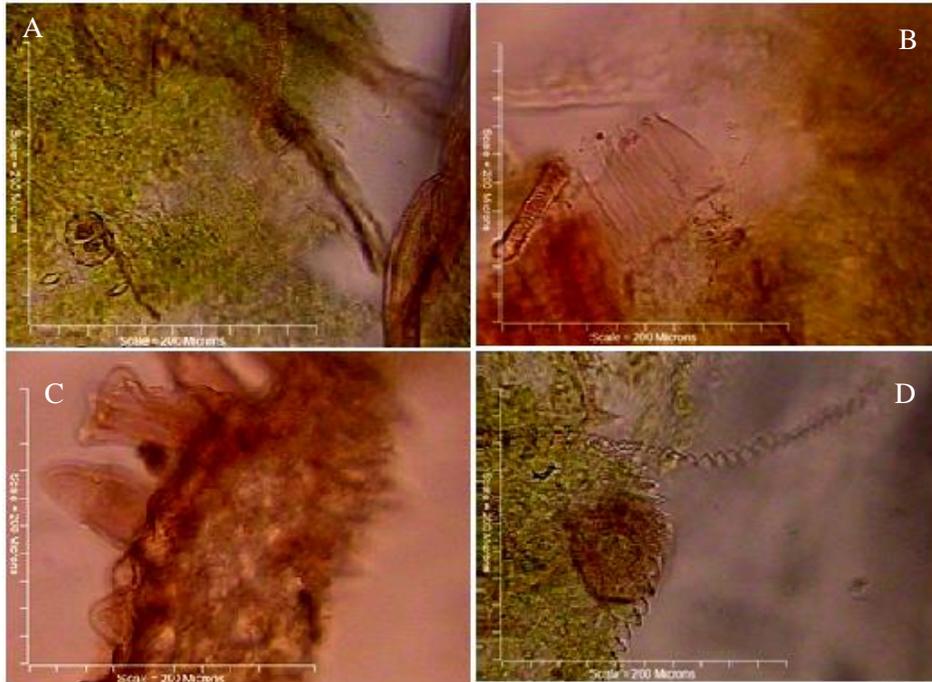


Figura 13. Disociado. *Ocimum basilicum* var blanca. (A) Escleridas y traqueidas (B) Células epidérmicas en lámina (C) Epidermis papilosa (D) Xilema helicoidal. 400X.

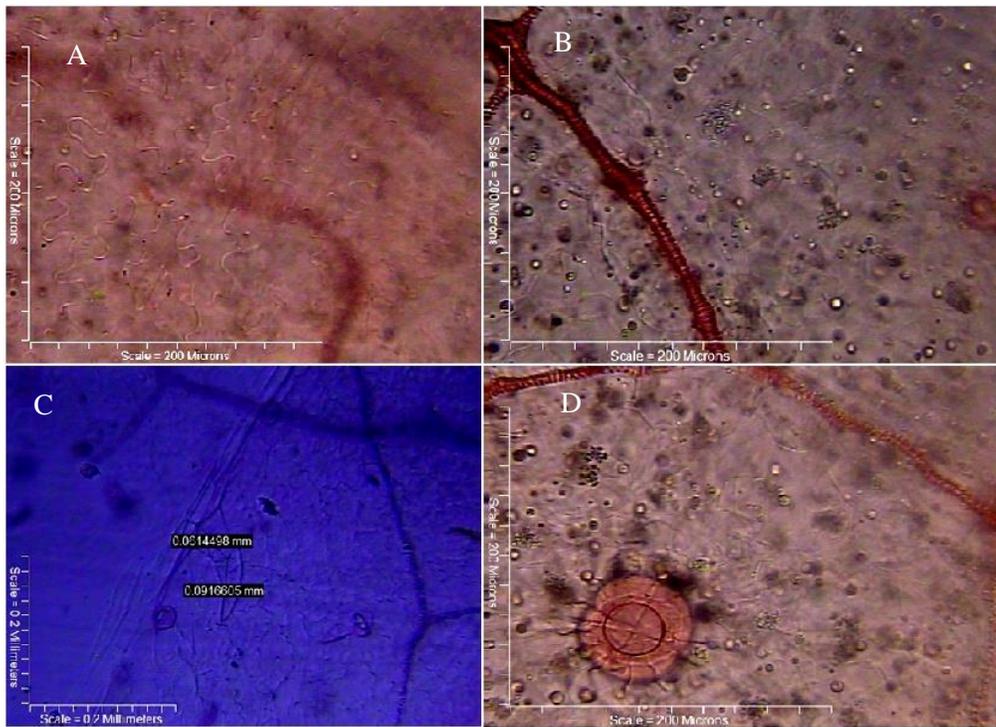


Figura 14 Diafanizado. Cara adaxial *Ocimum basilicum* var genovese. (A) Celulas epidérmicas (B) Xilema y glándulas de aceite (C) Tricoma uniseriado (D) Tricoma globoso. 400X.

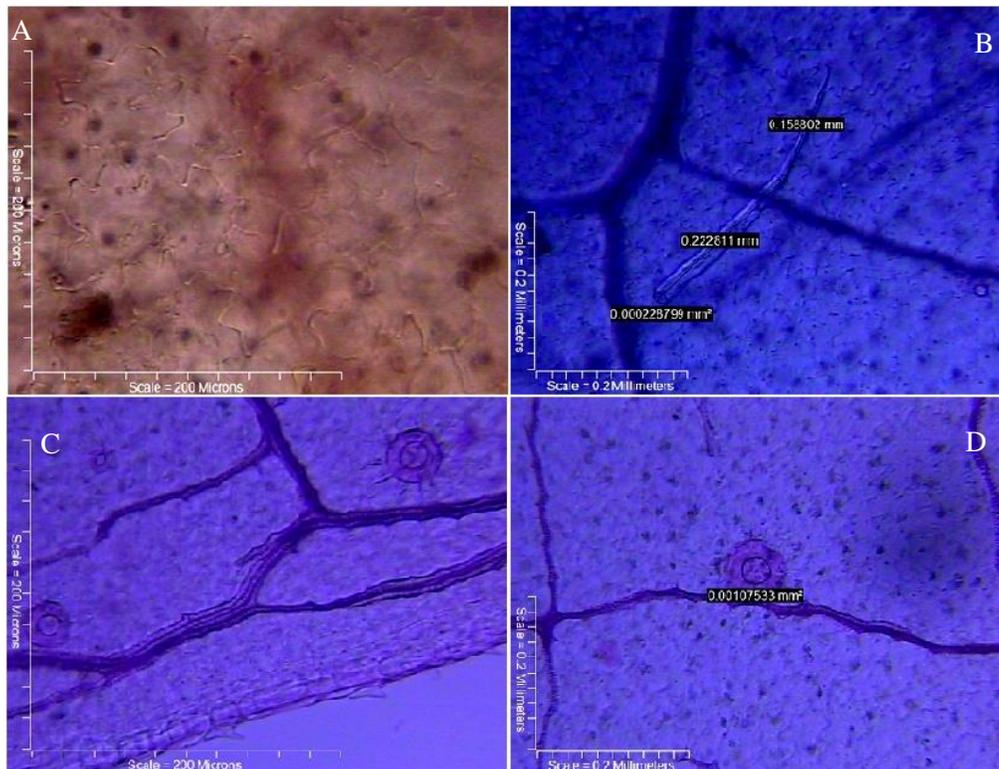


Figura 15: Diafanizado. Cara adaxial *Ocimum basilicum* var genovese. (A) Celulas epidérmicas (B) Tricoma alargado (C) Tricoma globoso (D) Tricoma globoso y glándulas de aceite. 400X.

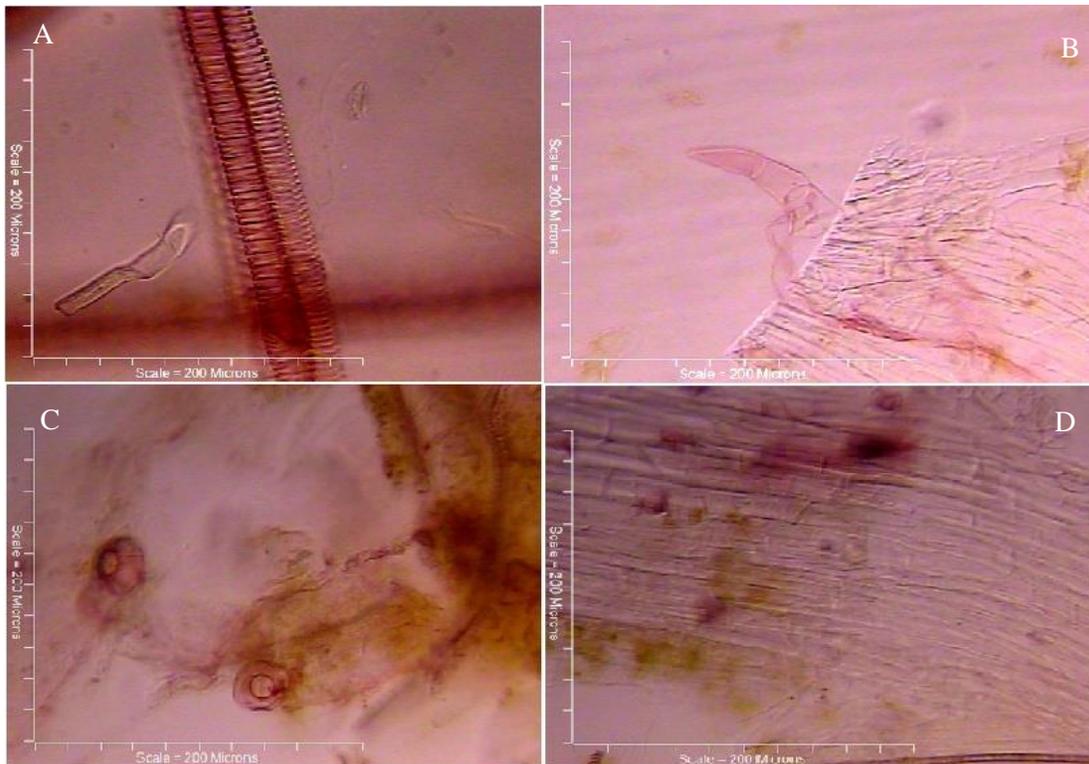


Figura 16: Disociado. *Ocimum basilicum* var genovese. (A) Segmento de nervadura central (B) Tricoma bicelular (C) Tricomas globosos (D) Esclerida 400X.

2. Pecíolo

a. *Ocimum basilicum* var morada

En el corte transversal se observa de contorno semicircular, posee la cara ventral limitado por lóbulos. La epidermis es uniestratificada con células redondeadas, por debajo de esta se muestra un colénquima angular 1-2 celular. Se observa un haz colateral en forma de arco, rodeado por parénquima, el floema se encuentra acompañado de pequeñas secciones de esclerénquima. En la cara ventral se observa colénquima angular 2-4 celular; en dirección a cada uno de los lóbulos se observan dos hacecillos con casquetes de colénquima. Se

observan también pelos glandulares de tres tipos, unos de pie corto unicelular y cabeza globosa unicelular, y los otros de pie alto unicelular y cabeza globosa y no glandulares tricomas simples uniseriados de 2-3 celular (Figura 17 A).

b. Ocimum basilicum var blanca

En el corte transversal se observa la epidermis uniestratificada con células redondeadas, por debajo de esta se muestra un colénquima angular 1-2 celular. En la cara ventral se observa colénquima angular 2-4 celular; en dirección a cada uno de los lóbulos se observan dos hacecillos con casquetes de colénquima. Se observa un haz colateral en forma de arco, rodeado por parénquima, el floema se encuentra acompañado de pequeñas secciones de esclerénquima. En la cara ventral se observa colénquima angular 2-4 celular; en dirección a cada uno de los lóbulos se observan dos hacecillos con casquetes de colénquima. En la cara adaxial se observan algunos tricomas simples uniseriados de 2-3 células (Figura 17 B).

c. Ocimum basilicum var genovese

En el corte transversal se observa la epidermis uniestratificada con células redondeadas, por debajo de esta se muestra un colénquima angular 1-2 celular. Se observa un haz colateral en forma de letra “C”, rodeado por parénquima, el floema se encuentra acompañado de pequeñas secciones de esclerénquima. En la cara ventral se observa colénquima angular 2-4 celular. En dirección a cada uno de los lóbulos se observan restos

de hacesillos con casquetes de colénquima. En la cara adaxial se observan algunos tricomas simples uniseriados de 2-3 células y también pelos glandulares (Figura 17 C).



Figura 17: Corte transversal de peciolo. (A) *Ocimum basilicum* var morada (B) *Ocimum basilicum* var blanca (C) *Ocimum basilicum* var morada. (A) y (C) Tinción: azul de cresil. (B) Tinción: Lugol 400X.

3. Tallo

a. *Ocimum basilicum* var morada

En el corte transversal, el tallo se presenta de forma cuadrangular, se observa la epidermis uniestratificada con células poligonales aplanadas y coloración morada (Figura 17 A); colénquima de tipo angular con células isodiamétricas 3-5 celular; por debajo se distinguen el parénquima cortical (Figura 18 A). El cilindro vascular está formado por cuatro secciones continuas separadas de forma opuesta por 1 o 2 hacesillos, separados a su vez por cambium interfascicular. Todos los haces son de tipo colateral abierto, poseen xilema endarco y se aprecia el cambium vascular. Fascículos de fibras esclerenquimáticas pericíclicas, limitan al floema. Abundante parénquima medular, ambos parénquimas presentan conductos de aceite.

El indumento está formado por tricomas de superficie uniseriados 1-3 celulares. Se observan pelos glandulares de tres tipos: de pie corto y cabeza globosa, de pie alto y cabeza globosa y glándulas de aceite con pie corto unicelular y cabeza 1-2 celular (Figura 17)

b. Ocimum basilicum var blanca

El tallo se presenta de forma cuadrangular con los cuatro extremos redondeados, epidermis unistratificada con células poligonales aplanadas, con leve coloración morada (Figura 18 B); colénquima de tipo angular con células isodiametricas de 1-3 células; por debajo se distinguen el parénquima cortical (Figura 19 B). Los haces vasculares forman casi un cilindro completo, aunque se observa cambium interfascicular en los cuatro achatamientos del tallo. Así mismo se observan elementos de los vasos del xilema y células del esclerénquima. El indumento está formado por tricomas de superficie uniseriados 1-3 celulares. Se observan pelos glandulares de tres tipos: de pié corto y cabeza globosa, de pie alto y cabeza globosa y glándulas de aceite con pié corto unicelular y cabeza 1-2 celular (Figura 18 B).

c. Ocimum basilicum var genovese

El tallo se presenta de forma cuadrangular con una hendidura pronunciada en dos de los lados opuestos, la epidermis, uniestratificada con células ovaladas a cuadrangulares con paredes tangenciales planas y cutícula prominente sin coloración característica (Figura 18 C); colénquima, con células isodiametricas 4-6 celular; por debajo se distinguen el

parénquima cortical que rodea al floema y xilema (Figura 19 C). El cilindro vascular está formado por cuatro secciones continuas separadas de forma opuesta por 1 o 2 hacesillos, separados a su vez por cambium interfascicular. Todos los haces son de tipo colateral abierto, poseen xilema en arco y se aprecia el cambium vascular. Fascículos de fibras esclerenquimáticas pericíclicas, limitan al floema. Parénquima medular abundante. El indumento está formado por tricomas de superficie uniseriados 1-3 celulares. Se observan pelos glandulares de tres tipos: de pie corto y cabeza globosa, de pie alto y cabeza globosa y glándulas de aceite con pie corto unicelular y cabeza 1-2 celular (Figura 18 C).

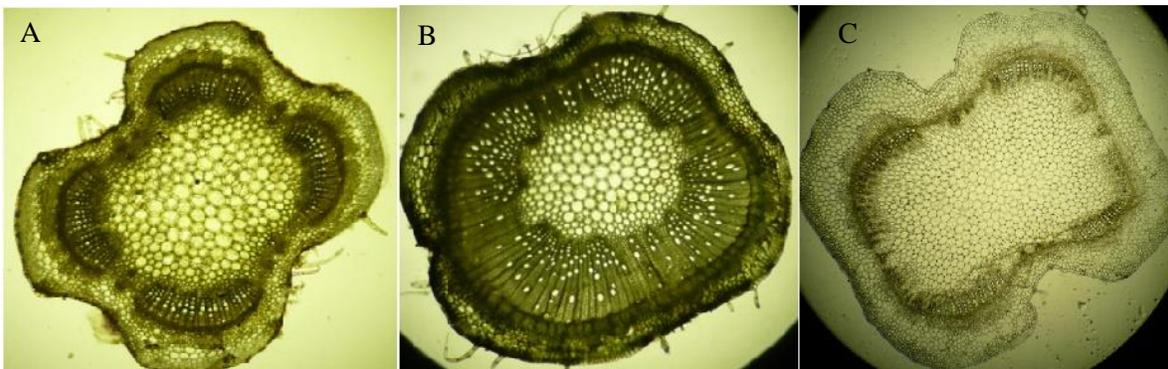


Figura 18. Corte transversal de tallo. (A) *Ocimum basilicum* var morada (B) *Ocimum basilicum* var blanca (C) *Ocimum basilicum* var genovese. (A) Tinción: Lugol (B) Tinción: Sulfato férrico y (C) Sin teñir. 400X.

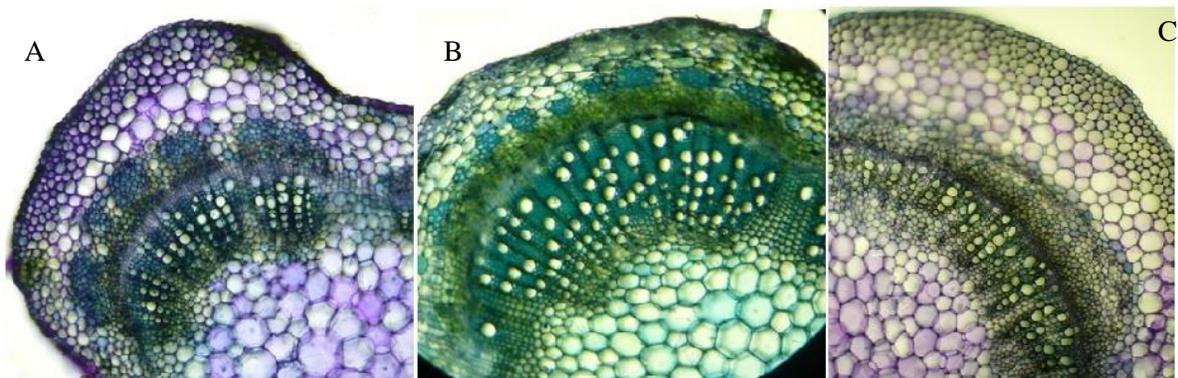


Figura 19. Corte transversal de tallo. (A) *Ocimum basilicum* var morada (B) *Ocimum basilicum* var blanca (C) *Ocimum basilicum* var morada. (A) (B) y (C) Tinción: azul de cresil. 400X.

Tabla 1. Resumen de caracteres histológicos y micromorfológicos.

Variedad	<i>O. basilicum</i> var. morada	<i>O. basilicum</i> var. blanca	<i>O. basilicum</i> var. <i>genovese</i>
Estomas diacíticos	+	+	+
Glándula productora de aceite	+	+	+
Tricoma glandular	+	+	+
Tricoma pluricelular	+	+	+
Tricoma aduncado	+	+	+
Tricoma verrucoso	+	+	+
Hoja con venación reticulada	+	+	+
Haz vascular colateral en forma de abanico en la nervadura central	+	+	-
Haz vascular colateral en forma de arco en la nervadura central	-	-	+
Tallo cuadrangular	+	+	+

+: Presente; -: Ausente

4. Índice de Estomas

Se calculó el índice de estomas para las tres variedades de *O. basilicum* y *O. micranthum*, se observa que *O. micranthum* presentó mayor índice, seguido por *O. basilicum* variedad morada, luego *O. basilicum* variedad blanca y por ultimo *O. basilicum* variedad genovese (Tabla 2).

Tabla 2. Índice de estomas encontradas en la cara abaxial y adaxial en las hojas de las plantas de estudio.

Variedad	Índice de estomas calculado
<i>Ocimum basilicum</i> var. blanca	11
<i>Ocimum basilicum</i> var. morada	14
<i>Ocimum basilicum</i> var. genovese	9
<i>Ocimum micranthum</i>	26

C. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

1. Identificación microquímica

La reacción de alcaloides fue débilmente positiva para las tres variedades de *O. basilicum*, principalmente en la nervadura central y el peciolo (Figura 20), se observaron grasas y aceites en las tres variedades, con menor proporción en la variedad genovese. Se identificaron en la cutícula, la epidermis, el parénquima empalizada y en las glándulas productoras de aceite, así también en la epidermis del peciolo y del tallo (Figura.21). La reacción de mucilagos fue moderadamente positiva en el mesófilo y en el xilema de la nervadura central para las tres variedades (Figura.22), así también como en el floema del tallo en las tres variedades (Figura 19) y (Tabla 3)

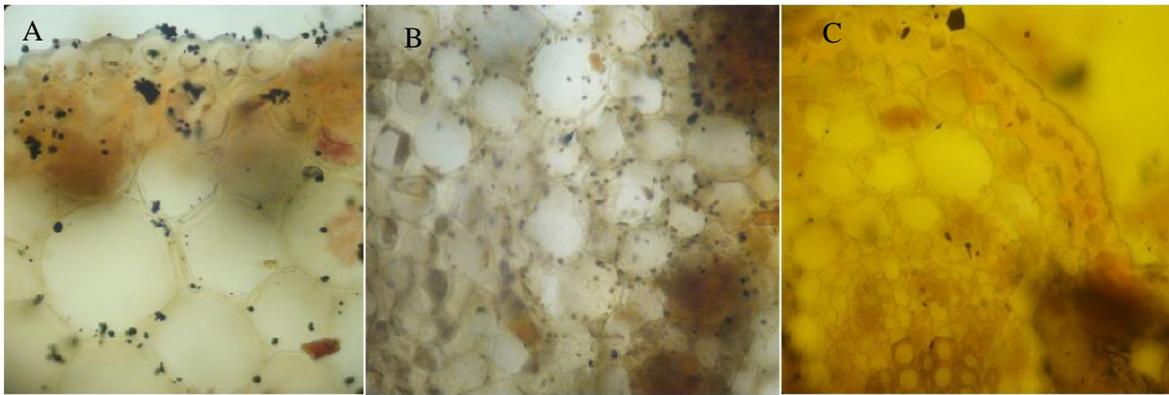


Figura 20. (A) *Ocimum basilicum* var morada (B) *Ocimum basilicum* var blanca (C) *Ocimum basilicum* var morada. (A) (B) y (C) Tinción: Dragendorff. 400X.



Figura 21. (A) *Ocimum basilicum* var morada (B) *Ocimum basilicum* var blanca (C) *Ocimum basilicum* var morada. (A) (B) y (C) Tinción: Sudan IV. 400X.

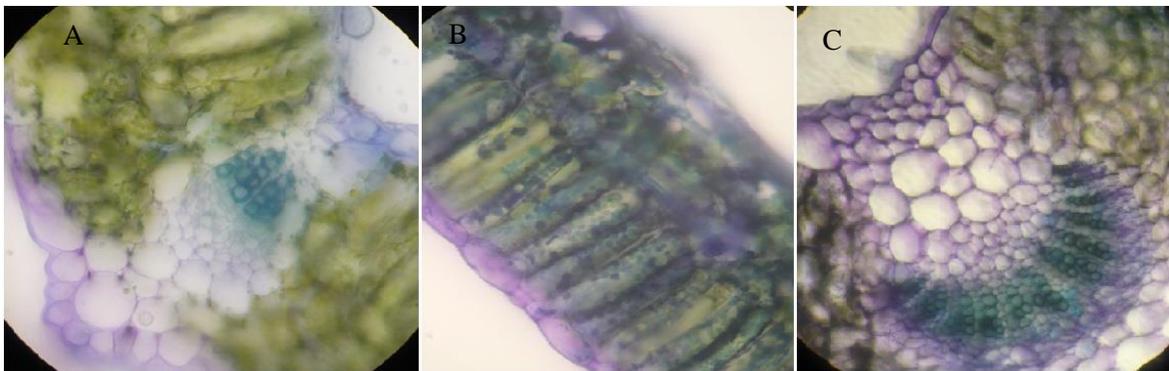


Figura 22. (A) *Ocimum basilicum* var morada (B) *Ocimum basilicum* var blanca (C) *Ocimum basilicum* var morada. (A) (B) y (C) Tinción: azul de cresil. 400X.

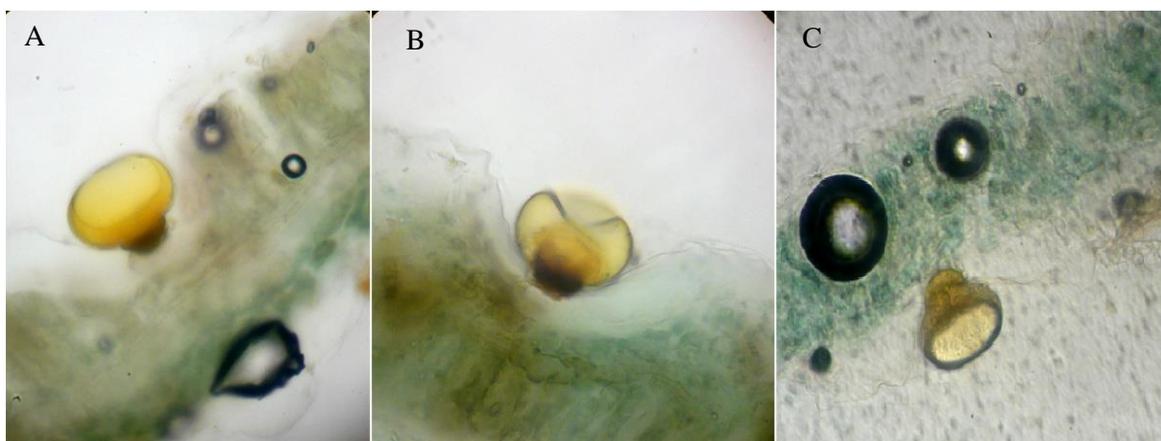


Figura 23. (A) *Ocimum basilicum* var. morada (B) *Ocimum basilicum* var. blanca (C) *Ocimum basilicum* var. morada. (A) (B) y (C) Tinción: Ácido sulfúrico. 400X.

Tabla 3. Resumen de características microquímicas de las tres variedades de *Ocimum basilicum*

Variedad	Metabolito					
	Alcaloides	Almidones	Grasas y aceites	mucilagos	Saponinas	Taninos
Hoja <i>Ocimum basilicum</i> var. blanca	±	±	++	+	+	-
Tallo <i>Ocimum basilicum</i> var. blanca	±	±	++	+	+	-
Hoja <i>Ocimum basilicum</i> var. morada	±	±	++	+	+	-
Tallo <i>Ocimum basilicum</i> var. morada	±	±	++	+	+	-
Hoja <i>Ocimum basilicum</i> var. genovese	±	±	+	+	+	-
Tallo <i>Ocimum basilicum</i> var. genovese	±	±	+	+	+	-

+: Positivo; -: Negativo; ~+: Débilmente positivo

1. Cromatografía en capa fina

Se determinó la presencia de metabolitos secundarios por medio de cromatografía en capa fina. Se obtuvo como resultado que *O. basilicum* en sus variedades morada y blanca y *O. micranthum* presentan los 4 metabolitos estudiados. *O. basilicum* en la variedad genovese

no presentó flavonoides ni saponinas, únicamente presentó alcaloides y flavonoides (Tabla 4.)

Tabla 4. Determinación de metabolitos secundarios de las plantas de estudio utilizando cromatografía en capa fina.

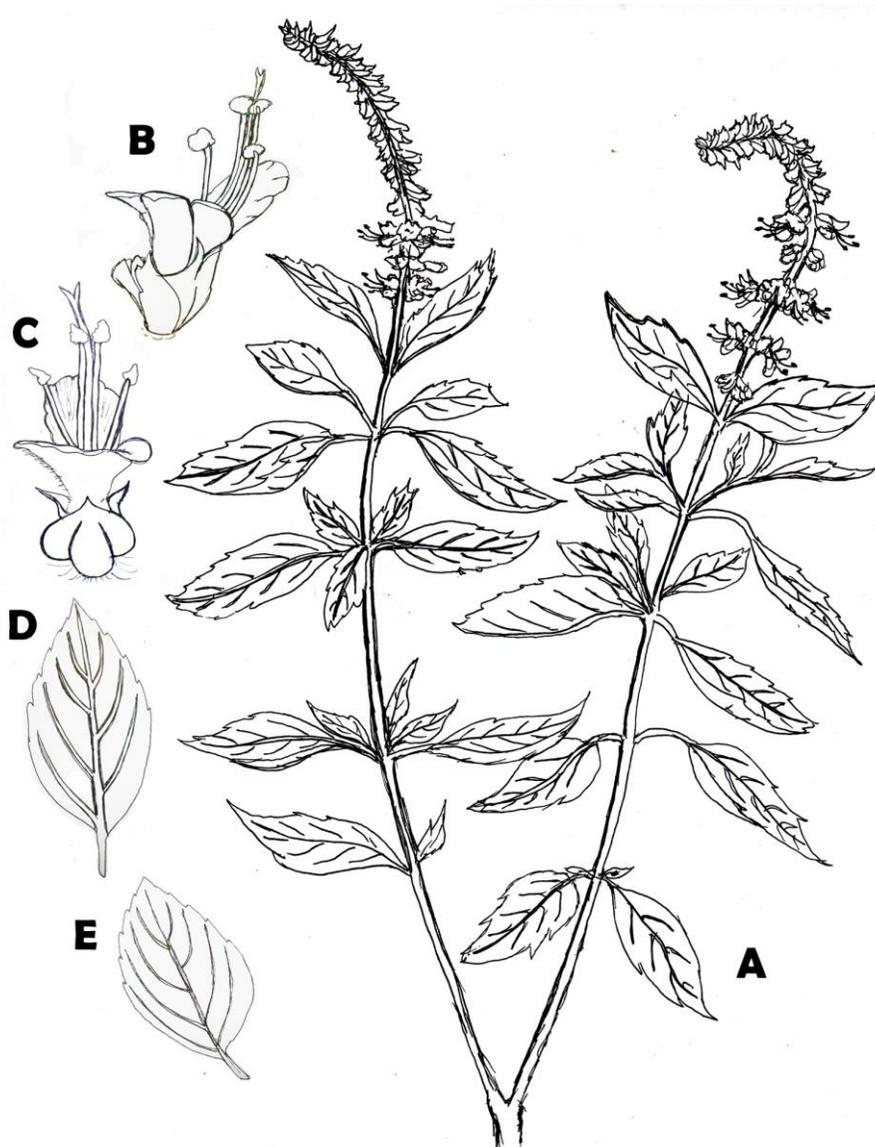
	<i>O. basilicum</i> var. morada	<i>O. basilicum</i> var. blanca	<i>O. basilicum</i> var. genovese	<i>O. micranthum</i>
Aceites volátiles	+	+	+	+
Alcaloides	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	-	+
Saponinas	+	+	-	+

+: Presente; -: Ausente

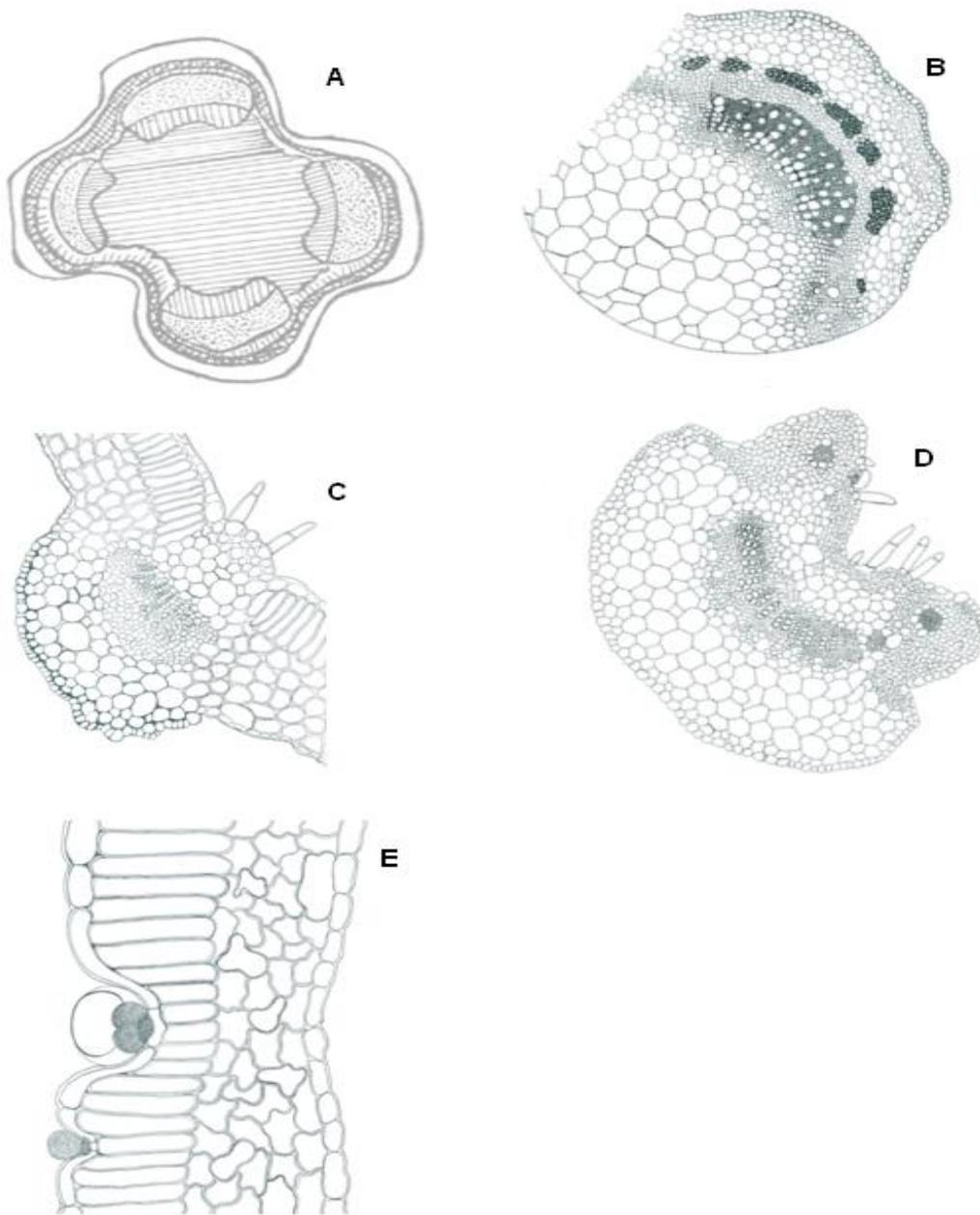
D. CARTILLA MICROGRÁFICA

En base a la morfología de la droga fresca, a los cortes realizados y las imágenes obtenidas de hoja, peciolo y tallo de cada una de las tres variedades de *O. basilicum*, se realizaron las respectivas cartillas micrográficas

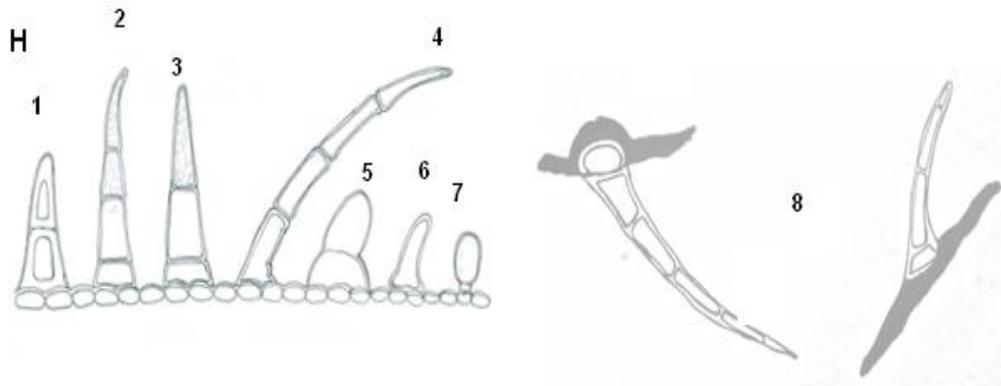
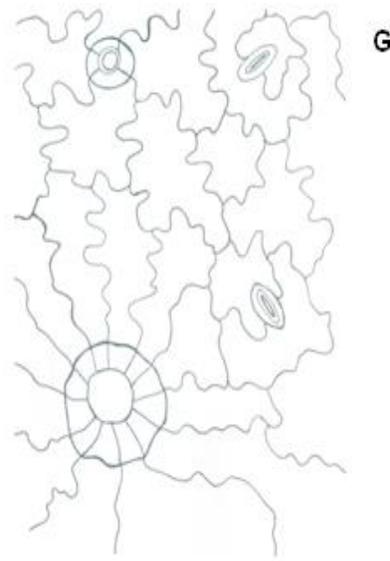
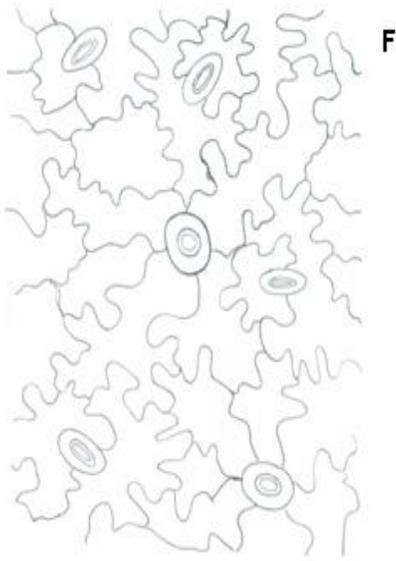
1. *Ocimum basilicum* var. *morada*



A. Rama florida; B. Corola y cáliz florífero en vista lateral; C. Vista frontal de del cáliz florífero y la corola mostrando los estambres; D. Vista abaxial de la hoja E. Vista adaxial de la hoja



A. Vista de corte transversal de tallo **B.** Acercamiento de estructuras vasculares de tallo **C.** Nervadura central **D.** Vista de corte transversal de peciolo **E.** Glándula de aceite en cara adaxial de hoja.

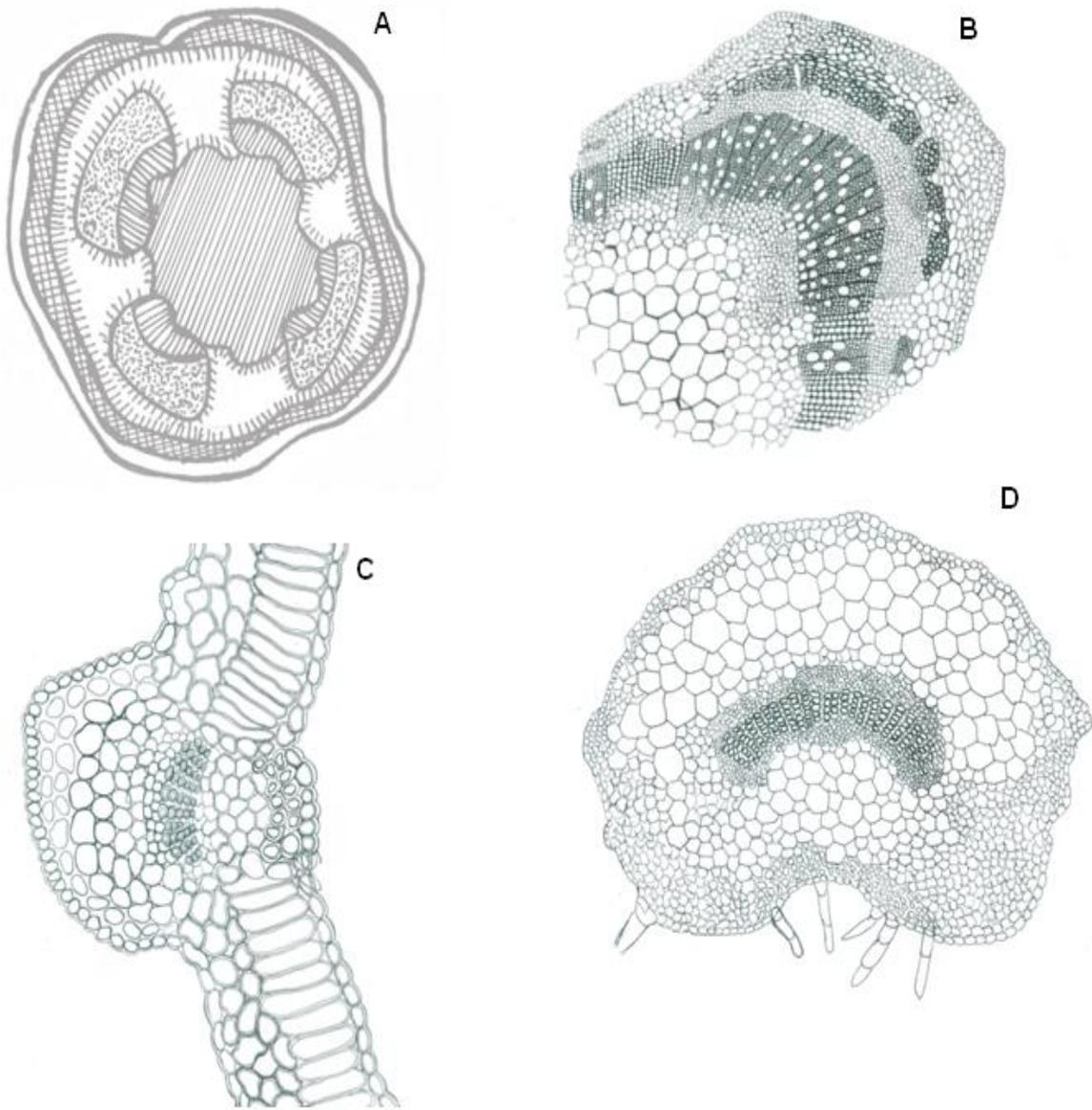


F. Estomas diacíticos en diafanizado de cara abaxial **G.** Tricoma globosa en diafanizado de cara adaxial **H.** 1. Tricoma bicelular de paredes engrosadas 2. Tricoma 4- celular verrucoso 3. Tricoma 3-celular verrucoso 4. Tricoma aduncado 5. Pelo glandular bicelular 6. Pelo glandular unicelular 7. Pelo glandular pie corto unicelular y cabeza unicelular. 8. Tricoma pluricelular curvo

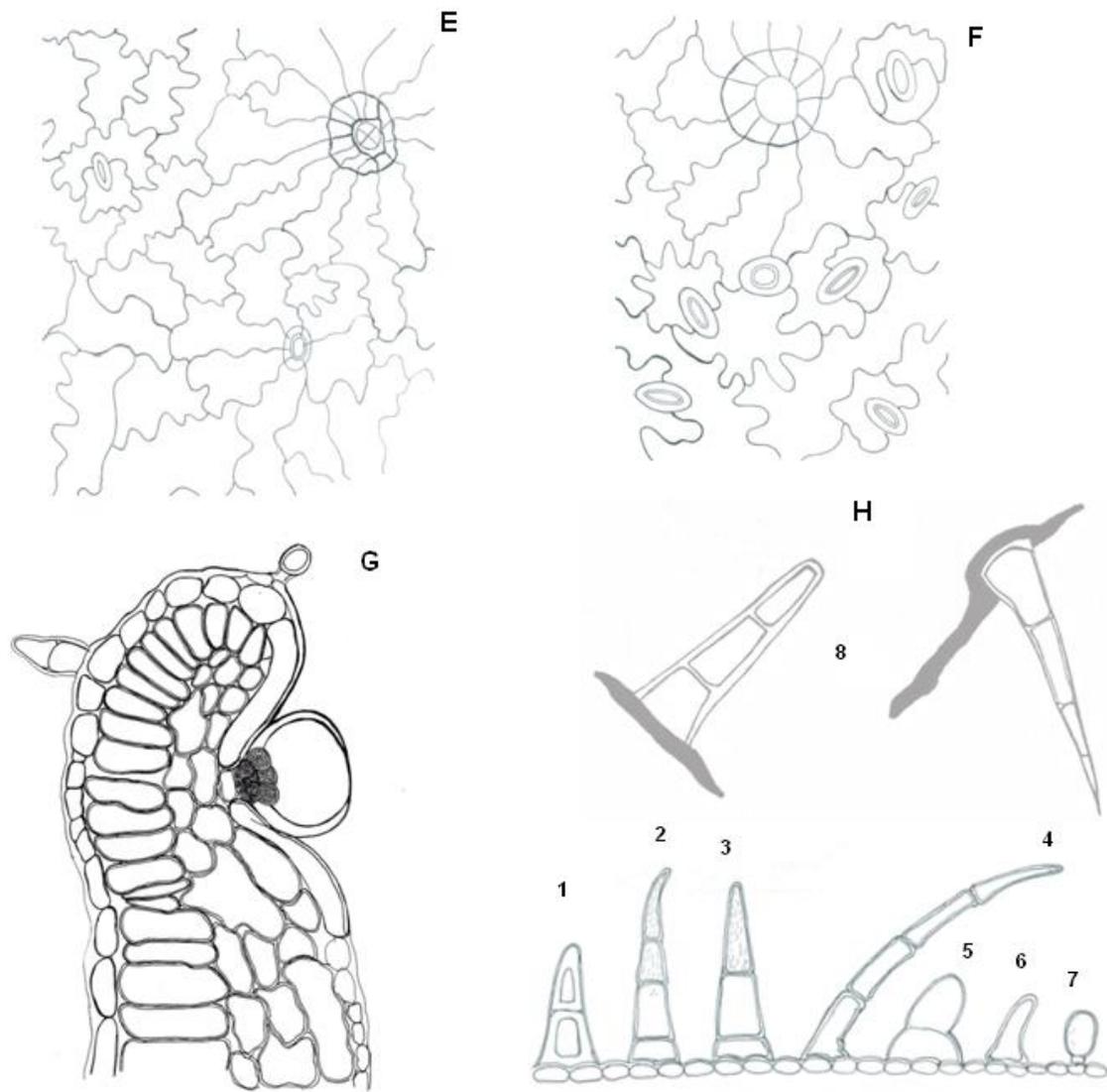
2. *Ocimum basilicum* var. *blanca*



A. Rama florida; B. Corola y cáliz florífero en vista lateral; C. Vista frontal de del cáliz florífero y la corola mostrando los estambres; D. Vista abaxial de la hoja E. Vista adaxial de la hoja

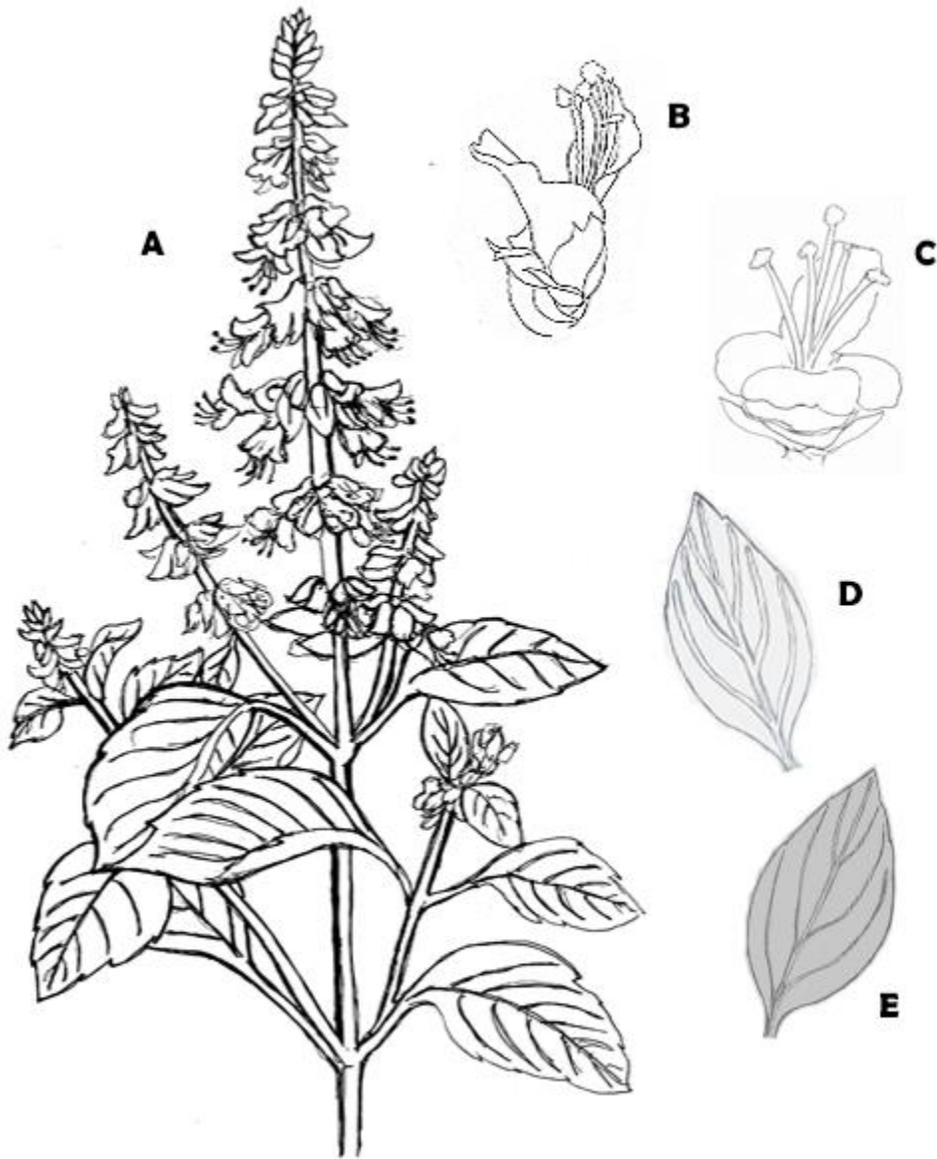


A. Vista de corte transversal de tallo **B.** Acercamiento de estructuras vasculares de tallo **C.** Nervadura central **D.** Vista de corte transversal de peciolo

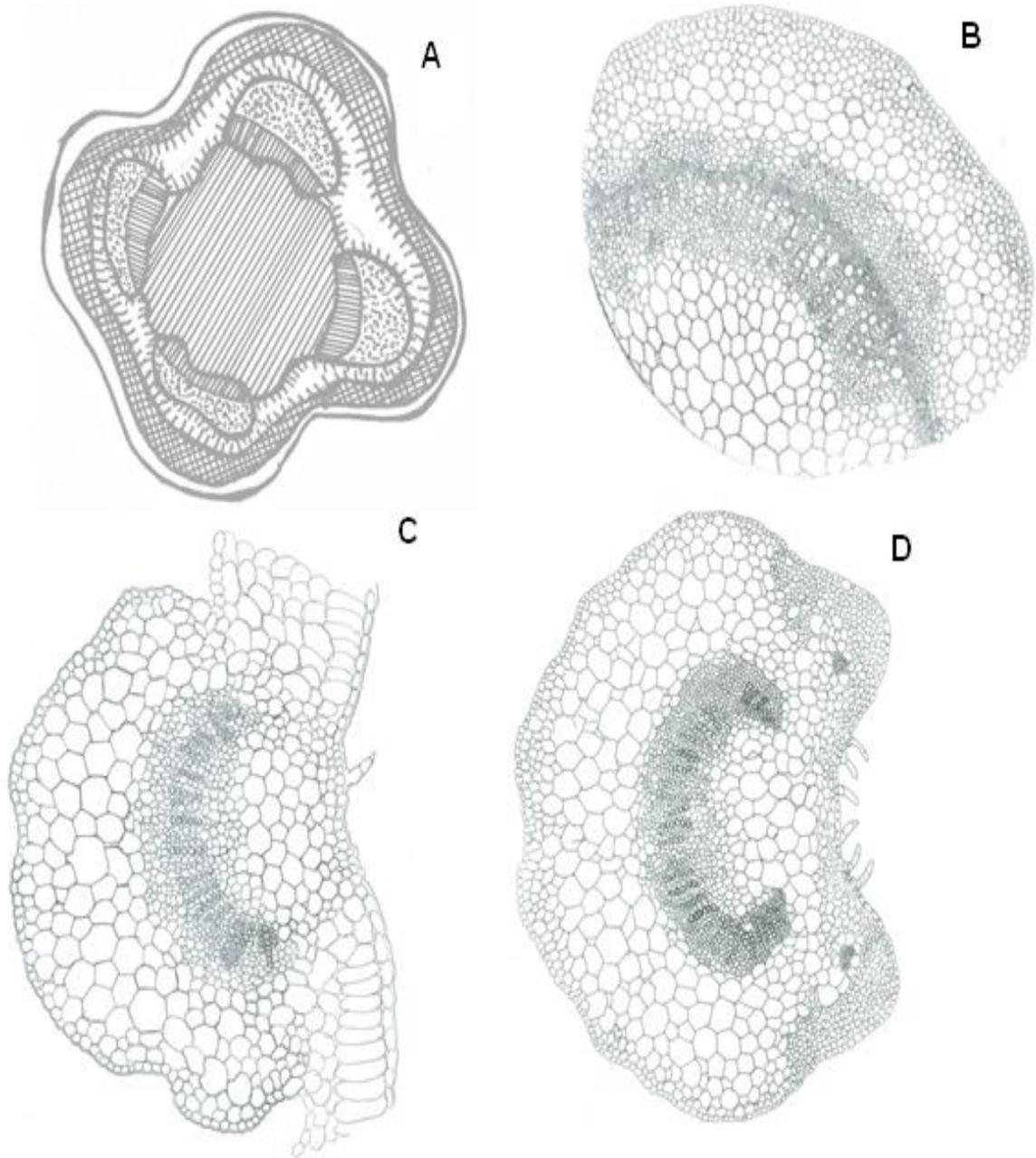


E. Estomas diacíticos en diafanizado de cara abaxial **F.** Tricoma globosa en diafanizado de cara adaxial **G.** **H.** 1. Tricoma bicelular de paredes engrosadas 2. Tricoma 4-celular verrucoso 3. Tricoma 3-celular verrucoso 4. Tricoma aduncado 5. Pelo glandular bicelular 6. Pelo glandular unicelular 7. Pelo glandular pie corto unicelular y cabeza unicelular 8. Tricoma pluricelular curvo

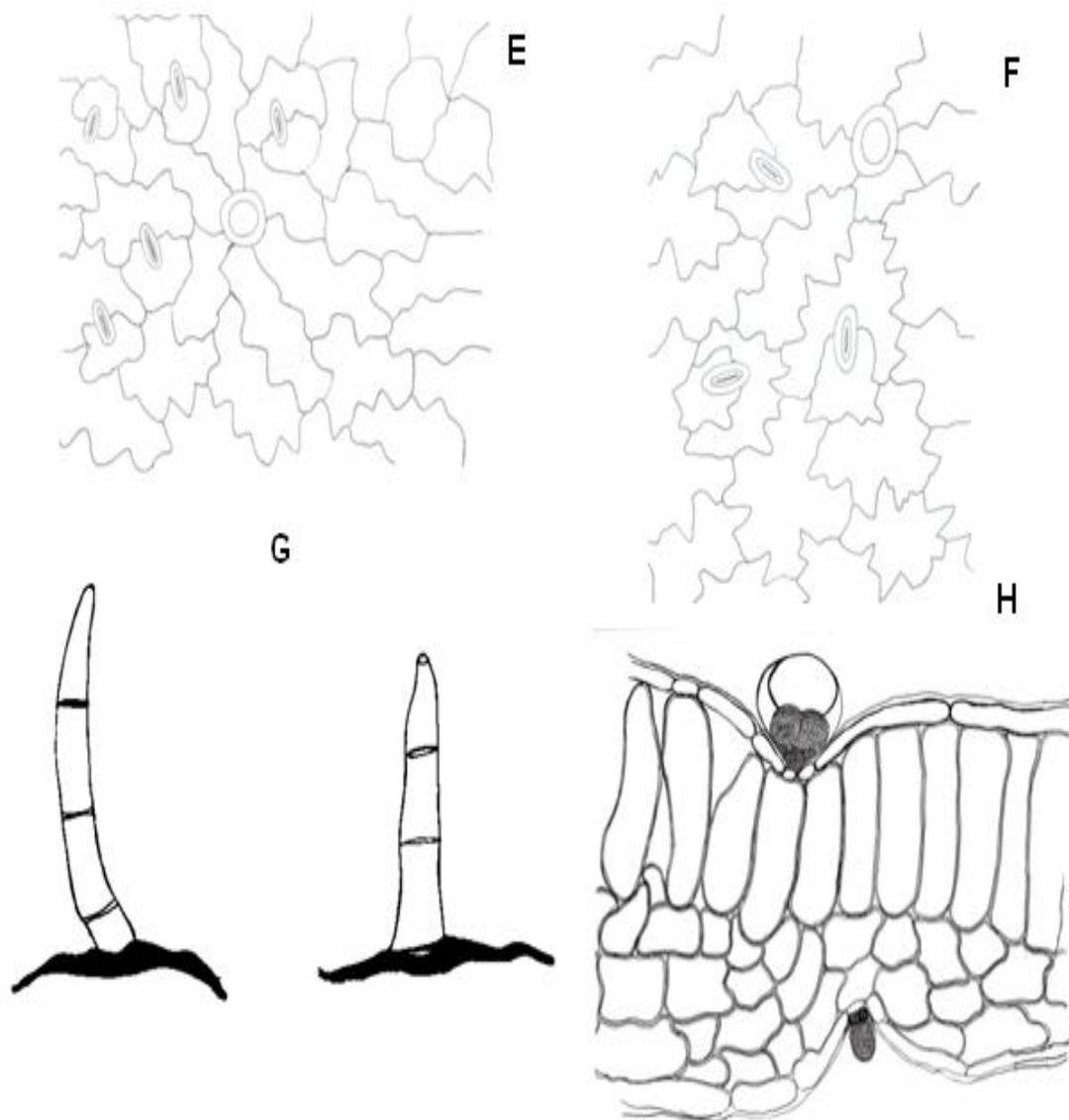
3. *Ocimum basilicum* var. *genovese*



A. Rama florida; **B.** Corola y cáliz florífero en vista lateral; **C.** Vista frontal de del cáliz florífero y la corola mostrando los estambres; **D.** Vista abaxial de la hoja **E.** Vista adaxial de la hoja



A. Vista de corte transversal de tallo **B.** Acercamiento de estructuras vasculares de tallo **C.** Nervadura central **D.** Vista de corte transversal de peciolo



E. Estomas diacíticos en diafanizado de cara abaxial **F.** Tricoma globosa en diafanizado de cara adaxial **G.** Tricomas pluricelulares uniseriados de 3-4 celular **H.** Glandula de aceite en mesofilo.

E. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y CONTENIDO DE CENIZAS TOTALES

Se determinaron parámetros fisicoquímicos de humedad y contenido de cenizas totales a las tres variedades de *O. basilicum* y comparando con lo que se encontraba reportado para *O. micranthum*. Primeramente se observó que se obtuvo mayor porcentaje de humedad en *O. micranthum* seguido por *O. basilicum* variedad blanca y por último en proporción similar *O. basilicum* variedades morada y genovese. En el porcentaje de cenizas totales, se obtuvo que *O. basilicum* variedad morada es la que presentó mayor este parámetro, seguido de *O. basilicum* variedad blanca luego *O. micranthum* y por último *O. basilicum* variedad genovese. Debido a que *O. basilicum* variedad blanca y variedad morada presentaron cenizas totales mayores a 10, se les realizó la prueba de cenizas ácidas insolubles (Tabla 5). Se realizó el análisis estadístico de estos parámetros con la prueba de Kruskal- Wallis para determinar si existía diferencia o no entre las tres variedades de *O. basilicum* y *O. micranthum*. No se evidenció diferencia significativa para ninguno de los dos parámetros (Tablas 6 y 7)

Tabla 5. Porcentaje de humedad, cenizas ácidas insolubles y totales de las plantas a estudio.

Variedad	<i>O. basilicum</i> var. morada	<i>O. basilicum</i> var. blanca	<i>O.</i> <i>basilicum</i> var. <i>genovese</i>	<i>O.</i> <i>micranthum</i> *
Porcentaje de humedad (%)	7.49	9.01	7.47	11.43
Cenizas totales (%)	13.98	12.73	6.67	8.74
Cenizas ácidas insolubles (%)	2.48	2.44	N/A	N/A

N/A: No aplica debido a que el % de cenizas totales no es mayor a 10%.

Tabla 6. Análisis estadístico de Porcentaje de Humedad de las variedades

	X	S	NC (95.0%)	IC (95.0%)	P
<i>O. basilicum</i> variedad morada	7.55	0.72	2.11	5.43-9.66	0.000458962
<i>O. basilicum</i> variedad blanca	9.05	0.47	1.70	7.35-10.75	
<i>O. basilicum</i> variedad genovese	7.52	0.57	1.87	5.66-9.39	
<i>O. micranthum</i>	11.30	0.16	0.99	10.32-12.29	

X= Media; S=desviación estándar; NC= nivel de confianza; IC= intervalo de confianza;

Tabla 7. Análisis estadístico de Cenizas totales de las variedades

	X	S	NC (95.0%)	IC (95.0%)	P
<i>O. basilicum</i> variedad morada	13.98	0.01	10.33	0.41-21.07	6.82X10 ⁻⁸
<i>O. basilicum</i> variedad blanca	12.73	0.12	8.55	1.50-18.60	
<i>O. basilicum</i> variedad genovese	6.69	0.17	2.98	2.78-8.75	
<i>O. micranthum</i>	8.80	0.38	3.90	3.70-11.51	

X= Media; S=desviación estándar; NC= nivel de confianza; IC= intervalo de confianza;

F. RENDIMIENTO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS Y ACEITES ESENCIALES

Se midió el rendimiento en porcentaje de los extractos acuosos y de aceites esenciales. Se obtuvo mayor rendimiento de extracto y aceite en la *O. basilicum* variedad morada y menor porcentaje de extracto y aceite en *O. basilicum* variedad blanca (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de rendimiento de extractos y aceites esenciales de las plantas a estudio.

Variedad	<i>O. basilicum</i> var. morada	<i>O. basilicum</i> var. blanca	<i>O. basilicum</i> var. genovese	<i>O.</i> <i>micranthum</i>
Porcentaje de rendimiento del extracto (%)	91.26	32.30	57.86	--
Porcentaje de rendimiento del aceite esencial (%)	4.03	1.39	1.75	3.16

G. TOXICIDAD

Se determinó la actividad larvicida en los aceites esenciales y los extractos de las cuatro plantas estudiadas. Ninguna de estas presentó actividad larvicida utilizando *Aedes aegypti* (Tabla 9) ni utilizando *Anopheles albimanus* (Tabla 10).

Así mismo se realizaron pruebas de toxicidad aguda en *Artemia salina* y ninguna de las cuatro plantas estudiadas lo presentó (Tabla 11).

Tabla 9. Tamizaje de la actividad larvicida utilizando *Aedes aegypti* con los aceites esenciales y extractos etanólicos de las plantas de estudio.

CP	CN	CSEE	CSAE	EA	EB	EC	ED	AA	AB	AC	AD
□											
	Larvas de primer estadío										
100%	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	Larvas de segundo estadío										
100%	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	Larvas de tercer estadío										
100%	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	Larvas de cuarto estadío										
100%	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0

CP: Contenido en el pozo; **□:** Concentración; **CN:** Control negativo; **CSEE:** Control solvente extracto etanólico al 50%; **CSAE:** Control solvente aceite esencial (N-pentano); **EA:** Extracto etanólico *Ocimum basilicum* variedad morada; **EB:** Extracto etanólico *Ocimum basilicum* variedad blanca; **EC:** Extracto etanólico *Ocimum basilicum* variedad genovese; **ED:** Extracto etanólico *Ocimum micranthum*; **AA:** Aceite esencial *Ocimum basilicum* variedad morada; **AB:** Aceite esencial *Ocimum basilicum* variedad blanca; **AC:** Aceite esencial *Ocimum basilicum* variedad genovese; **AD:** Aceite esencial *Ocimum micranthum*
Los valores presentados en la tabla indican: Número de nauplios iniciales/Número de nauplios muertos

Tabla 10. Tamizaje de la actividad larvicida utilizando *Anopheles albimanus* con los aceites esenciales y extractos etanólicos de las plantas de estudio.

CP	CN	CSEE	CSAE	EA	EB	EC	ED	AA	AB	AC	AD
100%	Larvas de primer estadío										
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
100%	Larvas de segundo estadío										
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
100%	Larvas de tercer estadío										
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
100%	Larvas de cuarto estadío										
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0

CP: Contenido en el pozo; []: Concentración; CN: Control negativo; CSEE: Control solvente extracto etanólico al 50%; CSAE: Control solvente aceite esencial (N-pentano); EA: Extracto etanólico *Ocimum basilicum* variedad morada; EB: Extracto etanólico *Ocimum basilicum* variedad blanca; EC: Extracto etanólico *Ocimum basilicum* variedad genovese; ED: Extracto etanólico *Ocimum micranthum*; AA: Aceite esencial *Ocimum basilicum* variedad morada; AB: Aceite esencial *Ocimum basilicum* variedad blanca; AC: Aceite esencial *Ocimum basilicum* variedad genovese; AD: Aceite esencial *Ocimum micranthum*

Los valores presentados en la tabla indican: Número de nauplios iniciales/Número de nauplios muertos

Tabla 11. Citotoxicidad contra *Artemia salina* con los aceites esenciales y extractos etanólicos de las plantas de estudio.

CP	CN	CSEE	CSAE	EA	EB	EC	ED	AA	AB	AC	AD
□											
100%	10/0	10/0	10/0	10/1	10/1	10/0	10/1	10/0	10/0	10/0	10/0
	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
50%				10/0	10/1	12/0	10/1	11/0	11/1	10/0	10/0
				10/0	10/0	10/0	11/0	10/0	11/0	10/0	10/0
				10/0	11/0	10/0	12/0	10/0	10/0	11/0	10/0
25%				10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
				10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
				10/0	10/0	10/0	10/0	11/0	10/0	10/0	11/0

CP: Contenido en el pozo; **□:** Concentración; **CN:** Control negativo; **CSEE:** Control solvente extracto etanólico al 50%; **CSAE:** Control solvente aceite esencial (N-pentano); **EA:** Extracto etanólico *Ocimum basilicum* variedad morada; **EB:** Extracto etanólico *Ocimum basilicum* variedad blanca; **EC:** Extracto etanólico *Ocimum basilicum* variedad genovese; **ED:** Extracto etanólico *Ocimum micranthum*; **AA:** Aceite esencial *Ocimum basilicum* variedad morada; **AB:** Aceite esencial *Ocimum basilicum* variedad blanca; **AC:** Aceite esencial *Ocimum basilicum* variedad genovese; **AD:** Aceite esencial *Ocimum micranthum*
 Los valores presentados en la tabla indican: Número de nauplios iniciales/Número de nauplios muertos

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se realizó una comparación de los caracteres de identidad de dos especies del género *Ocimum* cultivadas en Guatemala, para lo cual se analizaron los resultados del género *O. micranthum* reportados por Castillo y Pérez (2011), y se compararon con los resultados obtenidos en el presente estudio, para tres variedades del género *Ocimum basilicum* (variedades morada, blanca y genovese).

La descripción botánica para el género *O. basilicum* y sus tres variedades coincide con lo reportado por diferentes autores, diferenciándose la variedad morada y la blanca por la coloración de sus hojas y flores y con la variedad genovese por la forma y tamaño de las hojas (Ryding, 1994). Esta descripción difiere con la de *O. micranthum* tanto en la forma, tamaño y coloración de sus hojas y el tamaño de la planta (Castillo & Perez, 2011).

En el corte transversal (CT) de la hoja de *O. basilicum* var. Morada, se observa una coloración morada característica de la epidermis, la cual difiere de las otras dos variedades y de lo reportado para la especie *O. micranthum* (Castillo & Perez, 2011), las cuales no presentan esta coloración. Esta es una característica diagnóstica al momento de identificar microscópicamente las variedades y especies de albahaca.

Según lo reportado por Castillo y Pérez (2011) para *O. micranthum*, la lámina en el CT presenta una cutícula delgada seguida de una epidermis uniestratificada con células heterogéneas, lo cual es similar a lo encontrado para las tres variedades de *O. basilicum*.

Tanto en *O. micranthum* (Castillo & Pérez, 2011) como en las tres variedades de *O. basilicum*, el parénquima en empalizada ocupa un poco más de la mitad del mesófilo y el resto está conformado por parénquima esponjoso, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura para *O. basilicum* (Sam, de la Luz & Barroso, 2002).

La disposición de los tejidos en el CT de la nervadura central encontrada en este estudio para *O. basilicum*, var blanca y morada, coincide con lo reportado para *Ocimum micranthum* (Castillo & Pérez, 2011), ya que en ambas especies se observa una disposición colateral en el haz vascular en forma de abanico. La disposición del haz vascular en *Ocimum basilicum* var genovese es con un ángulo más cerrado que el de las otras variedades presentando una forma de arco, constituye una característica distintiva de la variedad.

La presencia de pelos glandulares y no glandulares se relaciona con funciones de protección a la planta pero su mayor importancia se encuentra con el valor para la identificación de especies (Rendón-Carmona, Ishiki-Ishihara Terrazas, & Nieto-López, 2006). En el indumento de las tres variedades se observan distintos tipos de pelos no glandulares que se encuentran sobreelevados en la epidermis, la mayoría son pluricelulares uniseriados de 3 a 5 células, algunos son agudos y curvos con paredes engrosadas y algunas levemente verrucosas, estas variedades de tricomas son características de la familia Lamiaceae (Solerender, 1908; Metcalfe & Chalk, 1979). Así también la morfología y el número de células tanto en el pie como en la cabeza secretora de los pelos glandulares, concuerda con lo descrito por Castillo y Pérez (2011) para *O. micranthum* y también descrito en la literatura para algunos géneros de la familia (Novoa, Monti & Viscaino, 2005). Por lo

que esta característica no posee valor diagnóstico para diferenciar entre especies y variedades.

En el CT del peciolo, se observaron varias similitudes en las tres variedades, ya que poseen un contorno cóncavo-convexo, un haz vascular en disposición colateral, y las tres poseen lóbulos prominentes, redondeados con restos de hacecillos con casquetes de colénquima angular sub epidérmico, característico de la familia Lamiaceae (Disapio, Bueno, Busilacchi, Quiroga & Severin, 2011).

En los cortes realizados en el tallo se observó que las tres variedades de *O. basilicum* presentaron un tallo en forma cuadrangular con vértices muy pronunciados, lados deprimidos y una pequeña prominencia en la zona media. En la zona cortical de los vértices por debajo de la epidermis, se observó colénquima angular que ocupa una gran parte del vértice, y en las prominencias de los lados se reduce el número de capas de colénquima observando principalmente parénquima angular y seguido de este el floema y el xilema en disposición colateral, lo cual concuerda con lo reportado para *O. micranthum* (Castillo & Pérez, 2011), en donde también se describe la presencia de glándulas productoras de aceite, tricomas glandulares así como uniseriados tipo tector de dos o más células en el limbo, como lo observado en el presente estudio y lo cual constituye una característica general para otras especies de labiadas (Novoa, Monti & Vizcaíno, 2006, Disapio, Bueno, Busilacchi, Quiroga & Severin, 2011), por lo que este hallazgo puede ser utilizado para identificar la familia, sin embargo no es distintivo de la especie.

Se determinó el índice de estomas para cada variedad de *O. basilicum* y se comparó con lo reportado por Castillo & Perez (2011) para *O. micranthum*, siendo esta última la que presenta un índice más alto, seguido por la variedad morada, luego la variedad blanca y por último la variedad genovese. Se ha observado que el índice de estomas es variable según las condiciones ambientales a la que el material vegetal se encuentre expuesto (Torral, Manriquez, Navarro, Tersi & Naulin, 2010). Ya que la materia vegetal fue recolectada en diferentes regiones del país en donde se presentan diversas condiciones ambientales, es posible que por esta razón presenten variación en el índice de estomas entre variedades y especies.

Tanto el diafanizado de hoja como el disociado de hoja de todas las muestras evidenciaron la presencia de las mismas estructuras las cuales pueden ser utilizadas en el control de calidad de la especie, mas no de la variedad.

Se determinó la presencia de metabolitos secundarios por medio de cromatografía en capa fina, las variedades moradas y blancas no presentaron diferencia con lo reportado por Castillo y Pérez (2011) para *O. micranthum*.

O. basilicum en su variedad genovese difiere en presencia de metabolitos secundarios con las otras dos variedades y con lo reportado para *O. micranthum* (Castillo & Pérez, 2011), ya que no presentó flavonoides y saponinas, por lo que este dato puede ser de utilidad para diferenciar propiedades farmacológicas ya que los flavonoides confieren propiedades antioxidantes (Martínez, González, Cukebras & Tuñón, 2002) y las saponinas propiedades

hipocolesteromizante, por lo que una mala identificación puede interferir con las propiedades medicinales atribuidas a la especie.

Se realizaron pruebas de pureza para las tres variedades y se compararon con lo reportado para *O. micranthum*. Se encontró que la variedad morada y la variedad genovese son las que presentan menor porcentaje de humedad, y *O. micranthum* es la que presenta más elevado este parámetro. Así también se determinó el porcentaje de cenizas totales, obteniéndose en mayor porcentaje en la variedad blanca y la morada, lo que determina que poseen mayor cantidad de residuos fisiológicos de la planta. Debido a que la variedad blanca y morada presentaron un porcentaje de cenizas totales elevado, se realizó la prueba de cenizas insolubles en ácido las cuales miden la cantidad de sílice presente, especialmente como arena y tierra silíceas. Estas dos variedades fueron cultivadas en el mismo suelo por lo que concuerda la similitud del resultado de cenizas. Cabe resaltar que para futuros estudios es importante el análisis del suelo de donde se recolectan las variedades para tomar en cuenta en parámetros de control de calidad. Estos resultados proporcionan información para el control de calidad de la materia vegetal.

Los estudios con extractos acuosos y aceites esenciales de diversas plantas han colaborado con el control vectorial de diversas enfermedades, se centra en la eliminación del estado larvario de los mosquitos, reportándose más de 140 especies de plantas con propiedades larvicidas (Pérez, Rodríguez, Lara, Montes & Ramirez, 2004).

De los aceites esenciales y extractos etanólicos estudiados, ninguno presentó actividad larvicida contra *Anophelesalbimanus* y *Aedes aegypti* en los cuatro estadios larvarios en tres distintas diluciones (100%, 50% y 25 %) por lo que el CL 100% > 1 mg/dL. Estos resultados son concordantes con lo reportado por otros autores, ya que el estudio de Murugan, Murugan & Noortheen (2007), el extracto de *O. basilicum* no presentó actividad citotóxica frente a larvas de los cuatro estadios; existen otros estudios de evaluación de citotoxicidad con otros géneros de *Ocimum* los cuales no han presentado ninguna actividad. Respecto a *O. micranthum* según Barreira, de Morais, Lima & Pinho en su estudio encontraron que esta planta presentó toxicidad obteniendo un LC₅₀ de 67ppm donde existe una diferencia con los resultados obtenidos, por lo que quedará investigar más al respecto ya que no existen otros estudios similares.

En la determinación de la toxicidad aguda con el test de *Artemia salina*, con la obtención de los extractos etanólicos como de los aceites esenciales, se puede observar en los resultados que tanto *O. basilicum* variedad morada, *O. basilicum* variedad blanca, *O. basilicum* variedad *genovese*, y *O. micranthum* no mostraron actividad biocida, por lo que no fue posible calcular su CL₅₀, y por lo tanto es considerado no tóxico ya que una sustancia es activa cuando su CL₅₀ es menor a 1mg/mL indicando que la actividad biocida se logra a bajas concentraciones (Mongelli, Coussio & Ciccía, 1995). Estos resultados concuerdan según Reyes & Patiño (2007) donde se buscó actividad citotóxica en dos especies de *Ocimum basilicum*, una sin pigmentación y otra con pigmentación morada, obteniendo del primer ejemplar un valor de CL₅₀ de 20.41 µg/mL después de 24 horas de exposición, clasificándose como un aceite de baja toxicidad, mientras que para el segundo ejemplar el resultado de esta

actividad no fue reproducible. Otro estudio que fortalece nuestros resultados fue realizado por Gutiérrez (2007) donde el CL_{50} de *Ocimum basilicum* L. fue de 2133.34 ppm indicando esto según parámetros establecidos como una sustancia no tóxica. Existen más estudios de distintas especies de albahaca como por ejemplo el realizado por Parra, Yhebra, Sardiñas, & Buela (2001), donde no se encontró actividad citotóxica a *O. gratissimum* L. y *O. tenuiflorum* L. Una de las limitaciones que sobresale en este estudio es que no se contó con todos los datos suficientes de la otra especie en comparación, y tampoco existen estudios relacionados con las especies y variedades por lo que no se puede llegar a un resultado concreto, lo que conlleva a futuras investigaciones. Por todo lo anteriormente descrito, se puede concluir que ninguna de las plantas estudiadas presentó toxicidad con ambos ensayos realizados.

Con el fin de detectar si hay o no diferencia entre las 4 variedades, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación del porcentaje de humedad y de cenizas totales, y en base a los resultados, se concluye que no hay diferencia significativa entre las variedades estudiadas.

X. CONCLUSIONES

1. *O. basilicum* en las variedades morada y la blanca se diferencian por la coloración de sus hojas y flores y estas con la variedad genovese por la forma y tamaño de las hojas.
2. Las tres variedades de *O. basilicum* se diferencian de *O. micranthum* tanto en la forma, tamaño y coloración de sus hojas y el tamaño de la planta.
3. El índice de estomas es una característica de diferenciación entre las tres variedades de *O. basilicum* y *O. micranthum*,
4. Las cenizas ácidas es una parámetro para diferenciar entre variedades y especie de *O. micranthum* y *O. basilicum*.
5. La ausencia de flavonoides y saponinas es una característica de diferenciación en *O. basilicum* variedad genovese
6. *O. micranthum* y *O. basilicum* en sus tres variedades, no presentaron toxicidad aguda contra *Artemia Salina*.
7. *O. micranthum* y *O. basilicum* en sus tres variedades, no presentaron actividad larvicida utilizando *Aedes aegypti* y *Anopheles albaminus*

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de actividad farmacológica, para comprobar si las tres variedades de *O. basilicum* y *O. micranthum* pueden ser utilizadas indistintamente por la población.
2. Realizar estudio de metabolitos secundarios por medio de cromatografía de gases para comprobar o descartar que existan diferencias que no se pueden evidenciar con estudio de cromatografía en capa fina.
3. Realizar ensayos acaricidas, de repelentes para mosquitos, biocidas y antifúngicos con las plantas de estudio para determinar si estas pueden ser utilizadas con otros fines a parte del medicinal y culinario.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, J., Miranda, M., Toledo, G., & Castillo, O. (2001). Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 35(1): 56-60.
- Acosta, M., González, M., Araque, M., Velazco, E., Khourl, N.,... & Usubillaga, A. (2003). Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *Basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensceus*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 45(1): 19-24.
- Akhtar, M. & Munir, M. (1989). Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea* and *Ocimum basilicum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 27(1): 163-176.
- Akinboro, A. & Bakare, A. (2007). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(1): 470-475.
- Albuquerque, U. & Laise, A. (1998). El género *Ocimum* L. (*Lamiaceae*) en el nordeste del Brasil. *Anales del Jardín Botánico*. 56(1): 43-64.
- Alvarado, B. (2011). *Determinación de la actividad larvicida de seis extractos y aceites de plantas del género Lippia nativas de Guatemala, contra Aedes aegypti y Anopheles albimanus vectores transmisores del dengue y el paludismo respectivamente*. (Tesis de Licenciatura para optar al Título de Químico Biólogo). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Anaya, L. (2003). *Ecología Química*. (pp.45-54). México: Valdez.
- Andrioli, N.B., Wulff, A.F., & Mudry, M.D. (2006). *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazol. *Theoria*, 15(2): 9-16.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG). (2008). An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85(1): 531-553.
- Anléu, L. (1998). *La flora silvestre de Guatemala*, (pp.7-10). Guatemala: Editorial universitaria Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Ara, A. (1994). *40 Plantas medicinales*. Madrid: EDAF. 3ra. Ed. 219 paginas
- Ara, A. (1997). *100 Plantas medicinales escogidas: Una guía de plantas de todo el mundo seleccionadas por su valor terapéutico*. Madrid: EDAF.
- Arana, M. & Ortiz, N. (2012). *Inhibición por extractos vegetales de uso medicinal de Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter baumannii multi-resistentes*. (Tesis de Licenciatura para optar al Título de Químico Biólogo). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Avalos, A. & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de Plantas. *Recursos educativos. Serie Fisiología Vegetal*, 2(3): 119-145.
- Balcázar, B., Martínez, E. & González, M. (2003). Efecto de la administración oral de inulina sobre el perfil de lípidos y la sensibilidad a la insulina en individuos con obesidad y dislipidemia. *Revista Médica de Chile*, 131(6): 596-604.
- Bandaranayake, W. (2003). Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs. In Ahmad, I., Aqil, F., & Owais, M. (Ed.), *Modern Phytomedicine Turning Medicinal Plants into Drugs*. (pp. 25-57). Germany: WILEY-VCH.
- Barreira, E., de Moraes, S., Lima, M. & Pinho, E. (2004). Larvicidal activity of essential oils from brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memorial Institute Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*. 99(5):541-544.
- Beric, T., Biljana, N., Stanojevic, J. & Vukcevic, J. (2008). Protective effects of basil (*Ocimum basilicum*) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 46(1): 724-732.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A. (2009). *Vademécum nacional de plantas medicinales*, Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A., Barrios, M., Morales, C., Orellana, R., Vásquez, A., & Paz, M.(2001). Actividad biocida de plantas detectadas por etnobotánica y bioprospección en la Reserva de Biósfera Sierra de las Minas. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 6(2): 23-47.
- Cambie, R.C., & Ash, J. (1994). *Fijian medicinal plants*. Australia: CSIRO.

- Campbell, N., Mitchell, L., & Reece, T. (2001). *Biología: Conceptos y Relaciones*. (3ra.ed). México: Pearson Educación.
- Canigual, S., & Vanaclocha, B. (2002). Albahaca (*Ocimum basilicum* L.). Vademecum de Fitoterapia, (Mar. 5, 2013). Recuperado de <http://www.masson.es/book/fitoterapia.html>
- Castañeda, J., & Aceituno, G. (1981). *Guatemala Indígena*. Guatemala: Instituto Indigenista Nacional.
- Castillo, I. & Romero, I. (2007). Plantas con actividad anti- *Helicobacter pylori*: Una revisión. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 80(1): 35-61.
- Chariandy, C.M., Seaforth, C.E., Phelps, R.H., Pollard, G.V., & Khambay, B.P.(1999). Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal Ethnopharmacology*, 64(3): 265-270.
- Charles, D., Simon, J. & Wood, K. (1990). Essential oil constituents of *Ocimum micranthum*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38(1): 120-122.
- Chiang, L., Cheng, P., Chiang, W. & Linn, C. (2005). Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32(1): 811-816.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press.
- Díaz, J. & Salas, R. (2008). Actividad Antimicrobiana en Plantas. *Revista Científica Universidad Científica del Sur*, 1(13): 6-18.
- Dreser, A., Wirtz, V., Corbett, K., & Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Revista Argentina*, 50(4): 480-487.
- Dorman, J., Peltoketo, A., Hiltunen, R. & Tikkanen, M. (2003). Characterization of the antioxidant properties of deodorized aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83(1): 255-262.
- Enrique, E., & Frati, A. (2005). *Hacia una política farmacéutica integral para México*. México D.F.: Secretaría de Salud.
- Fernández, A., Mendiola, J., Monzote, L., García, M., Sariego, I., & Gutiérrez, Y. (2009). Evaluation of toxicity of Cuban plant extracts with possible antiparasitic action based

- on the use of *Artemia salina* larvae. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 3(61): 254-258.
- Flores, E. (1999). La Planta. Cartago: Libro Universitario Regional.
- Galindo, M., Contreras, J., Palacios, E. (2006). Efectos de la albahaca (*Ocimum basilicum*) sobre dolor pélvico en dismenorrea primaria en mujeres en edad fértil. *Revista Colombiana de Enfermería*, 6(6): 47-60.
- García, A., Vizoso, A., Ramos, E. & Piloto, J. (2000). Estudio toxicogenético de un extracto fluido de *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca). *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 5(3): 78-83.
- García, D.E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27(12): 1-12.
- Garrido, B. & Polanco, S. (2012). *Establecimiento de caracteres farmacobotánicos para el control de calidad de 3 especies de plantas medicinales de uso popular en Guatemala*. (Tesis de Licenciatura para optar al Título de Químico Biólogo). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Gattuso, M., & Gattuso., S. (1999). Manual de Procedimientos para el Análisis de Drogas de Polvo. Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. 50p.
- Hernández, H. D., Conde, T. M., Izquierdo, S. S., & Sanabia, M. L. (2009). Extracción de lípidos de las semillas de *Cucurbita pepo* L. (calabaza). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(14): 1-6.
- Hernández, R. (1997) Obtencion de crudos de saponinas hipercolesteromiantes de *Chenopodium quinoa willd*. *Rervista Cubana de medicina military*, 1(26): 55-62.
- Heinz, K. (2010). History and sources of essential oil research. In K.H. Can & G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology and applications* (pp. 3-38). Florida: CRC.
- Hussain, R., Poveda, L., Pezzuto, J., Sojearto, D. & Kinghorn, A. (1990). Sweetening agents of plant origin: Phenylpropanoid constituents of seven sweet-tasting plants. *Economic Botany*, 2(44): 174-182.
- Jackson, B. & Snowdon, D. (1990). *Atlas of microscopy of medicinal plants, culinary herbs and Spices*. (12-13). London: Belhaven press.

- Jaki, B., Orjala, J., Bürgi, R., & Sticher, O. (1999). Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 2(37): 138-143.
- Jiménez, G., Porta, H. & Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 3(21): 355-363.
- Katzung, B. (2005). Farmacología Básica y Clínica. (pp. 3-25). México: Editorial El Manual Moderno.
- Keita, S., Vincent, C., Schmit, J. & Belangera, C. (2000). Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suave* L. in the Republic of Guinea. *Flavour Fragrance Journal*, 15(1): 339–341.
- Khatri, L., Nasir, M., Saleem, R. & Noor, F. (1995). Evaluation of Pakistani sweet basil oil for commercial exploitation. *Pakistan Journal Science Indian Research*, 38(1): 281-282.
- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. (pp. 21-45). Barcelona: Editorial Omega, S.A.
- Lachowicz, K., Jones, G., Briggs, D., Bienvenu, F., Palmer, M.,... & Hunter M. (1996). Characteristics of essential oil from basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1(44): 877-881.
- Lagarto, A., Tillán, J., Bueno, V., Chávez, I., Vega, I., & Guerra, I. (2005). Toxicidad aguda oral y subcrónica en ratas de un extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. *Revista de Toxicología*, 3(22): 175-179.
- Laza, D., Rodríguez, I. & Sardiña, G. (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 3(8): 1-3.
- Leme, D.M., & Marin, M.A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682(1): 71-81.
- Lino C., Gomes, P., Lucetti, D., Diógenes, J., Sousa, F., & Viana G. (2005). Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory activities of the Essential Oil (EO) of *Ocimum micranthum* Wild from Northeastern Brazil. *Phytotherapy Research*, 19(1): 708-712.

- Lock, O. (2002). Análisis fotoquímico de metabolitos secundarios. (pp. 54-72). Lima: Pontificia Universidad Católica.
- Marotti M., Piccaglia R. & Giovanelli E. (1996). Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1(14). 3926-3929.
- Martínez, A. (2003). Aceites esenciales. *En Manual de Farmacología* (pp. 1-34). Medellín: Universidad de Antioquia.
- Martínez, I., Quintero, G., Márquez, L., González, J., Álvarez, A., & Zarragoitia, A. (2006). Determinación de la citotoxicidad de extractos de *Erithroxylum confusum* Britt mediante el método de la *Artemia salina*. *Acta Farmacológica Bonaerense*, 3(25): 429-431.
- Martínez, S.;Gonzalez, J.; Culebras, J. & Tuñon, J. (2002). Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 17(6). 271-278.
- Mongelli, E.R., Coussio, J.D., & Ciccía, G.N. (1995). Estudio de toxicidad aguda de plantas medicinales argentinas mediante el bioensayo de *Artemia salina* Leach. *Dominguezia*, 12(1): 35-42.
- Monzote, L., Sarigo, I., Montalvo, A., Garrido, N., Scull, R., Abreu, J. (2004). Propiedades anti protozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 3(56): 230-233.
- Müller, L. (2000). Manual de laboratorio de Morfología Vegetal. Turrialba: CATIE.
- Muñoz, F. (2002). Plantas Medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. (4ta. Ed.). Madrid: Mundi Prensa.
- Murillo, E., Fernández, K., Sierra, D., & Viña, A. (2004). Caracterización físico-química del aceite esencial de Albahaca. *Revista Colombiana de Química*, 2(33): 139-148.
- Murillo, E., Viña, A., & Correa, L. (2002). Actividad antifúngica y composición química del aceite esencial de doce variedades de *Ocimum* sp. cultivadas en Ibaguè-Colombia. *Revista de Información Tecnológica*, 1(13): 77-85.
- Murugan, K., Murugan, P. & Noortheen, A. (2007). Larvicidal and repellent potential of *Albizia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti*. *Bioresource Technology, USA*. 98(1):198-201.

- Núñez, Y., Barzaga, P., Carrillo, C., Lastra, H., Chávez, I.,... & González, M. (2004). Efecto del extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. sobre la anafilaxia pasiva cutánea, espasmo y tonicidad bronquial. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(3): 45-51.
- Orellana, A. (1995). Diagnóstico de Guatemala. *En Estado de la domesticación de plantas medicinales en Centroamérica*. (pp. 13-20). Costa Rica: CATIE.
- Orozco, N., Leal, C., Rivera, J. & Monterroso, M. (2012). *Búsqueda de actividad anti-Helicobacter pylori en 16 plantas de uso popular guatemalteco*. (Tesis de Licenciatura para optar al Título de Químico Biólogo). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Osorio, E., Montoya, G. & Arango, G. (2006). Productos naturales alcaloides con actividad antiprotozoal. *Vitae*, 13(1): 20-25.
- Osuna, M. & Pérez, C. (2003). Metabolitos primarios y secundarios en la descomposición. En J. Álvarez y E. Naranjo (pp. 123-139) *Ecología del suelo en la selva tropical húmeda de México*. Veracruz: Instituto de Ecología A.C.
- Oxenham, S., Svoboda, K. & Walters, D. (2005). Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Phytopathology*, 3(153): 174-180.
- Pahlow, M. (1985). *El gran libro de las plantas medicinales: Salud a través de las fuerzas curativas de la naturaleza*. Madrid: Editorial Everest S.A.
- Parra, L., Yhebra, S., Sardiñas, G., & Buela, I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plants extracts. *Phytomedicine, USA*. 8(5):395-400.
- Pérez, P., Rodríguez, H., Lara, J., Montes R., & Ramírez G. (2004). Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 1(20): 141-152.
- Pino, S., Prieto, S., Pérez, M., & Molina, J. (2004). Género *Erythrina*: Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(2): 252-8.
- Polanco, C. & Pérez, V. (2012). *Caracterización de las especies botánicas, utilizadas popularmente como cardo mariano en Guatemala*. (Tesis de Licenciatura para optar

- al Título de Químico Biólogo). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Politeo, O., Jukic, M. & Milos, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, 1(101): 379-385.
- Quintana, M. & Yax, R. (2012). *Aislamiento de Helicobacter pylori e inhibición de la bacteria por diez extractos de plantas medicinales utilizadas popularmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales*. (Tesis de Licenciatura para optar al Título de Químico Biólogo). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Raya, D., Chávez, J., Urrutia, S., Castro, R., Martínez, R., Ron, O.,... & Martínez, M.(2008). Estudio toxicológico del extracto acuoso obtenido del duramen de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 3(13): 1-8.
- Real Farmacopea Española. (2002). 2ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Reyes, J., & Patiño, J. (2007). *Comparación de los metabolitos secundarios volátiles de dos especies de Ocimum sp. (Labiatae) en función del método de su extracción y estudio de las actividades antioxidante, citotóxica y antifúngica*. (Tesis de Licenciatura para optar al Título de Químico). Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- Rojas, R., Sánchez, Y., Abreu, Y., Espinosa, I., Correa, T. & Pino, O. (2012). Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *Genovese* L. *Revista de Protección Vegetal*, 2(27): 130-134.
- Ryding, O. (1994). Notes on the sweet basil and its wild relatives (*Lamiaceae*). *Economic Botany*, 1(48): 65-67.
- Samol, V. & Santizo, B. (2012). *Actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra Campylobacter jejuni*. (Tesis de Licenciatura para optar al Título de Químico Biólogo). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

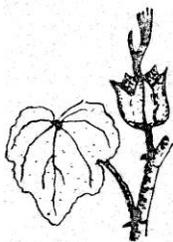
- Sanabria, A., López, S. & Gualdrón, R. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Farmacia*, 1(26): 15-19.
- Sánchez, E. G., Leal, I. M., Fuentes, L., & Rodríguez C. A. (2000). Estudio Farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (Albahaca Blanca). *Revista Cubana de Farmacología*, 3(34): 187-195.
- Sánchez-Medina, A., García, K., May, F., & Peña, L. (2001). Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine Part I. Antioxidant, antimicrobial and β -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*, 2(8): 144-151.
- Schilie, M., González, A. & Luna, L. (2009). Las Acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(13): 254-257.
- Selvakkumar, C., Balakrishnan, A. & Lakshmi, B. (2007). Potential anti inflammatory properties of crude alcoholic extract of *Ocimum basilicum* L. in human peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 1(10): 324–331.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Covenio Andrés Bello y CYTED.
- Silbergeld, E.K. (2003). Toxicología. Capítulo 33: Herramientas y enfoques. 84p.
- Singh, S. (1999). Mechanism of action of anti-inflammatory effect of fixed oil of *Ocimum basilicum* L. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1(37): 248–252.
- Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillipson, J.D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Medica*, 59(1): 250-252.
- Solis, P., Gattuso, S., & Cáceres, A. (s.f.) Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto de Desarrollo y Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos. OEA/AICD/AE 089/03.

- Sousa, P., Linard, C., Acevedo, D., Oliveira, A., Cohelo, A. & Leal, J. (2009). Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 7(42): 655-659.
- Standley, P., Williams, L., (1970). *Flora of Guatemala*. Chicago: Fieldiana.
- Thangam, T. & Kathiresan, K. (1997). Mosquito larvicidal activity of mangrove plant extracts and synergistic activity of *Rhizophora apiculata* with pyrethrum against *Culex quiquefasciatus*. *International Journal of Pharmacognosy*, 35(1), 69-71.
- Toral, M., Manríquez, A., Navarro, R., Denise, T., Naulin, P., (2010) Características de los stomas, densidad e índice estomático en secuoya (*Sequoia sempervirens*) y su variación en diferentes plantaciones de Chile. *Bosque*, 31(2), 157-164.
- US Food and Drug Administration. (2011). *Title 21 Code of Federal Regulations (21 CFR Part 11): Electronic records; electronic signatures*. The current status of 21 CFR Part 11 Guidance is located under Regulations and Guidance. Recuperado de <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/03-4312.pdf>.
- Volák, J. & Stodola, J. (1988). *Plantas medicinales* (pp.7-16). Checoslovaquia: Editorial Susaeta S.A.
- Whaterman, P.G. (2007). The current status of chemical systematics. *Phytochemistry*, 68(1): 2896-2903.
- World Health Organization. (2011). *Quality control methods for herbal materials*. Geneva: WHO Press.
- World Health Organization. (1999). Guidelines for inspection of drug distribution channels. In: *WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-fifth report*. Geneva: WHO Press, Annex 6 (WHO Technical Report Series, No. 885).
- Yoc, A., Soto, E., Gutiérrez, J. & Arriola, M. (2012). *Estudios de actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres plantas medicinales de la familia Euphorbiaceae: Euphorbialancifolia, Cnidoscolumaconitifoliusvar. Mansa y Cnidoscolumaconitifoliusvar. Estrella*. (Seminario de Investigación de Licenciatura

para optar al Título de Químico Biólogo). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Zarroug, I.M., Nugud, A.D., Bashir, A.K., & Mageed, A.A.(1988). Evaluation for Sudanese plant extracts as mosquito larvicides. *International Journal of Crude Drug Research*, 2(26): 77-80.

ANEXOS



HERBARIO BIGU

Escuela de Biología
Facultad de C.C.Q. y Farmacia

Guatemala, 04 de junio de 2012

A QUIEN CORRESPONDA:

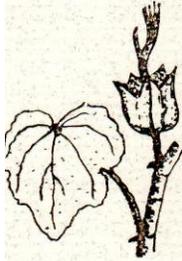
Por este medio se hace constar que los estudiantes (as) Miguel Angel Pontaza Tello carné 200610147; Edson Omar Saban Culajay carné 200610228 e Ilse Margoth Fernández Paz carné 200510395 de la carrera de Química Biológica, de la Facultad Ciencias Químicas y Farmacias, ingresaron al herbario BIGU el espécimen de la especie *Ocimum micranthum* Willd. familia **LAMIACEAE** la cual fue ingresada al libro de inventario y se le adjudico el número de Boucher 60622; por lo que a solicitud de los interesados (as), se les extiende la presente en el mismo lugar y fecha arriba indicados.

Atentamente

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Ing. For. Luis E. Velásquez Méndez
Coordinador a.i.
Herbario BIGU, Escuela de Biología





HERBARIO BIGU

Escuela de Biología
Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia

Guatemala, 28 de mayo de 2012

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio se hace constar que los estudiantes (as) Miguel Angel Pontaza Tello carné 200610147; Edson Omar Saban Culajay carné 200610228 e Ilse Margoth Fernández Paz carné 200510395 de la carrera de Química Biológica, de la Facultad Ciencias Químicas y Farmacias, ingresaron al herbario BIGU el espécimen de la especie *Ocimum basilicum* L. familia **LAMIACEAE** la cual fue ingresada al libro de inventario y se le adjudico el número de Boucher 60601; por lo que a solicitud de los interesados (as), se les extiende la presente en el mismo lugar y fecha arriba indicados.

Atentamente

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Ing. For. Luis E. Velásquez Méndez
Coordinador a.i.
Herbario BIGU, Escuela de Biología

