

*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE FARMACIA*



*Trabajo de Diploma Para Optar Al Título De Licenciado Químico
Farmacéutico*

Tema:

Actividad citotóxica del aceite esencial presente en la hoja de *Ocimum basilicum* (albahaca) mediante el bioensayo con *Artemia salina*, Marzo 2010.

Autores:

- ✓ Br. Leydiesky Sbetlana Pérez Gutiérrez.
- ✓ Br. Yeymi Lisseth Picado Pantoja.
- ✓ Br. Silvio Uel Reyes García.

Tutor:

- ✓ Msc. Saura Mendoza

Asesor:

- ✓ Msc. Fernando Baca.

León, Abril del 2010



AGRADECIMIENTOS

***A Dios:** por permitirnos haber alcanzado una más de nuestras metas propuestas, y por habernos iluminado nuestras mentes para la realización del presente trabajo.*

***A Nuestros Padres:** Por ser la cuna de nuestros valores, por enseñarnos a luchar por lo que deseamos y jamás quedarnos en el intento.*

***A Nuestra Tutora:** Msc. Saura Lesbia Mendoza Marín, por el tiempo y apoyo brindado en toda la realización de nuestro trabajo. Por tenernos paciencia y exigirnos para hacer de nosotros unos profesionales de calidad.*

***A Nuestro Asesor:** Lic. Fernando Emilio Baca Escoto, por transmitirnos su conocimiento y apoyarnos firmemente en el transcurso de este trabajo.*

***A Todo el Personal Docente de la facultad de Ciencia Químicas:** Por ser la base de nuestros conocimientos y por ser personas ejemplares.*

***Al Lic. Kelvin Núñez:** Por su apoyo incondicional, ya que sin el no hubiese sido posible la culminación de este arduo trabajo.*

***A la Fundación ISNAYA:** Por permitirnos realizar en su laboratorio la extracción del aceite esencial, facilitándonos las condiciones necesarias para lograr nuestro objetivo.*



Dedicatoria

A mi Dios: *Todopoderoso, Señor de la ciencia y sabiduría, quien con su poder otorgo a su siervo fuerzas para hacer de un sueño, todo un trabajo y verlo hecho una realidad, y por ubicarlo como cabeza según la promesa hecha a nuestros antepasados.*

A mis Padres: *“Efraím Basilio Reyes Sevilla” y “Cecilia Marcelina García Latino”: quienes han llenado mi vida con sus ejemplos, valentía y capacidad, mostrándome de esta manera que la única forma de cumplir los sueños es esforzándome.*

Además porque son personas ideales, dignos de seguir e imitar y porque tienen la convicción de cambiar el mundo con sus ideas a pesar de la infinidad de obstáculos que han encontrado en el camino.

Al Cuerpo Docente de la Facultad de Ciencias Químicas: *Por haberme exigido y apoyado en todos los momentos difíciles, y por ser la base de mi conocimiento tanto profesional como ético.*

A mis Compañeros y Amigos: *por brindarme su confianza y amistad y por haberme aconsejado y apoyado en los momentos difíciles además tenerme paciencia durante todo este tiempo.*

Silvio Vel Reyes García

תודה רבה אדני ישוע



Dedicatoria

A mi Dios: *por concederme el Don de la vida y que con su sabiduría ha iluminado mi mente y me ha enseñado a descubrir que la perseverancia es un medio importante para alcanzar con éxito todas las metas propuestas en nuestra vida.*

De manera muy especial a mis amados Padres:

- ✓ *“Armando José Pérez Villalta” que a lo largo de mi niñez y adolescencia me inculcó valores importantes para culminar con éxito esta etapa de mi vida como universitaria, aún cuando ya no este presente para ver realizado este sueño y nuevo logro quiero dedicárselo a él especialmente por haberme impulsado hasta sus últimos días de vida.*
- ✓ *“Nicolasa Maritza Gutiérrez Bermúdez” símbolo de superación y administración por brindarme la confianza, cariño, comprensión y sobre todo por sus esfuerzos y sacrificios a lo largo de estos años de estudios contribuyendo así a mi realización tanto personal como profesional.*

Agradezco a Dios por haber nacido en el seno de estos padres y comparto con ambos y para ellos este éxito profesional. Los Amo.

A mis Hermanos:

- ✓ *Georgina Maritza Coulson Gutiérrez;*
- ✓ *George José Coulson Gutiérrez;*
- ✓ *Anielka María Coulson Gutiérrez;*
- ✓ *Sonia Maritza Hammond Gutiérrez.*
- ✓ *Armando José Pérez Gutiérrez.*

Por ser espejos en mi vida encontrando en ellos gran valor, ánimo, consejos y fuerzas para seguir adelante y no dejarme vencer por los obstáculos que se atraviesan en la vida.

A mis Tíos: *Mercedes Ramón García Pérez y María Verónica Montiel Ramírez, por brindarme todo su apoyo, acogerme en su casa y hacerme sentir un miembro más de la familia, sin su calor humano, mi formación profesional no hubiese sido posible, les estaré agradecida de por vida.*

A Benjamín Antonio Thomas Montiel por darme su amor, comprensión y apoyo incondicional en todos los momentos de mi carrera.

A mis amigos por mostrarme que la amistad es un Don y tesoro invaluable en la vida, por ser símbolo de confianza y fidelidad y por ser parte de esta etapa importante de mi vida garantizando un lugar en mi corazón.

Y a todas aquellas personas que forman parte de este éxito y que de alguna u otra manera pusieron su granito de arena.



Leydiesky Sbetlana Pérez Gutiérrez.

DEDICATORIA

A Dios

- *Por guiarme en el camino de la dedicación que me llevo a culminar mis estudios*
- *Por darme fortaleza, entendimiento y seguridad en la toma de decisiones que se asociaban a mis estudios.*
- *Por darme fortaleza, perseverancia y entendimiento a lo largo de mis estudios lo cual me permitió finalizar mis estudios con gran satisfacción.*

A mis padres

- *Por todo su esfuerzo al trabajar constantemente y dignamente para darnos a sus hijos los estudios necesarios para llegar a ser profesionales ya que con gran ilusión destinaron una parte de su dinero a mis estudios lo cual hoy es recompensado puesto que he logrado uno de mis sueños.*
- *Por brindarme todo su apoyo y confianza desde mis inicios hasta el final de mis estudios siendo ellos el pilar fundamental en mi vida es por ello que les dedico especialmente este éxito.*
- *A mi Madre Jacinta Maribel Pantoja Reyes por darme todo lo que su corazón y trabajo le permitió a lo largo de mis estudios y por no dejarme desistir de mis estudios cuando caí, Ya que ella es mi gran apoyo en toda mi vida. Así como también por enseñarme la importancia del estudio en la vida. Gracias mama la quiero mucho.*
- *A mi padre José Abraham Picado Bonilla Por enseñarme que la fortaleza y el carácter son importantes en la vida ya que uno los necesita en los momentos difíciles. También por mostrarme el amor que uno debe de tenerle al estudio estudiando conmigo desde muy chiquita. Gracias papá lo quiero mucho.*

A mi bebe Leslieth Anahí Sandoval Picado quien de alguna forma fue mi motivo de finalizar mis estudios en los 2 últimos años.

*Infinitas **gracias** a todos los nombrados anteriormente ya que gracias a cada uno de ellos quienes aportando un grano de arena o más me llevaron a ser lo que actualmente soy.*

Yeymi Lisseth Picado Pantoja



INDICE

INTRODUCCION	6
OBJETIVOS	7
MARCO TEÓRICO	9
HIPOTESIS	19
DISEÑO METODOLÓGICO	20
DISEÑO EXPERIMENTAL	23
RESULTADOS Y ANALISIS	28
CONCLUSIÓN	35
RECOMENDACIONES	36
BIBLIOGRAFIA	37
ANEXOS	40



INTRODUCCION

La historia de la vida del ser humano sobre la tierra está dominada por su relación simbiótica con el reino vegetal. A base de las plantas, el hombre primitivo obtuvo los medios para su alimentación, bebidas, abrigo, salud y bienestar. De esta manera los primeros medicamentos tuvieron su origen en las plantas, muchas de las cuales por sus propiedades curativas están actualmente en uso, por ejemplo la digoxina, codeína, etc.

En Nicaragua el uso de las plantas medicinales ha venido incrementándose como una alternativa terapéutica para el tratamiento de muchas afecciones comunes y otras no tan comunes, lo cual lleva muchas veces al abuso o uso irracional de ellas sobre todo en lo relacionado a las dosis, por aquella creencia que por ser natural es inocuo. Esta situación se ve agravada por la falta de información accesible acerca: de la acción farmacológica, la toxicidad, la mínima o máxima cantidad que deberá ingerir de las plantas que eviten a corto o a largo plazo problemas mayores de salud.

Es así que la *Ocimum basilicum* conocida popularmente como Albahaca, es muy empleada en medicina tradicional por sus propiedades tales como: antibiótico, antihelmíntico, antiséptico, antiinflamatorio, antiespasmódico, analgésico, depresor del sistema nervioso, relajante de músculo liso y tráquea, utilizando comúnmente las hojas, las cuales contienen principalmente; aceite esencial. Esta es una planta aromática, fácilmente cultivable en los hogares nicaragüenses y se encuentra distribuida principalmente a lo largo de la región del pacífico.

En este sentido, el presente estudio va dirigido a conocer la toxicidad del aceite esencial de *Ocimum basilicum* y de sus principales componentes como son: linalol, eugenol y estragol, presentes en la hoja, para lo cual haremos uso del bioensayo de *Artemia salina*.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- ✓ Determinar la actividad citotóxica del aceite esencial presente en la hoja de *Ocimum basilicum* (albahaca) mediante el bioensayo de **Artemia salina** Marzo del 2010.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Extraer el aceite esencial presente en la hoja de *Ocimum basilicum* a través de la técnica de arrastre por vapor.
- ✓ Identificar los principales componentes del aceite esencial presentes en la hoja de *Ocimum basilicum* mediante cromatografía en capa fina.
- ✓ Obtener el DL_{50} del aceite esencial mediante el bioensayo de *Artemia salina*.



MARCO TEÓRICO



Según la OMS, una planta medicinal es todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos sustancias que pueden ser utilizados con fines terapéuticos o que son los precursores de hemisíntesis farmacéutica. ²⁴

El valor medicinal de una planta se debe a la presencia en sus tejidos de una o varias sustancias químicas que producen una acción fisiológica concreta sobre el organismo humano. Estas sustancias son denominadas principios activos.

Los principios activos normalmente se encuentran en las hojas de las plantas, por ejemplo la digital que contiene en sus hojas principios activos que ejercen acción sobre el corazón. Otra planta conocida, que posee sustancias capaces de ejercer acción en el organismo humano es la Albahaca, la cual se estudiará a continuación.

DESCRIPCION DE LA PLANTA

La albahaca (*Ocimum basilicum L.*) es una planta anual pequeña, de 30 a 50 cm de altura, despide un agradable olor característico y salvo en la punta de las ramas, carece de pelos. Posee tallos erectos, ramosos y cuadrados. Hojas anchas, jugosas y están finamente dentadas, aunque hay variedades de jardín sin dentar, de color verde, lanceoladas. Es de Origen sudasiática y persa, proviene de la familia de las Labiatae (Labiadas) o Lamiaceae. Las flores se agrupan en espigas, blancas o rosadas.²⁵

FORMA DE CULTIVO

Para el cultivo de la planta *Ocimum basilicum*, se recomienda preparar el suelo con abono de preferencia orgánico, así aseguramos que la planta sea más productiva en cuanto a hojas y al tamaño de las mismas.

La siembra se lleva a cabo a finales de invierno, en semilleros. Hay que sembrar las semillas a poca profundidad y trasplantarlas hacia mediados del verano, con cuidado de no dañar las raíces. La germinación se produce a los 10 ó 15 días, Luego, los plantones se colocan en hileras a 30 cm de distancia unas de otras. Es conveniente plantarlos algo profundo y regarla abundantemente.

Se escarda para eliminar las malas hierbas con frecuencia y se desmochan las puntas de las ramas cuando empiecen a formarse los capullos florales para favorecer el crecimiento arbustivo, es decir, un crecimiento tupido. Se seca después de su floración, por lo que conviene cortar las flores apenas aparecen, de esta manera se las puede utilizar hasta dos años. La albahaca crece bien en tierra fresca, ligera y bien drenada, es muy sencilla de cultivar incluso en suelos pobres.



RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN

Esta se debe realizar desde finales de la primavera hasta inicio del verano, procediendo a su tratamiento para envasarse en seco. Tras lavar las hojas se procede a su secado colocándolas en un sitio aireado, seco y alejado de la luz, para una vez troceadas, envasarlas en recipientes herméticos de cristal o cerámica donde conservarán durante varios años su aroma casi íntegro.

De la planta las partes utilizadas, sólo son las hojas frescas o secas y cuando más aromáticas son, es cuando son jóvenes, siendo estas de color verde intenso y verde grisáceo por el envés, que una vez destiladas al vapor de agua producen esencia, cuya cantidad y calidad variará según el tipo de albahaca tratada o su procedencia.

EFFECTOS DE LA PLANTA EN EL ORGANISMO

Anteriormente, se mencionaba que la Albahaca es una Planta Medicinal que se le atribuyen varios efectos, tanto de uso interno como externo, así tenemos:

Uso interno:

Digestiva: Favorece la digestión y evita los espasmos gástricos, siendo muy útil en los casos de gastritis, de hernia de hiato, de flato, etc. Infusión de un puñado de hojas frescas- unos 15 g por litro de agua. Tomar 3 tazas al día después de las comidas. ²⁶

Estimulante digestivo y láctico: La esencia de la planta abre el apetito (2 o 3 gotas al día disueltas en azúcar) Estimula la producción de leche en las mujeres lactantes (Decocción de 30 g de hojas secas por litro de agua. Dos tazas diarias)

Antivomitiva: En caso de tener sensación de vómitos o malestar intestinal. (15 g de la infusión de hojas secas por litro de agua.)

Problemas nerviosos: Refuerza el sistema nervioso y tranquiliza sus manifestaciones adversas en el estómago. Infusión de una cucharadita de hojas secas por vaso de agua. Tomar un par de tazas al día después de las comidas principales. Si se aumenta la dosis tiene propiedades narcóticas.

Mal de altura: Su contenido en eugenol le otorga propiedades anticoagulantes, muy adecuadas para mejorar la circulación sanguínea. Esta propiedad puede ser aprovechada para evitar el mal de altura o mejorar sus síntomas ya que un mayor riego celular permite un mayor aporte de oxígeno a las células y una mayor limpieza de las toxinas. (Infusión de una cucharadita de planta seca por taza de agua. Tomar un par de tazas diarias un par de días antes de emprender el viaje a la montaña o la ascensión).



Como Uso externo:

Bucal: Cuando aparecen problemas en la boca, como inflamaciones, llagas o mal aliento (Gargarismos con la decocción de 100 g de hojas secas por litro de agua)

Quistes de ovario: Realizar un masaje abdominal utilizando el aceite esencial.

Otros usos:

Repelente de mosquitos: Durante mucho tiempo se ha utilizado para repeler los mosquitos, a los que parece ser que les disgusta el olor penetrante que desprende la presencia en la planta del estragol y eugenol. Parece ser que su uso masivo en su país de origen - la India - favorece la disminución de estos insectos dentro de las casas, aunque la planta realmente sea utilizada allí por considerarla sagrada.

Especia: Su uso para sazonar comidas en forma de hojas secas trituradas y mezclada con otras hierbas esta bastante extendido. Se puede tomar fresca en las ensaladas.

Tónico capilar: Para fortalecer el cabello y contribuir a preservarlo de la caída (Realizar fricciones con el líquido resultante de la infusión de hojas secas).²⁶

Es necesario decir que muchos de los efectos terapéuticos anteriormente mencionados son producidos por los componentes del aceite esencial (eugenol, linalol, estragol) presente en la hoja de Albahaca (*Ocimum basilicum*).

Sin embargo, se han realizado estudios de **toxicidad aguda en ratón**, a los componentes señalados como principales del aceite esencial, comprobándose mediante administración de un extracto a una dosis de 2g/kg y con el polvo de las hojas a una dosis de 6g/kg, ambos por vía intragástrica, que no hay aparición de efectos nocivos. De igual modo se reporta que el aceite esencial de albahaca no es tóxico, aunque se ha demostrado que el estragol, uno de los mayores componentes en algunas variedades, produce tumores (carcinomas hepatocelulares).³⁴

Cabe señalar que los **Aceites Esenciales** son en general, el conjunto de compuestos químicos que se obtienen mediante un determinado método de extracción de las sustancias odoríferas presentes en un gran número de vegetales, que se conocen como plantas aromáticas.

Se encuentran **distribuidos en todo el reino vegetal**, tanto en las plantas inferiores como en especial en plantas superiores. Son particularmente abundante en algunas familias como las: Umbelíferas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Coníferas, Rutáceas, Zingiberáceas, entre otras.



CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.^{27, 35}

De acuerdo con su **consistencia** los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.).

De acuerdo a su **origen** los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencia de rosa, geranio y jazmín enriquecida con linalol, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química, estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, frutilla, etc.).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con **los componentes mayoritarios**. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos (por ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpénicos (por ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (por ej. clavo, canela, anís, etc.). Aunque esta clasificación es muy general resulta útil para estudiar algunos aspectos fitoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos, sin embargo existen clasificaciones más complejas que tienen en cuenta otros aspectos químicos.

Específicamente el **contenido en aceite esencial de la hoja de albahaca** oscila entre 0,04 y 0,70% según la variedad, el quimiotipo, la procedencia y el momento de la recolección.²⁸ Los compuestos principales del aceite esencial son: **linalol** (en algunos quimiotipos hasta un 75% del aceite esencial), metilchavicol (o **estragol**, hasta un 87%) y **eugenol** (hasta un 20%); se encuentran otros monoterpenos (como el ocimeno y el cineol), sesquiterpenos y fenilpropanoides (entre otros el cinamato de metilo). La droga contiene también taninos, flavonoides: xantomicro y heterósidos de la quercetina y del kempferol, ácido cafeico y esculósido. No es segura la presencia de saponinas.



PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

- Líquidos a temperatura ambiente
- Volátiles
- Recién destilados son incoloros o ligeramente amarillentos
- Densidad inferior a la del agua (oscila entre 0,8 y 1,2 g/mL)
- Alto índice de refracción (para la albahaca esta entre 1,40 y 1,61 a 20 °C)
- Muy poco solubles en agua, pero le comunican el aroma.
- Solubles en alcohol de alto porcentaje.
- Soluble en aceites fijos o grasas. ³⁰

Los aceites esenciales se extraen de los tejidos mediante diversos procedimientos físicos y químicos, en función, principalmente de la parte de la planta en la que se encuentre (pétalos, raíces, tallo, ramas, semillas, savia, hojas), así como de la posibilidad de descomponer estos compuestos. Es importante decir que la obtención siempre conlleva unas modificaciones inevitables de algunos de los compuestos que los forman.

PROCESOS DE EXTRACCIÓN

Los diferentes Procesos de Extracción utilizados para la obtención de aceites esenciales y extractos aromáticos ³⁴, se pueden resumir de la siguiente forma:

En la **destilación por arrastre con vapor de agua**, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, se coloca en una recipiente cerrado y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.³²

En el método de **extracción con solventes volátiles**, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura.

Los solventes más empleados son: Etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan clorados ni benceno por su peligrosidad a la salud. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles.³²



En la extracción de aceites esenciales mediante la **Hidrodestilación** el material está en contacto directo con el agua generador de vapor, es decir el material a extraer se encuentra en el mismo recipiente del agua, posteriormente se calienta a ebullición, el aceite extraído es arrastrado junto con el vapor de agua el cual deberá pasar por una trampa de tipo Clevenger adaptado a su vez a un refrigerante en posición de reflujo. Este tipo de extracción es útil para separar aceites más ligeros que el agua. 32, 35

Extracción en continuo Sólido-Líquido (Soxhlet), es una operación de la ingeniería química que se usa en numerosos procesos industriales. Técnicamente, es una operación de transferencia de masa, donde un disolvente o mezcla de éstos, extraen selectivamente uno o varios solutos que se hallan dentro de una matriz sólida. Al igual que en la destilación, existen una serie de parámetros físico - químicos, tales como la viscosidad del disolvente, los coeficientes de solubilidad de los solutos, los coeficientes de difusión, las temperaturas de ebullición, etc. que son de importancia fundamental para el diseño del equipo y el éxito del proceso de extracción. Extractores de lecho fijo, de lecho móvil, continuos de bandejas, etc., son algunos de los tipos que se usan normalmente en la industria. En la industria de los procesos naturales, ya con fines analíticos a escala de producción, se utiliza con frecuencia el extractor sólido - líquido tipo Soxhlet. La misma cuenta con una cámara de extracción, un depósito para el disolvente y un sistema de condensación de vapores. 31, 35

En el método de enflorado o **Enfleurage**, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (concreto) de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa. 32, 35

Extracción por prensado:

También se le conoce como “expresión”. El material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas discontinuas (tipo batch) ó en forma continua, Dentro de éstos se tienen los equipos: Tornillo sin fin de alta ó de baja presión, extractor expeller, extractor centrífugo, extractor decanter y rodillos de prensa. 32, 35

El método de **extracción con fluidos supercríticos**, es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO₂), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. 32, 35



Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

Una vez obtenido el aceite esencial se procede a su debido aislamiento e identificación, la mayoría de monoterpenos y sesquiterpenos (linalol) se encuentran presentes en los aceites esenciales de diversas plantas. A partir de dichos aceites es posible realizar su aislamiento mediante la utilización de uno o varios métodos cromatográficos tales como la cromatografía en columna, en capa fina y HPLC. Para las cromatografías en columna y en capa fina se utiliza ampliamente la sílica gel como fase estacionaria. Como fase móvil se emplea solventes apolares puros o mezclados. Sin embargo actualmente se utilizan técnicas de separación más eficientes y rápidas como la cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, y la cromatografía de gases (GC), así como también combinaciones “online” HPLC-GC-MS.³⁵

Esta última técnica gracias al desarrollo reciente de columnas capilares de alta resolución, permite analizar mezclas complejas presentes en aceites esenciales, e identificar los componentes a partir de los tiempos de retención a través de los denominados Índices de Retención de Kovats (IK). Estos valores son característicos para cada componente y existen bases de datos con los índices de muchos componentes de aceites esenciales.

Los valores IK se determinan en dos columnas cromatográficas una polar (por ejemplo Carbowax 20M) y una apolar (por ejemplo SE-52, DB-5). Adicionalmente, la técnica acoplada Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS), permite obtener el espectro de masas de cada componente con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Así mismo existen bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes, por lo cual el índice de Kovats (determinado en dos columnas de diferente polaridad) y el espectro de masas son criterios para la asignación química de muchos componentes de aceites esenciales, no solo monoterpenos sino también otros tipos de sustancias características de dichos aceites.

Más recientemente se han desarrollado columnas cromatográficas quirales para la separación de componentes ópticamente activos, y se han desarrollado métodos para el análisis combinado HPLC-MS y HPLC-NMR de mezclas de sesquiterpenos.³⁴



En el caso de fenilpropanos (eugenol y estragol) existen ensayos de reconocimiento para el anillo aromático como la reacción con formaldehído y ácido sulfúrico. Así mismo con hidroxilos fenólicos estos pueden reconocerse por el ensayo del cloruro férrico, el cual produce coloraciones verdes y azules con sustancias fenólicas en general.³⁵

USO DE ARTEMIA SALINA

Como se menciona anteriormente los aceites esenciales tienen toxicidad relativa la cual se puede determinar mediante el bioensayo de **Artemia Salina** comúnmente conocida como camarón de agua salada.^{7, 8, 9}

Artemia salina, es un pequeño crustáceo que ha sido utilizado como prueba preliminar, general y económica para evaluar la actividad citotóxica no específica de extractos vegetales en el descubrimiento de sustancias insecticidas y antitumorales específicamente anticancerígenas realizadas utilizando sistemas de cultivo in vitro. En este sentido esta prueba se utiliza para determinar agentes con actividad antitumoral de una gran variedad de especies vegetales, obteniéndose los niveles citostáticos y de toxicidad de la mismas, siendo el parámetro de referencia los valores de las dosis letal media (**DL₅₀**) obtenidos durante el tamizaje utilizando Artemia salina.

La disponibilidad de los huevos, la fácil incubación, el rápido crecimiento y la facilidad de mantenimiento de los mismos bajo condiciones de laboratorio, han hecho del camarón de agua salada una prueba simple, rápida y de mayor importancia, barata y reproductiva.

El camarón de agua salada pertenece al orden Anostraca de la clase Branquiopodas que al igual que otras Branquiopodas representa la más singular forma de crustáceos. Su embriogénesis comienza de 16- 36 horas después de su inmersión, siendo sus características primitivas, el sistema nervioso en forma de escalera, con ganglios dispuestos de manera segmentada, el corazón es largo tubular, posee huesos pares en cada segmento (ver Anexo). La larva es un NAUPLIO primitivo cuyo desarrollo es gradual sin ninguna metamorfosis compleja.

En el crecimiento de los NAUPLIOS se desarrollan, tres etapas que influyen en la reproducibilidad de los resultados existiendo una marcada diferencia de la sensibilidad entre NAUPLIOS de la primera etapa y NAUPLIOS de la segunda etapa y esto ha sido demostrado utilizando la toxicidad del ácido crónico.

Las larvas en su primera etapa son significativamente más resistentes ya que se alimentan de vitellium embrionario mientras que las larvas en su segunda y tercera etapa son menos resistentes ya que ingieren partículas de material que expone el epitelio de su tracto digestivo al medio externo. La sensibilidad del camarón de agua salada también puede variar considerablemente de una clase a otra.



En cuanto a la Incubación del camarón: Para incubar huevos de Artemia salina se utiliza agua de mar artificial (cuya concentración no se especifica), en un plato que contiene dos compartimientos aislados por un material plástico, separados por dos agujeros de 2mm de diámetro. La siembra de los huevos se realiza dentro de un compartimiento profundo, luego de 48 horas de su inmersión debido a su movimiento fototrópico los NAUPLIOS nadan hacia un compartimiento iluminado donde son colectados con la ayuda de un micro pipeta.

Las Condiciones del medio de cultivo son: Salinidad del agua artificial: 35 g de sal por litro de agua que es aproximadamente igual a la salinidad del agua natural del mar.

- ❖ Temperatura: 6-40°C
- ❖ pH: 7-8
- ❖ Luz
- ❖ Alimento para Larva
- ❖ Levadura o Algas Unicelulares

Para la realización del bioensayo se deben preparar diferentes muestras estas se disuelve en metanol, para una solución total conteniendo 50, 500 y 5000 µg de la misma obteniéndose una concentración final de 10, 100, 1000 ppm, estas son transferidas a un disco de papel filtro de 1.25 cm de diámetro, el disco es secado al aire libre luego es sometido al vacío por una hora. El disco control se prepara en metanol, cada dosis es repetida cinco veces por igual. Descripciones subsecuentes del método de Mc laughlin's en 1991 menciona la alternativa de disolver la muestra en Dimetil Sulfoxido (**DMSO**) con una concentración máxima del 1% del solvente.

PROCEDIMIENTO DEL BIOENSAYO

El disco de papel filtro y 10 larvas son transferidas a un frasco, agregándole agua de mar artificial para hacer un volumen de 5 mL. Una gota de levadura seca en suspensión es adicionada a cada frasco como alimento de las larvas. Los frascos son conservados bajo iluminación (sin temperatura específica) y los NAUPLIOS sobrevivientes son contados con la ayuda de una lupa 3X después de 6- 24 horas. Si ocurren muertos en el grupo control los resultados son corregidos utilizando la fórmula de Abbot. 7, 8, 9

Determinación de la DL₅₀: El 95% del intervalo de confianza y el DL₅₀ se determinan utilizando el conteo de análisis indagado a las 24 horas, para los casos donde los datos no son suficiente en el análisis se modifican según **abbot** para determinar el DL₅₀.

También, existen otras vías para tratar la información cuantitativa derivada de una serie de pruebas biológicas, tales como: el método logaritmo de probit, el procedimiento de D-beer y el método de Reed- Muench, es el más conveniente. Este procedimiento, asume que un animal que sobrevive a una dosis alta, podría también sobrevivir a una dosis baja y viceversa.



La dosis que mata el 50 % de NAUPLIOS, puede ser determinada por dos procedimientos gráficos que pueden ser utilizados. El primer procedimiento grafica, el número de acumulados vivos y el número de acumulados muertos en la misma abscisa, número de animales versus el logaritmo de las dosis. Las dos curvas se entrecruzan, donde el número de acumulados vivos es igual al número de acumulados muertos. Esto puede ser utilizado para obtener un estimado rápido de la tolerancia media.

En el segundo método, se grafica la dosis versus el porcentaje de mortalidad, la dosis al 50% de mortalidad es obtenida por la interpretación de las curvas. En contraste el segundo método permite la utilización de la fórmula para estimar el error estándar.

$$SEDL_{50} = \sqrt{(0.79hR/n)}$$

Donde: **h**= promedio del intervalo entre dosificaciones; **R**= extensión del rango (DL_{75} - DL_{25}) de los porcentajes acumulados; **n**= números de animales. **R** puede ser obtenida de la gráfica de porcentaje de mortalidad versus dosis.

Si un DL_{75} ó DL_{25} no pueden ser obtenidos de la gráfica, entonces la extensión del rango puede ser estimado como dos veces DL_{75} para DL_{50} para DL_{25} .

El 95% de los límites de confianza del DL_{50} puede ser derivado de la siguiente relación:

$$LOG DL_{50} \pm 2 SE DL_{50}$$



Hipótesis

El aceite esencial extraído de las hojas de albahaca *Ocimum basilicum* presenta actividad tóxica a diferentes concentraciones y evaluados a diferentes tiempos de exposición, en el bioensayo de la Artemia salina.



DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio:

El presente estudio, es de tipo Experimental.

Área de estudio:

El departamento docente de Análisis de Drogas, Tóxico y Medicamentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAN-León.

Población:

Especie vegetal *Ocimum basilicum* L. cultivadas en el Occidente de Nicaragua.

Muestra:

320g de las hojas de *Ocimum basilicum* L. sembrada y recolectada en la ciudad de Chinandega, debidamente seleccionadas y fraccionadas manualmente.

Unidad de análisis:

Hojas de la especie en estudio.

Tipo de muestreo:

El muestreo que se empleó, fue por conveniencia, ya que este nos permitió seleccionar sólo las hojas frescas.

Criterios de selección:

Para la recolección de las hojas se tomó en cuenta; olor, ya que en teoría las más aromáticas son las más jóvenes, de color verde intenso, esto con el objetivo de obtener una mayor concentración del aceite.

Variables:

- Extracción del aceite esencial *Ocimum basilicum*
- Identificación de los principales componentes del aceite esencial
- Citotoxicidad del aceite esencial

Procesamiento de la información:

Se utilizó el método analítico Read-Muench, para la determinación de la DL₅₀, calculada por extrapolación de la gráfica y posterior uso de la siguiente fórmula:

$$DL_{50} = \text{antilog (valor)}$$

El **error estándar** fue calculado por:

$$SEDL_{50} = \sqrt{0.79hR/n}$$

El **límite de confianza** fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{LOG } DL_{50} \pm 2 \text{ SE } DL_{50}$$



Plan de análisis:

Variable Dependiente: Número de Náuplios muertos.

Variable Independiente: Concentración del aceite esencial.

Operacionalización de variables:

Variables	Definición	Indicador	Valor
Extracción del aceite esencial <i>Ocimum basilicum</i>	Método utilizado para obtener aceite esencial de las hojas de la planta.	Cantidad de aceite esencial obtenido	mL
Principales componentes del aceite esencial	Identificación de los componentes del aceite esencial: Eugenol Estragol, Linalol.	Presencia de los componentes del aceite esencial.	Positivo Negativo
Citotoxicidad del aceite esencial	Capacidad del aceite esencial para matar a un número determinado de Náuplios.	$\frac{\text{N}^\circ \text{ Náuplios muertos}}{\text{N}^\circ \text{ Náuplios vivos}}$	DL ₅₀



Materiales:

Reactivos:

- ✓ Agua Destilada.
- ✓ Acetato de etilo; Pureza: 99.9%; Densidad: 0.894 g/mL; CAS:141-78-6.
- ✓ Sílica gel 60 F₂₅₄.
- ✓ Tolueno; PM: 78-11g/mol.
- ✓ Vainillina; Pureza: 99%; M: 152.15g/mol.
- ✓ Acido sulfúrico; Pureza: 96.1%.
- ✓ Dimetil Sulfoxido; Pureza: 99.7%; CAS: 67-68-5; PM: 78.13g/mol.
- ✓ Sulfato de cobre; Pureza: 99%.
- ✓ Agua de Mar.
- ✓ Metanol; Pureza: 99.9%; Densidad: 0.793g/mL. K37257907.
- ✓ Cintas indicadoras de pH 4-7; Marca EM- Reagents; Us-patent N°4.029.

Estándares:

- ✓ Linalol; Merck; 97% pureza.
- ✓ Eugenol; Sigma.
- ✓ Huevos de Artemia salina

Equipos:

- ✓ Destilador clevenger; marca Schmmizoae; volumen max: 3mL; gradación 0.01mL.
- ✓ Refrigerante DLK 20; Lauda.
- ✓ Estufas con mallas de asbesto de aluminio; Cat N° TM106; Ser N° 147051 A; walts 270; volts:115.
- ✓ Balanza Analítica.
- ✓ Balanza de dos brazos; Harvard trip Balance; capacidad 2kg- 5lb. OHAUS.
- ✓ Horno Fisher scientific Isotemp Oven 220°C.
- ✓ Balanza analitica HM-120 LCCM-BAL-01 Cap. Max=120g Marca= AND, Modelo HM-120,Deriva d=0.1 mg.
- ✓ Contador de colonia; Darkfield Québec; Scientific Instruments; Modelo 3325; 40watts.

Cristalería:

- ✓ Balones Borosilicate; 3.3; NS 29/33; capacidad 1000mL.
- ✓ Balones Borosilicate; 3.3; NS 29/33; capacidad 500mL.
- ✓ Termómetro científico.
- ✓ Beacker 1000; Pirex; N°1000.
- ✓ Rociador Aceglass 250 mL. 24/40 # 7.
- ✓ Picnómetro 1 mL A KIMAX
- ✓ Digital Thermometer/ Sonda para medir la temperatura, Marca=Thomas Scientific. Rango=50 to 150°C
- ✓ Micropipeta; 1mL; Eppendorf.



DISEÑO EXPERIMENTAL

Sembrado de la planta de albahaca:

Fue realizado en el departamento de Chinandega bajo las condiciones apropiadas, descritas por bibliografías consultadas, las cuales son: Se preparó la tierra, sin abono para que fueran más naturales, se sembraron las semillas en macetas y se cuidaron hasta que crecieron a una altura de 25 cm aproximadamente, para luego trasplantarse a un espacio de tierra en el patio de la casa (de una de las autoras del presente trabajo), localizada en El viejo, Chinandega. Se regaron diariamente 2 veces al día (por la mañana y por la noche).

Recolección de hojas:

Las plantas fueron recolectadas directamente de donde fueron sembradas, de ellas seleccionamos solamente las hojas y posteriormente, fueron trasladadas al área de estudio para la realización del bioensayo.

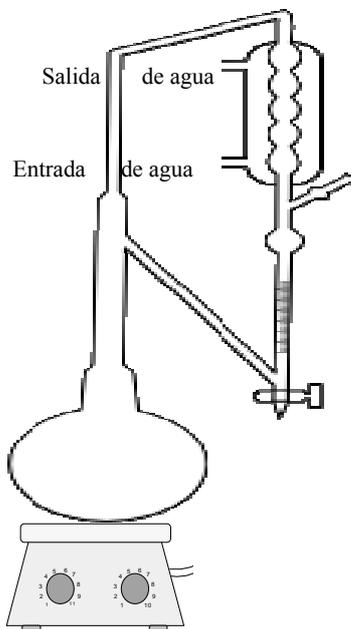
Método de extracción

El método empleado, fue arrastre por vapor, utilizando el aparato de Clevenger, ya que nos permitió obtener un buen rendimiento del aceite esencial. El procedimiento fue el siguiente:

1. En dos balones de 500mL y en uno de 1000mL, se colocó la cantidad 30g de hojas fraccionada de albahaca en los 2 primeros y 100g en el último, añadiéndole posteriormente 300 y 800mL de agua destilada individualmente.
2. Se colocaron cuerpos porosos dentro de los balones.
3. Se engrasó las bocas de cada uno de los balones.
4. Cada balón fue colocado en estufa y en las bocas de ellos se colocaron las trampas de Clevenger sostenidas con clanes y engrasando ligeramente las partes esmeriladas.
5. Se llenaron los bulbos de cada una de las trampas con agua destilada.
6. Se calentaron simultáneamente los balones, por dos horas, cuidando en no exceder el límite de temperatura.
7. Pasadas las dos horas, se dejó el equipo en reposo por 10 minutos.
8. Concluidos los 10 minutos, se extrajo el aceite contenido en la bureta de la trampa dejándolo caer en un tubo de ensayo de 5mL.
9. El aceite esencial obtenido, se almacenó para su posterior uso.



Aparato para la extracción del Aceite esencial.



Es necesario, mencionar que la extracción del aceite esencial de la hoja de Albahaca, fue realizada en la Fundación “ISNAYA” ubicado en la ciudad de Estelí, ya que las condiciones y equipos brindados por esta institución, son las adecuadas para su realización.

Condiciones experimentales:

1. Las cocinas del calentamiento tienen que ser con mallas de asbesto de aluminio, ya que esta nos permitió, que el calentamiento no fuera directo, impidiendo así la desnaturalización del aceite.
2. Los cuerpos porosos colocados, son necesarios para evitar una ebullición muy violenta.
3. El control de la temperatura, se realizó mediante un sistema de circulación de agua fría a los refrigerantes integrados en la trampa de Clevenger, utilizando un refrigerante DLK 20, manteniendo la temperatura, dentro del rango aceptable de 22-25°C, medida esta con un termómetro.
4. La presión debe ser baja, cuidando que la velocidad de destilación sea de 2-4 mL/min.
5. El tiempo de destilación fue de dos horas. Este tiempo, comenzó a transcurrir a partir de la caída de la primera gota de destilación.



Almacenamiento:

El aceite fue almacenado en tubos de ensayos con tapas envueltos en papel de aluminio y conservados en una nevera a aproximadamente 4°C, hasta su utilización.

Método de Identificación de los componentes del Aceite esencial:

Cromatografía de Capa Fina, teniendo el siguiente sistema cromatográfico:

Fase estacionaria: Sílica gel 60 F₂₅₄ activadas previamente por calentamiento a 100° C por media hora

Fase móvil: Tolueno: Acetato de Etilo (93: 7), la cámara será dispuesta a saturación cuando mínimo un tiempo de 8 horas

Revelador: Vainillina 1%- Acido sulfúrico 5%, ambas en etanol.

Procedimiento:

1. Se preparó 100mL de la fase móvil y se mantuvo la cámara cromatográfica en saturación por 10 horas.
2. La cromatoplaca fue previamente calentada a 100 °C en horno, por media hora.
3. Tanto la muestra, como los estándares de Eugenol y Linalol, fueron colocadas en la cromatoplaca, la cual fue posteriormente colocada en la cámara para su desarrollo.
4. Posterior al desarrollo, se dejó la cromatoplaca unos minutos al ambiente para que se evaporara el solvente de la fase móvil.
5. Haciendo uso de un atomizador se le aspergearon las soluciones que componen el revelador.
6. Las cromatoplas fueron colocadas en un horno, en donde se mantuvo por 10 minutos a 110°C, para luego poder apreciar las manchas correspondientes.
7. Se procedió a calcular los R_f.

Especificaciones de los Componentes del Aceite esencial de Albahaca:

- ✓ Linalol: color de la mancha Azul intenso (R_f= 0.54)₃₆
- ✓ Estragol: color de la mancha Rosado (R_f= 0.72)₃₅
- ✓ Eugenol: color pardo. (R_f=0.56-0.60)₁₀



Método de Determinación de Citotoxicidad:

Bioensayo de Artemia salina: Se realizó por triplicado bajo condiciones adecuadas.

Preparación del medio de cultivo:

1. El agua de mar utilizada es natural, la cual se obtuvo de los balnearios de Poneloya y el Viejo. Según referencia bibliográfica, posee un equivalente de 35g de sal por litro de agua.
2. El agua de mar, fue filtrada y transferida a 3 beacker de 1000 mL, se hizo hervir por 30 minutos para esterilizarla, posteriormente se enfrió y se aforó a 1000mL cada beacker con agua destilada.

Incubación de los Náuplios.

1. En un recipiente de vidrio limpio, se colocaron 25mL de agua de mar previamente preparada, se adicionó la punta de una espátula de huevos de camarón.
2. Se incubaron los huevesillos por 36 horas.

Preparación de reactivos para el Bioensayo:

I. Solución Patrón:

La solución patrón fue preparada: pesando 25mg de sulfato de cobre en un vidrio de reloj, se solubilizó con agua destilada hasta completar un volumen de 100mL. La solución obtenida debe tener un color celeste claro característico del sulfato de cobre. A partir de esta solución se hicieron las diluciones.

II. Solución Muestra:

- ✓ Se midieron 200 µl de aceite esencial.
- ✓ Se agregó 150 µl de Dimetilsulfóxido hasta que se mezcló completamente.
- ✓ Se adicionó 2.75 mL de agua de mar para obtener una concentración inicial de 1mg/mL a partir de la cual se realizaron diluciones.

III. Preparación del blanco:

Se midió 150 µl de Dimetilsulfóxido añadiéndole posteriormente agua de mar hasta completar el volumen de 3mL.



Bioensayo:

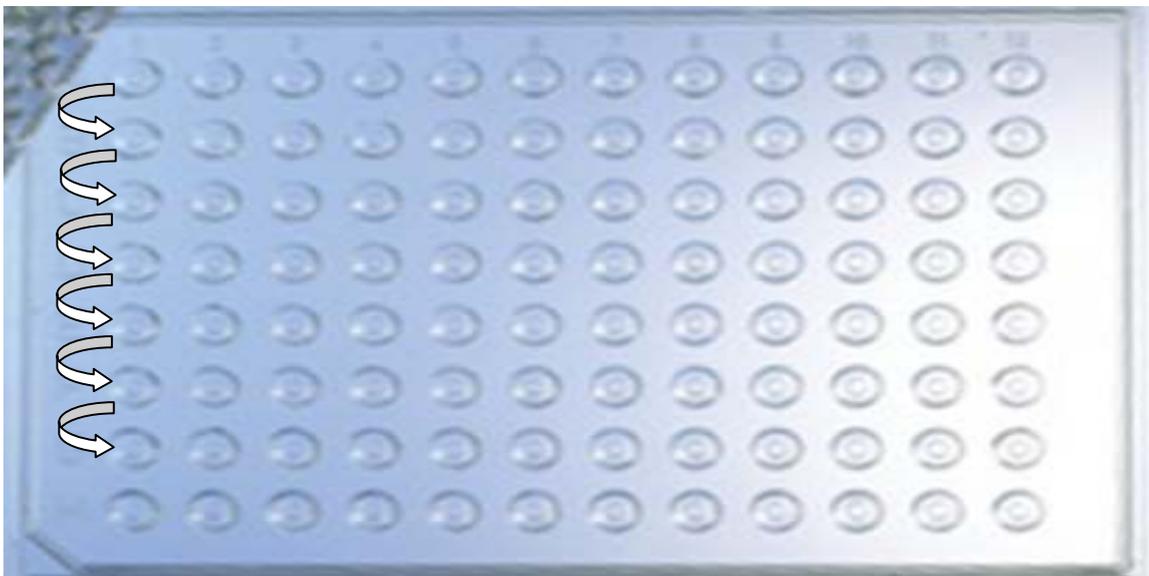
Se trabajó con micropozos, desde **A** hasta **G**, por triplicado, cada uno con un volumen total de 200 μ L. Desde la fila B hasta la G, se les colocó previamente 100 μ L de agua de mar. En la fila A (A1, A2, A3), se colocó 200 μ L de la Solución Muestra de estos se tomaron 100 μ l y fueron llevados al siguiente micro pozo (B). Luego, de B se extrajo el mismo volumen (100 μ l) y se colocó en C, y se procedió de igual manera hasta llegar a la fila G.

El Blanco se colocó en los micropozos: A4, A5, A6. Siguiendo el procedimiento anterior.

En los micropozos: A7, A8, A9, fue colocado el sulfato de cobre.

Luego de 36 horas de incubación, los Náuplios ya eclosionados fueron tomados de 10 a 15 de ellos con una micropipeta de 0.5mL, para ser puestos en cada uno de los micropozos que contienen: muestra, patrones y blanco.

Posteriormente, a las 6 y 24 horas, se realizaron lecturas de los Náuplios muertos, con la ayuda de una lupa.





RESULTADOS Y ANÁLISIS



Para realizar la extracción del aceite esencial utilizamos 320g de la hoja de albahaca, el método utilizado fue arrastre por vapor haciendo uso del equipo de Clevenger, obteniéndose un total de 2.5mL del aceite que presentó las siguientes características:

Tabla N°1: Características Organolépticas y Físicas del Aceite esencial de Albahaca.

Propiedades	Característica	Valoración
Organolépticas	Olor	Característico a la planta.
	Color	Amarillo claro
	Sabor	Ligeramente amargo.
Físicas	pH	4.9
	Densidad	1.018g/mL
	Solubilidad en Agua	insoluble
	Solubilidad en Acetato de etilo.	Soluble

Los datos presentados en la Tabla N°1, comprueban la presencia del aceite esencial ya que teóricamente aunque la mayoría de las esencias vegetales son incolora, algunas presentan coloraciones modificables por el oxígeno del aire, tal fue el caso del aceite esencial de *Ocimum basilicum* obtenido, cuyo color presentado fue amarillo claro, con un sabor ligeramente amargo que indica la mezcla de los componentes del aceite.

La densidad del aceite esencial extraído fue de 1.018g/mL concordando con los valores referidos en la bibliografía (0,8 - 1,2 g/mL), lo cual implica un alto contenido de compuestos de bajo peso molecular o de constituyentes tipo fenol, capaces de asociarse a través de puentes de hidrógeno, que aumentarían la masa en un volumen pequeño.

Así mismo, el valor de pH de 4.9, es un indicio de la presencia de compuestos fenólicos, lo que concuerda con lo planteado en relación a la densidad.

Como es de esperarse, el aceite resulta soluble en solventes de naturaleza orgánica e insoluble en agua; no obstante, ésta adquiere el olor y sabor de la esencia al combinarse, lo que se explica por la presencia de compuestos capaces de formar puentes de hidrógeno con ella o bien moléculas lo suficientemente pequeñas para solubilizarse en el agua.



Tabla N°2: Rendimiento del aceite esencial

Cantidad de hoja en g.	1ª Destilación	2ª Destilación	% 1ª Destilación	% 2ª Destilación
30	0.4	0.3	1.3	1
100	0.8	0.5	0.8	0.5
30	0.2	0.3	0.7	1
		$\bar{X} =$	0.9	0.8

En nuestra extracción, obtuvimos un rendimiento de 0.9 % de aceite esencial, esto debido a que el solvente utilizado fue agua destilada y no xileno, ya que este último presenta alta toxicidad para los Nauplios, viéndose afectado el bioensayo con Artemia salina.

Cabe destacar, que la farmacopea Europea, refiere que los valores del rendimiento del aceite esencial oscila entre 0.4 a 1% y según lo referido por la fundación “ISNAYA” el valor promedio de sus rendimientos es de 1.3%, utilizando como solvente Xileno.

Para la identificación de los componentes del aceite esencial de albahaca, realizamos el análisis de cromatografía en capa fina, utilizando los patrones: linalol y eugenol, siendo estos componentes principales del aceite esencial. Los resultados se muestran en la tabla N°3.

Tabla N°3: Resultados de Cromatografía de Capa Fina

Componentes	C.T	Rf _T	Rf _P	C. O
Linalol	Azul intenso	0.54	0.51	Azul intenso
Eugenol	Pardo	0.56-0.60	0.60	Pardo
Estragol	Rosado	0.72	0.75	Rosado

C.T: Color teórico. C. O: Color obtenido. Rf_T: Rf Teórico. Rf_P: Rf Práctico.

La tabla N°3, se señala que el Rf encontrado en la muestra del aceite esencial extraído coincide, con el Rf Teórico para ambos componentes y la coloración obtenida con el revelador es positiva, lo cual nos comprueba la presencia de dichos compuestos.

Con respecto al Rf del estragol, es posible que no coincida con el Rf teórico, ya que este valor es el obtenido en una fase móvil de Benceno, ya que no se encontró Rf en fase móvil de tolueno- acetato de etilo.



Tabla N° 4: **Lectura Náuplios Vivos y Muertos en Función de la Concentración del Aceite Esencial a las 6 Horas de Exposición**

Ppm	Log []	Vivos	Muertos	AV	AM	%M
67.8793	1.83173	0	10	0	14	100
33.9396	1.5307	10	3	10	4	28.57
16.9698	1.2296	10	0	20	1	4.76
8.4849	0.9286	10	1	30	1	3.22
4.24245	0.6276	11	0	41	0	0
2.12122	0.3265	10	0	51	0	0
1.06061	0.0255	10	0	61	0	0

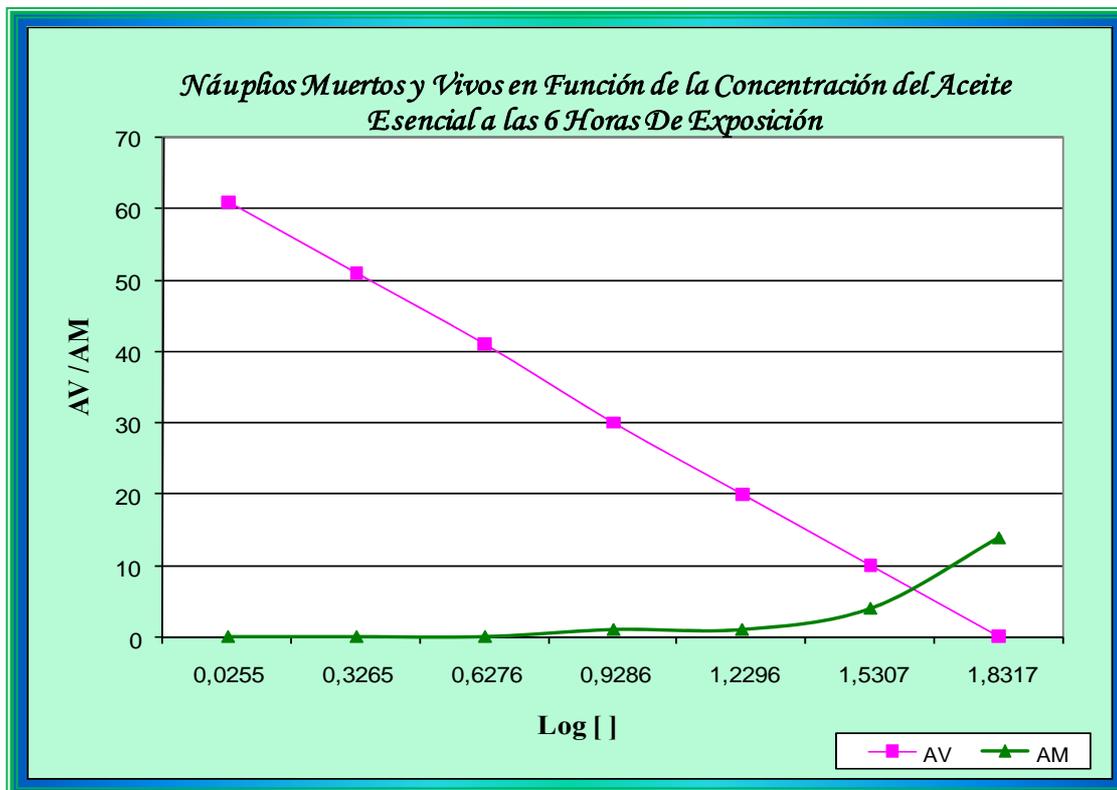
Fuente: Bioensayo de Artemia Salina.

En la tabla N° 4 se muestran datos tales como la concentración en que se encontraba el aceite esencial, la cual va de la más alta a la más baja, el log de la concentración la cual nos ayuda a realizar el gráfico, así mismo un promedio de Náuplios vivos y muertos, de igual forma se presenta los acumulados de Náuplios vivos y muertos y por ultimo el porcentaje de mortalidad.

En esta tabla se muestra el comportamiento del porcentaje de mortalidad con respecto a la concentración, ya que se observa que a la dosis más alta del aceite esencial (67.8793) el porcentaje de mortalidad es 100%, y a medida que la concentración va disminuyendo va decreciendo el porcentaje de mortalidad, hasta llegar a 0% de Náuplios muerto, lo cual indica que a tan solo 6 horas de exposición a una concentración de 67.8793, el aceite esencial puede tener una alta toxicidad.



Gráfico N° 1



AV: Acumulado Vivos. AM: Acumulado Muertos.

En la gráfica N° 1, se puede apreciar que esta tiene un desplazamiento hacia la derecha lo cual indica que el Acumulado de Náuplios vivos va disminuyendo notablemente a medida que se va incrementando la concentración del aceite esencial, a tan solo 6 horas de exposición.

Un comportamiento contrario se analiza en el número de nauplios muertos, el cual va aumentando a medida que la concentración se incrementa pero, este no supera el acumulado de 20 Náuplios muertos, lo cual significa que el tiempo de exposición no es suficiente como para matar el 100 % de los nauplios.

Además se observa que el punto en donde se interceptan las dos curvas (1.6974) es el valor con el cual se calcula la DL_{50} (49.81ppm).



Tabla N° 5: Lectura Náuplios Vivos y Muertos en Función de la Concentración del Aceite Esencial a las 24 Horas de Exposición

ppm	Log []	Vivos	Muertos	AV	AM	%M
67.8793	1.83173	0	10	0	41	100
33.9396	1.5307	2	10	2	31	93.9
16.9698	1.2296	3	8	5	21	80.76
8.4849	0.9286	4	7	9	13	59.09
4.24245	0.6276	6	5	15	6	28.57
2.12122	0.3265	10	1	25	1	3.84
1.06061	0.0255	10	0	35	0	0

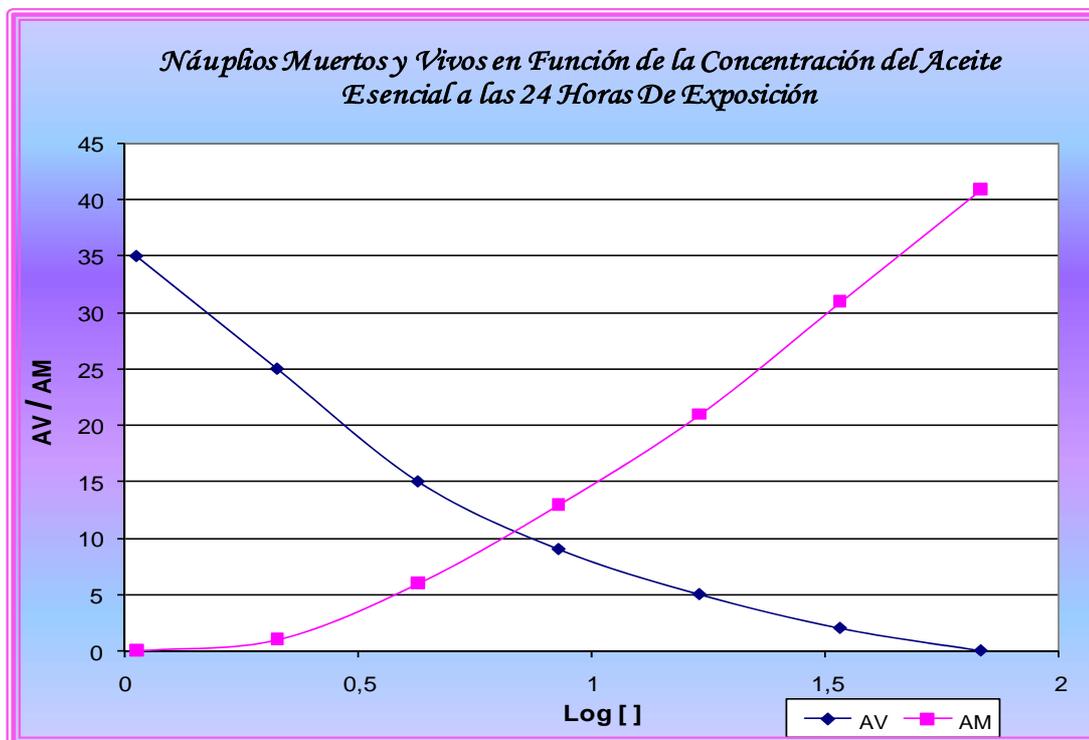
Fuente: Bioensayo de Artemia Salina.

En la tabla N° 5 se observa que, el promedio de Náuplios vivos va aumentando significativamente conforme va disminuyendo la concentración del aceite esencial, esto significa que a tan solo 24 horas de exposición, la toxicidad del aceite esencial va aumentando.

A las 24 horas de exposición, se puede apreciar, que el porcentaje de mortalidad es mayor en comparación a las 6 horas, e igualmente va decayendo conforme disminuye la concentración del aceite esencial.



Gráfico N° 2



AV: Acumulado Vivos. AM: Acumulado Muertos.

En el Gráfico N° 2 se observa que la cantidad de muertos supera el acumulado de 40 Náuplios a 24 horas de exposición, lo cual indica que el aceite esencial presenta mayor toxicidad a medida que se va aumentando el tiempo de exposición

En cambio, el acumulado de vivos va decreciendo mientras se aumenta la concentración hasta llegar al valor de cero, lo cual indica que a este tiempo y a esta concentración, el aceite esencial mata el 100% de los Náuplios.

Además se observa que el punto en donde se interceptan las dos curvas (0.8370) es el valor con el cual se calcula la DL_{50} (6.87ppm).



CONCLUSIÓN

Se determinó por medio del bioensayo de *Artemia salina*, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, que el aceite esencial presente en la hoja de *Ocimum basilicum* presenta actividad citotóxica tanto a las 6 como a las 24 horas de exposición ya que los valores obtenidos de la Dosis Letal media (DL_{50}) son inferiores a 100ppm (49.81 y 6.87 ppm respectivamente). La toxicidad que presenta es crónica y no aguda.

La toxicidad en humanos estará en dependencia de la cantidad de hoja y de la frecuencia con la que se consume.



RECOMENDACIONES

1. Recolectar las muestras vegetales en el tiempo indicado en la bibliografía.
2. Realizar un bioensayo en ratas para comprobar que el extracto de aceite esencial de albahaca produce carcinomas Hepatocelulares en las concentraciones planteadas.
3. Que se realice un seguimiento de nuestra investigación con el propósito de llevar a cabo la cuantificación de los componentes presentes en el aceite esencial mediante cromatografía de gas.
4. Efectuar posteriores estudios para determinar otros compuestos presentes en la planta.
5. Ejecutar otros estudios para lograr la separación de cada uno de los componentes para evaluar la toxicidad presente en cada uno de ellos.
6. Realizar un estudio tipo descriptivo con el fin de conocer el grado de utilización de la planta en la población Nicaragüense.
7. Informar a la población acerca de la correcta utilización de la planta en los hogares Nicaragüenses ya que una automedicación puede ser peligrosa.



BIBLIOGRAFIA

LIBROS:

1. Bruneton Jean (2001), Farmacognosia “Fotoquímica plantas medicinales, Zaragoza, España, 2^{da} ed, Acribia SA, 477-566 p.
2. Ocampo, Rafael, et all; Programa iberoamericano de ciencia y Tecnología para el desarrollo para CYTED 270 plantas medicinales iberoamericanas. Reconocimiento a Dr. Henry Yesid Bernald; Pag. 320-321.
3. M, Brussel, Juanita, et all; Manual de plantas medicinales para el promotor de medicina preventiva y salud comunitaria; ISNAYA; Estelí, Nic. 1998. Pag. 236- 237.
4. Alvarez Herrera Juan Pablo, Lista básica de plantas medicinales y su uso farmacológico en Nic. León, Nic: UNAN, 1995.
5. Cañigüeral Folcara Salvador et all; Plantas Medicinales y drogas vegetales para infusión y tisana. Un manual de base científica para farmacéutico y médicos editorial española a cargo de Salvador Canigüeral Roser villa Max Wichtl. Pag 106- 107.
6. Robineau Germosen, Farmacopea caribeña; Edición universitaria León Nicaragua 1998, segunda edición ; pag 241-242

TESIS

7. Maradiaga Trujillo Sorania Yesenia, Evaluación de la citotoxicidad mediante el bioensayo de Artemia salina y caracterización de alcaloides en 4 especies vegetales: citrus aurantifolia, catharanthus roseus, tabebuia rosea y pouteria sapota, Licenciatura, UNAN- León , Nicaragua, 2003 108 p.
8. Baca Escoto, Fernando Emilio et al (1999), Evaluacion de la citotoxicidad de 59 especies de plantas colectadas bajo el concepto de biodiversidad en la estación biológica, Bartola – Rio San Juan, a través de bioensayos de Artemia salina, Leon , Nic. UNAN.
9. Idiaquez Membreno, Lilliam Amparo Evaluacion de la citotoxicidad, mediante el bioensayo de Artemia salina y caracterización de alcaloides en 4 especies vegetales: Citrus aurantifolia (Limon acido) catharanthus roseus (mariposa) tabebuia rosea (roble) y pouteria sapota (sapote) recolectadas en la ciudad de Leon durante el II semestre del 2002, Leon, Nic.: UNAN, 2003.

REFERENCIAS DE INTERNET:

Artículos de revista científica:

10. Caracterización físico-química del aceite esencial de albahaca. [Publicación periódica en línea] 2004 II disponible en: <http://monografia/caracterización físico-química.mht>.
11. Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig" Estudio farmacognóstico de ocimum basilicum l. Rev Cubana Farm v.34 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic. 2000 (albahaca blanca), Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152000000300006&script=sci_arttext



Sitios en internet:

12. Albahaca. www.botanical-online.com/medicinalsocimum.htm
13. Espectro UV de fenilpropano bandas características, <http://www.pdfqueen.com/pdf/es/espectro-uv-de-fenilpropanos-bandas-caracteristicas>.
14. 270 plantas medicinales iberoamericanas / editor, Mahabir P. Gupta. <http://searchworks.stanford.edu/view/3128520>.
15. Composición química de extractos obtenidos por destilación-extracción simultánea con solventes de hojas e inflorescencias de nueve especies y/0 variedades de albahaca (*OCIMUN ssp*)
16. Actividad antifúngica y composición química del aceite esencial de 12 variedades de *ocimum sp* cultivadas en Ibagué – Colombia .Disponible en: <http://monografia.com/actividad-antifungica-y-composicion-quimica.mht>.
17. Instructivo técnico del cultivo de la albahaca (*ocimum basilicum l*) en cuba.
18. Determinación de constituyentes volátiles de la albahaca (*ocimum spp*) mediante dos métodos de extracción. Disponible en: <http://monografia.com/determinacion-de-constituyentes.mht>
19. Extracción de aceites esenciales. disponible en :<http://monografia.com/extraccion-de-aceites-esenciales.mht>
20. Estragol. Disponible en Wikipedia.com
21. Linalol. Disponible en Wikipedia.com
22. Eugenol. Disponible en Wikipedia.com
23. Estación experimental de plantas medicinales "Dr. Juan tomás roig".Estudio Farmacognóstico De Ocimum Basilicum l.(albahaca blanca). Disponible en: [far06300.pdf](http://monografia.com/far06300.pdf)
24. Farmacognosia general. Conceptos de farmacognosia. Campos de acción. Planta medicinal. Droga. Medicamento. Disponible en : http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apbot-farm2a/montesm02/02.html
25. Libro de bitacora -carlogra tarraco. Disponible en : <http://carlogra.blogspot.com>.



26. Albahaca plantas medicinales propiedades enfermedades. Disponible en :
www.medicinasnaturistas.com/.../albahaca_usos_plantas_medicinales_propiedades_enfermedades.php - Perú
27. Apuntes de botánica. Disponible en:
<http://apuntesdebioquimica.tripod.com/botanica/id6.html>
28. Plantas medicinales y otras especies. Disponible en:
http://www.iica.int.ni/Estudios_PDF/Plant_Medic.pdf.
29. Disponible en:
www.mgap.gub.uy/BibliotecasdelMGAP/BibliotecaCentral/.../aromaticas.pdf
30. Aceites esenciales. Disponible en : <http://pdf.rincondelvago.com/aceites-esenciales.html>
31. Extracción de aceites esenciales. Disponible en: html.rincondelvago.com/extraccion-de-aceites-esenciales.html
32. Plantas medicinales - ¿Que son los aceites esenciales?.Disponible en:
<http://plantasquecuran.com/documentos/que-son-los-aceites-esenciales.html>
33. Aceites esenciales. Disponible en:
<http://www.galeon.com/joar/NewFiles/Extraccion.htm>
34. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Disponible en:
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7195>
35. UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA aceites esenciales. Profesor Alejandro Martínez M,Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>
36. Las especias, Disponible en :www.scribd.com/doc/7064029/Las-Especias



ANEXOS



Anexo 1
Ocimum basilicum
Labiatae





Anexo 2

Principales Componentes Del Aceite Esencial De La Hoja De Albahaca

LINALOL: (3,7-dimetil-1,6-octadieno-3-ol)

Este es un alcohol terpénico, terciario, no saturado. Aporta olor de muchos aceites esenciales naturales como el de menta, tomillo, lavanda, bergamota, etc.

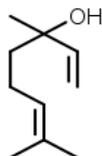
Este compuesto orgánico es poco soluble en agua. Es un líquido incoloro con olor característico.

Fórmula: $C_{10}H_{18}O$

Peso molecular: 154 g / mol

Punto de ebullición: 198- 200 ° C

Densidad: 0.87 g/mL



EUGENOL:

Es un líquido incoloro o amarillo claro, por exposición al aire se oscurece y aumenta su viscosidad.

Un volumen de la muestra es soluble en dos volúmenes de etanol al 70%; soluble en ácido acético glacial; casi insoluble en agua, miscible en etanol, cloroformo, éter de dietílico y aceites. Se fija en soluciones acuosas de hidróxidos alcalinos.

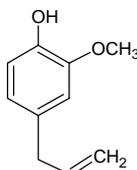
El rango de destilación es no menos del 95.0% de la muestra destila entre 250°C y 255°C.

Formula: $C_{10}H_{12}O_2$

Peso molecular: 164.20

Punto de ebullición: 253.5 °C

Densidad: va de 0,84 a 1,18;



ESTRAGOL:

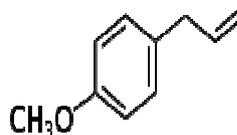
Es un líquido viscoso, incoloro con un olor a perfume similar, que se disuelve solo ligeramente en el agua (0,178 g / L de Agua La sustancia se usa en perfumes, licores y alimentos como un perfume.

Formula: $C_{10}H_{12}O$

Peso molecular: 148,20 g/Mol 148.20 G / Mol

Punto de Ebullición: 216°C

Densidad: 0,96 g·Cm³





Anexo 3

Número de Náuplios Vivos y Muertos

		1		2		3	
		Aceite esencial					
Horas	Letra	V	M	V	M	V	M
6 Horas	A	0	9	0	10	0	11
	B	11	4	9	3	9	2
	C	10	0	11	0	10	1
	D	9	1	11	0	10	2
	E	12	0	10	0	11	0
	F	10	1	10	0	11	0
	G	10	0	10	0	9	1

		1		2		3	
		Aceite esencial					
Horas	Letra	V	M	V	M	V	M
24 Horas	A	0	9	0	10	0	11
	B	3	10	3	9	0	11
	C	6	4	3	8	0	11
	D	5	5	6	5	1	11
	E	10	2	9	1	0	11
	F	10	1	10	0	10	1
	G	9	1	10	0	10	0

V: Náuplios vivos

M: Náuplios muertos



		1		2		3	
		Blanco					
Horas	Letra	V	M	V	M	V	M
6 Horas	A	10	1	13	0	12	0
	B	11	0	10	0	11	0
	C	15	0	12	0	11	1
	D	12	0	12	0	9	1
	E	12	0	13	0	11	1
	F	10	1	13	0	10	1
	G	13	0	14	0	12	0

		1		2		3	
		Blanco					
Horas	Letra	V	M	V	M	V	M
24 Horas	A	0	11	0	13	0	12
	B	10	1	10	0	11	0
	C	14	1	11	1	11	1
	D	11	1	12	0	9	1
	E	12	0	13	0	11	1
	F	10	1	13	0	10	1
	G	13	0	14	0	12	0

V: Náuplios vivos

M: Náuplios muertos



		1		2		3	
		Sulfato de cobre					
Horas	Letra	V	M	V	M	V	M
6 Horas	A	0	10	1	10	0	10
	B	0	11	1	11	1	10
	C	0	10	3	7	1	11
	D	0	12	0	12	1	13
	E	0	11	4	6	2	9
	F	8	2	10	0	8	3
	G	8	2	11	0	12	0

		1		2		3	
		Sulfato de cobre					
Horas	Letra	V	M	V	M	V	M
24 Horas	A	0	10	0	11	0	10
	B	0	11	0	12	0	11
	C	0	10	0	10	0	12
	D	0	12	0	12	0	14
	E	0	11	0	10	0	11
	F	0	10	5	5	7	4
	G	3	7	4	7	5	7

V: Náuplios vivos

M: Náuplios muertos



Anexo 4

Tablas de la toxicidad del blanco.

Número de Náuplios vivos y muertos en el Blanco lectura: 6 horas

Vivos	Muertos	AV	AM	%M
12	0	12	1	7.69
11	0	23	1	4.16
13	0	36	1	2.70
11	0	47	1	2.08
12	0	59	1	1.66
11	1	70	1	1.40
13	0	83	0	0

Número de Náuplios vivos y muertos en el Blanco lectura: 24 horas

Vivos	Muertos	AV	AM	%M
0	12	0	15	100
11	0	11	3	21.42
12	1	23	3	11.53
11	1	34	2	5.55
12	1	46	1	2.12
11	0	57	0	0
13	0	70	0	0



Anexo 5

Tablas de la toxicidad del Sulfato de Cobre.

Número de Náuplios vivos y muertos en el Sulfato de cobre lectura: 6 horas

Vivos	Muertos	AV	AM	%M
0	10	0	54	100
1	11	1	44	97.77
2	9	3	33	91.66
0	12	3	24	88.88
2	9	5	12	70.58
9	2	14	3	17.64
10	1	24	1	4

Número de Náuplios vivos y muertos en el Sulfato de cobre lectura: 24 horas

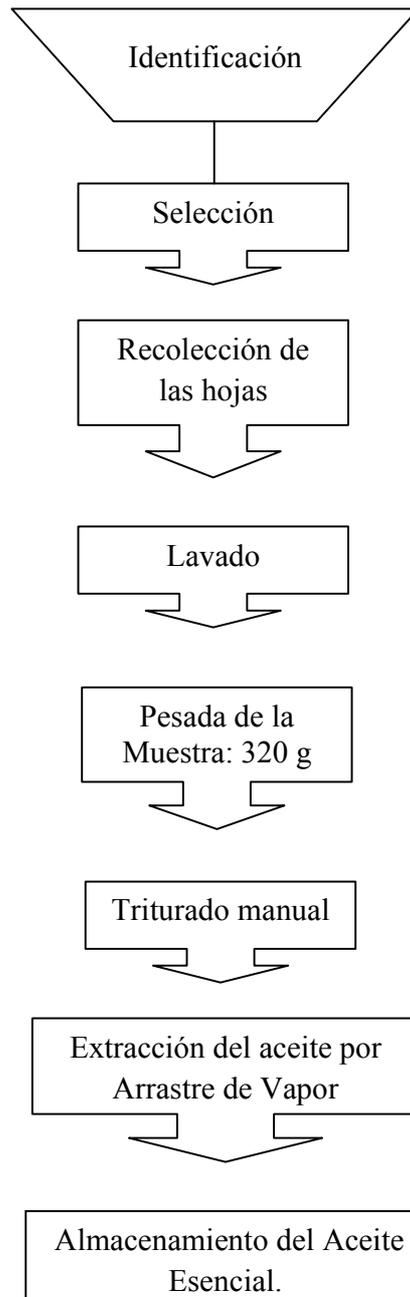
Vivos	Muertos	AV	AM	%M
0	10	0	71	100
0	12	0	61	100
0	11	0	49	100
0	13	0	38	100
0	11	0	25	100
4	7	4	14	77.77
4	7	8	7	46.66



Anexo 6

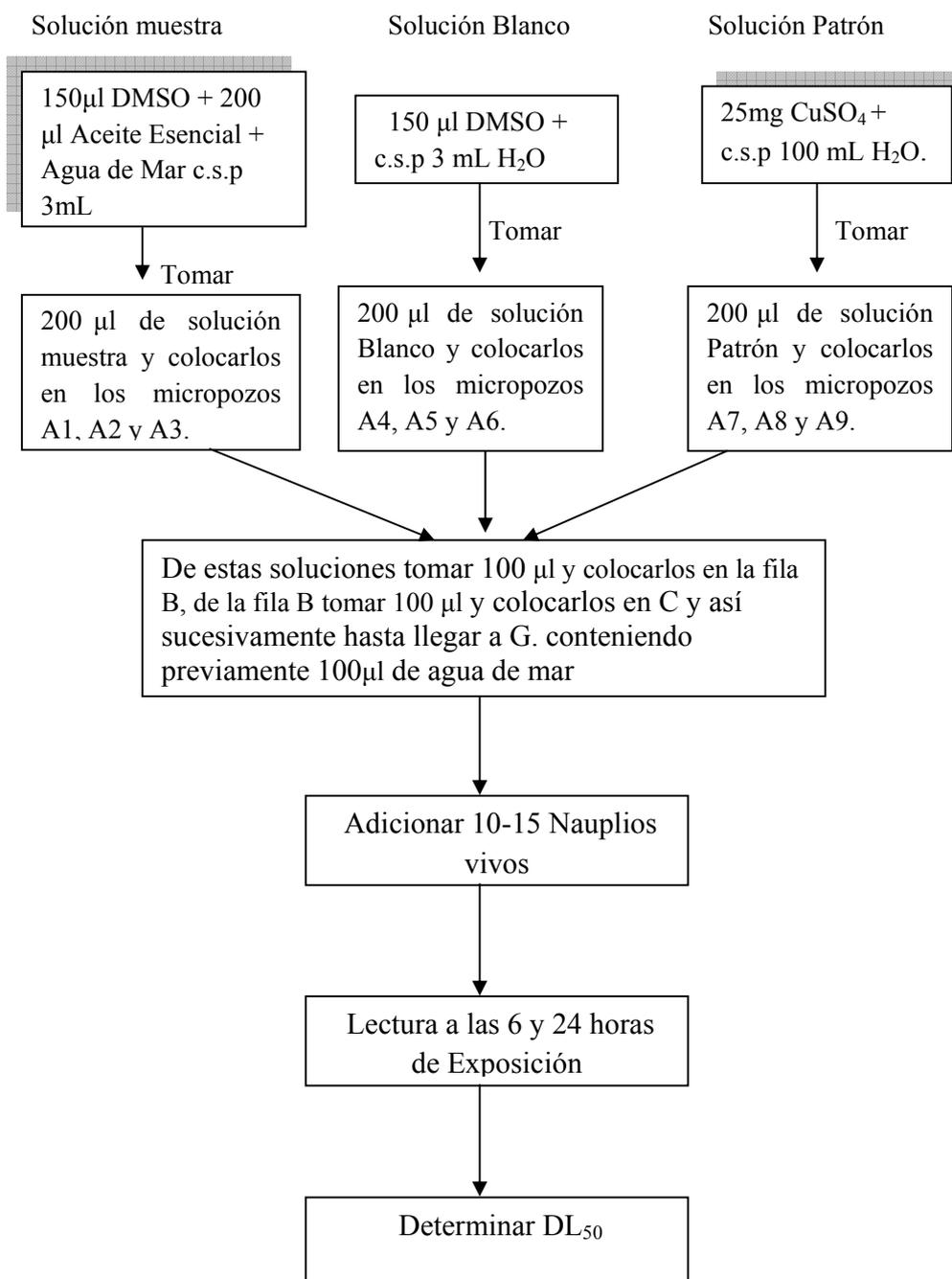
Extracción del Aceite Esencial.

Especie: *Ocimum basilicum*





Anexo 7 Bioensayo Artemia Salina





Anexo 8 Calculo de DL_{50}

Lectura: 6 Horas

Valor obtenido de la extrapolación: 1.6974

Calculo de la DL_{50}

$$DL_{50} = \text{anti log}(\text{valor})$$

$$DL_{50} = \text{anti log}(1.6974)$$

$$DL_{50} = 49.8195729$$

Calculo del Error

Estándar:

$$SEDL_{50} = \sqrt{\frac{0.79hR}{n}}$$

$$h = \frac{\text{mayor} + \text{menor}}{2}$$

$$h = 50$$

$$SEDL_{50} = \sqrt{\frac{(0.79)(50)(100)}{11}}$$

$$SEDL_{50} = 18.94969417$$

Calculo del Límite de Confianza

$$\text{Log}DL_{50} (90\%I.C) = \text{Log}DL_{50} \pm 2SEDL_{50}$$

$$\text{Log}DL_{50} (90\%I.C) = \text{Log}(49.8195729 \pm 2(18.94969417))$$

$$\text{Log}DL_{50} = (-36.2019)$$

$$\text{Log}DL_{50} = (39.5967)$$



Anexo 9 Calculo de Densidad

Calculo de la Densidad del aceite Esencial

$$\zeta_{25^{\circ}\text{C}} = \frac{0.99602(M_1 A)}{M_2 + A}$$

M1= Es la masa en g de la sustancia a analizar.

M2= Es la masa en g del H₂O.

A= Es el Factor de corrección del aire (0.0012M2)

0.99602 = Es la densidad del agua a 25°C en Kg^m⁻³.

Picnómetro Vacío: 19.0887g.

Peso H₂O: 19.1919

Peso Aceite Esencial: 19.1943.

(Pic. +H₂O) masa- (Pic. Vacío)masa
19.1919-19.0887 = 0.1032g Masa H₂O

(Pic. + Muestra) masa – (Pic. Vacío) masa
19.1943 – 19.0887 = 0.1056 Masa A.E.

$$\zeta_{25^{\circ}\text{C}} = \frac{0.996025(0.1056\text{g} + 0.0012)}{0.1032\text{g} + 0.0012}$$

$$\zeta_{25^{\circ}\text{C}} = \frac{0.99602\text{g} / \text{mL}(0.1068)}{0.1044}$$

$$\zeta_{25^{\circ}\text{C}} = \frac{0.106374936}{0.1044}$$

$$\zeta_{25^{\circ}\text{C}} = 1.018917011\text{g} / \text{mL}$$



Anexo 10

Foto de Extracción del Aceite Esencial Realizada en ISNAYA

