

Efecto relajante de las hojas de *Ocimum basilicum* y *Foeniculum vulgare* colombianas en íleon aislado de rata

CAROLINA ALBA ROSERO¹

ROBINSON CAMACHO²

MAURICIO POLANCO²

SEBASTIÁN GÓMEZ²

Resumen

El hinojo y la albahaca han sido usadas por largo tiempo en la medicina popular como antiespasmódicos para mejorar las dolencias gastrointestinales y el cólico intestinal. Se evaluó el efecto *in vitro* de la infusión al 10% de hojas secas de *Ocimum basilicum* (albahaca) y *Foeniculum vulgare* (hinojo) cundiboyacenses y la mezcla 1:1 de ambas infusiones, en el tono de íleon precontraído de rata. Se observó una disminución del tono al comparar con el agua destilada en cantidades iguales, la cual fue dependiente de la dosis, con una diferencia estadísticamente significativa, para cada una de las plantas y la mezcla. No se encontró un efecto aditivo con la mezcla de ambas plantas. El estudio demostró el efecto relajante de las infusiones de albahaca e hinojo al 10%, en el tono del íleon precontraído de rata.

Palabras clave: *Ocimum basilicum*, *Foeniculum vulgare*, medicina tradicional, cólico intestinal, antiespasmódico, albahaca, hinojo

Title:

Relaxing effect of the leaves of Colombian *Ocimum basilicum* and *Foeniculum vulgare* in a rat's cut off ileum

Abstract

Fennel and basil have been used for a long time in popular medicine as antispasmodic to alleviate gastrointestinal colics and complaints. The effect of 10% of dry leaves of basil infusion (*Ocimum basilicum*) as well as fennel infusion (*Foeniculum vulgare*) was evaluated. The mixture of both infusions 1:1 in the tone of a rat contracted ileum were also evaluated *in vitro*. A decrease in the tone compared with the distilled water in equal quantities was seen. This one was a dependent dose with a statistical meaningful difference for each one of the plants and the mixture. We did not find out an additive effect with the two plants mixture. The study showed the relaxing effect of the fennel and basil 10% infusion, in the tone of the pre-contracted rat's ileum.

Key words: *Ocimum basilicum*, *Foeniculum vulgare*, traditional medicine, intestinal colic, antispasmodic, fennel and basil

1 Médico Interno, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

2 Estudiante de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido: 19-09-2008

Revisado: 15-11-2008

Aceptado: 15-01-2009

Introducción

Una gran variedad de enfermedades se manifiestan con dolor abdominal tipo cólico, un síntoma claramente inespecífico, pero significativamente molesto, cuya prevalencia estimada para la población adulta es cercana al 30% [1]. Entre las opciones terapéuticas para tratar el cólico intestinal, los antiespasmódicos suelen considerarse los fármacos de primera línea de tratamiento [2]. Sin embargo, aunque algunos estudios consideran su eficacia mayor a la del placebo, el número necesario por tratar de pacientes para fármacos como el butil bromuro de hioscina y la mebeverina, varía entre 5 a 8 pacientes, para lograr aliviar el síntoma en tan sólo uno, por lo cual es necesario el estudio de alternativas más eficaces [2].

La medicina alternativa, y dentro de ella la terapia herbal, se convierte en una posibilidad frente al tratamiento de las alteraciones gastrointestinales, siendo su uso muy común en la población general [3]. Se han realizado estudios experimentales y clínicos para evaluar la efectividad de algunas plantas en el cólico intestinal y se han encontrado efectos a favor del uso de la terapia herbal frente a enfermedades como el síndrome de intestino irritable y el cólico de los lactantes [3,4,6,7]. El uso del hinojo, específicamente del aceite de sus semillas, ha demostrado beneficios mayores a los del placebo, en la reduc-

ción de los síntomas del cólico en lactantes entre las 2 y 12 semanas ($p < 0,01$) [5], al igual que su uso en conjunto con otras plantas como la manzanilla, en cuyo caso, 57% de los lactantes eliminaron el síntoma de cólico frente al 27% del grupo placebo ($p < 0,01$) [6]. En poblaciones adultas, el aceite de menta redujo la intensidad del dolor abdominal en pacientes con síndrome de intestino irritable, de forma significativa [7].

Ocimum basilicum

La albahaca es una planta originaria de Europa perteneciente a la familia de las lamináceas; mide, aproximadamente, 80 cm de altura y se encuentra en climas templados [8,9]. Sus componentes químicos han sido estudiados en varias ocasiones y entre ellos se han encontrado las siguientes sustancias: alfa-pineno, beta-pineno, 1,8-cineol, linalol, camfor, metil chavicol (estragol), metil (Z)-cinamato, eugenol, beta-elemeno, metil (E)-cinamato, beta-cariofileno, beta-cubebeno, beta-bisaboleno, y alfa-muurolol [10]. Algunos de estos componentes se han estudiado de manera individual, y han demostrado efectos relajantes y espasmolíticos sobre el músculo liso *in vitro*, principalmente en el íleon [11-16].

Algunos experimentos realizados en íleon aislado de rata, con *O. basilicum* mexicana, han demostrado

que su extracto y el de otras plantas, usadas comúnmente en la cultura popular mexicana, logran inhibir la actividad secretora inducida por la toxina del *Vibrio cholerae*, con un rango de inhibición entre el 68% (extractos acuosos) y el 68,7% (extractos metanólicos)[17], aunque no haya más estudios que sustenten su uso en otras patologías gastrointestinales que cursen con dolor abdominal tipo cólico.

Foeniculum vulgare

El hinojo es una planta perteneciente a la familia de las umbelíferas, originaria del Mediterráneo, la cual crece en un amplio rango de temperatura; posee hojas verde-grisáceas triangulares con numerosos folíolos filiformes y puede alcanzar una altura de 1 a 2 metros[8]. Entre las principales sustancias del aceite esencial de esta planta, se encuentran el anetol y el estragol, aunque se ha descrito una gran variedad de sus componentes, como la alanina, arginina, histidina, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido linoleico, trans-anetol, fenchono, limoneno y alfa pineno[18].

Alrededor del hinojo se han elaborado numerosos estudios, que han establecido dentro de sus múltiples propiedades, efectos antiinflamatorios, antioxidantes y analgésicos, en la respuesta a la inflamación en modelos

animales[19], al igual que efectos broncodilatadores *in vitro*[20], y efectos gastroprotectores capaces de disminuir la peroxidación lipídica e incrementar la actividad antioxidante en la mucosa gástrica[21].

Un único estudio clínico evalúa su uso en el manejo del síndrome de intestino irritable, en una muestra de tan sólo 5 pacientes a quienes se les administraron semillas de hinojo; los pacientes presentaron una disminución en la frecuencia e intensidad de los síntomas, a las dos semanas de tratamiento[22]. Ambas plantas, tanto el hinojo como la albahaca, se han utilizado ampliamente en la cultura popular para el alivio de síntomas gastrointestinales como el cólico, aunque no exista una clara evidencia científica que soporte su uso.

Teniendo en cuenta la gran utilización de la terapia herbal como tratamiento en enfermedades gastrointestinales, su prevalencia en la población general y la falta de información sobre los efectos de esta terapia, el principal objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las infusiones de albahaca (*O. basilicum*) e hinojo (*F. vulgare*) sobre el tono de íleon precontraído de rata, en búsqueda de evidencia científica que sustente su uso popular para el manejo de síntomas espasmódicos en algunas enfermedades gastrointestinales.

Materiales y métodos

Diseño

Se realizó un estudio experimental *in vitro* en tejido aislado de íleon de rata y se observó el cambio de tono del músculo liso del íleon precontraído con cloruro de potasio (KCl), por medio de la infusión al 10% de hojas secas de *O. basilicum* y *F. vulgare*.

Se analizó la diferencia entre el efecto de la infusión de *O. basilicum*, *F. vulgare* y la mezcla de ambas infusiones, entre sí.

Variables

Durante los experimentos se analizó el porcentaje de cambio del tono, medido como la disminución porcentual en el tono, observado con la contracción obtenida con KCl del músculo liso de intestino aislado de rata inducido por las diferentes infusiones.

Técnica

Plantas. Se adquirieron en el mercado local, específicamente en las plazas Paloquemao y Samper de Bogotá; se seleccionaron las plantas que tenían menos de dos días de recolección y que habían sido sembradas en el altiplano cundiboyacense (Colombia). Fueron identificadas por Gabriel Delfín Pascual Amaya, experto en botánica del Departamento de Farmacología de la

Pontificia Universidad Javeriana. Se escogieron muestras de *F. vulgare* y *O. basilicum*, y se seleccionaron las hojas.

Animales. Se escogieron nueve hembras de ratas Wistar albinas adquiridas en el Laboratorio de Fisiología y Farmacología de la Pontificia Universidad Javeriana, con pesos entre 200 y 350 g, que fueron criadas en condiciones ambientales estandarizadas.

Productos químicos. El KCl, la atropina y el agua destilada, se adquirieron en el Laboratorio de Farmacología y Fisiología de la Pontificia Universidad Javeriana.

Preparación de las plantas. Las plantas fueron secadas en un ambiente a 50° grados Celsius con circulación permanente de aire, libre de luz solar, por 15 horas aproximadamente. Se tomaron las hojas secas de *F. vulgare*, se trituraron y pulverizaron para ser diluidas en agua destilada, previamente calentada hasta la ebullición para preparar una infusión al 10% peso/volumen (P/V), y se dejaron enfriar por 10 minutos. Con *O. basilicum*, se tomaron las hojas y se realizó el mismo procedimiento. Luego, se preparó una mezcla de las dos infusiones 1:1.

Preparación de íleon. Se realizó el sacrificio del animal por disección cervical y, posteriormente, la extracción quirúrgica del íleon de cada rata, to-

mando 2 cm de longitud. La muestra se sujetó con seda 3-0 en sus dos extremos: el proximal se ató al sensor de tensión, previamente calibrado con un peso de 0,5 g y, el distal, a un soporte de vidrio sumergido en solución Tyrode (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2 g de CaCl₂, 0,1 g de MgCl₂, 0,05 g de NaH₂PO₄, 1 g de NaHCO₃ y 1 g de glucosa).

La dosis máxima de precontracción con KCl al 10% encontrada en una curva preliminar fue de 1 ml, y se utilizó en todas las unidades de análisis.

En todos los grupos se dejó estabilizar la muestra, al menos, por 20 minutos y luego se realizó la precontracción con 1 ml de KCl al 10%, con lo cual se logró la máxima contracción. En el primer grupo se registró la acción de 0,02 ml, 0,3 ml y 3 ml de la infusión al 10% de *O. basilicum* aplicadas en el íleon aislado de rata, con un intervalo entre dosis de 3 minutos, aproximadamente. Luego de la administración de la última dosis, se registró el tono durante 10 minutos, se realizó el lavado de la cámara de órgano aislado y se esperó la estabilización de la muestra durante 10 minutos. En el segundo grupo se registró la acción de la infusión al 10% de 0,02 ml, 0,3 ml y 3 ml de *F. vulgare* y, en el tercero, se registró la acción de 0,02 ml, 0,3 ml y 3 ml de la mezcla de ambas infusiones en relación 1:1, en ambos grupos

y siguiendo el mismo procedimiento mencionado para la albahaca. En el cuarto grupo se registró el efecto de 3 ml de agua destilada, como grupo control, que se dejó estabilizar 10 minutos antes del último lavado. Se utilizaron siete unidades de análisis para cada uno de los grupos.

Recolección de datos

Se recolectaron los datos por medio de un transductor de tensión con conexión a un polígrafo (Powerlab 800) y un computador que realizó un registro de la actividad muscular del íleon aislado de rata. Se consignaron los cambios en el tono de la muestra.

Análisis

Después de la recolección de datos, se buscó la diferencia estadística por medio de las pruebas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, con una significancia de 0,05.

La prueba de Mann-Whitney se utilizó para encontrar diferencias en el porcentaje de cambio del tono de músculo liso de intestino aislado de rata con las diferentes infusiones en comparación con el control.

La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para buscar diferencias de promedios del efecto máximo encontrado con las diferentes infusiones.

Se realizó una curva logarítmica de dosis-respuesta de cada uno de los grupos.

Resultados

Todas las infusiones utilizadas (*O. basilicum*, *F. vulgare* y la mezcla de ambas) a una dosis máxima de 3 ml lograron disminuir el tono de íleon precontraído con KCl, con una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control.

Una dosis de 3 ml de la infusión de *O. basilicum* mostró una disminución promedio de 75,2% en el tono del músculo liso, en comparación con una disminución de 13,04% en el grupo control ($p=0,002$); la infusión de *F. vulgare* y la mezcla a las mismas do-

sis, también mostraron una disminución del tono significativa con respecto al grupo control (tabla 1).

No se encontró ninguna diferencia en la comparación de los porcentajes de relajación obtenidos con cada una de las infusiones a la mayor dosis ($p=0,932$).

El porcentaje promedio de cambio de tono con cada una de las dosis se muestra en la tabla 2.

La comparación del promedio de porcentaje de relajación mostró un cambio significativo entre la dosis de 0,3 ml y 3 ml con las infusiones de *F. vulgare* y de *O. basilicum*, con un valor de p de 0,017 y 0,026, respectivamente, mientras que con la infusión

Tabla 1

Disminución del tono del músculo liso con una dosis de 3 ml con las diferentes infusiones

Experimento	Hinojo al 10% 3 ml	Albahaca al 10% 3 ml	Mezcla al 10% 3 ml	Agua destilada 3 ml
1	48,52	53,13	72,32	-7,17
2	93,83	83,03	-	20,35
3	25,12	48,32	13,29	23,28
4	93,57	128,16	134,2	28,41
5	94,83	119,52	90,65	9,65
6	46,97	-	83,51	35,75
7	75,71	73,51	61,61	-6,75
8	-	20,84	15,2	0,79
Promedio de porcentaje de relajación	68,40% $p=0,002$	75,20% $p=0,002$	67,20% $p=0,017$	13,04% -

de la mezcla no fue significativo ($p=0,053$) (tabla 2).

Con los resultados obtenidos y el método utilizado, se puede construir una curva logarítmica de dosis-respuesta de cada una de las infusiones, con la cual nos podemos aproximar al cálculo del p50 (figura 1).

La tabla 1 muestra el porcentaje de descenso de tono al utilizar cada una de las infusiones y agua destilada a una dosis de 3 ml. Obsérvese cómo, al comparar el resultado de las infusiones con el grupo control, todas las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Discusión

García-Barriga realizó una recopilación de las propiedades medicinales atribuidas a las plantas en Colombia y encontró que la albahaca y el hinojo

se usan para tratar el cólico intestinal, con base en la creencia de su acción espasmolítica sobre el músculo liso intestinal[8].

En el estudio se encontró que las hojas secas de la albahaca y el hinojo, preparadas en infusión al 10%, relajan el íleon de rata precontraído con KCl, con un efecto similar; con la albahaca se obtuvo el mayor promedio de relajación. Sin embargo, hubo dos experimentos (tabla 1) en los que la diferencia con el grupo control fue mínima. Aunque se siguió la metodología arriba descrita, la preparación de las infusiones se realizó en días previos al experimento, lo que pudo haber afectado la composición de la preparación y, de esta forma, su efecto. No obstante, no hay estudios que avalen esta afirmación.

En cambio, hay factores como las características morfológicas de las

Tabla 2
Promedio de porcentaje de disminución del tono según la dosis con las diferentes infusiones

Dosis (ml)	Promedio de porcentaje de cambio		
	Hinojo	Albahaca	Mezcla
0,02 ml	15,8	8,6	9,6
0,3 ml	33,8	21,3	27
3 ml	68,4*	75,2*	67,2x ò

* Comparación entre las dosis de 0,3 ml y 3 ml (hinojo $p=0,017$, albahaca $p=0,026$)

x Comparación entre las dosis de 0,3 ml y 3 ml de la mezcla ($p=0,053$)

? Comparación entre las dosis de 0,02 ml y 3 ml de la mezcla ($p=0,038$)

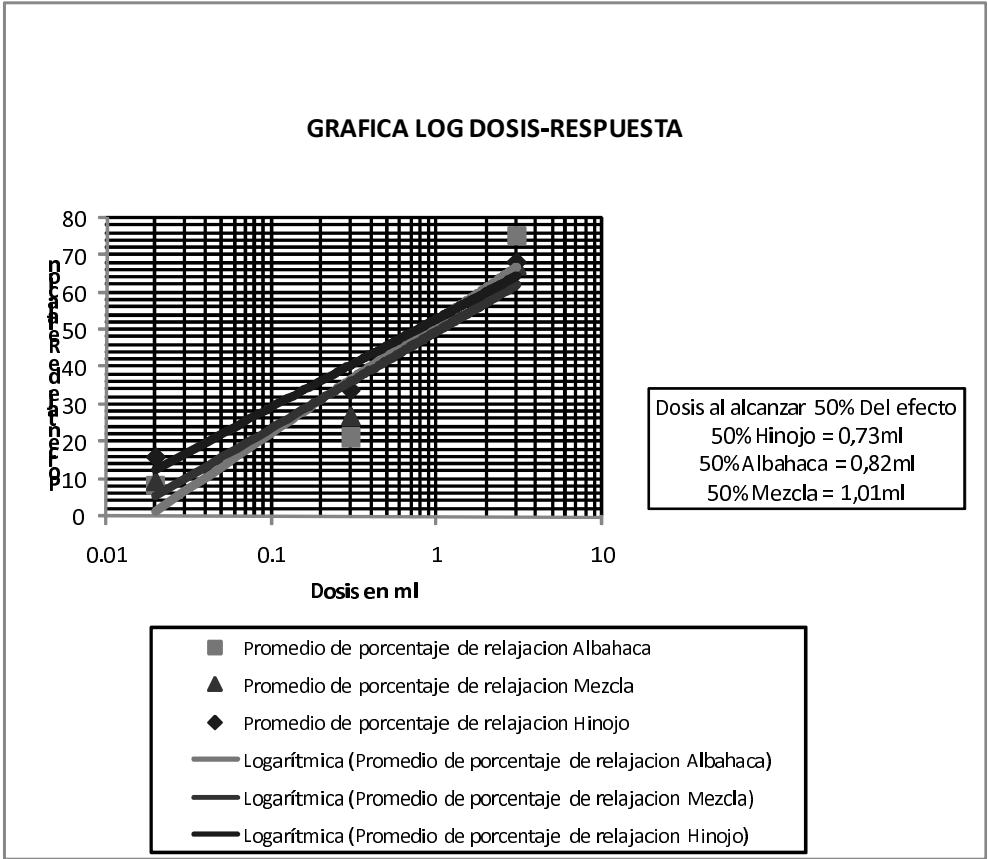


Figura 1. Comparación del porcentaje de disminución del tono en función de la dosis utilizada en cada una de las infusiones.

plantas, la forma de sembrado y de recolección[23,24] y hasta el procesamiento para obtener la infusión[25-28], que se han identificado como procesos que potencialmente varían la composición de las plantas, y es posible que esto altere la reproducibilidad de los resultados obtenidos en nuestro estudio.

El efecto relajante de las infusiones dependió claramente de las dosis

utilizadas en todas las unidades de análisis y fue significativamente mayor para la dosis de 3 ml, lo que podría establecer que el efecto relajante de las infusiones tendría una relación dependiente de la dosis.

El hecho de que ambas infusiones, la de *O. basilicum* y la de *F. vulgare*, lograrán un efecto relajante *in vitro*, podría hacer suponer que, al unir ambas plantas en una relación 1:1, el re-

sultado obtenido respecto a la disminución de tono mostraría un efecto aditivo. Los resultados no mostraron tal efecto, aunque la relajación obtenida fue significativa comparada con el grupo control.

De igual manera, las curvas logarítmicas de dosis-respuesta de las tres preparaciones tuvieron una forma similar y la comparación del efecto de cada grupo entre sí, alcanzado con la dosis de 3 ml, no mostró diferencia significativa. Esto, y el hecho que la mezcla de ambas infusiones no mostrara un efecto aditivo ni antagónico, indican que el mecanismo de acción del principio activo de cada planta puede ser similar e, incluso, que el principio activo puede ser el mismo.

Algunas sustancias compartidas por el hinojo y la albahaca han mostrado tener efecto sobre el músculo liso, el linalol, que parece tener un efecto espasmolítico claro mediado por AMPc sobre el íleon de cobayo y el útero de rata[11]; el cineol es capaz de disminuir la contracción del músculo liso de la tráquea del cobayo[12] y, al igual que el eugenol y el metil eugenol, parece ser el responsable del efecto relajante de *O. gratissimum* sobre el íleon aislado de cobayo[13,14]; el alfa pineno también mostró un descenso significativo del tono basal en íleon del cobayo precontraído previamente con KCl y acetilcolina[15,16].

No obstante, la proporción de estos compuestos químicos varía entre las hojas del hinojo y la albahaca, y es necesaria la realización de nuevos estudios que analicen los componentes del hinojo y la albahaca colombianos, su variabilidad, su efecto en el músculo liso intestinal y cualquier efecto adverso en animales y humanos.

La contracción del íleon inducida por KCl afecta directamente el músculo liso intestinal. Una gran concentración de este compuesto en el medio extracelular hace que la célula se despolarice y, como consecuencia, se activen los canales de calcio que dependen del voltaje, ingrese calcio a la célula y ésta se contraiga, producto de su unión con componentes intracelulares[29]. La disminución del tono con estas plantas posterior a la contracción con KCl debe, de alguna manera, alterar o inhibir alguno de los pasos de la contracción inducida por canales que dependen del voltaje.

En un experimento preliminar, las dosis ascendentes de atropina, desde 0,01 ml hasta 1 ml de una solución al 0,1 M, en íleon de rata precontraído con KCl, no mostraron cambio en el tono. Sin embargo, en diferentes estudios han mostrado una acción relajante cuando el íleon aislado se contrae con acetilcolina[29]. Esto sugiere que tanto la albahaca como el hinojo poseen un mecanismo de acción alterno al de

la atropina, sin poder descartarse que actúen mediante el receptor muscarínico; y que dicho mecanismo está relacionado con la contracción mediada por canales dependientes del voltaje, ya sea actuando sobre canales iónicos que modifiquen la polaridad de la membrana o alterando la función de los componentes intracelulares implicados en la contracción del músculo liso intestinal.

El cólico intestinal es un síntoma inespecífico que carece de marcadores biológicos que puedan determinar su valor y significado en las enfermedades gastrointestinales de carácter orgánico y funcional. Dada la dificultad de su aproximación clínica y fisiopatológica, las posibilidades terapéuticas incluyen una amplia gama de alternativas, entre las que se encuentran los antiespasmódicos y la terapia herbal, que se convierte en una de las más utilizadas hoy en día.

El efecto relajante *in vitro* de *O. basilicum* y *F. vulgare*, obtenido en nuestro estudio, podría explicar su uso en la cultura popular para el alivio del cólico intestinal, aunque no permite establecer a cuál o cuáles de los componentes de estas plantas se debe dicho efecto. De hecho, el procesamiento de la planta desde su cultivo hasta su estado dentro de la infusión, incluye una serie de procesos que varían entre sí y, por lo tanto, pueden modificar los componentes

herbales. Por esto, establecer con precisión el o los sustratos específicos que poseen un efecto antiespasmódico, podría dar lugar a nuevos estudios.

Agradecimientos

Al Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Pontificia Universidad Javeriana, especialmente a Gabriel Pascual, Henry Aceros, Esperanza Holguín y Darío Riascos.

Bibliografía

1. Tytgat GN. *Hyoscine butylbromide: a review of its use in the treatment of abdominal cramping and pain*. *Drugs*. 2007;67:1343-57.
2. Spiller R, Aziz Q, Creed F, Emmanuel A, Houghton L, Hungin P, et al. *Guidelines for the management of irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management*. 2007 Dec;56(12):1770-98. Epub 2007 May 8.
3. Liu JP, Yang M, Liu YX, Wei ML, Grimsgaard S. *Herbal medicines for treatment of irritable bowel syndrome*. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;25;(1):CD004116.
4. Hussain Z, Quigley EM. *Systematic review: Complementary and alternative medicine in the irritable bowel syndrome*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 23:465-71.
5. Alexandrovich I, Rakovitskaya O, Kolmo E, Sidorova T. *The effect of fennel (Foeniculum vulgare) seed oil emulsion in infantile colic: a randomized, placebo controlled study*. *Alternative Therapies in health and medicine*. Jul-Aug 2003;9(4):58-61.

6. Gardiner P. *Complementary, holistic, and integrative medicine: Chamomile*. *Pediatr Rev*. Apr 2007;28(4):e16-8.
7. Kliger B, Chaudary S. *Peppermint Oil*. *Am Fam Physician* 2007;75:1027-30.
8. García-Barriga H. *Flora medicinal de Colombia*. Botánica médica. Bogotá: Imprenta Nacional; Tomo 2. 1975;336-7.
9. Mahabir G. *270 plantas medicinales iberoamericanas*. Santa Fe de Bogotá: Editorial Presencia Ltda.; 1995;320-4.
10. Grayer RJ, Kite GC, Goldstone FJ, Bryan SE, Paton A, Putievsky E. *Infraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*. 1996;43:1033-9.
11. Lis-Balchin M, Hart S. *Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (Lavandula angustifolia P. Miller)*. *Phyther Res*. 1999;13:540-2.
12. Coelho-de-Souza LN, Leal-Cardoso JH, de Abreu FJ, Lahlou S, Magalhães PJ. *Relaxant effects of the essential oil of Eucalyptus tereticornis and its main constituent 1,8-cineole on guinea-pig tracheal smooth muscle*. *Planta Med*. 2005;71:1173-5.
13. Madeira SV, Rabelo M, Soares PM, Souza EP, Meireles AV, Montenegro C, et al. *Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of Ocimum gratissimum L. (Labiatae) on guinea-pig ileum*. *Phytomedicine*. 2005;12:506-9.
14. Lima CC, Criddle DN, Coelho-de-Souza AN, Monte FJ, Jaffar M, Leal-Cardoso JH. *Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum*. *Planta Med*. 2000;66:408-11.
15. Câmara CC, Nascimento NR, Macêdo-Filho CL, Almeida FB, Fonteles MC. *Antispasmodic effect of the essential oil of Plectranthus barbatus and some major constituents on the guinea-pig ileum*. *Planta Med*. 2003;69:1080-5.
16. Sadraei H, Asghari GR, Hajhashemi V, Kolagar A, Ebrahimi M. *Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of Ferula gummosa Boiss on ileum contractions*. *Phytomedicine*. 2001;8:370-6.
17. Velásquez C, Calzada F, Torres J, González F, Ceballos G. *Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico*. *J Ethnopharmacol*. 2006;103:66-70.
18. Barazani O, Fait A, Cohen Y, Diminshtein S, Ravid U, Putievsky E, et al. *Chemical variation among indigenous populations of Foeniculum vulgare var. vulgare in Israel*. *Planta Med*. 1999;65:486-9.
19. Choi EM, Hwang JK. *Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*. 2004;75:557-65.
20. Boskabady MH, Khatami A, Nazari A. *Possible mechanism(s) for relaxant effects of Foeniculum vulgare on guinea pig tracheal chains*. *Pharmazie*. 2004;59:561-4.
21. Birdane FM, Cemex M, Birdane YO, Gülçin I, Büyükkuroglu ME. *Beneficial effects of Foeniculum vulgare on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats*. *World J Gastroenterol*. 2007;13:607-11.
22. Amjad H, Jafary HA, Beckley, WV. *Foeniculum vulgare therapy in irritable bowel syndrome*. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95 (9): 2491 – 2491.

23. Akgül A, Bayrak A. *Comparative volatile oil composition of various parts from Turkish bitter fennel*. Food Chemistry. 1988;30:319-23.
24. Vagen IM, Moe R, Ronglan E. *Diurnal temperature alternations (DIF/drop) affect chlorophyll content and chlorophyll a/chlorophyll b ratio in Melissa officinalis L. and Ocimum basilicum L., but not in Viola x wittrockiana Gams*. Scientia horticulturae. 2003; 97(2): 153-162
25. Telci I, Bayram E, Yilmaz G, Avci B. *Variability in essential oil composition of Turkish basils (Ocimum basilicum L)*. Biochem Syst Ecol. 2006;24:489-97.
26. Antonelli A, Fabbri C, Boselli E. *Modifications of dried basil (Ocimum basilicum) leaf oil by gamma and microwave irradiation*. Food Chemistry. 1998; 63:485-89.
27. Lucchesi ME, Chemar F, Smadja J. *Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation*. J Chromatog. Volume 1043, Issue 2, 23 July 2004, Pages 323-7.
28. Özcan M, Arslan D, Ünver A. *Effect of drying methods on the mineral content of basil (Ocimum basilicum L.)*. J Food Process Eng. 2005;69:375-9.
29. Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. *Relaxant effect of essential oil of Melissa officinalis and citral on rat ileum contractions*. Fitoterapia. 2003;74: 445-52.