

**EFECTO ESPASMOLÍTICO Y
ANTIBACTERIANO DE LA ESPECIE
Bursera graveolens (Kunth) Triana & Planch.**

**SPASMOLYTIC AND
ANTIBACTERIAL EFFECT OF THE
Bursera graveolens (Kunth) Triana &
Planch. SPECIES.**

Sánchez-Recillas, A., S. L. Aragón-Castillo, A. L. Arroyo-Herrera, J.A. Araujo-León y R. R. Ortiz-Andrade.

EFECTO ESPASMOLÍTICO Y ANTIBACTERIANO DE LA ESPECIE *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch.

SPASMOLYTIC AND ANTIBACTERIAL EFFECT OF THE *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch. SPECIES.

EFFECTO ESPASMOLÍTICO Y ANTIBACTERIANO DE LA ESPECIE *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch.

SPASMOLYTIC AND ANTIBACTERIAL EFFECT OF THE *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch. SPECIES.

Sánchez-Recillas, A.,
S. L. Aragón-Castillo,
A. L. Arroyo-Herrera,
J.A. Araujo-León y
R. R. Ortiz-Andrade

EFFECTO ESPASMOLÍTICO
Y ANTIBACTERIANO DE
LA ESPECIE *Bursera
graveolens* (Kunth) Triana
& Planch.

SPASMOLYTIC AND
ANTIBACTERIAL EFFECT
OF THE *Bursera graveolens*
(Kunth) Triana & Planch.
SPECIES.

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 49: 135-147. Enero 2020

DOI:
10.18387/polibotanica.49.9

A. Sánchez-Recillas
S. L. Aragón-Castillo
A. L. Arroyo-Herrera

Laboratorio de Farmacología; Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Calle 43 # 613 x Calle 90, Colonia Inalámbrica, 97069 Mérida, Yucatán.

J.A. Araujo-León

Laboratorio de Cromatografía; Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Calle 43 # 613 x Calle 90, Colonia Inalámbrica, 97069 Mérida, Yucatán.

R. R. Ortiz-Andrade / rolffy@correo.uady.mx

Laboratorio de Farmacología; Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Calle 43 #613 x Calle 90, Colonia Inalámbrica, 97069 Mérida, Yucatán.

RESUMEN: La especie vegetal *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch. es utilizada en la medicina tradicional Maya por sus efectos antidiarreicos, sin embargo, esta especie ha sido poco explorada con la finalidad de conocer sus efectos farmacológicos, además de que carece de estudios que sugieran su potencial antidiarreico. Con base en esto, en el presente trabajo se determinó el efecto espasmolítico *ex vivo* en íleon aislado de rata, así como la actividad antibacteriana *in vitro* en cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella choleraesuis* de tres extractos vegetales (hexánico: EHBg, diclorometánico: EDBg y metanólico: EMBg) obtenidos a partir de las hojas de *B. graveolens*. Los extractos EHBg ($E_{\text{máx}} = 74.88\%$, $CE_{50} = 97.38 \mu\text{g/mL}$) y EDBg ($E_{\text{máx}} = 89.21\%$, $CE_{50} = 87.15 \mu\text{g/mL}$) presentaron efecto espasmolítico significativo (* $p < 0.05$) comparado con papaverina (usada como control), en la contracción espontánea del íleon aislado de rata. En cuanto a la inhibición del crecimiento de enterobacterias, el EHBg presentó actividad antibacteriana contra las cuatro cepas evaluadas ejerciendo mayor inhibición frente a *E. coli*, por lo que se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de dilución en caldo, observándose que *E. coli* es sensible a la concentración de 5 mg/mL de EHBg. La disminución de la contracción espontánea en intestino de rata, así como el efecto antibacteriano ejercido sobre enterobacterias de interés patógeno mostrado por los extractos orgánicos de las hojas de *B. graveolens* puede atribuirse a la presencia de sesquiterpenos según los reportes de la literatura.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, *Bursera graveolens*, diarrea, ensayo *ex vivo*, íleon de rata.

ABSTRACT: *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch. is used in traditional Mayan medicine due to its antidiarrheal effect. This species has been poorly explored for pharmacological effects knowledge, and it lacks assays describing the antidiarrheal effect. Due to this lack of information, our teamwork conducted efforts to establish spasmolytic effect using rat isolated ileum and antibacterial effect using *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella choleraesuis*. We evaluated three extracts (hexanic: HEBg, dichloromethanic: DEBg and methanolic:

MEBg) of *B. graveolens* leaves. HEBg ($E_{max} = 74.88\%$, $EC_{50} = 97.38 \mu\text{g/mL}$) and DEBg ($E_{max} = 89.21\%$, $EC_{50} = 87.15 \mu\text{g/mL}$) extracts shown significant spasmolytic effect ($*p < 0.05$) challenging papaverine, in spontaneous contraction of rat isolated ileum. HEBg shows antibacterial activity against four different bacteria's, and was more efficient against *E. coli*, with a Minimal Inhibitory Concentration (MIC) asset in broth dilution equal to 5 mg/mL. The decrease in spontaneous contraction in the rat intestine as well as the antibacterial effect exerted on pathogenic enterobacteria demonstrated by the organic extracts of the leaves of *B. graveolens* can be attributed to the presence of sesquiterpenes according to literature reports.

Key words: Antibacterial activity, *Bursera graveolens*, diarrhea, rat ileum, *ex vivo* test.

INTRODUCCIÓN

La diarrea se define como un aumento de la frecuencia, el volumen y la fluidez en las deposiciones, considerándose patológico un peso de heces superior a 225 g/día, y con un contenido acuoso superior al 70% de la masa total, frecuentemente se presenta gran pérdida de líquido y electrolitos, provocando deshidratación (Pérez, 2003). En la actualidad, las infecciones diarreicas representan una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en países subdesarrollados y en desarrollo, afectando principalmente a población en edad infantil (World Health Organization, 2017). El abordaje terapéutico comprende hidratación oral con soluciones ricas en glucosa y electrolitos, una dieta con alimentos en pequeñas cantidades varias veces al día evitando alimentos con lactosa y cafeína, así como farmacoterapia con antiinfecciosos y espasmolíticos (Román *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de existir una terapia bien establecida, se estima que alrededor del 80% de la población en los países en desarrollo dependen casi completamente de la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de salud. En este contexto, las plantas se consideran la base de los sistemas de Medicina Tradicional (MT), que por cientos de años diferentes culturas han empleados para mantener la salud e incrementar la calidad de vida del hombre (Organización Mundial de la Salud, 2002). En las últimas décadas, las drogas secas y los extractos vegetales han tenido una aportación cada vez mayor en el descubrimiento de nuevos fármacos o fitofármacos, ya que han sido coadyuvantes al tratamiento de enfermedades prevalentes. Así, entre los propósitos de la ciencia actual están las investigaciones dirigidas hacia la transformación del conocimiento tradicional en científico; los hábitos y costumbres en terapias comprobadas, y los preparados, remedios e infusiones en suplementos nutricionales y productos farmacéuticos (Prieto-González *et al.*, 2004).

En el Estado de Yucatán, de acuerdo con registros de Méndez & Durán, 2012, los padecimientos en los que se emplea un mayor número remedios herbolarios son: gastrointestinales, respiratorios, problemas cutáneos, problemas renales y urinarios, diabetes y enfermedades de la mujer (Durán & Méndez, 2015; Romero *et al.*, 2004). Entre las especies vegetales que son empleadas para tratar problemas diarreicos se enlistan: *Annona muricata* ("Tak'ob", "guanábana"), *Antigonon leptopus* ("Chaklolmakal", "Flor de San Diego"), *Bauhinia divaricata* ("Sakst'ulubtok", "Pata de vaca") *Brosimum alicastrum* ("Ox", "Ramón"), *Guazuma ulmifolia* ("Pixoy", "Guácima"), *Cordia dodecandra* ("K'opte", siricote") y *Bursera graveolens* ("Nabanche", "Sasafrás"). De las cuales destaca *Bursera graveolens* que además es utilizada en la medicina tradicional Maya en casos de hipertensión arterial, dolor de estómago, asma y para facilitar las labores de parto (Méndez *et al.*, 2010); estudios farmacológicos reportan su actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Robles *et al.*, 2005), su efecto antiinflamatorio (Manzano *et al.*, 2009), antiproliferativo (Monzote *et al.*, 2012), antineoplásico (Nakanishi *et al.*, 2005) y vasorrelajante mediado por la producción de óxido nítrico (Yañez-Pérez, 2016). Con respecto a sus efectos tóxicos, Yañez-Pérez *et al.*, (2016) reportaron que no se presento evidencia de hemato-toxicidad, hepatotoxicidad ni nefrotoxicidad en el ensayo de toxicidad oral aguda en roedores administrados con 50, 300 y 2000 mg/Kg del extracto metanólico integro de hojas de *B. graveolens* (Yañez-Pérez *et al.*, 2016). Con base en lo anterior, se considera que *B. graveolens*

es una especie que ha sido poco explorada con el propósito de conocer su potencial antidiarreico ya sea en modelos farmacológicos *ex vivo* e *in vitro*. Así, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto espasmolítico de tres extractos orgánicos de *B. graveolens* en intestino de rata, y la actividad antibacteriana frente a enterobacterias de interés patógeno, con la finalidad de proporcionar sustento científico al uso etnomédico que la medicina tradicional Maya le atribuye a dicha especie vegetal, y con ello, enriquecer el conocimiento científico sobre *Bursera graveolens* para futuras investigaciones.

MÉTODOS

Obtención de la especie vegetal

Las hojas de *Bursera graveolens* fueron colectadas en la ciudad de Mérida, Yucatán, en mayo de 2017, en el predio ubicado en la calle 29 por 28 de la colonia García Ginerés de la ciudad de Mérida, Yucatán (20.984854, -89.637074). El material vegetal fue identificado por el doctor Salvador Flores Guido de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, y una muestra del ejemplar fue depositada en el herbario “Alfredo Barrera Marín” de dicha Facultad, en el cual se le asignó el siguiente número de voucher: J. S. Flores 11238.

Obtención de los extractos

500 g de hojas de *B. graveolens* se limpiaron con un paño húmedo; posteriormente, se sometieron a un proceso de secado a temperatura ambiente y molienda con un pulverizador de aspas con tamiz # 10 (Hamilton Beach®. EUA). La obtención de los extractos se realizó por maceración exhaustiva por triplicado, empleando 300 g de material vegetal inicial y disolventes orgánicos de polaridad ascendente: hexano (Hx), diclorometano (CH₂Cl₂) y metanol (MeOH), en una proporción 1:10 (m/v), realizando cambios de disolvente cada 72 horas. (Estrada-Soto *et al.*, 2012; Sánchez-Recillas *et al.*, 2018; Sánchez-Recillas *et al.*, 2019). Se obtuvieron tres extractos orgánicos de diferente polaridad, el extracto hexánico (EHBg), diclorometánico (EDBg) y metanólico (EMBg) los cuales fueron llevados a sequedad total mediante evaporación a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio (Büchi®, Suiza). Finalmente, se calcularon los rendimientos porcentuales de cada extracto respecto a la masa inicial de material vegetal utilizado para la maceración (m/m).

Evaluación farmacológica

Fármacos y reactivos

Hidrocloruro de papaverina, dimetilsulfóxido (DMSO) y amikacina fueron obtenidos comercialmente del distribuidor local de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Éter etílico, n-hexano, diclorometano, metanol y sales inorgánicas grado ACS fueron obtenidos de distribuidores comerciales locales.

Efecto espasmolítico intestinal *ex vivo*

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas hembra nulíparas de la cepa Wistar con un peso aproximado de 200-300 g de peso las cuales fueron obtenidas del bioterio de la División Académica de Ciencias de la Salud de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) estos animales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio con acceso a agua y alimento *ad libitum* y fotoperiodos controlados de luz/oscuridad, tal como lo establece la Norma Oficial Mexicana 062 emitida por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA). Los experimentos se realizaron con el menor número de animales de laboratorio posibles, tal como lo sugiere dicha NOM.

Obtención del tejido

Los roedores fueron sacrificados por dislocación cervical previa anestesia profunda con éter etílico (20 mL/kg; vía inhalatoria), a continuación se les realizó un corte a nivel abdominal que permitió el acceso al aparato digestivo, del cual se disectó el íleon y fue colocado en una caja de cultivo con solución fisiológica Ringer Krebs-Henseleit (RKH), la cual fue preparada el mismo día del experimento con la siguiente composición (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25.0; EDTA, 0.026 y dextrosa, 11.1 en agua destilada, la cual fue ajustada a un pH \approx 7.4 y se mantuvo a 37 °C y en constante burbujeo con una mezcla gaseosa de O₂:CO₂ (95:5%). A los segmentos de íleon se les removió el tejido adyacente, mucosidad y alimento, y posteriormente fueron cortados en segmentos de aproximadamente 5 mm de longitud (Sánchez-Recillas *et al.*, 2017).

Sistema de registro

Los tejidos se colocaron en cámaras de incubación de un sistema de registro de tensión isométrica vertical para tejido aislado marca BIOPAC®. En las cámaras los tejidos se sujetaron por medio de dos ganchos de Nikrom®, uno en la parte inferior, sujetado a la base de la cámara y otro colocado en la parte superior, el cual tiene contacto con el transductor de fuerza marca Grass® el cual envía las señales al software Acknowledge® (Vinet *et al.*, 2012). Los segmentos de íleon se ajustaron a 1 g de tensión inicial y se mantuvieron en 14 mL de la solución RKH en condiciones fisiológicas.

Evaluación del efecto espasmolítico sobre la contracción espontánea en íleon de roedor

Para las evaluaciones del efecto espasmolítico sobre la contracción espontánea, los tejidos fueron sometidos a un proceso de estabilización por 30 minutos, manteniendo la tensión espontánea en 1 g de contracción. Al término del tiempo de estabilización, se adicionaron alícuotas de 100 μ L de las diferentes concentraciones de los extractos [de 3.03 a 1000 μ g/mL], del control utilizado (papaverina; [de 1.13 X 10⁻³ a 100 μ g/mL]) y del vehículo (DMSO; de 0.03 a 10%) en orden creciente de concentración. Las concentraciones de las muestras fueron añadidas en orden acumulativo en intervalos de tres minutos hasta completar la concentración máxima del stock [1000 μ g/mL], en el análisis de los resultados se consideró una dilución 1:100 de cada alícuota añadida a las cámaras de incubación para calcular la concentración real de las muestras de prueba en los tejidos y estas fueron utilizadas para la elaboración de las curvas concentración-respuesta (CCR).

El efecto de los extractos, control y vehículo se determinó por comparación de los valores de tensión registrados antes y después de la adición de las muestras de prueba, considerando la actividad espontánea del íleon como el 100% de contracción (Sánchez-Recillas *et al.*, 2017).

Actividad antibacteriana *in vitro*

Condiciones generales del cultivo bacteriano

Los microorganismos que se utilizaron para la determinación antibacteriana fueron cepas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC), de las especies *Escherichia coli* (ATCC 128), *Salmonella enterica* (ATCC 14028), *Salmonella enteritidis* (ATCC 22177), y *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708). Los cultivos de bacterias se incubaron durante 24 h. a 37 °C en agar nutritivo. Los cultivos de existencia se mantuvieron a -80 °C hasta su uso (Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Ramirez & Marin Castaño, 2009).

Método de Kirby-Bauer

Inicialmente los cultivos se ajustaron a 1x10⁸ UFC/mL (0.5 McFarland) con caldo nutritivo, posteriormente se inocularon con las suspensiones sobre placas con agar Mueller-Hinton. Los extractos fueron disueltos en mezcla DMSO: agua (30:70%). En condiciones asépticas, se impregnaron discos de papel filtro estériles y vacíos (8 mm de diámetro) con 50 μ L de las diferentes concentraciones de los extractos [1, 3 y 5 mg/mL], y se colocaron sobre la superficie del agar. Como control positivo se utilizó amikacina [31.2 mg/mL] y DMSO al 30% como vehículo. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las cajas fueron incubadas a 37 \pm 1 °C

durante 24 h, transcurrido el tiempo se midió la zona de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco. Los resultados fueron expresados como el promedio de los mm de diámetro de inhibición bacteriana de tres repeticiones (Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Ramirez & Marin Castaño, 2009; Sánchez-Recillas *et al.*, 2017).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Del extracto con mayor actividad se llevó a cabo la evaluación antibacteriana siguiendo el método de microdilución en placa de 96 pocillos, que consistió en colocar 100 μ L de caldo nutritivo en cada uno de ellos. A continuación, se agregaron las tres concentraciones del extracto seleccionado las cuales fueron disueltos en mezcla DMSO: agua (30:70%) y con una concentración tres veces mayor que la concentración final (1, 3 y 5 mg/mL) en pocillos diferentes, y se realizaron diluciones seriadas (1 a 7.8 μ g/mL; 3 a 23.4 μ g/mL; 5 a 39 μ g/mL). En otros pozos se añadió el control positivo (amikacina; [12.5 μ g/mL]), como control negativo se consideraron pocillos con caldo e inóculo bacteriano (1:1). Se utilizaron cuatro pocillos como blancos, en el primero se adicionó caldo (BC) y en los demás caldo + extracto (uno por cada concentración del extracto; BE1, BE3 y BE5) (Sánchez-Recillas *et al.*, 2017).

Finalmente, se añadieron 100 μ L de inóculo (a 0.5 Mc Farland) a cada pocillo, exceptuando los que correspondían a los blancos, y las placas se incubaron durante 24 h. a 37 ± 1 °C. Posteriormente al tiempo de incubación y para determinar si hubo inhibición del crecimiento bacteriano por la acción del extracto, se añadieron 100 μ L de cloruro de INT (2- (4-yodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5-feniltetrazolio) al 0.02% a la mezcla de reacción, y luego se incubó a 37 ± 1 °C en agitación orbital durante 30 min. El cambio de coloración ocasionado por la interacción de los microorganismos con INT, se determinó mediante la medición de la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro Multiskan® (Ramirez & Marin Castaño, 2009; Sánchez-Recillas *et al.*, 2017).

Análisis estadístico

Los resultados de la evaluación *ex vivo*, fueron representados como el valor de la media de cinco experimentos en animales independientes \pm la desviación estándar de la media para cada extracto. Mientras que la actividad antibacteriana de cada concentración de extracto, controles y los blancos fue determinada por triplicado en experimentos independientes. El análisis estadístico se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba post-hoc de Tukey, considerándose estadísticamente significativos los valores de *p* menores a 0.05 (**p* < 0.05).

RESULTADOS

Se obtuvieron los extractos hexánico (EHBg), diclorometánico (EDBg) y metanólico (EMBg) por maceración exhaustiva, obteniéndose los rendimientos porcentuales mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Rendimientos porcentuales de los extractos obtenidos con disolventes de polaridad ascendente a partir de hojas de *B. graveolens*.

| Disolvente | Extracto | Rendimiento (%) |
|---------------|----------|-----------------|
| Hexano | EHBg | 2.67 |
| Diclorometano | EDBg | 1.49 |
| Metanol | EMBg | 11.14 |

EHBg: Extracto hexánico de *B. graveolens*; EDBg: Extracto diclorometánico de *B. graveolens*; EMBg: Extracto metanólico de *B. graveolens*.

Efecto espasmolítico de *B. graveolens* sobre la contracción espontánea en íleon aislado de rata

En la figura 1 se muestran las curvas concentración-respuesta (CCR) del efecto espasmolítico de los extractos evaluados, se observa que el extracto diclorometánico de las hojas de *B. graveolens* (EDBg) induce un efecto relajante significativo dependiente de la concentración, con un Efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) de $89.21 \pm 5.11\%$, seguido del extracto hexánico (EHBg) que presentó un $E_{m\acute{a}x} = 74.88 \pm 6.06\%$, mientras que el extracto metanólico (EMBg) fue el menos eficaz con un $E_{m\acute{a}x} = 35.18 \pm 3.72\%$. El extracto EDBg fue igual de eficaz que papaverina (un inhibidor de fosfodiesterasas; $E_{m\acute{a}x} = 91.63 \pm 0.92\%$), utilizada como control positivo. En la tabla 2 se muestran los parámetros farmacológicos obtenidos del efecto espasmolítico.

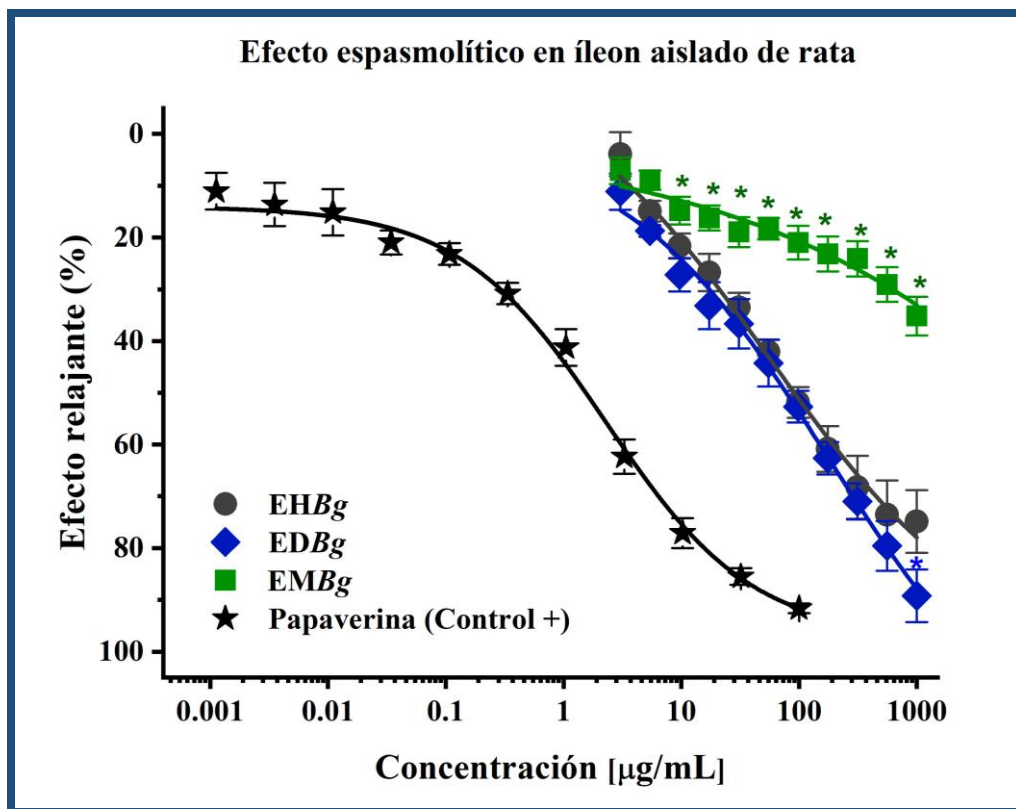


Fig. 1. Curva concentración-respuesta de los extractos de *B. graveolens* y el control positivo (papaverina), sobre la contracción espontánea de íleon aislado de rata (n = 5) *p < 0.05.

Tabla 2. Parámetros farmacológicos de la evaluación del efecto espasmolítico de los extractos de *B. graveolens* sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata.

| Muestra | $E_{m\acute{a}x}$ (%) | CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| EHBg | 74.88 ± 6.06 | 97.38 ± 2.84 |
| EDBg | $89.21 \pm 5.11^*$ | 87.15 ± 3.81 |
| EMBg | 35.18 ± 3.72 | > 1000 |
| Papaverina | 91.63 ± 0.92 | 1.45 ± 0.32 |

$E_{m\acute{a}x}$: Efecto máximo, CE_{50} : Concentración efectiva media, Papaverina: control positivo; inhibidor de fosfodiesterasas, *indica diferencia significativa respecto EHBg

Evaluación antibacteriana *in vitro*

La actividad antibacteriana contra cepas de *E. coli*, *S. enterica*, *S. enteritidis* y *S. choleraesuis* se determinó en cajas Petri con agar Müller-Hinton para los tres extractos orgánicos: hexánico, diclorometánico y metanólico de hojas de *B. graveolens* (EHBg, EDBg y EMBg) siguiendo la metodología de difusión en disco. Los resultados obtenidos de las tres concentraciones evaluadas se muestran en la tabla 3, en donde se indican los milímetros (mm) de inhibición que presentaron los extractos y controles evaluados.

Tabla 3. Inhibición bacteriana presentada por los extractos de *B. graveolens* y los controles utilizados.

| Muestra | Concentración [mg/mL] | Diámetro de inhibición bacteriana (mm) | | | |
|---------------------------------|--------------------------|--|-----------------------|--------------------|------------------------|
| | | <i>E. coli</i> | <i>S. enteritidis</i> | <i>S. enterica</i> | <i>S. choleraesuis</i> |
| DMSO (Control -) | * | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Amikacina (Control +) | 31.2 | 33 | 35 | 30 | 28.33 |
| EHBg | 1 | 29.66 | 19.66 | 14.33 | 15.33 |
| | 3 | 19.66 | 17.66 | 10.66 | 12.33 |
| | 5 | 16 | 16 | 11 | 10.33 |
| EDBg | 1 | 12.25 | 11.8 | 13.33 | 10 |
| | 3 | 11 | 10.4 | 0 | 0 |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EMBg | 1 | 18 | 21 | 11.33 | 15.333 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* Representa DMSO:agua (30:70%).

Los tres extractos orgánicos presentaron actividad antibacteriana contra las cuatro cepas de enterobacterias evaluadas a la concentración de [1 mg/mL]. Los mayores halos de inhibición de cada extracto fueron para el EHBg contra *E. coli*, con un diámetro de inhibición (DI) de 29.66 mm, el EDBg contra *S. enterica* con DI de 13.33 mm y el EMBg contra *S. enteritidis* con DI de 21 mm. Los tres extractos mostraron menor DI a las mayores concentraciones evaluadas.

Considerando la inhibición bacteriana, se determinó la CMI del EHBg sobre *E. coli* mediante el método de microdilución en caldo por medio de la formación de cristales de formazán, evidenciando de esta manera la actividad metabólica bacteriana; se estableció que la CMI del EHBg contra *E. coli* es de 5 mg/mL.

DISCUSIÓN

La especie *B. graveolens* fue elegida mediante el criterio de selección etnomédico y su recolección se realizó en un terreno de traspatio, debido a que en la Península de Yucatán la población depende en gran medida de los remedios herbolarios, es posible encontrar estos ejemplares en terrenos urbanos (Prieto-González *et al.*, 2004). Adicionalmente, la recolecta se realizó en un área libre de pesticidas y herbicidas, alejada de zanjas de drenajes, vertederos o sitios donde transitan animales, seleccionado material vegetal sin evidencias de ataques de insectos u hongos, tal como lo recomienda la OMS (Mesa para la Conservación y Manejo de Plantas Medicinales Tradicionales, 2016). La obtención de los extractos se llevó a cabo por maceración, éste es uno de los métodos de extracción más utilizados cuando los principios activos son muy solubles o cuando la estructura de la droga vegetal es muy permeable, tal es el caso de las hojas, además es útil para la extracción de metabolitos termolábiles (Kuklinski, 2000).

La diarrea es comúnmente causada por infecciones gastrointestinales, estas provocan desequilibrios osmóticos a causa de la pérdida excesiva de líquido, lo que conlleva a la deshidratación, la cual puede ser fatal sobre todo en niños y ancianos (Hernández *et al.*, 2011; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2015). El tratamiento farmacológico en cuadros de diarrea infecciosa comprende una terapia dual, en la que se administra un antibiótico y un espasmolítico (Pérez, 2003). En Yucatán, México, existen comunidades de bajos recursos que utilizan las plantas medicinales para tratar diarreas, entre las que se encuentra el Nabanche' (*Bursera graveolens*). Esta planta carece de estudios farmacológicos que sugieran su efecto antidiarreico. Por esta razón, en este estudio se determinó el potencial espasmolítico y antibacteriano de tres extractos vegetales de las hojas de *B. graveolens*. Los extractos fueron obtenidos mediante maceración con tres disolventes de polaridad ascendente, con la finalidad de correlacionar el contenido metabólico de los extractos con el efecto farmacológico observado. En la evaluación espasmolítica sobre la contracción espontánea del íleon aislado de rata, los extractos EHBg y el EDBg fueron los más eficaces ($E_{\text{máx}} > 75\%$) lo que sugiere que el efecto puede atribuirse a compuestos lipófilos que son extraídos con disolventes de baja-mediana polaridad, como lo son el hexano y el diclorometano; ejemplos de estos compuestos podrían ser esteroides y terpenoides que se han reportado son extraídos con dichos disolventes (Sasidharan *et al.*, 2011; Widyawati *et al.*, 2014).

Específicamente, de las hojas de *B. graveolens* se han aislado metabolitos secundarios como sesquiterpenos, entre ellos el germacreno D y trans- β -cariofileno en proporciones de 20.7% y 18%, respectivamente (Muñoz-Acevedo *et al.*, 2013). Por otra parte, Leonhardt *et al.* (2010) reporta el efecto antiespasmódico del aceite esencial de otra especie, la *Pterodon polygalaeflorus* y de su componente mayoritario, el sesquiterpeno β -cariofileno. De acuerdo con sus resultados, se halló que tanto el extracto como el β -cariofileno reducen el tono basal e inducen un efecto antiespasmódico reversible y dependiente de la concentración en íleon aislado de rata. Este efecto parece estar mediado principalmente a través de un mecanismo intracelular miogénico y que también ambos pueden inhibir la entrada de Ca^{2+} a través de VOCCs y ROCCs por acción directa o indirecta. Con base en lo anterior, el efecto espasmolítico del EHBg y EDBg podría atribuirse a la presencia de sesquiterpenos. El extracto EMBg presentó ligero efecto espasmolítico ($E_{\text{máx}} = 35\%$), el cual por las características del disolvente utilizado para la extracción, se podría atribuir a metabolitos polares como carbohidratos, aminoácidos, compuestos glicosilados, compuestos fenólicos de bajo y mediano peso molecular, metabolitos de polaridad media, flavonoides agliconados, antocianinas, saponinas, taninos, xantoxilinas, flavonas, fenonas y polifenoles entre otros (Dehkharghanian *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2009; Widyawati *et al.*, 2014). De estos compuestos, se ha reportado que los flavonoides poseen actividad espasmódica ya que, prolongan el tiempo de tránsito en el intestino delgado, inhiben la amplitud de la contracción fásica y disminuyen el tono del íleon, también antagonizan las contracciones inducidas en preparaciones de órgano aislado intestinal por varios agonistas, entre ellos prostaglandinas E_2 , acetilcolina y BaCl_2 , estos mecanismos podrían explicar el efecto relajante mostrado por el EMBg (Astudillo-Vázquez *et al.*, 2009).

Los resultados de la inhibición bacteriana mostraron que la concentración más baja [1 mg/mL] de cada uno de los tres extractos evaluados, fue la que presentó mayor actividad antibacteriana frente a todas las cepas, mientras que al incrementar la concentración a [3 mg/mL] y [5 mg/mL] la actividad fue disminuida o nula. Lo anterior puede deberse a que, al tratarse de extractos vegetales, se encuentran una variedad de compuestos en diferentes concentraciones, con diversas formas y tamaños, estos factores pueden modificar la difusión ya que, a pesar de que a mayor número de partículas la difusión será más rápida, las partículas más grandes difundirán más lentamente en el agar. Es decir que, a mayor concentración del extracto, mayor número de partículas cuyo tamaño pudiese reducir la velocidad de difusión y, por consiguiente, el menor efecto antibacteriano (Valgas *et al.*, 2007). Adicionalmente, a pesar de que el método de difusión en disco se ha propuesto generalmente para la evaluación de compuestos polares, la técnica presenta algunas desventajas. Una de ellas es la composición del papel filtro, el cual se compone de celulosa (uniones β -1,4 de monómeros de glucosa), que tienen grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica, interviniendo directamente con la difusión de algunos compuestos catiónicos de los productos naturales, absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión adecuada a través del agar, esto pudiera ocasionar menores halos de inhibición. Por el contrario, los compuestos apolares como los que se pueden encontrar en extractos de baja polaridad como el EHBg pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar, lo cual explicaría la mayor actividad de dicho extracto (Burgess *et al.*, 1999; Ramirez & Marin Castaño, 2009).

En la tabla 3 se observa que el extracto más eficaz fue el EHBg, encontrándose mayores halos de inhibición frente a *E. coli* (29.66 mm), seguido de *S. enteritidis*, *S. choleraesuis* y *S. enterica*.

Ruis & Susunaga, (2000), reportaron la evaluación de extractos etanólicos y las fracciones de hojas y cortezas de *B. graveolens*, indicando que esta especie tiene actividad frente a cepas de *S. aureus* y *B. subtilis*, pero no se encontró actividad frente a *E. coli*, el mismo resultado fue reportado por Luján-Hidalgo *et al.*, (2012) en donde trabajaron con aceites esenciales obtenidos de las partes aéreas de *B. graveolens* los cuales presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *B. subtilis* y levaduras como *C. albicans*. De acuerdo con la polaridad del disolvente empleando en el extracto con mayor efecto inhibitorio (EHBg), pueden encontrarse aceites esenciales, de los cuales se ha reportado su actividad antibacteriana debida a la presencia de compuestos terpenoides (Griffin, 2000). Algunos metabolitos presentes en el aceite esencial de *B. graveolens* que han mostrado efecto inhibitorio frente a *E. coli* son el limoneno, trans- β -cariofileno y germacreno-D, así como el linalol, terpineol y carvona, también encontrados en las hojas de esta especie en un 6.5%; 3.1%, y 0.4%, respectivamente (Swamy *et al.*, 2016; Muñoz-Acevedo *et al.*, 2013). Otros autores, reportan un aceite esencial extraído de partes aéreas de la especie *Montanoa quadrangularis*, conformado principalmente por compuestos monoterpénicos como el limoneno, y sesquiterpénicos como β -cariofileno y germacreno-D, los cuales presentaron actividad antibacteriana contra bacterias Gram (-), incluyendo a *E. coli*. Estos reportes pudiesen explicar la actividad antibacteriana del EHBg, puesto que el limoneno, β -cariofileno y germacreno-D son de los compuestos mayoritarios aislados de hojas de *B. graveolens* y estos metabolitos pueden ser extraídos con hexano (Muñoz-Acevedo *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante este estudio mostraron que los extractos de hojas de *B. graveolens*, producen disminución de la contracción espontánea en intestino de rata, y efecto antibacteriano contra enterobacterias de interés patógeno, de acuerdo con la literatura, ambos efectos podrían atribuirse a la presencia de sesquiterpenos. Estos hallazgos representan la primera evidencia científica preclínica del potencial farmacológico espasmolítico de la especie

vegetal *Bursera graveolens*, proporcionándole un valor agregado a esta especie para emplearse como materia prima en la búsqueda y obtención de nuevos fármacos antidiarreicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán por el apoyo otorgado al proyecto “Evaluación Farmacológica *ex vivo* y estudio toxicológico de plantas medicinales de Yucatán usando la musculatura lisa como modelo experimental” con número de registro SISTPROY: FQUI-2016-0007 del cual derivan parte de los resultados de este trabajo.

Sánchez-Recillas A. agradece al apoyo otorgado por el CONACyT mediante la convocatoria EPN-2018(1); Beca núm. 298553. Sánchez-Recillas A. y Ortiz-Andrade R. pertenecen a la Red Mexicana de Investigación Preclínica y Desarrollo Farmacéutico.

Los autores agradecen a la Unidad de Producción, Cuidado y Experimentación Animal de la División Académica de Ciencias de la Salud de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por la provisión de los animales de experimentación.

LITERATURA CITADA

- Astudillo-Vázquez, A., Mata, R., & Navarrete, A. (2009). El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarreicos. *Revista Latinoamericana de Química*, 37(1), 7–44.
- Burgess, J., Jordan, E., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., & Boyd, K. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology*, 70(1–3), 27–32.
- Dehkharghanian, M., Adenier, H., & Vijayalakshmi, M. A. (2010). Study of flavonoids in aqueous spinach extract using positive electrospray ionisation tandem quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121(3), 863–870.
- Durán, R., & Méndez, M. (2015). Medicina tradicional y las plantas medicinales en el contexto actual. *Desde el Herbario CYCY*, 168(7), 165–168.
- Estrada-Soto, S., Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., & Ibarra-Barajas, M. (2012). Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. *Journal of ethnopharmacology*, 139(2), 513–518.
- Griffin, S. (2000) *Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure*. University of Western Sydney.
- González, F., Hernández, F., Rojas, L., & Araque, M. (2015). Composición química y evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Montanoa quadrangularis* Sch. Bip. ex C. Koch. contra cepas bacterianas de referencia internacional. *Ciencia*, 23(1), 14–22.
- Hernández, C., Aguilera, M. G., & Castro, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México Resumen. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4), 137–151.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2015). Enfermedades Gastrointestinales. Recuperado a partir de <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/enfermedades-gastrointestinales>
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia* (1a ed.). España: Ediciones Omega.
- Leonhardt, V., Oliveira, A. C., Pereira, R. F., Silva, L. P., Silva, A. P. F. S., & Magalha, P. J. C. (2010). Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* and its main constituent b-caryophyllene on rat isolated ileum. *Fundamental & clinical pharmacology*, 24, 749–758.

- Lin, H., Kuo, Y., Lin, Y., & Chiang, W. (2009). Antioxidative Effect and Active Components from Leaves of Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15), 6623–6629.
- Lujan-Hidalgo M., Gutierrez-Miceli F., Ventura-Canseco L. M. C., Dendooven L., Mendoza-Lopez M. R., Cruz-Sanchez S., García-Barradas O., & Abud-Archila M. (2012). Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de *Bursera graveolens* y *Taxodium mucronatum* de Chiapas, México. *Gayana Bot*, 69:7-14.
- Manzano, P., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García, G., Orellana, T., & Orellana, A. (2009). Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch. (Palo santo) de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(3), 45–53.
- Méndez, M., & Durán, R. (2012). Base de datos de especies medicinales de la Península de Yucatán. Mérida, Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).
- Méndez, M., Durán, R., Borges, R., Peraza, S., Dorantes, A., Tapia, J., ... Ferrer, M. (2010). *Flora medicinal de los mayas peninsulares* (1a ed.). México: Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).
- Mesa para la Conservación y Manejo de Plantas Medicinales Tradicionales. (2016). *Guía para la recolección de plantas medicinales nativas*. Araucanía Costa.
- Monzote, L., Hill, G., Cuellar, A., Scull, R., & Setzer, W. (2012). Chemical composition and anti-proliferative properties of *Bursera graveolens* essential oil. *Natural Product Communications*, 7(11), 1531–1534.
- Muñoz-Acevedo, A., Serrano-Urbe, A., Parra-Navas, X., Olivares-Escobar, L., & Niño-Porras, M. (2013). Análisis multivariable y variabilidad química de los metabolitos volátiles presentes en las partes aéreas y la resina de *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch. de Soledad (Atlántico, Colombia). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(3), 322–337.
- Nakanishi, T., Inatomi, Y., Murata, H., Shigeta, K., Iida, N., Inada, A., ... Oku, N. (2005). A new and known cytotoxic aryltetralin-type lignans from stems of *Bursera graveolens*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53(2), 229–231.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Organización Mundial de la Salud. (2002). Perspectivas políticas sobre medicamentos de la OMS - Medicina tradicional – Necesidades crecientes y potencial. *Organización Mundial de la Salud*, (2), 1–6.
- Pérez, M. (2003). Diarrea. Clínica y tratamiento. *Farmacia profesional*, 17(4), 84–88.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(39), 1–8.
- Prieto-González, S., Garrido-Garrido, G., González-Lavaut, J., & Molina-Torres, J. (2004). Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35(1), 19–36.
- Ramirez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 2(42), 263–268.
- Robles, J., Torrenegra, R., Gray, A., Piñeros, C., Ortiz, L., & Sierra, M. (2005). Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4), 283–286.
- Román, E., Barrio, J., & López, M. J. (2010). Diarrea aguda. En *Protocolos Diagnóstico-Terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición* (pp. 11–20). Madrid: Ergón S.A.
- Romero, O., Reyes, H., Herrera, A., Lozoya, X., & Tortoriello, J. (2004). Aceptación de los fitofármacos por médicos y pacientes en clínicas de atención primaria. *Revista Médica de Instituto Mexicano del Seguro Social*, 42(2), 125–130.
- Ruis, M., & Susunaga, C. (2000). *Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies Bursera simaoruba y Bursera graveolens (Burseraceae), frente a microorganismos como: Agrobacterium tumefaciens, Erwinia carotovora, Fusarium*

Recibido:
18/marzo/2019

Aceptado:
8/noviembre/2019

- oxysporum*, *Trichoderma viride* y *Botrytis cinere*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Sánchez-Recillas, A., Araujo-León, J. A., Rivero-Medina, L., Moreno-Díaz, H., Antonio-de-la-Cruz, A., & Ortiz-Andrade, R. (2018). Vasorelaxant activity of *Euphorbia furcillata* Kunth mainly by activation of NO/cGMP pathway and calcium channel blockade. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 17(3), 310 – 323.
- Sánchez-Recillas, A., Arroyo-Herrera, A. L., Araujo-León, J., Hernández Núñez, E., & Ortiz Andrade, R. (2017). Spasmolytic and antibacterial activity of two *Citrus sinensis* Osbeck varieties cultivated in Mexico. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Sánchez-Recillas, A., Rivero-Medina, L., Ortiz-Andrade, R., Araujo-León, J. A. & Flores-Guido, J. (2019). Airway smooth muscle relaxant activity of *Cordia dodecandra* A. DC. mainly by cAMP increase and calcium channel blockade. *Journal Ethnopharmacology*, 30(229), 280–287.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., & Yoga, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Valgas, C., Machado, S., Smânia, E., & Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369–380.
- Vinet, R., Knox, M., Mascher, D., Paredes-Carbajal, C., & Martínez, J. (2012). Isolated aorta model and its contribution to phytopharmacology. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(1), 35–45.
- Widyawati, P. S., Budianta, T., Kusuma, F. A., & Wijaya, E. (2014). Difference of solvent polarity to phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indicia* Less leaves extracts. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), 850–855.
- World Health Organization. (2017). Diarrhoeal Disease. Recuperado a partir de <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
- Yañez-Pérez, V. (2016). *Determinación del efecto vasorrelajante e hipotensor de extractos vegetales de seis especies medicinales utilizadas en el tratamiento de la Hipertensión Arterial*. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Yañez Pérez, V., Araujo León, A., Rubio Zapata, H., Ortiz Andrade, R., Sánchez Recillas A. (2-6, Octubre, 2016). Determination of acute oral toxicity of *Bursera graveolens* used in Mayan folk medicine for the treatment of arterial hypertension. En Betzabet Quintanilla Vega (Presidencia), XIV International Congress of Toxicology In conjunction with the X Mexican Congress of Toxicology (Mérida, Yucatán).