



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE
DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE ESPECIES
DEL GÉNERO *Bursera*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CRUZ OLVERA GABRIELA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos

1. Datos del alumno
Cruz Olvera Gabriela
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308201664
2. Datos del tutor
Dra.
Patricia
Guevara
Fefer
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Jaime
Jiménez
Ramírez
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Norma Carolina
Sánchez
Aranda
5. Datos del sinodal 3
M. C.
Ramiro
Cruz
Durán
6. Datos del sinodal 4
M. C.
Ana Patricia
García
García
7. Datos del trabajo escrito
Actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de especies del género *Bursera*.
43 p
2017

Jurado asignado

Presidente: Jaime Jiménez Ramírez

Vocal: Norma Carolina Sánchez Aranda

Secretario: Patricia Guevara Fefer

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Fitoquímica. Edificio B. Facultad de Ciencias. Ciudad Universitaria.

Asesor

Patricia Guevara Fefer

Sustentante

Gabriela Cruz Olvera



Dedicatorias

A mis padres, hermanos y abuelitos.

A mis amigos.





Agradecimientos académicos

Agradezco mi tutora de tesis, la Dra. Patricia Guevara Fefer, por sus explicaciones, su interés, paciencia, tiempo y apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Fitoquímica.

A mis sinodales, por sus comentarios y tiempo empleado en la revisión de este trabajo, así como su aporte a mi formación académica.

Dr. Jaime Jiménez Ramírez

Dra. Norma Carolina Sánchez Aranda

M. en C. Ramiro Cruz Durán

M. en C. Ana Patricia García García

A la Q. A. Verónica Muñoz Ocotero, Técnica Académica del Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias, por explicarme, guiarme y aconsejarme en todos los procedimientos realizados en este trabajo, así como la revisión de la parte escrita. Además, por su comprensión, paciencia y amistad.

Al M. en C. Roberto Enrique Llanos Romero, Técnico Académico del Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias, por su apoyo en la realización del análisis del perfil cromatográfico de los extractos y la determinación antioxidante.

Al Q. F. B. Alejandro Camacho Cruz, responsable del cepario de la Facultad de Química de la UNAM, por brindarme las cepas usadas en este trabajo.

Así mismo, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de formar parte de ella y de realizar éste objetivo de vida dentro de sus instalaciones.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”





Contenido

Lista de Figuras.....	1
Lista de Tablas.....	2
Resumen.....	3
1. Introducción.....	4
2. Antecedentes.....	5
2.1. Antioxidantes.....	5
2.2. Antimicrobianos.....	6
2.3. Género <i>Bursera</i>	7
2.4. Compuestos químicos en el género <i>Bursera</i>	8
2.5. Estudios relacionados sobre la actividad biológica y química del género <i>Bursera</i>	9
3. Justificación.....	11
4. Objetivo general.....	11
4.1. Objetivos particulares.....	12
5. Material y método.....	12
5.1. Recolección de material biológico y obtención de extractos.....	12
5.2. Análisis de los extractos.....	12
5.2.1. Perfil cromatográfico de los extractos.....	12
5.2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	13
5.2.2.1. Microdilución.....	13
5.2.2.2. Prueba de difusión con discos.....	15
5.2.2.3. Bioautografía.....	15
5.3. Fraccionamiento y análisis cromatográfico.....	16
5.4. Análisis antimicrobiano de las fracciones.....	16
5.4.1. Prueba de difusión con discos.....	16
5.4.2. Bioautografía.....	17
6. Resultados y discusión.....	18
6.1. Obtención de extractos.....	18
6.2. Perfil cromatográfico de los extractos.....	19
6.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	20
6.3.1. Microdilución.....	20
6.3.2. Prueba de difusión con discos.....	24





6.3.3. Bioautografía.....	27
6.4. Fraccionamiento y perfil cromatográfico.....	29
6.5. Análisis antimicrobiano de las fracciones.....	31
6.5.1. Prueba de difusión con discos	31
6.5.2. Bioautografía.....	35
7. Conclusión.....	37
8. Referencias.....	38





Lista de Figuras

Figura	Descripción	Página
1	Ejemplar de <i>Bursera galeottiana</i> Engl.	7
2	Estructura química de algunos flavonoides.	9
3	Distribución de las muestras en los pozos de la microplaca. Verde: 200µL de la mayor concentración del extracto de acuerdo al ensayo. Azul: diluciones, Naranja: control del crecimiento bacteriano. Gris: medio de cultivo. Morado: la mayor concentración del antibiótico (40 mg/mL).	15
4	Placa de sílica gel 60F ₂₅₄ . Revelada con 4A: RPN-PEG y UV 365nm, 4B: RPN-PEG y luz visible, 4C: DPPH y luz visible. Los estándares de flavonoides Q: quercetina, R: rutina, Ne: naringenina, Ni: naringina, A: apigenina y Ag: glucósido de apigenina. Los extractos 1: hoja 2: tallo de <i>B. áptera</i> ; 3: hoja 4: tallo de <i>B. schlechtendalii</i> ; 5: hoja 6: tallo de <i>B. morelensis</i> ; 7: hoja 8: tallo de <i>B. fagaroides</i> ; 9: hoja 10: tallo de <i>B. galeottiana</i> .	19
5	Halos de inhibición por difusión con discos de papel filtro de 7mm impregnados de extracto de hoja de <i>B. áptera</i> . Concentración de la disolución stock del extracto de hoja: 27.3 mg/mL. Cada dilución se muestra por triplicado. 5A: Dilución 4 a la 6, 5B: de la 8 a la 11. 5C: El Control de crecimiento (NaCl 0.9%) sin halo y control del vehículo de disolución (alcohol 70%) sin halo.	26
6	Bioautografía del extracto hidroalcohólico de hoja de <i>B. áptera</i> . 6A: Cromatografía en capa fina (CCF) desarrollada en una dimensión. 6B: CCF desarrollada en dos dimensiones. 6C: CCF en dos dimensiones revelada con RPN-PEG y UV 365nm. 6D: Bioautografía bidimensional.	28
7	Placas en doble dimensión corridas en las fases correspondientes vistas en UV 365nm. A) Fracción hexánica, B) Fracción de acetato de etilo, C) Fracción metanólica.	31
8	Difusión con discos. 1 a 4: discos de mayor concentración a menor concentración. Ct: control. A: extracto de hoja de <i>B. áptera</i> , control: ninguno; B: fracción de hexano de hoja, control: EtOH; C: fracción de acetato de etilo de hoja, control: AcOEt; D: fracción de metanol de hoja, control: MeOH; E: extracto de tallo de <i>B. áptera</i> , control: AcOEt; F: fracción de hexano de tallo, control: EtOH; G: fracción de acetato de etilo de tallo, control: cloroformo; H: fracción de metanol de tallo, control: MeOH	34
9	Placas de bioautografía. A: fracción de hexano, B: fracción de acetato de etilo. C: fracción de metanol.	36





Lista de Tablas

Tabla	Descripción	Página
1	Peso y porcentaje del rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de: <i>Bursera aptera</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. galeottiana</i> (procedentes del estado de Oaxaca) y <i>B. morelensis</i> de dos diferentes localidades (Puebla y Oaxaca) obtenidos por maceración a temperatura ambiente con etanol al 70%.	18
2	Concentración máxima y de las diluciones de los extractos del primer ensayo.	21
3	Columnas 1: máxima concentración del extracto (3.57 mg/mL) y de antibióticos (40 mg/mL) (Control 1= Ampicilina, Control 2= Cefalexina). 2-12 Dilución de extractos y de antibióticos. Factor de dilución= 2. Renglones <i>Bursera aptera</i> : 1T, 1H; <i>B. schlechtendalii</i> : 2T, 2H; <i>B. morelensis</i> : 3T, 3H; <i>B. fagaroides</i> : 4T, 4H; <i>B. galeottiana</i> : 5T, 5H; <i>B. morelensis</i> : 6T, 6H. T= Tallo y H= hoja. ×= activo y CMI (mg/mL). □= No activo.	22
4	Concentración máxima y de las diluciones de los extractos del segundo ensayo.	23
5	Columnas 1: máxima concentración del extracto (3.84 mg/mL) y de antibióticos (40 mg/mL) (Control 3= Cloranfenicol). 2-12 Dilución de extractos y de antibiótico. Factor de dilución= 2. Renglones <i>Bursera aptera</i> : 1T, 1H; <i>B. fagaroides</i> : 4T, 4H; <i>B. morelensis</i> : 6T, 6H. T= Tallo y H= hoja. ×= activo y CMI (mg/mL). □= No activo.	24
6	Concentración en cada disco a partir de la cuarta dilución con sus respectivos halos de inhibición.	26
7	Fase para el perfil cromatográfico del extracto hidroalcohólico de <i>B. aptera</i>	27
8	Rendimiento de las fracciones del extracto hidroalcohólico de <i>Bursera aptera</i> .	29
9	Perfil cromatográfico de las fracciones del extracto hidroalcohólico de <i>B. aptera</i> .	30
10	Concentración del extracto y fracciones de tallo y hoja de <i>B. aptera</i> en cada disco con sus diluciones y sus respectivos halos de inhibición.	35





RESUMEN

Las bacterias son causantes de varias enfermedades, que han llegado a provocar muertes y otras podrían llegar a ser letales. Por mucho tiempo se han contraatacado con la producción de antibióticos, los cuales se vuelven obsoletos ya que las bacterias van adquiriendo resistencia ante estos. Además, existen medicamentos que causan efectos secundarios, tal como las alergias, por lo que se han buscado nuevas soluciones. Una de ellas es la implementación de las plantas, como las del género *Bursera*, de las cuales se han registrado varios usos dentro de la medicina tradicional mexicana, sin embargo aun es escasa la información acerca de su actividad antibiótica. Por lo anterior, en este trabajo se pretende contribuir al conocimiento de la actividad antimicrobiana y antioxidante de cinco especies del género *Bursera* mediante la evaluación de sus extractos hidroalcohólicos de tallos y hojas, como objetivo general. Además, determinar la acción antioxidante y la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Bursera*, fraccionar aquel extracto con mayor actividad antimicrobiana y mayor rendimiento así como conocer la naturaleza de los compuestos que presentan actividad antimicrobiana, como objetivos particulares.

Para este trabajo se utilizaron los tallos y hojas de *Bursera aptera* (162074), *B. schlechtendalii* (162073), *B. fagaroides* (162071), *B. galeottiana* (162075), *B. morelensis* (162072) y se les realizó una extracción hidroalcohólica. Se determinó el perfil cromatográfico y la actividad antioxidante de los extractos mediante el método de DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo). Se usaron las siguientes cepas: *Bacillus subtilis* (ATCC663), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), *Salmonella typhi* (ATCC6539) y *Shigella sp.* Para evaluar la actividad antimicrobiana se realizó la técnica de microdilución. Posteriormente se hizo la prueba de difusión de discos y bioautografía con el extracto de mayor rendimiento y actividad antimicrobiana. Se fraccionó el extracto activo y se aplicó la técnica de difusión de disco y bioautografía con cada una de las fracciones. El extracto con mayor actividad antioxidante resultaron ser los de tallo y hoja de *B. fagaroides* y tallo de *B. galeottiana*, el extracto con mayor actividad antimicrobiana fue *B. aptera* con una concentración mínima inhibitoria de 412.32µg/mL contra *S. typhimurium* que resultó ser la bacteria más susceptible, cuya fracción con mayor actividad bactericida resultó ser la de acetato de etilo. Dicha actividad se atribuye a la presencia de compuestos flavonoides en particular rutina





presente en varios extractos apreciable en el perfil cromatográfico. Cabe mencionar que se mostró que la concentración del extracto influye en la actividad antimicrobiana.

1. Introducción

Las bacterias son causantes de enfermedades que muchas veces se han convertido en epidemias y han provocado millones de muertes desde la antigüedad. Algunas pueden ser emergentes y otras convertirse en un problema de salud aún mayor (Molina y Uribarren, 2015). De acuerdo con un reporte de la Organización Mundial de la Salud del 2010, las infecciones por bacterias y hongos ocupan el tercer lugar de causas de muerte en el mundo (Rodríguez, 2014). Además, las bacterias tienen mutaciones que van aumentando gradualmente su capacidad de soportar los antibióticos, muchas veces por el mal uso de los fármacos, haciéndolos menos efectivos (Muñoz *et al.*, 2004), esto provoca un mayor aumento en la mortalidad y costo médico. En el primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos del 2014, específicamente los antimicrobianos se consideraron una amenaza para la salud pública, debido a que estos organismos son capaces de desarrollarse en diferentes ambientes y a que su dispersión es muy rápida atacando cualquier región del mundo. Por ejemplo, *E. coli* que presenta resistencia a ciertos antibióticos como ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol y no necesariamente por haber estado expuestas a alguno de estos antibióticos (Rosas *et al.*, 2015) sino que las bacterias también pueden obtener resistencia debido las condiciones ambientales en las que se encuentren, por ejemplo la presencia de materia orgánica en cuerpos de agua proporciona nutrientes que favorecen a la transferencia horizontal de los genes (Rosas *et al.*, 2015). Además se han aislado bacterias de animales, como *Salmonella sp.*, que mantienen una estrecha relación con el hombre (Alba, 2013) y se transmiten fácilmente por alimentos.

El Dr. Keiji Fukuda, subdirector de la OMS, ha declarado que las infecciones comunes podrían volverse potencialmente mortales si no se toman las medidas necesarias para la producción y uso de antibióticos (OMS, 2014). Sin embargo, algunos medicamentos pueden generar diferentes efectos secundarios en el cuerpo humano como daños renales por dosis elevadas o provocar alergias que podrían ser graves, impulsando así la búsqueda de nuevas formas de contraatacar a estos





microorganismos (Haddadin *et al.*, 2002). Por esta razón, desde tiempos remotos la humanidad ha hecho uso de las propiedades de las plantas para sus fines y continúan las investigaciones para dar mejores soluciones. Actualmente se pueden aislar aquellas sustancias con actividad para el tratamiento de diferentes enfermedades, de los cuales en algunos casos se logra identificar al compuesto y pasan a ser parte de la elaboración de medicamentos (Villareal *et al.*, 2014). El recurrir al uso de recursos naturales con potencial biológico es todavía prometedor, pues existen especies con pocos estudios al respecto y con importantes antecedentes etnobotánicos. Un ejemplo de esto son las plantas del género *Bursera* de la familia *Burseraceae*, las cuales cuentan con una gran diversidad en México, en su mayoría endémicas. Varias investigaciones indican que dentro de la medicina tradicional, el género *Bursera* tiene un papel importante, ya que son utilizados en varias regiones del país, además de ser representativa culturalmente teniendo presencia en algunos rituales y ceremonias, simbolizando los conocimientos que se han transmitido durante generaciones (Reguera, 2011). Por otro lado, obtener productos para la salud de manera natural impulsa a la conservación y el buen manejo de las especies utilizadas, por lo que se disminuye el mal uso de esta especie y promueve su propagación, cuidando de esta manera la biodiversidad mexicana.

Tomando en cuenta que las plantas del género *Bursera* son importantes dentro de la medicina tradicional mexicana y siendo una especie representativa del país poco estudiada, en este trabajo se evaluaron las propiedades antioxidante y antibacteriana con los tallos y las hojas de cinco especies de este género, donde los extractos de tallo y hoja de *B. aptera* Ramírez, se mostraron con mayor actividad y fueron fraccionados para determinar la polaridad de los constituyentes de la fracción activa. Por tanto, para la comprensión y desarrollo de este trabajo, se deben conocer ciertos conceptos y antecedentes de los estudios realizados acerca del tema. A continuación se presentan algunos.

2. Antecedentes

2.1 Antioxidantes

La oxidación es la reacción química a partir de la cual un átomo, ion o molécula cede electrones, sin embargo, durante este proceso se pueden liberar radicales libres que pueden dañar a las células. Estos radicales son responsables del envejecimiento y se





ha reportado que causan cambios en la estructura lipídica de la membrana celular originando algunas enfermedades como la aterosclerosis y el Parkinson.

Los antioxidantes mantienen nuestro organismo en buen estado y en las industrias son usados para conservar ciertos alimentos, puesto que la oxidación también genera la pérdida de nutrientes y un mal sabor (López, 2006).

Existen antioxidantes que disminuyen la producción de radicales libres (Ruiz *et al.*, 2008) como algunas vitaminas, carotenoides y compuestos fenólicos, los cuales generalmente obtenemos de los alimentos vegetales (López, 2006).

Algunos antioxidantes que se han reportado en plantas son los ácidos fenólicos, los tocoferoles (Arriaga, 2011) y flavonoides. Estos últimos pueden inhibir a algunas enzimas que participan directa e indirectamente en la oxidación, como las oxidasas, además, debido a su función quelante y a su estructura química, los flavonoides pueden atrapar radicales libres (Escamilla *et al.*, 2009).

2.2 Antimicrobianos

Las sustancias antimicrobianas son aquellas que evitan o eliminan el crecimiento de microorganismos, por ejemplo, las bacterias. En la búsqueda de estas sustancias se debe tomar en cuenta la concentración mínima inhibitoria (CMI) que se define como la menor concentración del antimicrobiano para evitar el crecimiento como el bacteriano. Es importante recordar que las condiciones *in vivo* son distintas a las utilizadas en una prueba que se realiza *in vitro*. Además, los antibióticos no deben generar toxicidad en las células humanas y especificar en qué tipo de organismo actúa (Silva *et al.*, 2006). Si un antimicrobiano inhibe el crecimiento de alguna bacteria parcialmente, pero no provocan su muerte, se le llama bacteriostático. También existen antimicrobianos a los que se les llama bactericidas ya que no solo evitan el crecimiento bacteriano, sino que llevan a la lisis celular y por tanto a la muerte de la bacteria (Cavaliere *et al.*, 2005).

Por mucho tiempo se han fabricado medicamentos de origen fúngico para contraatacar diferentes enfermedades, principalmente las originadas por bacterias. Los antibióticos fabricados a partir de plantas se encuentran en menor cantidad debido a los pocos estudios sobre ellos, siendo un área que podría ser potencializada (Cowan, 1999).



2.3 Género *Bursera*

Una de las familias de plantas utilizadas de manera tradicional para tratar y curar diversos padecimientos es *Burseraceae* del orden de las Sapindales, subclase Rosidae, clase Magnoliopsida, división Magnoliophyta (Cronquist, 1988), que incluye 18 géneros y centenares de especies con usos documentados desde la antigüedad. Dentro de esta familia se encuentra el género *Bursera* que cuenta con más de 100 especies. Se distribuye principalmente en zonas tropicales desde el sur de Estados Unidos hasta Perú (Gigliarelli *et al.*, 2015), siendo México su centro de diversidad, donde de acuerdo con Rzedowski *et al.*, (2005) hay un aproximado de 80 especies descritas, de las cuales 70 son endémicas y la mayoría se distribuye a lo largo de la vertiente del Pacífico (Hernández *et al.*, 2002). En este género se encuentran tanto árboles como arbustos con hojas alternas, rara vez opuestas, estipuladas y pinnadas, además de ser caducifolios, es decir que pierden sus hojas en época de secas, con tronco de corteza externa gris o de rojiza a amarillenta e interna de tonos verdosos (Medina, 2008) y en ocasiones exfoliante. Siendo predominantes en las selvas bajas caducifolias (Rzedowski, 1978), tienen un papel ecológico importante y podrían considerarse como indicadores de clima. Un ejemplo de este género es *Bursera galeottiana* Engl. Figura 1.



Figura 1. Ejemplar de *Bursera galeottiana* Engl.



2.4 Compuestos químicos en el género *Bursera*

Existen compuestos químicos que se encuentran en todas las plantas, incluyendo las flores, frutos y semillas. Estas sustancias son originadas a partir del metabolismo secundario y son llamadas metabolitos secundarios (Cartaya y Reynaldo, 2001), las cuales se pueden encontrar distribuidas de manera diferente y en concentraciones distintas dentro de la planta. Puesto que algunas de sus funciones son las de pigmentación y protección, su producción depende mucho del ambiente en el que se desarrolle o las condiciones en las que se encuentre la planta, ya sea en situaciones de estrés o en alguna etapa de su desarrollo (Rodríguez, 2014). Este género cuenta con la presencia de diferentes compuestos como el grupo de los terpenos en los que se ubican las hormonas y aceites esenciales, también compuestos fenólicos (como los lignanos), los glicósidos, los alcaloides, ácidos grasos, ésteres, entre otros (Bah *et al.*, 2014; Ávalos y Pérez, 2009). Los metabolitos secundarios han sido reportados por sus usos como antioxidantes, antitumorales, antivirales, neuroprotectores, antihipertensivos y demás actividades. Un ejemplo de metabolitos secundarios dentro de los compuestos fenólicos son los flavonoides cuya estructura consiste en dos anillos aromáticos y una cadena de carbonos. Los flavonoides tienen diferentes funciones en las plantas, sin embargo, de acuerdo con Cartaya y Reynaldo (2001) se pueden clasificar en señalización química como es el caso de las señales florales, efecto sobre las enzimas que afectan al metabolismo de manera directa o indirectamente y como respuesta a estímulos bióticos y abióticos. Estos dan coloración a las flores y protegen a las células de los rayos UV concentrándose en la epidermis de las hojas y los tallos (Taiz y Zeiger, 2006). Dentro de los flavonoides se encuentra la rutina, naringenina, naringina, apigenina y glucósido de apigenina (Pineda, 2015) mostrados en la Figura 2. Se han encontrado isoflavonas con actividad insecticida, anticancerígena y antimicrobianas como las fitoalexinas, las cuales son producidas por las plantas para contraatacar las enfermedades dadas por bacterias y hongos (Cartaya y Reynaldo, 2001). Para *B. fagaroides* (H.B.K.) Engl., se han reportado la presencia del flavonoide 3'-O- α -L-ramno-piranosido de luteolina el cual fue aislado por una cromatografía con mezclas de hexano y acetato de etilo (Hernández *et al.*, 2002).



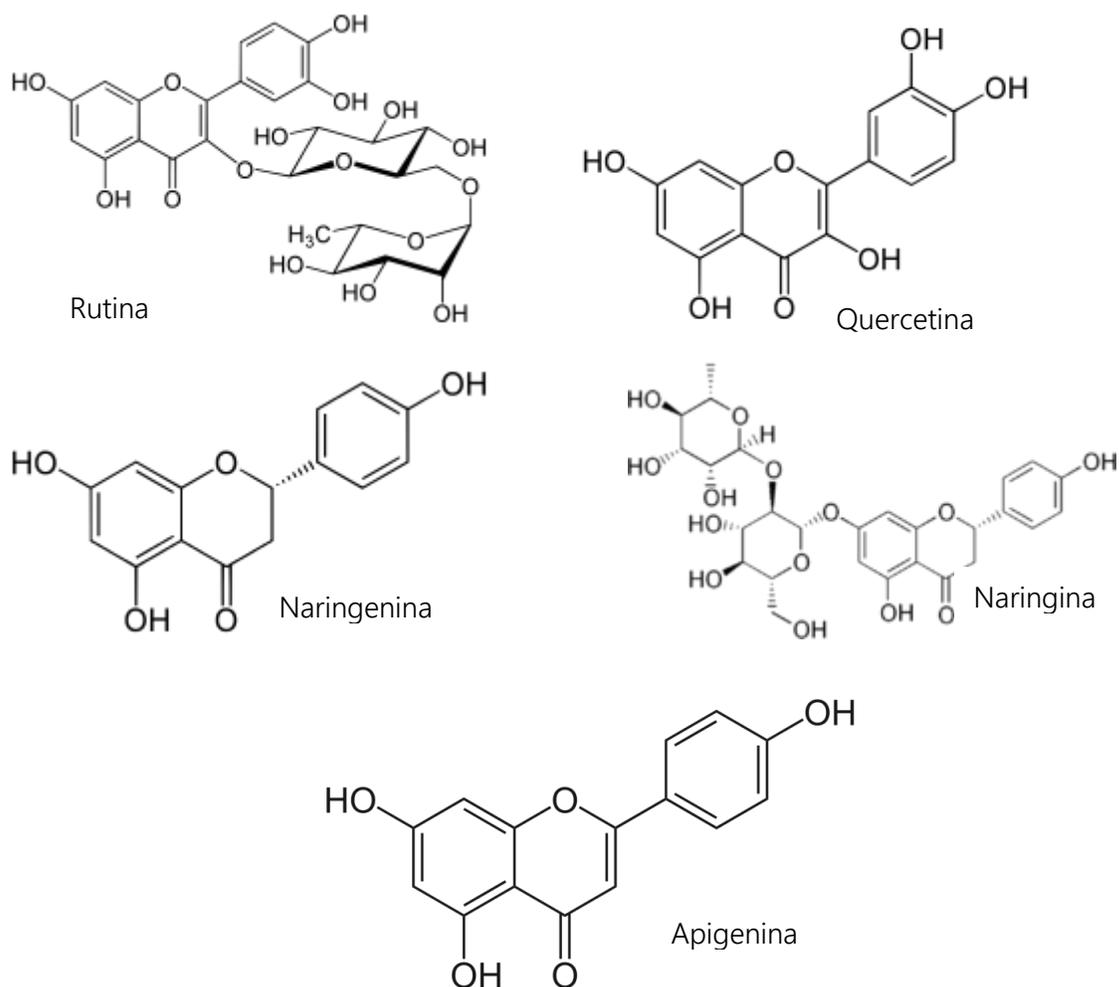


Figura 2. Estructura química de algunos flavonoides.

2.5 Estudios relacionados sobre la actividad biológica y química del género *Bursera*

La Organización Mundial de la Salud ha determinado que las sustancias producidas por las plantas como flavonoides, Kaempferol, Luteolina, Galangina, Myricetina ayudan a nuestro organismo a contraatacar ciertas enfermedades. Además, en un estudio con fraccionamiento biodirigido se demostró la actividad antibiótica de quercetina, apigenina, genkwanina, ramnocitrina, canferol y ramnazina contra *Vibrio cholerae* y *Enterococcus faecalis* (Martini *et al.*, 2004).

Muchas de las especies de *Bursera* producen metabolitos secundarios en toda su estructura vegetal (Evans *et al.*, 2000), los cuales cumplen diferentes funciones durante el desarrollo de la planta, siendo una de ellas la protección contra bacterias,



hongos, insectos y otros patógenos (Sadava *et al.*, 2009). Algunas especies de *Bursera* han mostrado propiedades antidepresivas, analgésicas, antisépticas y antioxidantes ya que contienen varios compuestos (Rodríguez, 2014).

En algunas localidades del país, se han usado el tallo, las hojas y algunos frutos en infusiones como parte de la medicina tradicional con aplicación en heridas, reumas, como antigripal, dolor estomacal, y de manera espiritual siendo parte de la cultura mexicana (Argueta *et al.*, 1994). Tal es el caso de *B. morelensis* Ramírez, la cual es usada en San Rafael Coxcatlán, Puebla, contra enfermedades de la piel provocadas por bacterias y en lesiones cutáneas (Serrano, 2013). Para este género se ha reportado actividad citotóxica en los extractos hexánicos de *B. bipinnata* (DC.) Engl., *B. copallifera* (Sessé & Moc. Ex DC.) Bullock y *B. fagaroides* los cuales presentaron toxicidad a células cancerígenas de colon, mama y nasofaríngeo (Acevedo *et al.*, 2015). Jolad *et al.* (1977) reportó que en *B. morelensis* se encuentran dos metabolitos secundarios que presentaron actividad biológica en pruebas tumorales, de los cuales el lignano 5'-desmetoxidesoxipodofilotoxina no había sido descrito antes para la especie (Serrano, 2013). También para las especies, *B. schlechtendalii* Engl. y *B. fagaroides* se han realizado trabajos de extractos hidroalcohólicos dirigidos a la actividad antitumoral (Puebla *et al.*, 1998).

En cuanto a la actividad antimicrobiana, Salinas *et al.* (2009) reportan inhibición de crecimiento de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* frente al extracto acetónico de hoja de *B. copallifera* y el hexánico de tallo de *B. grandifolia* (Schldl.) Engl. usando el método de dilución en agar. En el caso de *Bursera aloexylon* (Shiede ex Schlecht) Engl, se ha reportado actividad antibiótica sobre *Rhodococcus equi* y *Staphylococcus epidermidis* debido a la presencia de linalool (Queiroga *et al.*, 2007). Y en el trabajo de López (2011) se evaluaron las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *B. morelensis* sobre *Vibrio cholerae* resultando tener actividad bactericida, mencionando que las propiedades podrían depender de la proporción de los compuestos y de un sinergismo, es decir que varios componentes podrían estar actuando en conjunto para inhibir el crecimiento bacteriano de manera más efectiva que si lo hicieran por separado (Repetto y Repetto, 2009).

B. aptera también tiene aplicaciones en la medicina tradicional haciendo uso de sus diferentes partes, por ejemplo el látex como tratamiento contra picaduras de





mosquito. Además, para esta especie se ha reportado actividad antibacteriana del extracto metanólico (López, 2014).

Por otra parte, en uno de los trabajos realizados acerca de este género, se fraccionó el extracto de *B. fagaroides* para evaluar si la actividad citotóxica y antioxidante mantienen una relación dando resultados positivos (Delgado *et al.*, 2006). También, se han realizado estudios del extracto metanólico de *B. simaruba* (L.) Sarg en donde se usaron ensayos de DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), ABTS (2, 2'-Azinobis-3-etilbenzo- tiazolina-6-acido sulfónico) y FRAP (por sus siglas en inglés *Ferric Reducing Antioxidant Power*) mostrando una baja actividad atribuido a las cantidades menores de fenoles contenidos en el extracto, sin embargo, se aplicó el método de DPV (del inglés *Differential Pulse Voltammetry*) obteniendo resultados favorables probando la presencia de metabolitos secundarios con poder antioxidante (Bah *et al.*, 2014).

Finalmente, para *Bursera galeottiana* no se han reportado trabajos acerca de su actividad antimicrobiana o insecticida, sin embargo, tiene terpenos como amirina y felandreno (Hernández *et al.*, 2012).

3. Justificación

El género *Bursera* tiene diversos usos dentro de la medicina tradicional debido a sus propiedades. Los estudios realizados sobre estas especies todavía son escasos, en particular, sobre la composición química y la actividad biológica. Además, existen varias especies con las cuales no se han realizado estudios de este tipo, siendo de gran relevancia como base para la fabricación de nuevas alternativas de medicamentos, para lo cual, se deben conocer los componentes, así como la concentración y efectividad contra ciertos organismos. Por esta razón, se busca ampliar el conocimiento de las especies del género *Bursera* en lo correspondiente a su actividad biológica, resaltando la importancia en la conservación y buen manejo de estas plantas. Por tal motivo, en éste trabajo se planteó el siguiente objetivo.

4. Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la actividad antimicrobiana y antioxidante de cinco especies del género *Bursera* mediante la evaluación de sus extractos hidroalcohólicos de tallos y hojas.





4.1 Objetivos particulares

- Determinar la acción antioxidante de los extractos de *Bursera*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Bursera*.
- Fraccionar aquel extracto con mayor actividad antimicrobiana y mayor rendimiento.
- Conocer la naturaleza de los compuestos que presentan actividad antimicrobiana.

5. Material y método

5.1 Recolecta de material biológico y obtención de extractos

En este trabajo se utilizaron 150 g de hojas y 150 g de tallos de *Bursera aptera* (162074), *B. schlechtendalii* (162073), *B. fagaroides* (162071) y *B. galeottiana* (162075) cuya recolecta se llevó a cabo en el estado de Oaxaca, México y *B. morelensis* (162072) de dos diferentes localidades (Puebla y Oaxaca) y cuyos ejemplares herborizados fueron incluidos en el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM. El material vegetal fue secado en una estufa con vacío, posteriormente se molió y pesó cada muestra. Se procedió a una extracción exhaustiva hidroalcohólica (Etanol al 70%), mediante la maceración a temperatura ambiente. Una vez que se obtuvieron los extractos, se destilaron a presión reducida, se trasvasaron y se secaron al vacío para calcular su peso seco y determinar los rendimientos de cada extracción.

5.2 Análisis de los extractos

5.2.1 Perfil cromatográfico de los extractos

Se llevó a cabo un análisis para determinar el perfil cromatográfico, para ello se preparó de cada extracto una disolución con etanol a una concentración de 1mg/mL. Se aplicaron 50µL de cada uno en una placa de sílica gel 60F254, la cual se eluyó con la mezcla de disolventes Acetato de etilo: Metanol: Ácido fórmico: Agua (50:2:3:6). La placa una vez eluída fue visualizada con UV $_{365nm}$ y revelada con el reactivo RPN-PEG (Sigma) que consiste en asperjar con una solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina y seguida de una solución etanólica al 5% de polietilenglicol





400, el cual provoca una fluorescencia intensa, de esta manera, al observarse dicha placa en luz visible, se pudieron evidenciar los compuestos de tipo flavonoide, en presencia de estándares.

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos, se asperjó una solución al 2% de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) sobre el duplicado del perfil cromatográfico evidenciando los compuestos con actividad antioxidante, por lo que presentaron una marca color amarillo sobre púrpura debido a la decoloración de DPPH. Se tomó una captura de ambas placas para comparar.

5.2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se aplicaron las siguientes técnicas para determinar la actividad antimicrobiana de cada extracto: Microdilución, Prueba de difusión en discos y Bioautografía.

5.2.2.1 Microdilución

En esta técnica se requiere conocer la solubilidad de los extractos en medios acuosos con nula o baja concentración de disolventes orgánicos, por lo que se ensayó la disolución total de las muestras en medio de cultivo bacteriológico (nutritivo o LB).

Una vez conocida la solubilidad de los extractos en medio acuoso para el ensayo antimicrobiano, se procedió a la activación de inóculos de las cepas bacterianas proporcionadas por el Q. F. B. Alejandro Camacho, responsable del cepario de la Facultad de Química de la UNAM. Se usaron las siguientes cepas: *Bacillus subtilis* (ATCC6633), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC27853) en caldo nutritivo y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella entérica* serotipo *typhimurium* (ATCC14028), *Salmonella typhi* (ATCC6539), *Shigella sp.*, en medio de cultivo LB. Los inóculos fueron incubados a 37 °C hasta obtener una turbidez superior a 1.5×10^8 UFC/mL. Posteriormente se estandarizó la densidad del inóculo con una suspensión de sulfato de bario 0.5M como referencia, conocido como estándar de Mc Farland 0.5, que tiene una turbidez equivalente a una suspensión bacteriana que contiene 1.5×10^8 UFC/mL.

El estándar se preparó con 0.5 mL de BaCl_2 0.048M (1.175% m/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) agregados a 99.5 mL de H_2SO_4 , 0.18M. Para verificar la densidad correcta del





estándar se usó un espectrofotómetro (*Termo Spectronic Genesys 20*). Con una absorbancia a 625nm entre 0.08 y 0.10, para el estándar 0.5 de Mc Farland (BD, 2005).

Mediante el método de microdilución y usando las diferentes cepas bacterianas mencionadas, se determinó la concentración mínima inhibitoria de cada extracto, es decir la cantidad mínima del extracto para evitar el crecimiento de la bacteria. Para dicha técnica se usaron microplacas las cuales fueron divididas en diferentes secciones para realizar la prueba tal como se muestra en la Figura 3, en donde a cada pozo en color azul se le agregó 100µL de medio de cultivo y en el pozo en color morado se agregó 100µL de la disolución del antibiótico (40 mg/mL) para el control positivo. Para este ensayo se usaron los siguientes antibióticos los cuales son típicamente suministrados: Cefalexina, Ampicilina. En los pozos en color verde se depositó 200µL de la disolución del extracto concentrado por triplicado, del cual se realizaron pruebas previamente (3.57 mg/mL). Posteriormente se realizaron 11 diluciones con un factor de dilución de 2.

En gris están los pozos a los que se les agregó solo medio nutritivo y se utilizó como el control de esterilidad. A todos los demás pozos se les agregó 50µl del inóculo estandarizado, por tanto, quedó una sección con solo medio nutritivo e inóculo que sirvió como control negativo. Finalmente, a todos los pozos se les agregó 50µL del indicador incoloro redox, cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 0.2% m/v, que indica el crecimiento de la bacteria a través de la presencia de una coloración rosada-rojiza. La incubación de las microplacas fue por 24h a 37 °C y posteriormente se realizó la lectura del resultado.

Una vez determinadas las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para cada extracto, se seleccionaron aquellos con mayor actividad antimicrobiana para realizar un segundo ensayo usando el mismo método con un factor de dilución de 1.25, con la finalidad de determinar las CMI en un intervalo de concentraciones más preciso. En esta ocasión se usó 8µL de dimetilsulfóxido (DMSO) con cada extracto para disolverlo mejor en el medio de cultivo. El antibiótico usado fue Cloranfenicol con concentración máxima de 40mg/mL. La distribución, depósito y dilución de muestras en la microplaca fue igual que en el primer ensayo de acuerdo a la Figura 3. Cabe señalar que en esta ocasión se realizó un control con solo DMSO y el inóculo para saber si influye en el crecimiento de la bacteria.



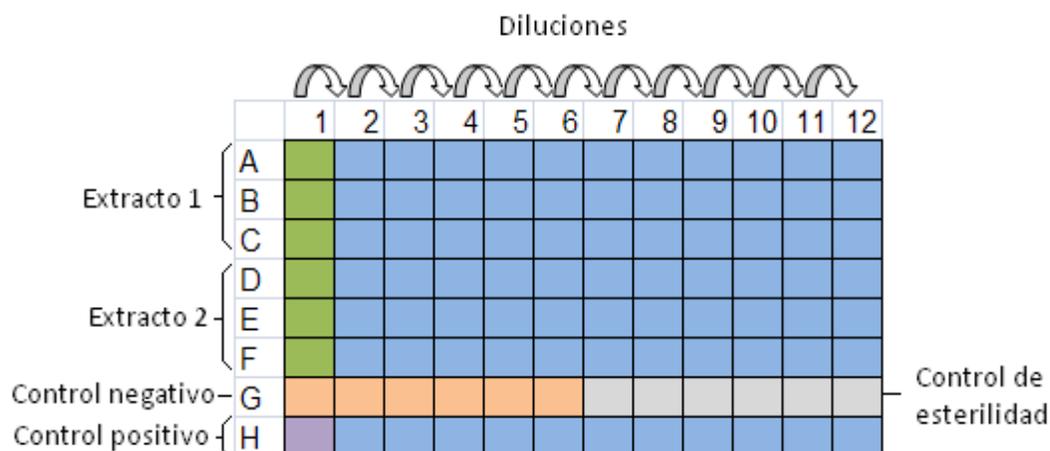


Figura 3. Distribución de las muestras en los pozos de la microplaca. Verde: 200µL de la mayor concentración del extracto de acuerdo al ensayo. Azul: diluciones, Naranja: control del crecimiento bacteriano. Gris: medio de cultivo. Morado: la mayor concentración del antibiótico (40 mg/mL).

5.2.2.2 Prueba de difusión con discos

Esta técnica sirve para conocer la sensibilidad de los organismos de prueba frente a los extractos a ensayar, sin embargo, requiere mayor cantidad de extracto, por lo que se ensayó en función de los rendimientos de extracción y de la mayor actividad del extracto mostrada en la prueba de microdilución, tomando en cuenta a la bacteria con mayor sensibilidad. Se prepararon previamente cajas de Petri con el inoculo ajustado incluido en agar nutritivo. Una vez listas las cajas, sobre el agar se colocaron discos de papel filtro de 7 mm de diámetro impregnados previamente con los miligramos que se quieren probar el extracto. Se etiquetaron y se dejaron incubar 24h a 36°C. Las muestras fueron trabajadas por triplicado. La lectura de la prueba fue a través de la medición de los halos de inhibición mediante un vernier marca *Scala*.

5.2.2.3 Bioautografía

Basado en los resultados del ensayo anterior, para este método se empleó el extracto que presentó mayor actividad, contra la bacteria que presentó mayor susceptibilidad.

Se desarrolló una cromatografía en capa fina en dos dimensiones (2D) de 10x10cm, para una mejor difusión de los componentes y poder evidenciar claramente si existe alguna zona de inhibición, empleando en ambos corrimientos la misma fase móvil



que se usó para conocer el perfil cromatográfico de los extractos. Este procedimiento se hizo por triplicado para comparar los resultados. Una vez desarrollado el cromatograma bidimensional o en 2D, una de las cromatoplasmas libre de disolventes se asperjó con TTC al 0.2% m/v e inmediatamente fue colocada sobre agar nutritivo con el inóculo ajustado incluido y se incubó a 37 °C por 24h para visualizar el resultado. Otra de las cromatoplasmas fue asperjada con TTC 0.2% m/v y se tomó como referencia. Las cromatoplasmas fueron visualizada en UV 365nm.

5.3 Fraccionamiento y análisis cromatográfico

De acuerdo con los resultados y tomando en cuenta el rendimiento, se procedió a realizar un fraccionamiento con el fin de separar por polaridades los componentes del extracto más activo, por lo que se aplicó un disolvente de baja polaridad (hexano), mediana polaridad (acetato de etilo) y alta polaridad (metanol), para así extraer las fracciones. Se siguió el siguiente procedimiento: el extracto fue disuelto en alcohol al 70%, se agregó a una caja de Petri con sílica 60G y se mezcló hasta formar una pasta homogénea. Se dejó secar y se colocó en un vaso de precipitados con hexano, se agitó por 20 minutos aproximadamente. Posteriormente se filtró para separar la sílica del disolvente con parte del extracto disuelto, el cual se colocó en un matraz de bola y se destiló. Se colectó la fracción hexánica en un frasco previamente pesado y etiquetado. Una vez seca la sílica, se realizó el procedimiento de agitación, filtración y destilación con acetato de etilo para la obtención de la fracción de Acetato y con metanol para la fracción metanólica.

Se dejaron secar las fracciones hasta que el disolvente se evaporó y se pesaron para conocer los rendimientos de cada una.

Se determinó el perfil cromatográfico de cada fracción aplicando una muestra en una placa de sílica gel 60F254 de 10x10cm y se eluyó en doble dimensión. Los resultados se visualizaron en UV 365nm.

5.4 Análisis antimicrobiano de las fracciones

5.4.1 Prueba de difusión con discos

Para saber si las fracciones conservan la actividad antibiótica se realizó una prueba con discos como anteriormente se explicó. Se probó a diferentes concentraciones con el fin de saber si afecta la inhibición de la bacteria. Para este procedimiento se





pesaron 24mg de cada fracción en un microtubo de 1.5 mL, se disolvieron en 160 μ L de disolvente obteniendo así la máxima concentración y se aplicaron 20 μ L de cada fracción en discos de papel filtro de 7mm. Cada disco se hizo por triplicado. Posteriormente se tomaron 60 μ L de la concentración máxima y se aforó a 120 μ L con disolvente. Se aplicaron nuevamente en discos por triplicado, el restante se volvió a aforar a 120 μ L continuando así hasta obtener la tercera dilución y aplicarla en discos. Adicionalmente, se impregnaron discos con clorofomo, acetato de etilo, metanol, etanol, hexano y discos sin disolvente como controles, cada uno por triplicado. Una vez impregnados los discos se dejaron secar hasta que el disolvente se evaporó por completo.

Mientras tanto, se prepararon cajas de petri con 72mL de agar nutritivo, 8mL de bacteria ajustada con el estándar de Mc Farland 0.5 y 1mL de reactivo indicador TTC. Una vez gelificadas las cajas se colocaron los discos de manera distribuida, identificando los de mayor concentración, así como los controles. Se dejaron incubar a 36°C durante 24 horas.

Posteriormente se midió el diámetro de inhibición a aquellos que presentaron halo con ayuda de un vernier (marca *Scala*) y se calcularon los promedios.

5.4.2 Bioautografía

Se aplicaron 0.5mg de la fracción metanólica de hoja de *B. aptera* en una placa de 10x10cm, se eluyó en doble dimensión con las fases correspondientes y se dejó secar. Cabe mencionar que se realizó con un duplicado que se tomó de referencia. Posteriormente una de las placas se asperjó con caldo nutritivo y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 0.2% m/v, e inmediatamente se colocó en una caja petri previamente preparada con 72mL de agar inoculado con 8mL de la bacteria ajustada referente al estándar de Mc Farland 0.5 mencionado en este trabajo y 0.5mL de TTC. Se incubó durante 24 horas a 37°C. Pasado este tiempo se desprendió la placa del agar dejándola secar y se reveló con sulfato cérico. Se realizó el mismo procedimiento con las fracciones de acetato de etilo y hexano.



6. Resultados y discusión

6.1. Obtención de extractos

En la extracción hidroalcohólica se obtuvieron componentes afines a la polaridad del disolvente aplicado, adquiriéndose un mayor rendimiento de las muestras de hoja que las de tallo. Dentro de los extractos de hoja, *B. fagaroides* obtuvo el mayor rendimiento, mientras que para las de tallo está *B. schlechtendalii* (Tabla 1).

En trabajos relacionados se ha aplicado este método de extracción en el que se ha comprobado que el aislamiento de compuestos es más concentrado en aquellas extraídas de hojas secas, tal como se realizó en este trabajo, que con otros métodos reportados, sin dejar de lado que durante todo el procedimiento se van perdiendo varios metabolitos secundarios (Pongsak y Parichat, 2010).

Se debe tomar en cuenta que la composición de cada planta puede ser afectada por el lugar en el que se encuentre y por diversos factores como el pH del suelo, el clima, etc. Además, la concentración de algunos compuestos depende de la edad de la planta, por lo tanto, a pesar de ser de la misma especie la planta puede variar de un lugar a otro (Villarreal *et al.*, 2014).

Especie	Peso del extracto (g)		Rendimiento (%)	
	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo
<i>B. aptera</i>	14.69	3.592	9.79	2.39
<i>B. schlechtendalii</i>	16.157	6.963	10.77	4.64
<i>B. morelensis</i>	10.779	2.214	7.19	1.48
<i>B. fagaroides</i>	38.945	5.241	25.96	3.49
<i>B. galeottiana</i>	12.092	5.230	8.06	3.49
<i>B. morelensis</i>	10.652	5.530	7.10	3.69

Tabla 1. Peso y porcentaje del rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de: *Bursera aptera*, *B. schlechtendalii*, *B. fagaroides*, *B. galeottiana* (procedentes del estado de Oaxaca) y *B. morelensis* de dos diferentes localidades (Puebla y Oaxaca) obtenidos por maceración a temperatura ambiente con etanol al 70%.

6.2. Perfil cromatográfico de los extractos

Con la técnica de cromatografía en capa fina empleada y con el revelador adecuado para identificar flavonoides, se identificaron quercetina y apigenina. La primera tiene antecedentes antibacterianos efectivos y se ha empleado, al igual que otros flavonoides, en industrias para evitar la descomposición de los alimentos por bacterias, así como para contraatacar organismos patógenos (Pongsak y Parichat, 2010). En cuanto a la apigenina y algunos de sus derivados, tienen actividad inhibitoria contra bacterias como *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* por lo que el poco crecimiento de las bacterias podría ser debido a la presencia de estos flavonoides (Liu *et al.*, 2013).

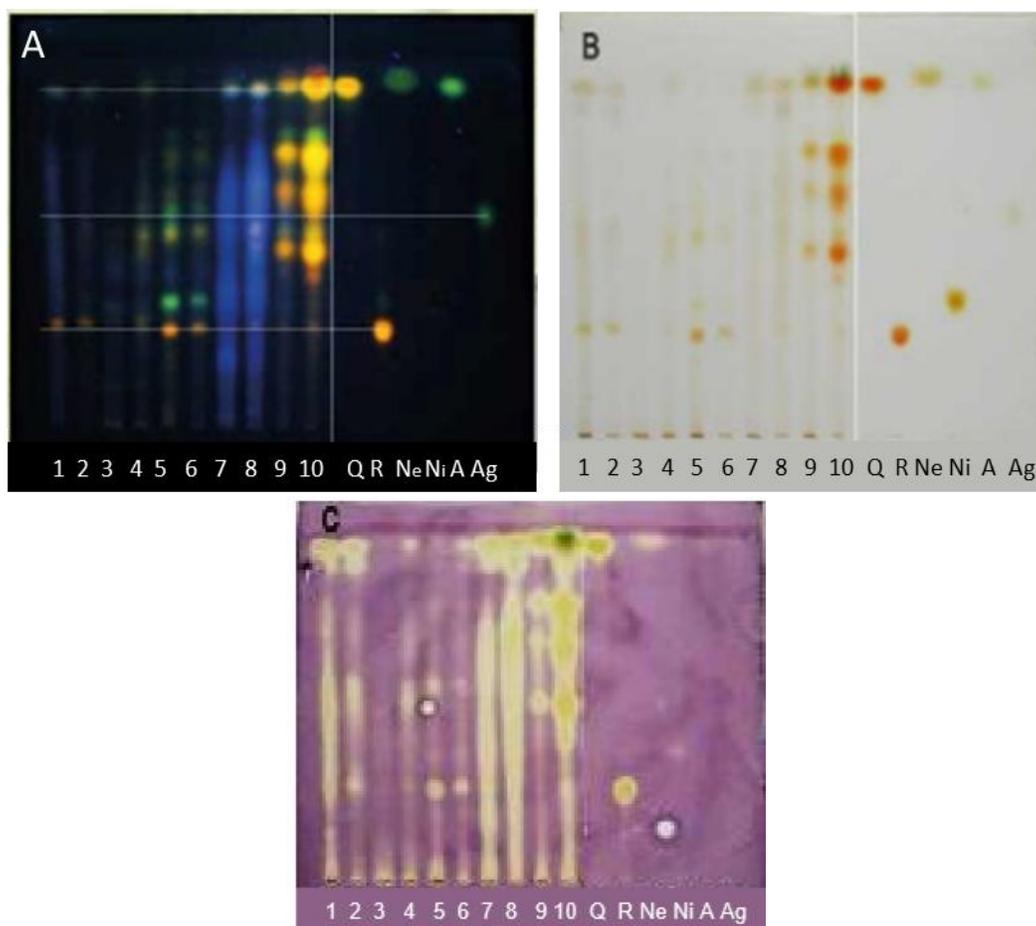


Figura 4. Placa de sílica gel 60F₂₅₄: Revelada con 4A: RPN-PEG y UV _{365nm}, 4B: RPN-PEG y luz visible, 4C: DPPH y luz visible. Los estándares de flavonoides Q: quercetina, R: rutina, Ne: naringenina, Ni: naringina, A: apigenina y Ag: glucósido de apigenina. Los extractos 1: hoja 2: tallo de *B. áptera*; 3: hoja 4: tallo de *B. schlechtendali*; 5: hoja 6: tallo de *B. morelensis*; 7: hoja 8: tallo de *B. fagaroides*; 9: hoja 10: tallo de *B. galeottiana*.



Las fluorescencias observadas en la Figura 4A en color amarillo, verde y azul indican la presencia de compuestos de tipo fenólico, la relación de las distancias del corrimiento de cada componente de la muestra y la fase móvil (Rf), muestran que hay coincidencia con tres de los seis flavonoides de referencia: quercetina, rutina y glucósido de apigenina. En la Figura 4B se confirma la correspondencia de las manchas de las muestras con las sustancias de referencia.

Se observa que los extractos de *B. aptera* y *B. morelensis* presentan el flavonoide rutina en sus extractos hidroalcohólicos. En los de *B. morelensis* y *B. galeottiana* son los únicos que muestran claramente la presencia del glucósido de apigenina y de quercetina, respectivamente.

Se aprecia una actividad antioxidante mostrada en la Figura 4C presentado una coloración amarillenta en la presencia de rutina, naringenina y naringina. Los extractos con mayor actividad antioxidante fueron hoja de *B. aptera*, tallo y hoja de *B. fagaroides* y tallo de *B. galeottiana*, mientras que el extracto de hoja de *B. schlechtendalii* no presentó actividad antioxidante.

6.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana

6.3.1. Microdilución

En la aplicación de este método, de las ocho cepas bacterianas ensayadas, solo cuatro (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Salmonella* serotipo *typhimurium*) fueron sensibles a algún extracto, el resto (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Shigella sp.*) muestran resistencia a los componentes de los extractos de las especies de *Bursera*.

A pesar de que no en todas las bacterias hubo una actividad deseada, el crecimiento disminuyó significativamente con respecto al control negativo, por lo que se puede decir que presentan ciertos componentes que ayudan a contrarrestar el efecto de agentes antimicrobianos, pero que posiblemente no sean lo suficientemente fuertes, ya sea por la concentración o por que pierden efecto en el transcurso del tiempo de incubación, convirtiéndose en antimicrobianos bacteriostáticos. Aquellos con mayor actividad contra estas bacterias fueron los de tallo y hoja de *B. aptera* (1H, 1T), *B. fagaroides* (4H, 4T) y *B. morelensis* (6H, 6T). En la Tabla 2 se muestran las concentraciones que se manejaron de los extractos durante la microdilución,





apreciándose en la Tabla 3 las concentraciones en las que cada extracto fue activo en un primer ensayo.

En cuanto a los antibióticos, la ampicilina pertenece al grupo de los antibióticos betalactámicos los cuales se caracterizan por tener un anillo b-lactámico (Marín y Gudiol, 2003). Estos actúan comúnmente en las bacterias gram positivas uniéndose a las enzimas que sintetizan la pared celular e interfieren con el crecimiento de la bacteria. En el caso de las gram negativas, estos antibióticos entran por los canales de la membrana externa y actúan de la misma manera uniéndose a enzimas de la membrana citoplásmica (Cavaliere *et al.*, 2005), por lo que tanto, en gram positivas como en negativas, provoca la debilitación y posterior lisis celular, de manera que la ampicilina resulta ser un claro ejemplo de agente bactericida tal como se muestra en los resultados mostrados en la Tabla 3. La diferencia de la resistencia a los b-lactámicos tiene que ver con el mecanismo de defensa que cada bacteria aplique, por ejemplo la producción de enzimas (Cavaliere *et al.*, 2005).

Revisando los resultados, los extractos que presentaron una mejor actividad antibacteriana contienen al flavonoide *Rutina* de acuerdo con el perfil cromatográfico (Figura 4A), por tanto, se puede atribuir a este compuesto la actividad parcial.

Además, se puede observar que la susceptibilidad al extracto es independiente del número de membranas que tenga la bacteria ya que no hubo una tendencia hacia gram negativa o positiva.

Dilución	Concentración (µg/mL)	Concentración (mg/mL)
Máxima concentración	3571.42857	3.57142857
1	1785.71429	1.78571429
2	892.857143	0.89285714
3	446.428571	0.44642857
4	223.214286	0.22321429
5	111.607143	0.11160714
6	55.8035714	0.05580357
7	27.9017857	0.02790179
8	13.9508929	0.01395089
9	6.97544643	0.00697545
10	3.48772321	0.00348772
11	1.74386161	0.00174386

Tabla 2. Concentración máxima y de las diluciones de los extractos del primer ensayo.





Extracto	Gram negativas																							
	<i>Salmonella typhimurium</i>												<i>Escherichia coli</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1H	x	x	x																					
1T	x	x																						
2H																								
2T																								
3H																								
3T																								
4H	x																							
4T																								
5H																								
5T																								
6H																								
6T																								
Control 1	x	x	x																					
Control 2	x	x	x																					
Extracto	Gram positivas																							
	<i>Bacillus subtilis</i>												<i>Staphylococcus epidermidis</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1H																								
1T																								
2H																								
2T																								
3H																								
3T	x																							
4H	x																							
4T	x																							
5H																								
5T	x																							
6H	x																							
6T	x																							
Control 1	x	x																						
Control 2	x	x	x	x	x	x	x																	

Tabla 3. Columnas 1: máxima concentración del extracto (3.57 mg/mL) y de antibióticos (40 mg/mL) (Control 1= Ampicilina, Control 2= Cefalexina). 2-12 Dilución de extractos y de antibióticos. Factor de dilución= 2. Renglones *Bursera aptera*: 1T, 1H; *B. schlehtendalii*: 2T, 2H; *B. morelensis*: 3T, 3H; *B. fagaroides*: 4T, 4H; *B. galeottiana*: 5T, 5H; *B. morelensis*: 6T, 6H. T= Tallo y H= hoja. x= activo y CMI (mg/mL). □= No activo.





Con base en los resultados de la Tabla 3, fueron seleccionados los extractos de *Bursera aptera*, *B. fagaroides* y *B. morelensis* para el segundo ensayo ampliando el margen de concentración para tener un conocimiento más detallado acerca de la CMI, cuyas concentraciones se muestran en la Tabla 4, mientras que en la Tabla 5 se observa en qué concentración hubo o no actividad antimicrobiana. La bacteria que presenta mayor sensibilidad frente a los extractos es *Salmonella typhimurium* y los extractos que muestran mayor efectividad a la mayoría de las cepas bacterianas son los de *B. aptera*. El cloranfenicol mostró menor actividad antibiótica, ya que fue efectiva en pocas diluciones.

De los tres antibióticos probados en este trabajo, el cloranfenicol resultó ser el de menor actividad contra las bacterias del segundo ensayo. Este antimicrobiano ha sido reportado como bacteriostático ya que puede evitar la unión de aminoácidos a la proteína de crecimiento en las bacterias (Cavalieri *et al.*, 2005). En general las bacterias presentan diferentes mecanismos de defensa contra agentes antimicrobianos como la producción de enzimas que hidrolizan o modifican la estructura del antimicrobiano, por lo que se vuelve inactivo. Algunas otras desarrollan mecanismos de permeabilidad evitando la entrada de moléculas antimicrobianas (Cavalieri *et al.*, 2005).

Dilución	Concentración (µg /mL)	Concentración (mg/mL)
Máxima concentración	3840	3.84
1	3072	3.072
2	2457.6	2.4576
3	1966.08	1.96608
4	1572.86	1.57286
5	1258.29	1.25829
6	1006.63	1.00663
7	805.31	0.80531
8	644.25	0.64425
9	515.4	0.5154
10	412.32	0.41232
11	329.85	0.32985

Tabla 4. Concentración máxima y de las diluciones de los extractos del segundo ensayo.





Extracto	Gram negativas																							
	<i>Salmonella typhimurium</i>												<i>Escherichia coli</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1H	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x												
1T	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x												
4H	x	x	x	x	x	x																		
4T	x	x	x	x	x	x	x	x	x															
6H	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x												
6T	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x												
Control 3	x												x	x										
Extracto	Gram positivas																							
	<i>Bacillus subtilis</i>												<i>Staphylococcus epidermidis</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1H													x											
1T	x																							
4H																								
4T																								
6H																								
6T													x											
Control 3	x	x	x																					

Tabla 5. Columnas 1: máxima concentración del extracto (3.84 mg/mL) y de antibióticos (40 mg/mL) (Control 3= Cloranfenicol). 2-12 Dilución de extractos y de antibiótico. Factor de dilución= 2. Renglones *Bursera aptera*: 1T, 1H; *B. fagaroides*: 4T, 4H; *B. morelensis*: 6T, 6H. T= Tallo y H= hoja. x= activo y CMI (mg/mL). □= No activo.

En general, los antibióticos usados en ambos ensayos con las concentraciones empleadas, fueron menos activos que el extracto de *B. aptera*, *B. galeottiana* y *B. morelensis* sobre *S. typhimurium*. En este punto se puede pensar que posiblemente la bacteria ha desarrollado resistencia cromosómica a diferentes antibióticos, entre ellos los aplicados en este trabajo, por ejemplo, el gen *cmlA/tetR* que da resistencia al cloranfenicol (Talavera *et al.*, 2011).

6.3.2. Prueba de difusión con discos

Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona o diámetro de inhibición de crecimiento bacteriano, es decir los halos de inhibición.





Dentro de la microbiología, el resultado de los halos, se interpretan por tres categorías: sensible, intermedia y resistente (Forbes y Sahm, 2009). Algunos de los problemas que se suelen presentar en esta prueba son la dureza del agar, así como el grosor, entre otros, ya que son influyentes en la difusión del extracto como en el crecimiento de la bacteria pudiendo crear una falsa resistencia. Por lo anterior, es importante comparar los resultados con un control tal como se realizó en este trabajo (Herrera, 1999), en el cual las proporciones de medio de cultivo que se usaron fueron las más óptimas para el crecimiento del inóculo.

En la Figura 5A y 5B, se observa la sensibilidad de *S. typhimurium* frente al extracto de hoja de *B. aptera*. Las diluciones corresponden a las últimas ocho concentraciones probadas en el ensayo de microdilución, siendo la dilución 11 la concentración mínima inhibitoria (CMI) en ambos métodos. Se observa que a mayor concentración del extracto de hoja de *B. aptera* hay mayor inhibición del crecimiento bacteriano de *S. typhimurium*, evidenciándose en el diámetro del halo formado (Tabla 6). El crecimiento de la bacteria sobre el agar presentó algunas colonias, sin embargo, se lograron observar claramente los halos de inhibición delimitados de la 4 a la 8 concentración, en la 9 y 10 dilución se observó un halo de inhibición mínimo y en el caso de la 11 era casi imperceptible, sin embargo en ningún disco con extracto se presentó crecimiento bacteriano a diferencia de los controles en la Figura 5C. El control de etanol, así como el de cloruro de sodio muestran un evidente desarrollo bacteriano alrededor y sobre los discos.

Cabe mencionar que, al ponerse el disco en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbió el agua y la muestra difundió por el agar, formándose un gradiente de concentración.

De acuerdo con los resultados, el extracto de hoja de *B. aptera* inhibe el crecimiento de *S. typhimurium* con una concentración mínima inhibitoria de 0.33 mg/mL, siendo la muestra más activa. Es relevante conocer la acción antimicrobiana de este extracto contra este microorganismo debido a que provoca daños en animales como aves y porcinos, de los cuales se ha aislado y está fuertemente relacionado con la tasa de mortalidad en terneros (McDonough *et al.*, 2000). También se han presentado casos en los que afecta a humanos.



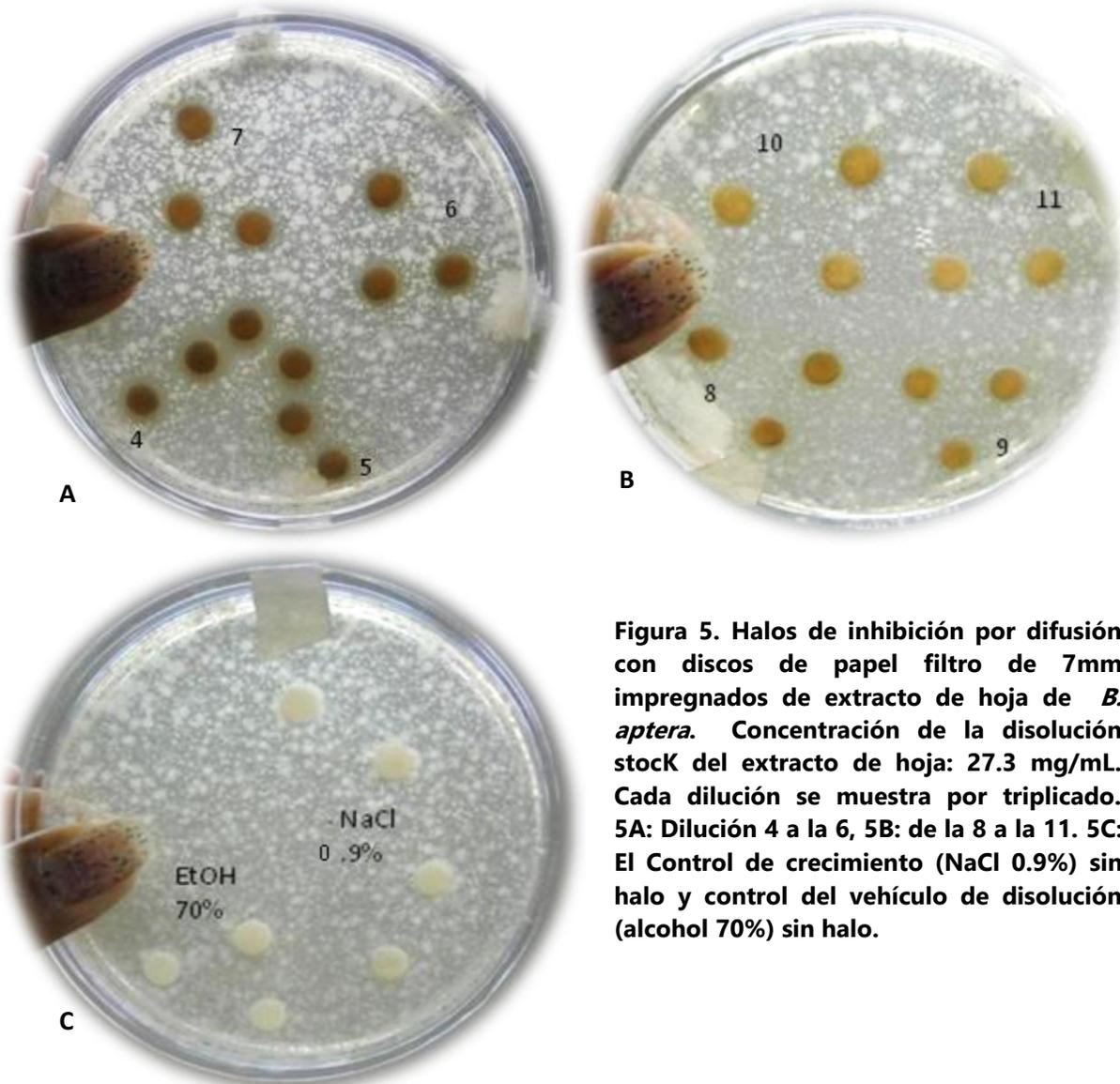


Figura 5. Halos de inhibición por difusión con discos de papel filtro de 7mm impregnados de extracto de hoja de *B. aptera*. Concentración de la disolución stock del extracto de hoja: 27.3 mg/mL. Cada dilución se muestra por triplicado. 5A: Dilución 4 a la 6, 5B: de la 8 a la 11. 5C: El Control de crecimiento (NaCl 0.9%) sin halo y control del vehículo de disolución (alcohol 70%) sin halo.

Dilución	mg de extracto	Halo promedio (mm)
4	1.57	9.5
5	1.26	9.0
6	1.01	8.0
7	0.81	8.0
8	0.64	7.5
9	0.52	7.0
10	0.41	7.0
11	0.33	7.0

Tabla 6. Concentración en cada disco a partir de la cuarta dilución con sus respectivos halos de inhibición.



6.3.3. Bioautografía

Mediante el uso de esta técnica se han determinado algunas sustancias activas contra varios microorganismos y resulta ser óptima en estudios con sustancias muy complejas ya que en la mayoría de las veces se logra ver con exactitud el área de inhibición y con ello la naturaleza de la sustancia responsable (Colorado *et al.*, 2007).

Algunos de los problemas suscitados en esta técnica es la determinación del perfil cromatográfico, ya que en ocasiones conlleva una serie de pruebas, sin embargo, el realizar un buen perfil facilita la determinación de la sustancia.

Por otro lado, debido a la falta de estudios de especies del género *Bursera*, no se han reportado suficientes trabajos acerca de la composición química de *B. aptera*, pero se sabe que esta planta tiene propiedades curativas dentro de la medicina tradicional mexicana (Argeta, 1994) y tiene actividad antimicrobiana (López, 2014) por lo que la aplicación del bioautografía resulta ser muy útil.

A continuación, se presenta la fase en la que fueron eluidas las cromatoplasmas (Tabla 7) y los resultados obtenidos.

Extracto	Fase
Hoja de <i>B. aptera</i>	Acetato de etilo: Metanol: Ácido fórmico: Agua 50:2:3:6

Tabla 7. Fase para el perfil cromatográfico del extracto hidroalcohólico de *B. aptera*.

Todas las cromatoplasmas se obtuvieron con la sexta dilución que corresponde a la cantidad de 1mg del extracto de hoja de *Bursera aptera*.

En la Figura 6 se observan los perfiles de la cromatografía en capa fina en una y en dos dimensiones del extracto de hoja de *B. aptera* los cuales se obtuvieron por triplicado, una para prueba de bioautografía contra *S. typhimurium*, otra para referenciar revelada con TTC, la tercera placa fue tomada de referencia del perfil cromatográfico.



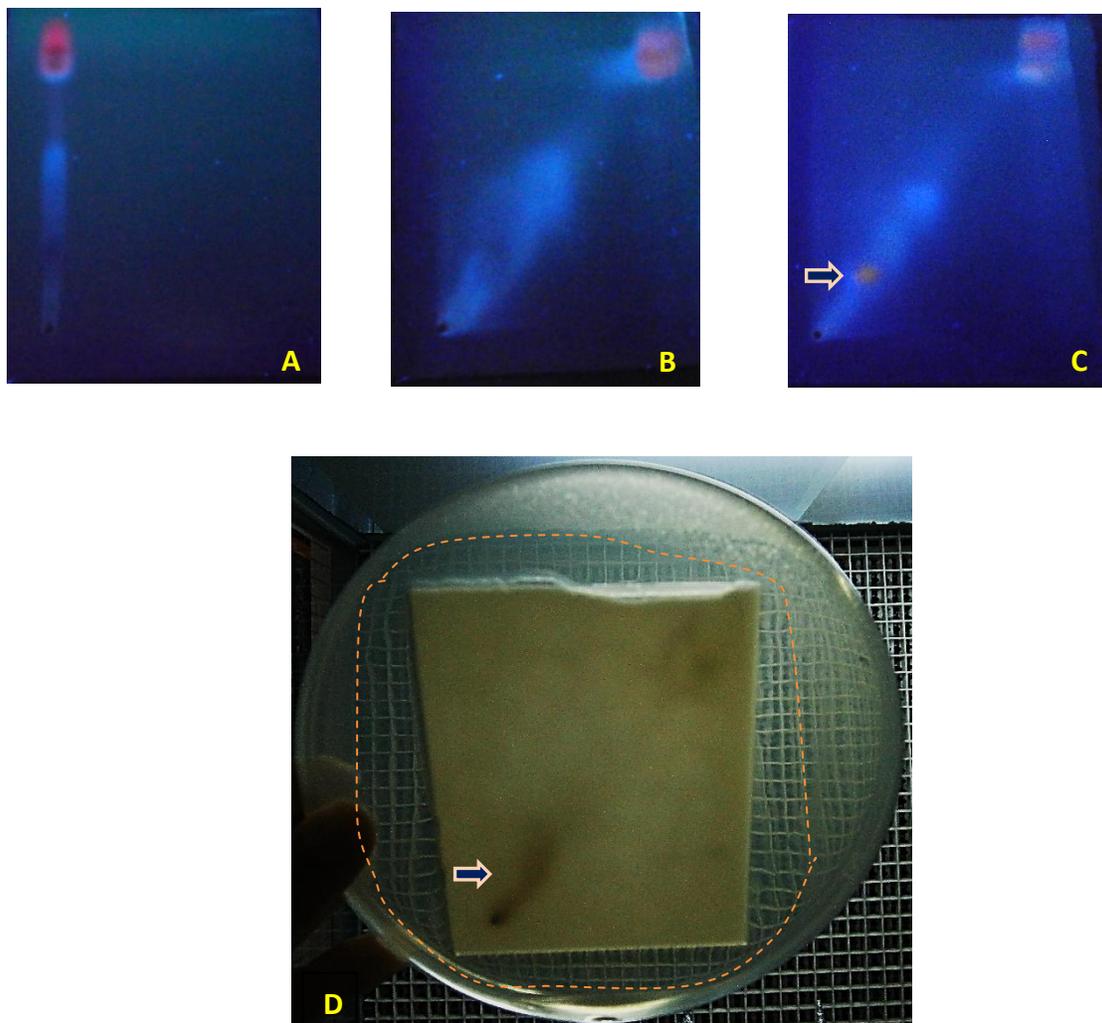


Figura 6. Bioautografía del extracto hidroalcohólico de hoja de *B. aptera*. 6A: Cromatografía en capa fina (CCF) desarrollada en una dimensión. 6B: CCF desarrollada en dos dimensiones. 6C: CCF en dos dimensiones revelada con RPN-PEG y UV 365nm. 6D: Bioautografía bidimensional.

Como se puede observar en los resultados, se logran distinguir varias bandas sobre las placas, estos son los diferentes componentes presentes que se lograron separar del extracto completo de la hoja de *B. aptera* mostrados en la Figura 6A y 6B.

En esta separación resaltan algunos componentes ya sea por el color o el tamaño, al aplicar el revelador se observan sustancias no identificadas en el extracto de manera más definida, en la que destaca la presencia de rutina marcada con una flecha en la Figura 6C.



En la bioautografía, comparando las placas de la Figura 6C y 6D, se puede decir que la presencia de rutina y otros compuestos fenólicos no identificados difundieron en el agar creando una zona de inhibición alrededor de toda la placa. Se nota la inhibición a los costados de manera horizontal más que en lo vertical del perfil cromatográfico, esto es debido a la forma en la que eluyó la placa, a partir del punto de aplicación hacia arriba y luego sobre el eje de elución hacia arriba, por lo que es apreciable un mayor margen a la altura de la mancha perteneciente al flavonoide rutina.

A diferencia de la microdilución, en la prueba de difusión de discos se evidencia el efecto de la concentración del extracto sobre el crecimiento bacteriano mostrando claramente un perímetro de inhibición y la prueba de bioautografía nos ayuda a ubicar la polaridad y la naturaleza química del compuesto activo.

6.4. Fraccionamiento y perfil cromatográfico.

Se obtuvieron las tres fracciones de manera exitosa. En la Tabla 8 se muestran los rendimientos de cada fracción, tanto de tallo como los de hoja de *B. aptera*. Se obtuvo un mayor rendimiento de la fracción metanólica de tallo y de hoja, mientras que la fracción hexánica presentó el menor rendimiento.

Fracción	Peso fracción		Rendimiento (%)	
	Tallo	Hoja	Tallo	Hoja
Hexánica	0.344	0.648	0.229	0.432
Acetato de etilo	2.739	6.380	1.826	4.253
Metanólica	3.597	15.713	2.398	10.475

Tabla 8. Rendimiento de las fracciones del extracto hidroalcohólico de *Bursera aptera*.

En cuanto a la cromatografía en capa fina, una de las ventajas es la separación de varios compuestos en un mismo ensayo en relativamente poco tiempo, además de emplear pequeñas porciones de la muestra y ser reproducible comprobando de esta manera que los resultados obtenidos son correctos. En esta prueba, las sustancias más afines a la fase estacionaria, en este caso la sílica G-25 UV₂₅₄, se encuentran más cercanos al punto de aplicación, y aquellos compuestos más afines a la fase móvil, la cual puede estar compuesta de varios disolventes, se encuentran más alejados del punto de aplicación debido a la polaridad. De esta manera se obtiene no solo una diferenciación, sino también una definición de los compuestos sobre la placa de sílica (Beyer y Walter, 1987).





A continuación, se presentan las correspondientes fases en las que se eluyó cada fracción en doble dimensión. En el caso de la fracción metanólica fue eluída tres veces bajo las mismas condiciones ya que los componentes se separaron mejor y gradualmente (Tabla 9).

Fracción	Fase 1° dimensión	# de veces eluídas	Fase 2° dimensión	# de veces eluídas
Hexano	Hexano: AcOEt 8.5 : 1.5	1	Hexano: AcOEt 8.5 : 1.5	1
AcOEt	CHCl ₃ : MeOH: HCOOH 4.5 : 3 : 0.15	1	CHCl ₃ : MeOH: HCOOH 4.5 : 3 : 0.15	1
MeOH	AcOEt:MeOH:HCOOH:H ₂ O 50 : 4 : 2 : 10	3	BuOH:Ac. Acético:H ₂ O 5 : 1 : 4	3

Tabla 9. Perfil cromatográfico de las fracciones del extracto hidroalcohólico de *B. aptera*. AcOEt: acetato de etilo, CHCl₃: cloroformo, MeOH: metanol, HCOOH: ácido fórmico, BuOH: butanol, H₂O: agua.

En la Figura 7 se muestran las fracciones corridas en placas de sílice, donde se aprecia una distribución de los componentes formando en dos de ellas una diagonal (Figura 7A y 7B), mientras que en la tercera (Figura 7C) se observa los componentes distribuidos en gran parte de la superficie de la placa. En el caso de la fracción metanólica, la separación de las bandas observadas en la placa, no formaron una diagonal debido a que en la segunda elución se pudieron separar más compuestos con diferente polaridad a los de la primera elución puesto que también es una fase diferente. Cabe aclarar que las fases que se usaron fueron las más óptimas para el desarrollo del trabajo.

En las imágenes de las fracciones, los componentes están en diferentes cantidades mostrándose en las placas en forma de círculos o manchas de diferente color y tamaño, sin embargo, esto no quiere decir que la más abundante sea la sustancia activa.



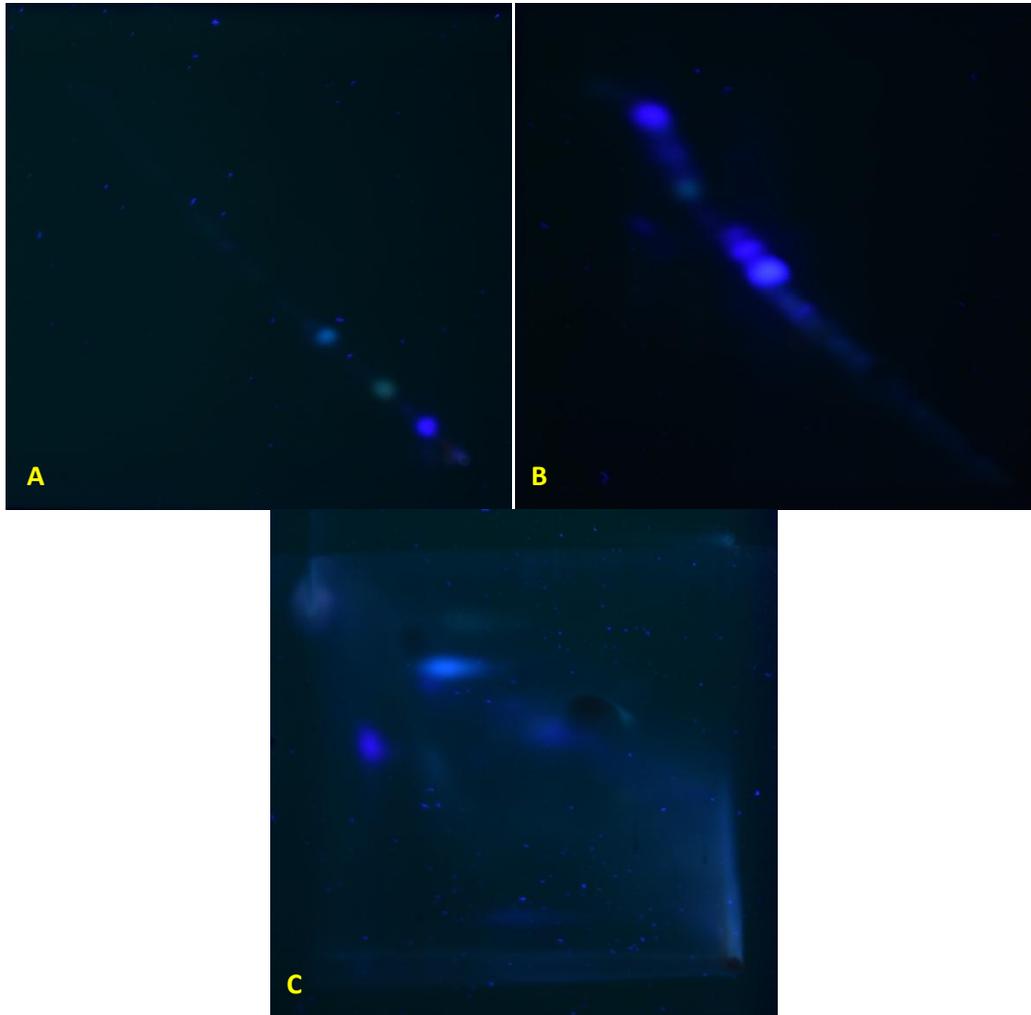


Figura 7. Placas en doble dimensión corridas en las fases correspondientes vistas en UV 365nm. A) Fracción hexánica, B) Fracción de acetato de etilo, C) Fracción metanólica.

6.5. Análisis antimicrobiano de las fracciones

6.5.1. Prueba de difusión con discos

Con esta técnica se puede observar y comprobar de manera más efectiva el desarrollo bacteriano ya que en el medio sólido se identifica el crecimiento de la bacteria a diferencia de la técnica de microdilución, cuando no se cuenta con un lector de microplacas, sin descartar que ésta última nos ayuda a identificar las concentraciones a las que son activos cada extracto sin hacer uso excesivo del material orgánico obtenido.

De acuerdo con el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano y las categorías de la microbiología, podemos clasificar como sensibles a aquellas bacterias



que no presentan crecimiento (Ferraro, 2001), en este caso la bacteria *S. typhimurium* es sensible frente las fracciones de acetato de *B. aptera*, mientras que para las fracciones de metanol se ubicaría en intermedia y la fracciones de hexano en intermedio a nulo ya que la concentración más alta de esta fracción obtuvo un halo casi imperceptible. Las fracciones de hoja presentaron mayor efecto en cuanto al crecimiento de la bacteria que las de tallo, sin embargo, no inhibieron completamente el crecimiento. La fracción de acetato de etilo de hoja fue la que presentó un halo mayor y mejor definido apreciable en la Figura 8, donde se observa la difusión del extracto sobre el agar, así como los controles de los diferentes disolventes los cuales presentaron crecimiento. Los diferentes diámetros del halo se muestran en la Tabla 9.

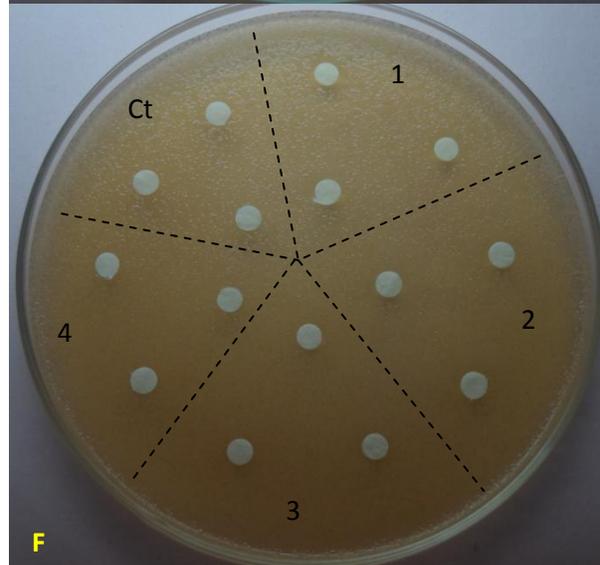
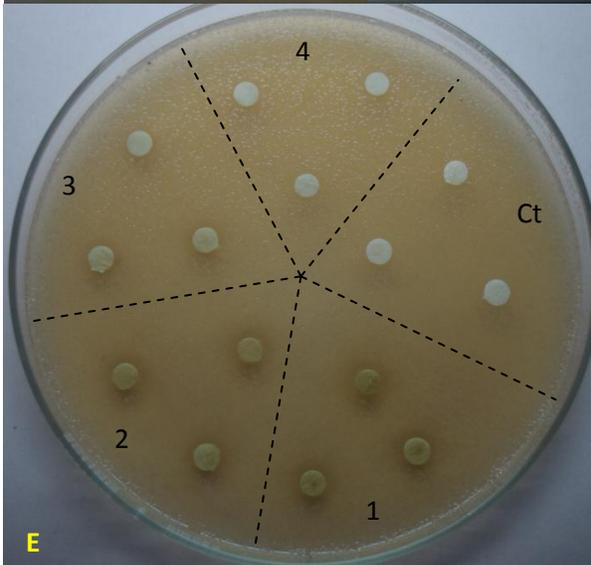
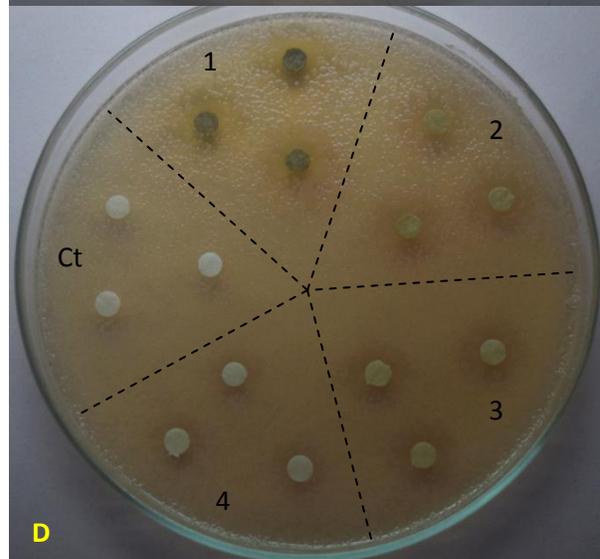
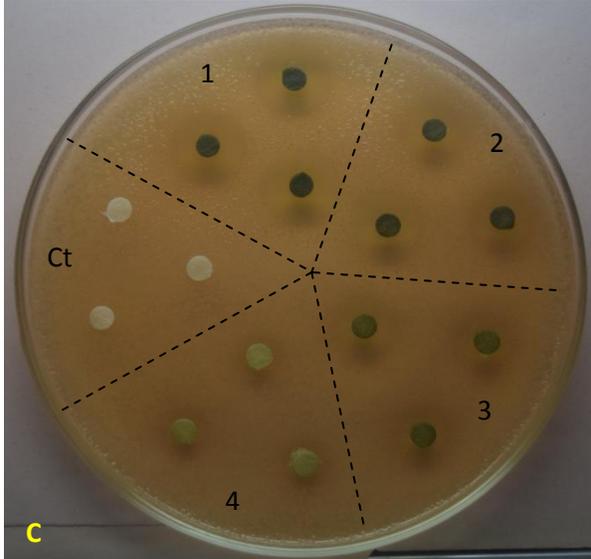
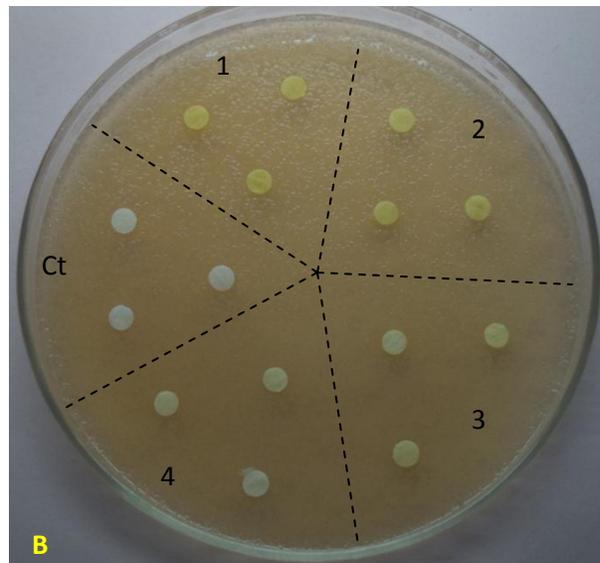
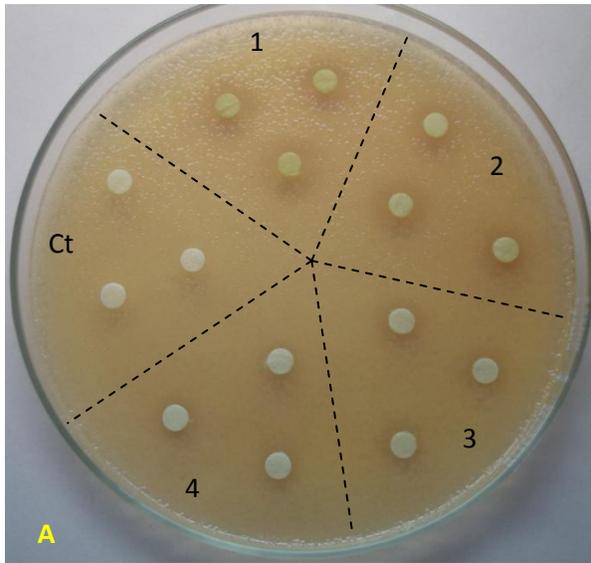
En cuanto a los extractos completos, ambos tuvieron un efecto sobre el crecimiento bacteriano, no obstante, no se logró observar un halo definido en ninguno.

En algunos casos no se lograba observar en halo definido, no obstante, había menor crecimiento. La difusión de cada extracto sobre el agar alcanzó un diámetro mayor al halo de inhibición, se puede decir que en los límites de dicha difusión la concentración disminuye por tanto posiblemente tenga un menor efecto por lo que la bacteria pudo haber crecido en una menor cantidad en ese espacio, entonces a cierta concentración la fracción puede tener actividad bacteriostática.

En esta prueba las fracciones de hexano de tallo y hoja muestran una actividad bacteriostática, ya que no se ve un halo definido, pero reducen el crecimiento de la bacteria respecto al control. Mientras que la fracción de acetato de etilo, tanto de tallo como de hoja, presentan actividad bactericida observándose un claro límite de su actividad sin disminuir aun después de haber transcurrido más de 24 horas. La fracción de metanol tiene una baja actividad bactericida.

Por lo tanto, los componentes con mayor efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano, se encuentra dentro de la fracción de acetato de etilo, observándose un halo mucho mayor que en el extracto completo al ser comparados. Esto puede ser debido a que el o los compuestos activos se encuentran más concentrados y separados de otros compuestos que posiblemente disminuyan la actividad, aunque puede ser que los compuestos de la fracción de acetato actúen de manera sinérgica puesto que en la prueba de bioautografía no se mostraron resultados positivos.





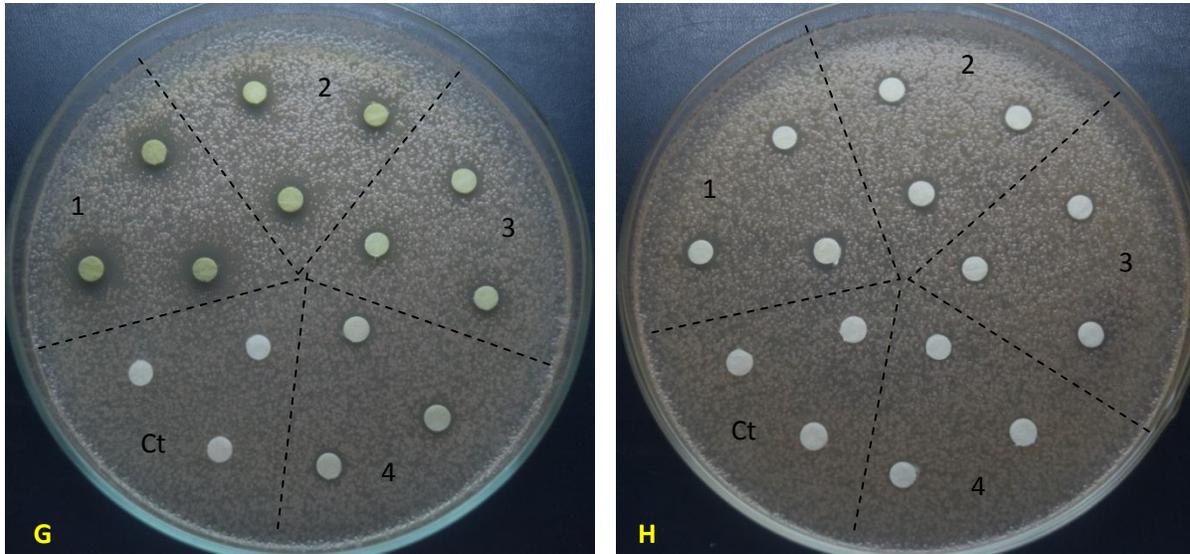


Figura 8. Difusión con discos. 1 a 4: discos de mayor concentración a menor concentración. Ct: control. A: extracto de hoja de *B. aptera*, control: ninguno; B: fracción de hexano de hoja, control: EtOH; C: fracción de acetato de etilo de hoja, control: AcOEt; D: fracción de metanol de hoja, control: MeOH; E: extracto de tallo de *B. aptera*, control: AcOEt; F: fracción de hexano de tallo, control: EtOH; G: fracción de acetato de etilo de tallo, control: cloroformo; H: fracción de metanol de tallo, control: MeOH.

Tallo/Hoja	<i>B. aptera</i>	Dilución	mg de extracto	Halo promedio (cm)	Difusión (cm)
Hoja	Extracto completo	1	3	Sin halo definido	1.7±0.05
		2	1.5		1.5±0.1
		3	1		1.1±0.05
		4	0.5		1±0.05
	Control ninguno			Sin halo	Sin difusión
	Fracción de hexano	1	3	Sin halo definido	0.9±0.01
		2	1.5		0.8
		3	1		0
		4	0.5		0
	Control EtOH			Sin halo	Sin difusión
	Fracción de AcOEt	1	3	1.6±0.11	2±0.1
		2	1.5	1.3±0.11	1.8±0.05
		3	1	1.1±0.05	1.4±0.05
		4	0.5	0.8±0.05	1.1±0.1
	Control AcOEt			Sin halo	Sin difusión
	Fracción de MeOH	1	3	1±0.05	2
2		1.5	Sin halo definido	1.6±0.11	
3		1		1.4	
4		0.5		1.1±0.15	
Control MeOH			Sin halo	Sin difusión	



Tallo	Extracto completo	1	3	0.8±0.01	1.3±0.4
		2	1.5	Sin halo definido	1±0.1
		3	1		0.8±0.05
		4	0.5		0.7±0.05
	Control AcOEt			Sin halo	Sin difusión
	Fracción de hexano	1	3	1±0.05	1
		2	1.5	Sin halo definido	0.9±0.05
		3	1		0.8±0.05
		4	0.5		0
	Control EtOH			Sin halo	Sin difusión
	Fracción de AcOEt	1	3	1.2±0.05	1.5±0.1
		2	1.5	1±0.05	1.1±0.05
		3	1	Sin halo definido	1±0.05
		4	0.5		0.9±0.15
	Control cloroformo			Sin halo	Sin difusión
	Fracción de MeOH	1	3	0.8±0.05	1.2±0.05
		2	1.5	Sin halo definido	1
		3	1		0
		4	0.5		0
	Control MeOH			Sin halo	Sin difusión

Tabla 10. Concentración del extracto y fracciones de tallo y hoja de *B. aptera* en cada disco con sus diluciones y sus respectivos halos de inhibición.

6.5.2. Bioautografía

En la Figura 9, se muestran las placas resultantes del bioautografía después de ser separadas del agar, en las que no se observó un área definida de inhibición sin embargo el crecimiento se mostró menor en el agar que en el control. Debido a que en esta prueba los componentes son separados a lo largo de la placa, es posible que no tuvieran el mismo efecto de manera separada sino más bien actúa de manera sinérgica, es decir cada compuesto puede tener cierto grado de actividad, pero no lo suficiente para impedir el crecimiento. Por tanto, al estar en conjunto podrían actuar de manera positiva o un compuesto puede ayudar a la actividad del otro y al ser separados pierden su efecto (Zaragoza *et al.*, 2007).



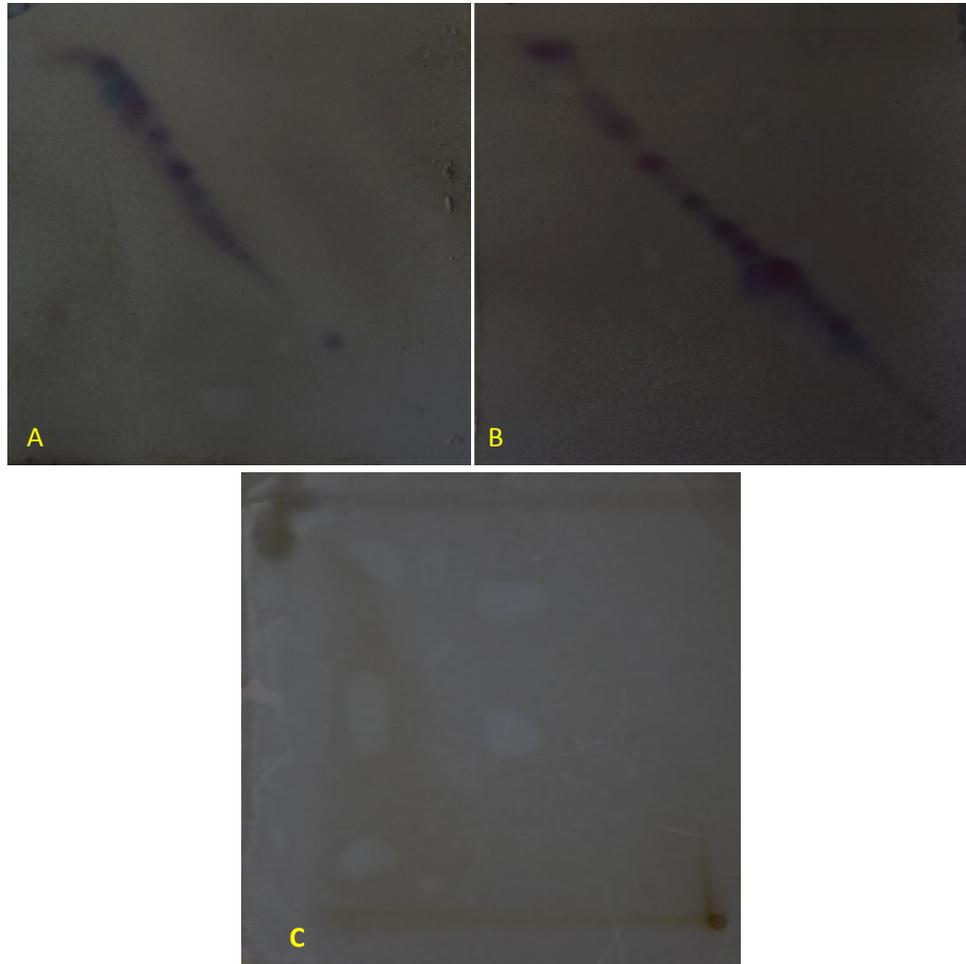


Figura 9. Placas de bioautografía. A: fracción de hexano, B: fracción de acetato de etilo. C: fracción de metanol.

Tal como se mostró en los resultados, los extractos de las diferentes especies del género *Bursera* usadas en este trabajo, mostraron un efecto contra varias bacterias con un potencial diferente entre ellas, por lo que se puede comprobar que este género contiene sustancias que afectan el desarrollo bacteriano, el cual provoca daños importantes tales como las del género *Salmonella*, causante de varias enfermedades. En este caso se trabajó con *Salmonella entérica* serotipo *typhimurium* o *Salmonella typhimurium*, ésta al entrar al organismo, se alberga principalmente en el intestino provocando una serie de síntomas. Dicha bacteria no solo afecta a la humanidad, sino que también a otros mamíferos como roedores o el ganado (Tacchini *et al.*, 2010), por lo que su propagación se facilita y por lo cual es importante realizar estudios para su control. En general y viendo los resultados, los extractos de tallo y hoja de *B. aptera* mostraron una apreciable actividad contra esta bacteria.



En este caso se observó la actividad de los flavonoides, de los cuales se dice que su capacidad para contraatacar algunas bacterias se debe a la formación de complejos proteínicos y la unión con las paredes celulares de las bacterias alterando su conformación (Cowan, 1999).

7. Conclusión

Se obtuvo la extracción hidroalcohólica de las especies del género *Bursera* de manera exitosa. Los extractos que presentaron actividad antioxidante fueron tallo y hoja de *B. aptera*, tallo de *B. schlechtendalii*, hoja y tallo de *B. morelensis*, hoja y tallo de *B. fagaroides*, hoja y tallo de *B. galeottiana*. Los extractos que presentaron mayor actividad antioxidante fueron hoja de *B. aptera*, hoja y tallo de *B. fagaroides*, y tallo de *B. galeottiana*, no obstante, el de *B. fagaroides* tiene la mayor capacidad antioxidante. Solamente uno de los doce extractos de las cinco especies de *Bursera* consideradas en este trabajo, no presentó actividad antioxidante, es decir, el extracto de hoja de *B. schlechtendalii*, por lo que este género resulta ser una buena fuente de antioxidantes con propiedades biológicas adicionales.

Las especies de tallos y hojas de *B. aptera*, *B. fagaroides* y *B. morelensis* (extracto 6) tuvieron una actividad antimicrobiana, sin embargo, *B. aptera* resultó ser la más efectiva, mientras que los extractos de tallos y hojas de las especies *B. schlechtendalii*, *B. morelensis* (extracto 3) y *B. galeottiana* no presentaron ninguna actividad. Las cepas que presentaron susceptibilidad fueron *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis* de las cuales *S. typhimurium* fue la más susceptible.

El estadio del ciclo de vida en el que se encuentre la planta, así como el lugar, e incluso la condición de vida, ya sea afectada por algún patógeno o algún factor abiótico, puede contribuir en la producción de ciertos metabolitos secundarios aun siendo de la misma especie tal como en el caso de las dos muestras de *B. morelensis* presentes en este trabajo.

El extracto con mayor actividad resultó ser *B. aptera* contra *S. typhimurium* en su composición completa, presuntamente por la presencia de Rutina.





La fracción de *B. aptera* con mayor actividad fue la de acetato de etilo, la cual se clasifica como bactericida y antioxidante debido en buena parte a la presencia del flavonoide Rutina.

Además, al comparar los resultados de los métodos aplicados se puede decir que los compuestos dentro del extracto de hoja de *B. aptera* mantienen una acción sinérgica por lo que la inhibición se hace más fuerte al estar en conjunto que de manera separada. Mientras que, la fracción de acetato de etilo es más activa separada que en conjunto en el extracto completo de *B. aptera*.

Cabe mencionar, que el crecimiento de *S. typhimurium* disminuye con el aumento de la concentración de los extractos de las especies de *Bursera* trabajadas y de las fracciones, en el caso de *B. aptera*, obteniendo en algunos casos un efecto bacteriostático o bactericida, a excepción de *P. aeruginosa* en la que la concentración parecía favorecer el desarrollo bacteriano.

8. Referencias

- Acevedo M., Nuñez P., González-Maya L., Cardoso A. y Villarreal M. 2015. Cytotoxic and Anti-inflammatory Activities of *Bursera* species from Mexico Macdiel. *Journal Clinical Toxicology*, 5: 8 p.
- Alba de la Torre F. 2013. Análisis retrospectivo y prospectivo del desarrollo de la resistencia bacteriana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, 123 p.
- Argueta A. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. [En línea] Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009, UNAM. [Fecha de consulta: 28 de febrero del 2016]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>
- Arriaga W. 2011. Evaluación del potencial antioxidante de extractos de especies de *Bursera*, *Matricaria* y *Cymbopogon* mediante técnicas electroquímicas. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química en Alimentos. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, 73 p.
- Ávalos A. y Pérez E., 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, 2 (3): 119-145 p.





- Bah M., Gutiérrez D., Mendoza S., Rodríguez V. y Castañeda R. 2014. Chemical constituents and antioxidant activity of extracts obtained from branch bark of *Bursera simaruba*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 13 (6): 527-536 p.
- BD Medical Technology, 2005. Patron de turbidez BBL preparado, McFarland Turbidity Standard No. 0.5. [En línea] Documentos reglamentarios. [Fecha de consulta: 10 de agosto del 2017]. Disponible en: http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421%280205%29_es.pdf
- Beyer H. y Walter W. 1987. Manual de química orgánica, 19° ed., Reverte, España. 980 p.
- Cartaya, O. y Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba, 22(2): 5-14 p. [En línea]. Fecha de consulta: 28 de junio de 2016. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>
- Cavalieri S., Rankin I. Harbeck R., Mc Carter Y., Ortez J., Spiegel C., Sharp S. y Sautter R. 2005. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Library of Congress Cataloging. [En línea], Fecha de consulta: 27 de noviembre de 2016, disponible en: www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download
- Colorado R., Galeano J. y Martínez M. 2007. Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia Medellín, Colombia, 14 (1): 67-71p.
- Cowan M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, Miami University, 12 (4): 564-582 p.
- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. 2nd ed. New York Botanical Garden, N. Y., 555 p.
- Delgado, S. J., Villaseñor, G. M., Rodríguez, M. A., Herrera, H. R., Santerre, A. y Puebla, P. A. 2006. Actividad citotóxica y antioxidante de los flavonoides y saponinas de las fracciones obtenidas de *Bursera fagaroides*. Revista de Fitoterapia, 6 (1), 103 p.
- Escamilla C., Cuevas E. y Guevara J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM, 52 (2), 73-75 p.





- Evans H., Becerra X., Venable D., y Bowers S. 2000. Chemical analysis of squirt-gun defense in bursera and counterdefense by chrysomelid beetles. *Journal of Chemical Ecology*, 26 (3): 745-754 p.
- Ferraro, M. J. 2001. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eleventh Informational Supplement, 21 (1).
- Forbes B. y Sahm F. 2009. *Diagnostico Microbiológico*, 12° ed., Medica Panamericana, Buenos Aires, 1160 p.
- Gigliarelli G., Becerra J., Curini M. y Marcotullio M. 2015. Chemical Composition and Biological Activities of Fragrant Mexican Copal (*Bursera* spp). *Molecules*, 20, 22383–22394 p.
- Haddadin A., Fappiano S. y Lipsett P. 2002. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgraduate Medical Journal*, 78: 385–392p.
- Hernández J., Ruiz C., Rodríguez A., Tapia I. y Urania L. 2012. Distribución de Amirina en Burseraceae, *Revista Latinoamericana de Química*, 39 p.
- Hernández, J., García, L., Hernández, A., Álvarez, R. y Urania R., 2002. Glicósidos de luteolina y miricetina de Burseraceae. *Journal of the Mexican Chemical Society*, México, 46 (4), 295-300 p.
- Herrera, M. 1999. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños, Costa Rica*, 34: 33-41 p.
- Jolad, S., Wiedhopf, R. y Cole, J. 1977. Cytotoxic agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae): Deoxypodophyllotoxin and a new lignan, 5'-desmethoxydeoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(6): 892-893 p.
- Liu R., Hongchi Z., Maosen Y., Jiao Z., Qin T., Jian-Jun L. y Jinyi W. 2013. Synthesis and biological evaluation of apigenin derivatives as antibacterial and antiproliferative agents. *Molecules*, 18(9), 11496-11511 p.
- López A., 2006. Cuando el estrés oxidativo nos alcance., *Revista de Divulgación de la Ciencia de la UNAM*, ¿Cómo ves? No. 89: 10 p.
- López M. 2014. Estudio de la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto de *B. aptera*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Laboratorio de Farmacognosia, UNAM, México, 92 p.





- López R., 2011. Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera morelensis* Ramírez. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Laboratorio de Farmacognosia, UNAM, México, 52 p.
- Marín M. y Gudiol F. 2003. Antibióticos betalactámicos, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, España, 21(1):42-55 p.
- Martini N., Katerere D. y Eloff J., 2004. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae), Journal of Ethnopharmacology 93: 207–212.
- McDonough L., Shin J., y Lein H. 2000. Diagnostic and Public Health Dilemma of Lactose-Fermenting *Salmonella enterica* Serotype *Typhimurium* in Cattle in the Northeastern United States. Journal of Clinical Microbiology, 38 (3): 1221–1226 p.
- Medina L. 2008. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Burseraceae. Departamento de Botánica. Instituto de Biología, UNAM, México, 66: 1- 76 p.
- Molina J. y Uribarren T. 2015. Generalidades de bacterias. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM. [En línea]. Fecha de consulta: 2016-06-29. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
- Muñoz, K., Arango, G. y Jaramillo, M. 2004. Los antibióticos y su situación actual. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 11: 21-33 p.
- Organización Mundial de la Salud, 2014. Ginebra. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/>, fecha de consulta: 25 de marzo del 2016.
- Pineda L. 2015. Transesterificación enzimática de flavonoides. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, UNAM, México, 80 p.
- Pongsak R. y Parichat P. 2010. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*, Journal of Medicinal Plants Research, 4(5), 393-396 p. [En línea], disponible en: <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- Puebla A., Huacuja L., Rodríguez G., Villaseñor M., Miranda M., Celis A. y Sandoval L. 1998. Cytotoxic and antitumour activity from *Bursera fagaroides* ethanol extract in mice with L5178Y Lymphoma. Revista de Fitoterapia, 12: 545–548 p.





- Queiroga C., Teixeira M., Baesa B. y Melillo P. 2007. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Revista de Fitoterapia*, 78 (4): 327–328 p.
- Reguera S. 2011. Caracterización de la actividad de extractos vegetales en la alimentación de *Spodoptera frugiperda* (Smith) como modelo de estudio. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México, 89 p.
- Repetto M. y Repetto G., 2009. *Toxicología fundamental*, 4ª ed., Díaz de Santos, Universidad de Sevilla, España, 587p.
- Rodríguez L. 2014. Estudio de la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto de *Bursera aptera*. Tesis de Licenciatura., Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México, 91 p.
- Rosas I., Salinas E., Martínez L., Cruz A., González B., Espinosa N. y Amábile C. 2015. Characterization of *Escherichia coli* Isolates from an Urban Lake Receiving Water from a Wastewater Treatment Plant in Mexico City: Fecal Pollution and Antibiotic Resistance. *Curr Microbiol.* 71(4):490-5.
- Ruiz F., Medrano A. y Navarro A., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, México, 8 p.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Editorial Limusa, México. 189 p.
- Rzedowski J., Medina R. y Calderón de Rzedowski G. 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (*Burseraceae*). *Acta Botánica Mexicana*, 70: 85-111 p.
- Sadava, D., Heller, G., Orians, G., Purves, W., y Hillis, D. 2009. *Vida, la ciencia de la biología*. 8ª ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1376 p.
- Salinas D., Arteaga G., León I., Dorado O., Valladares M. y Navarro V. 2009. Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla Sierra Biosphere Reserve in Morelos (México), *Revista Polibotánica México*, 28: 213-225 p.
- Serrano R. 2013. Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (*Burseraceae*), de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, Tesis de Doctorado, Posgrado en ciencias biológicas, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México, 138 p.





- Silva M., García M., Desongles J. y Ponce E. 2006. Técnico Especialista en Laboratorio Del Servicio Gallego de Salud. Temario Materias Específicas, Volumen 2. Editorial MAD, España. 502 p.
- Taiz L. y Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal. Publicaciones de la Universidad de Jaume I., Castello de la Palma, España, 1338 p.
- Tacchini A., Caraffini F., Montamat C., Spitale A., Bosio D. y Mínguez G. 2010. Empiema causado por *Salmonella typhimurium*, Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias, Chile, 26: 91-94 p.
- Talavera R., Varela G. y Reyes R. 2011. Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de *Salmonella spp* de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México. Veterinaria, UNAM, México, 42 (4): 269-276 p.
- Villarreal Ma. L., Cardoso T. A., Ortíz A. y Sharma A. 2014. Biotecnología para producir medicinas de plantas mexicanas, Revista Digital Universitaria, UNAM, 15(8): 1607-6079 p., [en línea]. Fecha de consulta: 2016-10-29. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art62/>
- Zaragoza R., Gimeno C., Permán J. y Salavert M. 2007. Microbiología Aplicada al Paciente Crítico. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 268 p.

