

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Estudio de la actividad antidiarreica de *Bidens odorata* Cav. y
Chrysactinia mexicana Gray

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA: M. en C. DANIEL ZAVALA MENDOZA

COMITÉ TUTORAL:

CODIRECTORES

DR. MIGUEL ÁNGEL ZAVALA SÁNCHEZ

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR

ASESOR

DRA. MARÍA DEL CARMEN ESCOBAR VILLANUEVA

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: **250640**”

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Estudio de la actividad antidiarreica de *Bidensodorata* Cav. y *Chrysactinia mexicana* Gray", que presentó:

DANIEL ZAVALA MENDOZA

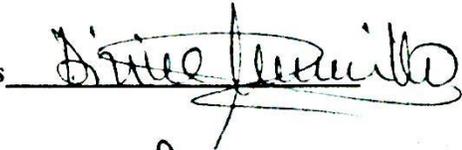
El día 1 de septiembre del año 2014

SINODALES

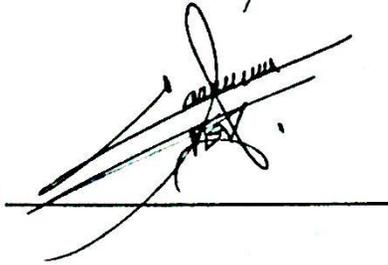
Presidente: Dra. María Salud Pérez Gutiérrez



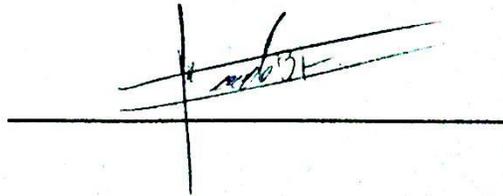
Secretario. Dra. María Divina Murillo López de Silanes



Vocal 1. Dra. María del Carmen Escobar Villanueva



Vocal 2. Dr. Gerardo Blancas Flores



Miembros del Comité Tutorial

Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez. Codirector

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar. Codirector

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva. Asesora

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Esto que para mi alma mater no es más que un granito de arena, para mí y mi familia es un enorme paso, lleno de amor y dedicación.

En este paso intervienen seres fundamentales que figurarán a continuación aunque estoy seguro que habrá quienes no figuren en este apartado pero será por omisión involuntaria ya que la única y verdadera razón de no mencionarlos es por mi mala memoria con los nombres, por eso a los omitidos en primer lugar mil gracias les doy.

Corazón María Luisa tu que has estado conmigo en todo este mi proceso formativo sabes mejor que nadie, lo que nos ha costado, siempre has sido mi motor y mis motivos para no rendirme y seguir adelante.

Gracias por tu apoyo, tu compañía, tu amor y saberme comprender.

Ahora igual que antes podemos decir, una vez más "LO LOGRAMOS".

Mélaney. Con tu presencia y tu ausencia.

Para lograr este objetivo has sido una de los motores que me han movido y motivado para que me esfuerce en cumplir mis objetivos los cuales te alcanzarán. Siempre estarás conmigo.

Dany Xim, con este logro que también es tuyo y con lo que hay detrás recordarás que hubo momentos difíciles, complicados aunque la verdad también inigualables, hermosos y llenos de retos, mira hija mía lo logramos.

Diego éste resultado también es tuyo, como olvidar que el divino obsequio de tu permanencia con nosotros fue en los momentos más decisivos del inicio de este proyecto.

Ana Luz tus ejemplos fueron decisivos y es lo que me ha motivado a no rendirme.

A la Sra. Catalina Suarez y a su hijo Néstor E. Rodriguez Suarez quienes gustosamente me apoyaron primero ubicando una de mis plantas y después a realizar la colecta, mil gracias nuevamente por su valiosa aportación.

David, Mary, Elizabeth, Juan y Luisa saben que les estimo muchísimo y me complace compartir esto con ustedes.

Dr. Miguel A. Zavala Sánchez, el apoyo, sugerencias, regaños, correcciones y amistad que usted me ha brindado a lo largo de mi formación han sido fundamentales para culminar este último gran proyecto, su experiencia y asesoría están detrás de este trabajo.

Dra. M. Salud Pérez G. Sin duda que éste espacio estaría incompleto sin escribir las más sinceras líneas de gratitud a quien por su gran visión ha logrado hacerme entender el rumbo que mi trabajo estaba tomando, gracias nuevamente.

Dr. Francisco J. Alarcón Aguilar su apoyo, dirección, comentarios y preguntas sobre que ocurría o como explicar los resultados obtenidos hicieron posible la culminación exitosa de mi proyecto, gracias por todo su apoyo.

Dra. M. Carmen Escobar gracias por sus comentarios y correcciones que siempre oportunos y por supuesto gracias también por permitir en muchas ocasiones abordar esa parte emotiva y humana que finalmente es lo que determina a los individuos a cumplir sus metas.

Dra. M. Divina Murillo López de Silanes en el resultado de éste trabajo no hay evidencia directa de su contribución, sin embargo el permitirme trabajar en su laboratorio, la forma en que se involucró con mi trabajo y desde luego el que aceptara la gran travesía para estar como integrante de mi jurado, es algo que aprecio y le agradezco muchísimo.

Griselda, que sin participar en este trabajo, contribuiste enormemente para que yo lo pudiera realizar Gracias.

Drs. Laura, Anabel, Pilar, Miguel, José, Ma. De Jesús. Siempre con sus comentarios que me infundieron confianza y por qué durante mi estancia en la unidad de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de la UNIZAR, me hicieron sentir aceptado en el grupo con lo que pude desempeñarme con confianza y seguridad.

Dra. Martha (prima), estudiantes del master Rebeca y Raquel, Gracias prima y compañeras de espacio, creo que por pequeño nuestro espacio nos permitió conocernos y pasar momentos agradables sobre todo en los días de intenso trabajo siempre había un intercambio de palabras que nos alegrara o nos hiciera reír. Momentos que siempre recordaré, Gracias también Claudia y Ana

No les digo adiós sino hasta pronto.

Mi estancia fue MAH gracias a ustedes.

Dra. Julia Pérez, el compartirme experiencias y palabras de aliento de su parte también me ayudaron como no tiene idea, hasta lograr que yo cumpla mis objetivos

Dr. Marco Martín gracias por la asesoría brindada y el análisis de mis muestras parte fundamental del proyecto.

Dr. Cuauhtémoc Pérez G. Pues mi amigo Don Cuau, gracias por sus comentarios, observaciones, correcciones, consejos, apoyo y amistad.

Dra. Norma C. Cárdenas Ortega nuevamente Norma, tus conocimientos y gran capacidad además de ese gran interés tuyo por apoyar a la gente, me han permitido que mi formación se enriquezca, gracias por apoyarnos en la colecta.

Roberto Serrano, Miquel Ramos, Kandy. Compañeros y amigos con quienes compartí cosas que hicieron más agradable y pasable esos largos días de trabajo.

Estimadísimos asesores, compañeros, amigos, colegas y hermosa familia gracias a todos,

Termino este apartado que en el manual de operaciones del posgrado figura como opcional es decir podría ser omitido sin ningún problema.

Mi deseo de escribirlo es porque para mí es el más importante.

Salvo a quien menciono primero que son mi esposa e hijos, el orden de aparición de todos aquellos a quienes agradezco enormemente no es precisamente el orden de importancia, es solo que siempre con alguien se debe iniciar y con alguien terminar y nunca será posible poner a todos en primer lugar.

Resumen

La diarrea es consecuencia de la disfunción en el transporte de agua y electrolitos a nivel del intestino. Como resultado de esta alteración se produce un aumento de la frecuencia, cantidad y volumen de las heces, además de cambio en la consistencia de éstas debido al incremento de agua y electrolitos.

A nivel mundial la mortalidad reportada por diarrea en menores de cinco años es de 1.87 millones, que representa el 19% de la mortalidad total de la niñez. Esta situación se dispara en los países en desarrollo ya que en África y Asia Sudoriental las muertes por esta causa llegan a 78% y en otros 15 países en desarrollo, entre los que se encuentra México, dichas muertes representan el 73% (Boschi y col., 2008).

En el presente trabajo se estudiaron dos plantas que son utilizadas como remedio en el control de trastornos digestivos en la medicina tradicional mexicana: *Bidens odorata* Cav. y *Chrysactinia mexicana* Gray.

Del extracto clorofórmico de *B. odorata* se aisló la fracción con mayor actividad antidiarreica (F4), Inhibiendo la diarrea inducida con aceite de ricino. Por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM) se detectan como compuestos mayoritarios al ácido palmítico (15.3%), ácido esteárico (13.12%), ácido linoleico (9.24%) y oleico (3.34). De los ácidos grasos detectados en F4, de la

mezcla de éstos y de F4 se estudió su actividad antidiarreica a diferentes dosis, se encontró que en la diarrea inducida con aceite de ricino el mayor efecto antidiarreico fue el observado con F4 a 100 mg/kg ($90.1 \pm 0.7\%$). Se determinó también que F4 no inhibe la diarrea inducida con prostaglandinas E_2 ; en cambio, si inhibe la diarrea inducida con ácido araquidónico ($72.9 \pm 2.7\%$). Se puede sugerir que el mecanismo de inhibición de la diarrea por administración de F4 puede ser por el bloqueo la biosíntesis de ácido araquidónico a prostaglandinas.

En relación con *C. mexicana*, se encontró que los extractos acuoso, clorofórmico y metanólico extractos tienen actividad antidiarreica ($51.9 \pm 6\%$, $48.2 \pm 6\%$ y $59.6 \pm 3\%$ respectivamente) en la diarrea inducida con aceite de ricino. Estos resultados permiten suponer que dicha actividad es producida por el aceite esencial de dicha planta (AECM), el cual inhibió la diarrea inducida con aceite de ricino a dosis de 100 mg/kg en un $63.6 \pm 5.9\%$. En la determinación de su composición por CG-EM se encontraron 17 compuestos, de los cuales eucaliptol, α -Terpineol y piperitona representan 90.7% (28.68, 9.9 y 52.12%, respectivamente).

El AECM no inhibió la diarrea inducida con prostaglandina E_2 , pero si inhibió la diarrea inducida con ácido araquidónico ($79 \pm 7.9\%$). Estos resultados permiten sugerir que el efecto antidiarreico del AECM podría involucrar la inhibición de la biotransformación del ácido araquidónico a prostaglandinas.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| Introducción | 1 |
| Antecedentes | 5 |
| Tipos de diarrea | 8 |
| Diarrea secretora | 8 |
| Diarrea osmótica | 9 |
| Estructura general y funcionamiento del intestino | 11 |
| Mediadores de la función intestinal | 14 |
| Liberación de AMPc y de GMPc | 14 |
| Calcio intracelular | 15 |
| Sistema endógeno de producción de prostaglandinas .. | 16 |
| Fármacos | 18 |
| Productos terapéuticos a partir de productos naturales | 22 |
| Otros compuestos con actividad biológica de interés | 23 |
| Agentes catárticos | 28 |

| | |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| Selección de especies vegetales para su estudio | 30 |
| <i>Bidens odorata</i> Cav. | 30 |
| <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray | 32 |
| Planteamiento y justificación del problema | 35 |
| Hipótesis | 37 |
| Objetivo general | 38 |
| Objetivos particulares | 39 |
| Material y métodos | 40 |
| Resultados y discusión | 49 |
| Conclusiones | 68 |
| Perspectivas | 71 |
| Bibliografía | 73 |

INTRODUCCIÓN

La diarrea es consecuencia de la disfunción en el transporte de agua y electrolitos a nivel del intestino. Como resultado de esta alteración se produce un aumento de la frecuencia, cantidad y volumen de las heces, además de cambio en la consistencia de éstas debido al incremento de agua y electrolitos. Los trastornos funcionales relacionados pueden ser relativamente leves, molestos o limitantes; causar desnutrición e incluso dar lugar a procesos graves en los que se puede presentar un cuadro de deshidratación, con lo que se puede presentar un importante desequilibrio hidroelectrolítico y poner en riesgo la vida del paciente (Riverón, 1999; Ganong y col., 1998).

A nivel mundial la mortalidad reportada por diarrea en menores de cinco años es de 1.87 millones, que representa el 19% de la mortalidad total de la niñez. Esta situación se dispara en los países en desarrollo ya que en África y Asia Sudoriental las muertes por esta causa llegan a 78% y, en otros 15 países en desarrollo entre los que se encuentra México, dichas muertes representan el 73% (Boschi y col., 2008).

La diarrea es la segunda causa de pérdida de tiempo productivo al año por incapacidad además de que entre el 30 y 50% de los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) padecen diarrea crónica como mayor problema clínico (WHO, 2005; Bafna y Bodhankar, 2003; Ryu y col., 2004).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera tan preocupante la mortalidad producida por la diarrea que en marzo del 2010 dio a conocer un

comunicado denominado “Lista de cuestiones prioritarias para la investigación”, en donde se recomienda mayor apoyo a las investigaciones dirigidas a estudiar todas las intervenciones disponibles para lograr mejores terapias para contrarrestar la diarrea y salvar la vida de tantos niños como sea posible. El comunicado subraya que si no hay una actuación urgente frente a la diarrea, los países no podrán alcanzar la meta del cuarto Objetivo de Desarrollo del Milenio (ODM4), que consistente en reducir en 66% la mortalidad de los niños menores de cinco años en el periodo de 1990 a 2015 (WHO, 2010).

Las terapias para combatir los cuadros diarreicos son diversas. Los fármacos utilizados con este fin son loperamida, difenoxilato, difenoxina, subsalicilato de bismuto, octreotido, colestiramina, fenilefrina y otros menos conocidos, tales como el maleato de zaldarida y alosetrón (Lucak, 2010; Aikawa y col., 2000A; 2000B; De Luca y Coupar, 1993; Awouters y col., 1993; Sandhu y col., 1981).

En relación con el uso de estos agentes antidiarreicos se tienen reportados varios efectos no deseados, como insomnio, estreñimiento agudo, taquicardias, en algunos casos adicción y en otros incluso la muerte (Scarlet, 2004; Lacy, 2003; Bafna y Bodhankar, 2003; Khan y col., 2004; De Luca y Coupar, 1993; Awouters y col., 1993; Sandhu y col., 1981).

Para contrarrestar las molestias fisiológicas relacionadas con la diarrea la población también suele utilizar plantas medicinales. Sin embargo, en muchos casos éstas no han sido sometidas a estudios científicos que permitan confirmar el efecto

antidiarreico que se les atribuye, lo cual es necesario para cumplir con el Programa de Medicina Tradicional de la OMS, en el cual se dice que es necesario realizar estudios que permitan garantizar la calidad, seguridad y eficacia de las plantas medicinales (WHO, 1998). En este sentido, el Dr. Xiaorui Zhang del Programa de Medicina Tradicional de la OMS menciona que, a pesar del desarrollo de la industria farmacéutica con fármacos sintéticos efectivos y potentes, no es posible minimizar la importancia terapéutica de las plantas medicinales (Xiaorui y col., 2000).

Los productos naturales son un recurso muy utilizado entre la población mexicana para aliviar muchas de las afecciones que le aquejan (Lacy, 2003; Aguilar y col., 1998; Argueta y col., 1994; Forés, 1997; Vibrans, 1995, 1997 y 1998). En estudios previos ha sido posible estudiar extractos de plantas antidiarreicas y se han identificado algunos de los compuestos presentes en ellos (Zavala y col., 2002). Las plantas que se estudiaron en el presente trabajo son *Bidens odorata* Cav. y *Chrysactinia mexicana* Gray. De *B. odorata* se encontró que su actividad antidiarreica se debe a los ácidos grasos que contiene. En relación con el efecto de *C. mexicana* se encontró que éste se debe a dos de los compuestos mayoritarios presentes en su aceite esencial.

ANTECEDENTES

En México las enfermedades diarreicas representan un problema de salud muy importante; los niños menores de cinco años presentan entre dos y cuatro episodios diarreicos al año, las demandas de consulta médica debidas a la diarrea llegan a ser de 20.8% y muchas veces se requiere hospitalización, que llega a ser el 10% de las hospitalizaciones pediátricas (WHO, 2009A).

Debido a la mortalidad mundial provocada por la diarrea, desde 1980 la OMS inició un programa denominado Control de Enfermedades Diarreicas en niños (CDD, por sus siglas en inglés). El programa se creó teniendo como objetivo inmediato disminuir la morbilidad provocada por diarrea y, como objetivo a corto plazo, disminuir la mortalidad. En este sentido se estableció la asistencia médica temprana mediante terapias de rehidratación oral (ORT). En este programa se registraron escasos avances debido a que 307 millones de niños de países de ingresos bajos y medios no recibieron dichas ORT. Se menciona que esta situación demuestra la urgente necesidad de abordar este punto pendiente de la agenda de la supervivencia infantil. Por último se menciona la necesidad de mejorar la eficacia del control de la diarrea y realizar para ello un examen crítico de las prácticas y actividades establecidas en la terapia, a fin de disminuir el riesgo de morir de enfermedades diarreicas en niños, además de extender masivamente las actividades de mejora en el manejo de los casos, reduciendo las defunciones infantiles por esta causa (Forsberg y col., 2007).

La diarrea puede originarse por la ingestión de alguna sustancia irritante para el sistema digestivo del individuo, de alimentos contaminados con microorganismos patógenos o por patologías del tracto gastrointestinal (Scarlett, 2004; Lacy, 2003).

Hay diferentes tipos de diarrea. El tipo de diarrea que causa más muertes en el mundo es la diarrea infecciosa (WHO, 2008, Riverón, 1999), dicha diarrea principalmente se puede clasificar en secretora y osmótica.

La descripción de los diferentes tipos de diarrea se presenta a continuación.

TIPOS DE DIARREA

Diarrea secretora

Este tipo de diarrea provoca movimiento neto de agua y electrólitos cuyo volumen excede los 10 ml/kg al día, dicho movimiento o incremento del peristaltismo va desde la mucosa intestinal hasta el lumen. La diarrea es abundante y produce deshidratación, desestabilizándose el equilibrio hidroelectrolítico y también el equilibrio ácido-base intestinal. Es producida por una variedad de enteropatógenos, como *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica, por *Shigella spp*, *Yersinia enterocolítica*, *Aeromonas* (Scarlett, 2004; Field, 2003; Lacy, 2003; McConnico y col., 2002; Bhattacharya, 2000; Riverón, 1999), *Salmonella*, *Shigella flexneri* y *Campylobacter*; además de virus como los rotavirus, astrovirus, adenovirus y calicivirus, así como protozoos como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium parvum* (Bhattacharya, 2000). El mecanismo por el que estos organismos dañan las funciones intestinales es induciendo deficiencias en la absorción, al producir y liberar toxinas o enterotoxinas que actúan en el epitelio (Ashkenazi y Pickering, 1989).

Este tipo de diarrea se produce también por la ingesta de ácidos grasos de cadena larga, como el ácido ricinoleico, formado por la hidrólisis después de la ingesta del aceite de ricino (Scarlett, 2004; Field, 2003; Lacy, 2003; McConnico y col., 2002; Bhattacharya, 2000).

Diarrea osmótica

La diarrea osmótica se produce por un incremento de carbohidratos en el lumen intestinal, como consecuencia de lesiones en forma de parches en las vellosidades intestinales o por invasión en los enterocitos que forman la vellosidad, lo que provoca aglutinación de las vellosidades afectadas. En la medida que las lesiones se hacen más extensas tendrá lugar una menor absorción y aumentará la secreción. Este mecanismo de producción de diarrea osmótica es el que provocan los agentes virales, principalmente los rotavirus (Athman y col., 2002; Riverón, 1999).

Otro factor de producción de diarrea osmótica es el que ocurre por la adhesión de algunos protozoos al "borde en cepillo" de los enterocitos y bloquean la entrada de agua, electrólitos y micronutrientes, con el consecuente incremento de carbohidratos en el lumen intestinal. Los carbohidratos son metabolizados por las bacterias y se produce ácido láctico, dando lugar a una diarrea ácida que se traduce clínicamente por un marcado eritema perianal. Los parásitos que con mayor frecuencia desencadenan este tipo de diarrea, con acentuada mala absorción a los carbohidratos, son: *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Ciclospora cayetanensis* y *Microsporidios*. También puede producirse cuando se ingiere una sustancia osmóticamente activa de pobre absorción, tal como el sulfato de magnesio (Riverón, 1999). Si esta sal es ingerida con una solución isotónica, el agua y los solutos pasan por el intestino sin absorberse. Este tipo de diarrea

también se puede observar en los pacientes con mala absorción a los disacáridos (lactosa) y en lactantes alimentados con la leche materna (exceso de lactosa), o cuando se ingieren grandes cantidades de leche animal o leches muy concentradas (Radanovic y col., 2005; Field, 2003; Athman y col., 2002; Riverón, 1999).

ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO GENERAL DEL INTESTINO

El sistema nervioso se divide en sistema nervioso central y periférico, y este último se subdivide en sistema somático y autónomo. El sistema nervioso autónomo a su vez se subdivide en simpático, parasimpático y entérico. El sistema nervioso autónomo es capaz de controlar las funciones motoras por emergencia o en estados en donde un organismo requiere la participación de los sistemas simpático o parasimpático, por ejemplo huida, pelea, etc. (Li y col., 2004).

La pared del intestino consta de las capas serosa, muscular, submucosa y mucosa. El sistema nervios entérico (SNE) se encuentra en la pared del intestino. El SNE es responsable de la regulación y el control de las funciones gastrointestinales (Sharkey y Kroese, 2001). Está formado por dos plexos, el mientérico y el submucoso, siendo de gran importancia en el control de la motilidad gastrointestinal (Sayegh y Ritter, 2003). La estructura nerviosa del intestino se muestra en la Figura 1.

La motilidad intestinal es modulada por fibras simpáticas y parasimpáticas que inducen la liberación de adrenalina y acetilcolina, respectivamente; la adrenalina regula un efecto relajador del músculo, que es producido después de que la acetilcolina produce la contracción. La adrenalina activa a los adrenoreceptores α_2 que están acoplados a los canales de Ca^{2+} vía proteínas Go/Gi, las cuales

inhiben la adenilato ciclasa o interactúan directamente con los canales de Ca^{2+} (Bian y Galligan, 2007).

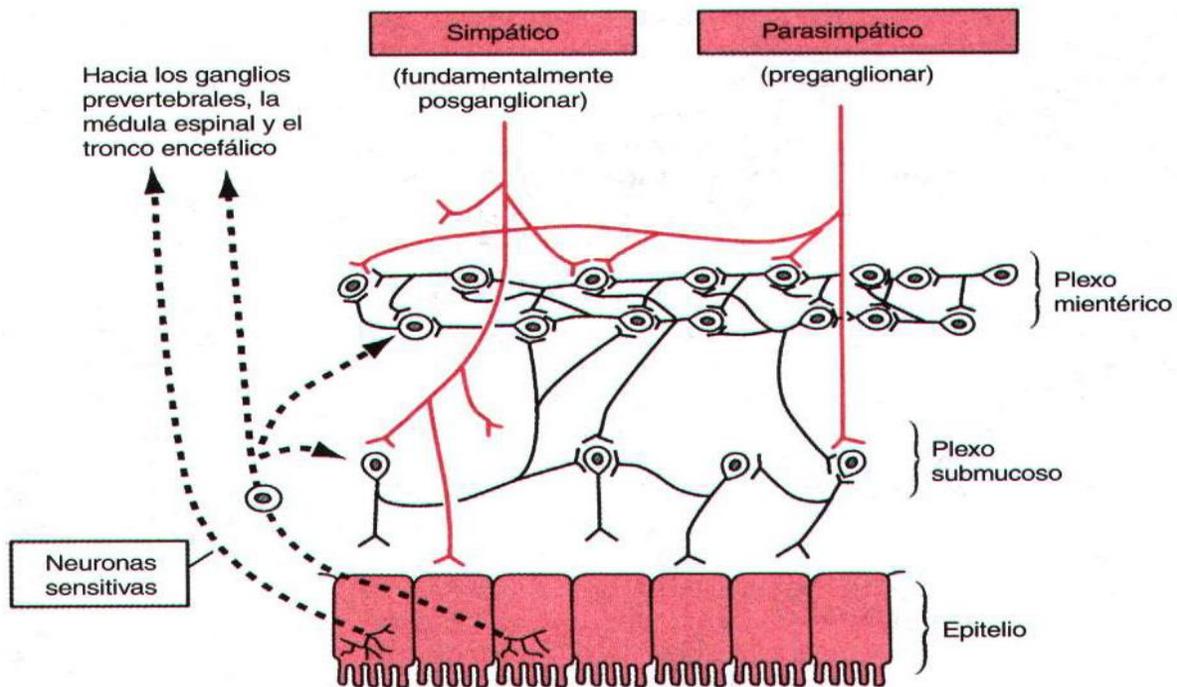


Figura 1. Estructura nerviosa del sistema digestivo (Guyton y Hall, 2006)

Después de la unión de acetilcolina a su receptor de membrana, en la célula ocurren una serie de eventos que se describen a continuación y se ilustran en la Figura 2 (Hansen y Koeppen, 2002; Ganong y col., 1998).

1. Fijación de la acetilcolina a los receptores muscarínicos abre los canales de calcio. Ambos eventos se inducen en la membrana celular a despolarizarse.
2. Aumento del flujo de calcio hacia el interior de la célula.

3. Activación de la cinasa de cadenas ligeras de la miosina tras la unión del Ca^{++} a la calmodulina.
4. Fosforilación de la miosina.
5. Fijación de la miosina a la actina y aumento de la actividad de la ATPasa de miosina.
6. Contracción muscular.
7. Desfosforilación de la miosina por diversas fosfatasas.
8. Relajación muscular.

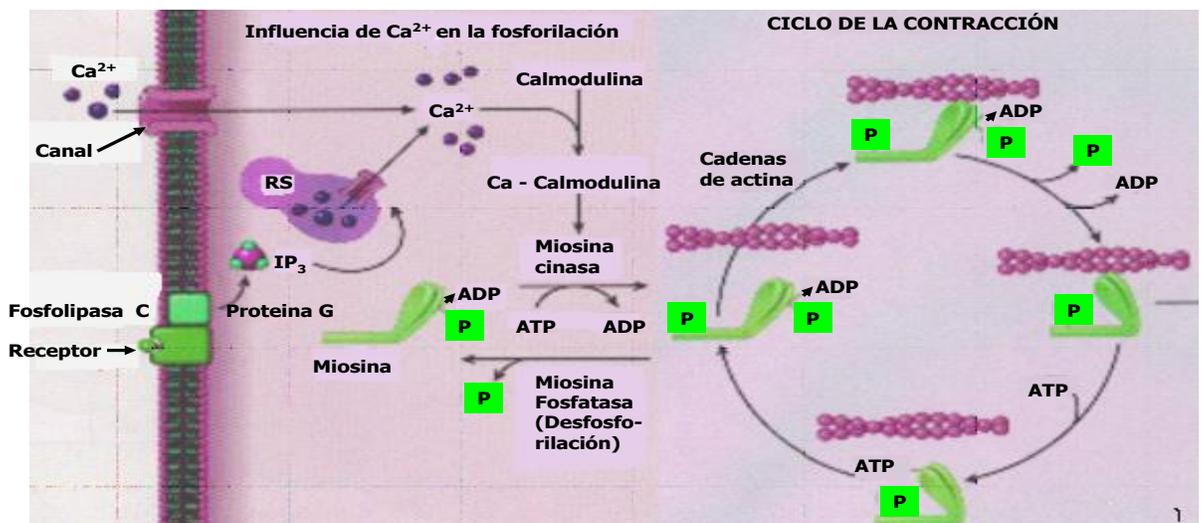


Figura 2. Mecanismo de la contracción del músculo liso (Hansen y col., 2002).

MEDIADORES DE LA FUNCIÓN INTESTINAL

En el control intracelular de la secreción hay descritos tres tipos de mensajeros secundarios y son:

1. Nucleótidos cíclicos enterocitarios (AMPc y GMPc).
2. Calcio intracelular.
3. Sistema endógeno de producción de prostaglandinas.

La descripción de estos mensajeros se presenta a continuación.

Liberación de AMPc o GMPc

Las concentraciones intracelulares de los nucleótidos cíclicos adenosil monofosfato y guanosil monofosfato (AMPc y GMPc, respectivamente) se incrementan debido a la liberación de enterotoxinas o toxinas bacterianas. La enterotoxina estable al calor de la bacteria *Escherichia coli* tiene su sitio de unión en la membrana de células intestinales del epitelio, siendo su mediador la guanilil ciclasa tipo c (GC-C), produciendo un incremento de la síntesis de guanosina 3'5' – monofosfato cíclica (GMPc) (Kots y col., 2008; Field, 2003). El GC-C es una proteína transmembranal con un dominio extracelular y un dominio intracelular. Los ligandos endógenos naturales de GC-C son la hormonas guanilina y urogualinina, que regulan la secreción de sales y fluidos del intestino (Kots y col., 2008). La estimulación de GC-C eleva los niveles de GMPc, induciendo la activación de la

proteína cinasa dependiente de GMPc y de los canales iónicos de cloruro, del regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis cística (CFTC). La activación de CFTC incrementa el transporte de cloruro dentro del lumen intestinal y provoca la acumulación de agua e iones de sodio, provocando así diarrea (Kots y col., 2008; Field 2003; Riverón, 1999).

La toxina colérica (TC) producida por *Vibrio cholerae* incrementa la concentración de adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPC) intracelular, produciendo una hipersecreción prolongada de agua y electrólitos. También se ha descrito un incremento de la secreción de cloro dependiente de sodio y se inhibe la absorción del sodio y del cloro (Kots y col., 2008). Así mismo, aun los más pequeños cambios en la concentración de AMPC son suficientes para incrementar las concentraciones de calcio intracelular y prolongar la contracción (Mokry y col., 2005).

Calcio intracelular

Cuando la acetilcolina se une al receptor muscarínico M_3 , inmediatamente se activa la proteína de activación $G_{q/p}$ y la fosfolipasa C, que cataliza la disociación de fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2) a inositol trifosfato (IP3) más diacilglicerol (interior de la célula). El IP3 tiene su receptor en el retículo sarcoplásmico, que libera calcio

para unirse a la proteína cinasa C, produciéndose la contracción del músculo liso (Estrada y col., 2009; Mokry y col., 2005, Flores y Segura, 2005).

Sistema endógeno de producción de prostaglandinas

Las prostaglandinas tienen a sus receptores en la membrana celular y activan los canales de calcio, permitiendo la entrada de calcio extracelular al interior de la célula (Park y col, 2011). Las prostaglandinas ejercen un efecto vasoconstrictor, tanto *in vivo* como *in vitro* (Sametz y col., 2000). La prostaglandina E₂ (PGE₂), junto con otros prostanoides, involucra la participación de múltiples enzimas para formarse, tales como la acil hidrolasa (Sparkes y col., 2010), las enzimas sinasas 1 y 2 H de prostaglandinas (SHPG), ciclooxigenasas 1 y 2 (COX1 – COX2), (Zhu y col., 2001) y radicales libres, que catalizan la peroxidación del ácido araquidónico (AA) independientemente de la ciclooxigenasa (Sparkes y col., 2010; Sametz y col., 2000). Dicha biosíntesis puede ser por oxidación con la participación de lipooxigenasa o el citocromo P-450 monooxigenasa (Sparkes y col., 2010; Venegas y col., 2006). La producción de PGE₂ se origina por la movilización de fosfolípidos de membrana a cargo de la fosfolipasa A2, que por participación de la COX2 induce la oxidación de este AA a PGE₂ (Venegas y col., 2006), aunque primeramente se forman las prostaglandina H PGH₂, las cuales se transforman a PGE₂ (Sparkes y col., 2010). En el colon las prostaglandinas también se biosintetizan por medio de las bradiquininas (Baird y col., 2008).

Muchos microorganismos patógenos, tales como *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Campylobacter jejuni*, producen un incremento de PGE₂ inducida por la enterotoxina que éstas producen. Así por ejemplo, el incremento de PGE₂ producido por *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas sobria* es por la hemotoxina- α . La toxina, por medio de la participación de fosfocinasa A, activa el factor transmembranal de regulación de conductancia de fibrosis y a COX2, que inducen la secreción de iones vía la apertura de los canales de Cl⁻ (Fujii y col., 2008). Otra vía de la formación de las PGE₂ es por la producción de interleucina 8 (IL-8), causada por la proliferación en el intestino de la amiba *Entamoeba histolytica* (Dey y Chadee, 2008).

FÁRMACOS

Con frecuencia los tratamientos antidiarreicos son deficientes, pues se restringen a mantener hidratados a los pacientes, ya que sí se trata de una diarrea infecciosa, el administrar un antidiarreico que inhiba la motilidad en el intestino puede aumentar la permanencia del microorganismo patógeno por disminución de la motilidad. Otro problema que se puede presentar está relacionado con el uso de antibióticos ya que la resistencia de muchos microorganismos a estos medicamentos llevan a la eliminación de la flora normal en el intestino (Cohen y col., 2000).

Aunque existe una gran variedad de compuestos con actividad antidiarreica, pocos son los que se pueden usar con confianza en la práctica clínica ya que casi en todos se han generado reportes de efectos adversos (Lacy, 2003; WHO, 2001 y 2005). Entre los antidiarreicos utilizados con más frecuencia están: los péptidos antimicrobianos (Chen y col., 2007), el octreotido, (Hardman y col., 1996), la colestiramina (Hardman y col., 1996), el alosetron (Lacy, 2003), el maleato de zaldarida que aún está en investigación (Aikawa y col., 2000A; Aikawa y col., 2000B) y los opioides. Los fármacos que se encuentran dentro de este grupo disminuyen la motilidad del músculo liso. Por tanto, ejercen una disminución del tránsito intestinal, provocando reducción de la secreción y estimulación de la absorción. Dentro de éstos se encuentran el difenoxilato y la loperamida.

Octreotido

Actúa sobre el sistema digestivo, inhibiendo la producción de ácido gástrico y del pepsinógeno, disminuyendo la contracción del músculo liso. Con el uso de este fármaco también se puede presentar hipersensibilidad (Fichas Técnicas del Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS – CIMA 2013. Hardman y col., 1996).

Colestiramina

Actúa como antidiarreico cuando la diarrea es causada por una mala absorción de ácidos biliares, se usa en pacientes con síndrome de colon irritable o en aquellos que fueron sometidos a resección íleal (Hardman y col., 1996), su uso crónico produce pérdida del apetito, estreñimiento, distensión abdominal, dolor de estómago, gases, malestar estomacal, vómito, diarrea, acidez estomacal, indigestión e incluso sangrado en las encías o en el recto (American Society of Health-System Pharmacist, Abril 2014).

Alosetrón

Otro fármaco antidiarreico de aparición en el mercado es el alosetrón, utilizado en la terapéutica para el control de la diarrea cuando está asociada con el Síndrome de Intestino Irritable. Se introdujo al mercado en Noviembre del 2000; sin embargo, en Junio del 2002, debido a severos casos de constipación intestinal e incluso a la muerte de algunos pacientes, la FDA recomendó que se usara sólo en mujeres con Síndrome de Intestino Irritable a dosis menores de 1 mg/día (Lacy, 2003).

Maleato de zaldarida

Dicho fármaco aún se encuentra en investigación, disminuye la secreción de iones, inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa, que es modulada por el complejo Ca-calmodulina, del cual aún no se reportan efectos adversos (Aikawa y col., 2000A, B).

Loperamida.

La loperamida es un opioide de la piperidina, es un agonista de los receptores opiáceos; adicionalmente tiene un efecto no opioide, inhibiendo el sistema de la calmodulina, modula la actividad de canales iónicos, como el de Ca^{++} , Cl^- y K^+ , alterando la señalización del Ca^{2+} y bloqueando la secreción de la mucosa del colon

(Diener y col., 1988). Al inhibir la motilidad intestinal, bloquea la salida de agua producida en la ingesta diaria y el metabolismo humano. Provoca depresión del Sistema Nervioso Central (SNC) y del centro bulbar de la respiración. Su uso crónico provoca adicción y se puede presentar síndrome de privación, además de constipación intestinal (Hardman y col., 1996; De Luca y Coupar, 1996 y 1993; Awouters y col., 1993). Se reportó efecto en la actividad de otros canales iónicos, que incide sobre la secreción de insulina (Ping y col., 2003)

PRODUCTOS TERAPÉUTICOS A PARTIR DE PRODUCTOS NATURALES

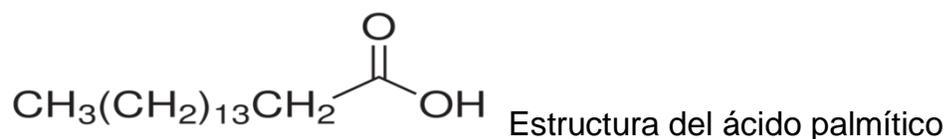
En los últimos años son muy pocas las sustancias que se han descubierto para controlar desórdenes del sistema digestivo (Sanger y Alpers, 2008). En relación con las sustancias de origen natural con actividad antidiarreica, sólo en algunos casos se ha llegado a conocer la molécula responsable de la actividad. En ocasiones se prefiere estandarizar el extracto activo usando como marcador el compuesto activo o alguno de los metabolitos. Tal es el caso de Mebarid[®] cápsulas, un producto que contiene extractos de 4 plantas y que inhibe la diarrea inducida por aceite de ricino (Bafna y Bodhankar, 2003). Otro producto con marca registrada es Soonkijangquebo[™], una formulación de extractos que se prepara sin conocer el metabolito activo pero se conocen las proporciones de cada extracto, el proceso de obtención de éstos y las condiciones de las plantas utilizadas. Soonkijangquebo[™] inhibe la diarrea provocada por aceite de ricino, tiene efecto relajante sobre el íleon y bloquea los canales de Ca²⁺ (Ryu y col., 2004).

OTROS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE INTERÉS

El uso con fines diversos y también terapéuticos de los ácidos grasos está aumentando considerablemente. Actúan como fuente de energía primaria, como componentes de biomembranas y como precursores de prostaglandinas. Reportes como el del Comité Nacional Sistema Producto Oleaginosas, fundado en México en 2005, reporta como especies de interés por ser fuentes de estos compuestos a la soya, a la canola, al cártamo, al algodón, al girasol, al olivo, al maíz, al lino, al cacahuate y al ajonjolí. Estas especies son clasificadas como oleaginosas por su contenido de ácidos grasos.

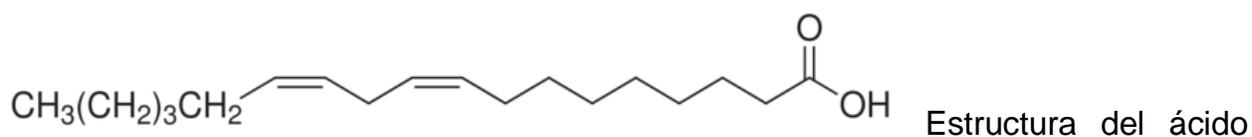
Ácido palmítico

Tiene un peso molecular de 256.42 g/mol (fórmula condensada $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$); en algunos reportes se le atribuyen actividades antimicrobiana (Lin y col., 2011) e insecticida (Pérez y col., 2011).



Ácido linoleico

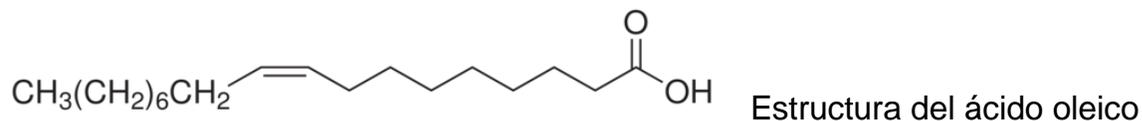
Tiene un peso molecular de 280.45 g/mol (fórmula condensada $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$); en algunos estudios se le ha determinado que ejerce efecto como antiaterosclerótico, anticancerígeno, antiadipogénico, inmunopotenciador, antioxidante, hipotensor y antiinflamatorio (Liu y col., 2011).



linoleico

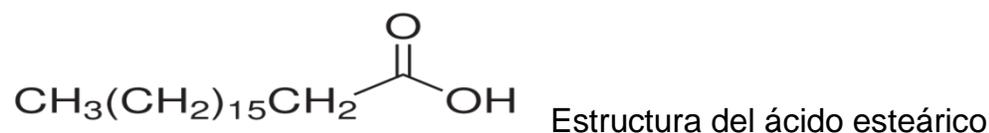
Ácido oleico

Peso molecular 282.46 g/mol (fórmula condensada $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$); es usado en casos de daños provocados a la exposición extrema de UV, estos casos incluyen eritema, edema, quemaduras de piel por exposición extrema al sol, hiperplasia, fotoenvejecimiento y para inicios de cáncer de piel (Mori e Iwahashi, 2011), así como efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus* resistente a metililana (Hsuan y col., 2011).



Ácido esteárico

Peso molecular 284.48 g/mol (fórmula condensada $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$); es usado como excipiente en la formulación de tabletas de liberación controlada y contienen dicloro trimetazidinae (Shunmugaperumal y col., 2013).

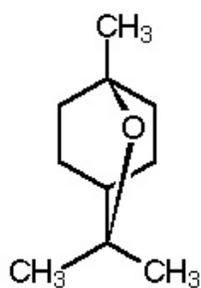


Los aceites esenciales están contemplados como compuestos muy importantes en las farmacopeas de países tropicales (Bakkali y col., 2008). Tienen características de interés en las industrias de cosméticos, alimenticia y farmacológica tienen actividad antioxidante y antiulcerogástrica (Anitescu y col., 1997). Otras propiedades farmacológicas que algunos aceites poseen son la inhibición de las contracciones inducidas con carbacol o verapamilo, lo que permite concluir que tienen actividades antidiarreica, antiasmática (Shah y col., 2011) y antihipertensiva (Yvon y col., 2012). Químicamente están formados por varios

metabolitos secundarios de plantas aromáticas; éstos pueden ser líquidos volátiles liposolubles con un fuerte olor (Rozza y Pellizzon, 2013).

Eucaliptol o 1,8-cineol

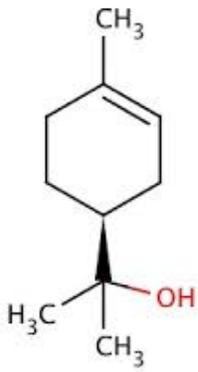
La fórmula condensada es $C_{10}H_{18}O$. Se usa comúnmente como descongestionante y expectorante (Mangprayool y col., 2013)



Estructura del eucaliptol

α -Terpineol

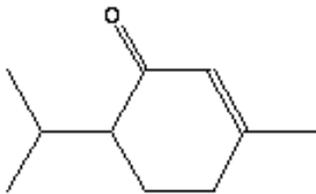
La fórmula química es $C_{10}H_{18}O$. Es un alcohol monoterpénico que se usa como repelente, antifúngico, desinfectante, analgésico y antiinflamatorio, ya que produce reducción del factor de necrosis tumoral alfa (Oliviera y col., 2012).



Estructura del terpineol

Piperitona

Se trata de una cetona, con fórmula condensada C₁₀H₁₆O, a la cual se le han detectado propiedades antimicrobianas (Herken y col., 2012)



Estructura de la piperitona

AGENTES CATÁRTICOS

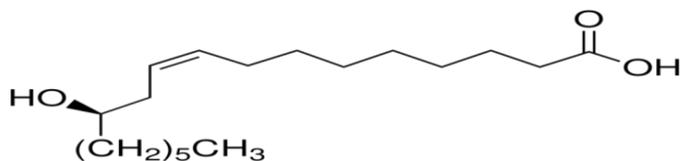
Aceite de ricino

El aceite de ricino es un líquido viscoso casi incoloro o ligeramente amarillo; se obtiene de las semillas del árbol *Ricinus cummunis* L. (Mckeen y col., 2000; Kishino y col., 2002; Billault y col., 2004). Por sus propiedades químicas se usa como precursor de numerosos productos, como lubricantes, pinturas, recubrimiento de acabados, plásticos, cosméticos y antifúngicos (Mckeen y col., 2000). Además, ejerce un efecto laxante aproximadamente a los 45 minutos de su ingesta (Mckeen y col., 2000; Tangpu y col., 2004).

Con la ingesta del aceite de ricino, las lipasas, como la fosfolipasa pancreática, lo hidrolizan a glicerol y a ácido ricinoleico, que tiene peso molecular 298.46 y fórmula condensada $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$, el cual también es producido por algunos organismos patógenos. El ácido ricinoleico es el precursor de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas; las PGE_2 contribuyen a que se estimule la motilidad del intestino (Hardman y col., 1996; Billault y col., 2004; Tangpu y col., 2004).

Además de lo anterior, el aceite de ricino produce irritación e inflamación de la mucosa intestinal, estimula la liberación de la colecistocinina en el intestino grueso, lo que aumenta la motilidad intestinal (Tangpu y col., 2004; Euser y Cipolla, 2005;

Hardman y col., 1996; Voet y Voet, 1992). La irritación de la mucosa reduce también la absorción de electrolitos como Na^+ , K^+ y agua (Rouf y col., 2003; Shoba y Molly, 2001).



Estructura del ácido

ricinoleico

Laxantes salinos

Dentro de los laxantes salinos se encuentran el sulfato de magnesio y los fosfatos de sodio, entre otros. El efecto catártico del sulfato de magnesio aparece de 1 a 2 horas después de su ingesta; primero provoca una irritación en la mucosa del intestino, con lo que cambia la osmolaridad, disminuyendo su capacidad de absorción. Además en el intestino también estimula la liberación de colecistocinina (Field, 2003), hormona que estimula la secreción intestinal de agua y electrolitos, y ejerce un efecto sobre la motilidad (Euser y Cipolla, 2005; Hardman y col., 1996; Voet y Voet, 1992).

SELECCIÓN DE ESPECIES VEGETALES PARA SU ESTUDIO

Con excepción de los resultados obtenidos por Zavala 2006 con ambas especies, en distintas bases de datos de publicaciones científicas se observa que no hay más reportes que describan las propiedades antidiarreicas de *Bidens odorata* Cav. Ni de *Chrysactinia mexicana* Gray, mucho menos de algún compuesto aislado de ellas. Por lo tanto, para este proyecto se propone la obtención de compuestos antidiarreicos a través de un estudio químico biodirigido de los extractos que resulten con actividad antidiarreica de cada especie estudiada, después de hacer estudios preliminares con los extractos clorofórmico, acuoso y metanólico de ambas especies, usando el modelo de diarrea inducida por administración de aceite de ricino.

***Bidens odorata* Cav.**

Es una planta herbácea de hasta 1 m de altura muy ramificada que pertenece a la familia Asteraceae (Compositae) (Figura 3). Tiene el tallo cuadrangular con pequeños pelos, sus hojas tienen de 3 a 5 folículos enteros, ovados a ovado-lanceolados. Sus flores son en forma de cabezuelas con lígulas blancas y una venación morada, su fruto es pequeño negruzco café. Es usada tradicionalmente en México para tratar diversos desórdenes del aparato digestivo, como diarrea, vómito,

dolor e infección estomacal, para el dolor de huesos, de cabeza y de riñones. Las hojas se utilizan para combatir la ictericia, como tranquilizante y antipirético. Habita a la orilla de caminos y en los campos de cultivo en zonas de clima cálido a templado, florece desde el mes de agosto hasta enero; se le conoce principalmente como aceitilla, mozoquelite, té de milpa blanco, amor seco, etc. (Aguilar y col., 1998; Argueta y col., 1994; Boettler, 2004).

Al extracto acuoso lo mismo que al etanólico se determinó la DL_{50} , que fue de 3184.3 y 1668.9 mg/kg, respectivamente (Astudillo y col., 2008).

Del extracto clorofórmico se encontró que inhibió $72.7 \pm 5.3\%$ la diarrea inducida con aceite de ricino, redujo el tránsito intestinal a los 30, 60 y 90 minutos de observación, inhibió la contracción inducida por concentraciones de 0.1, 1, 10, y 100 μM de carbacol (Zavala, 2006).



Figura 3. *Bidens odorata* Cav en estado silvestre.

***Chrysactinia mexicana* Gray**

Es un arbusto muy aromático de hasta de 60 cm de alto de la familia Asteraceae (Figura 4). Sus hojas son algo carnosas, lineares, de 5 a 15 mm de largo, verde oscuras, tiene flores liguladas amarillas al igual que sus corolas. En la medicina tradicional se le atribuyen propiedades farmacológicas como: afrodisíaco, antiespasmódico, sudorífico, diurético, tónico y febrífugo; se usa para ayudar en casos de menstruación dolorosa, enfermedades venéreas y leucorrea. En México se

le conoce con los nombres damiana, falsa damiana y hierba de San Nicolás (Sánchez, 1978; Martínez, 1996; Rzedowski y Rzedowski, 1979).

Del aceite esencial de esta planta recientemente se aislaron e identificaron varios compuestos, como el α -felandreno, α -mirceno, α -tujona, acetato de 1-metil-4-(1-metil etenil), ciclohexanol, 2-etil-6-metil bencenammina, 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol, *trans*-limonen 4-metil-1-(1-metil etil)-3-ciclohexen-1-ol, *cis*-limoneno, éster S-(tetrahidro-2H-piran-3-il) etanetiónico, acetato de exo-2-hidroxicineol, exo-2-hidroxicineol, fenol y éster 3-fenil-2-propenil etílico. En concentraciones altas se encontró al acetato de linalilo, el eucaliptol y la piperitona. A estos compuestos mayoritarios se les determinó la actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus* Link y se encontró que la piperitona tiene efecto fungicida a una concentración de 0.6 mg/ml (Cárdenas y col., 2005).

Del extracto acuoso se encontró que inhibió $73.9 \pm 5\%$ la diarrea inducida con aceite de ricino, redujo el tránsito intestinal a los 30 y 60 minutos de observación, no tuvo efecto relajante sobre la contracción inducida por concentraciones de 0.1 0.1, 1, 10, y 100 μ M de carbacol (Zavala, 2006).



Figura 4. *Chrysactinia mexicana* Gray en estado silvestre.

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En la investigación de nuevos fármacos las plantas emergen como una alternativa en la búsqueda de nuevos compuestos activos. En México existe una gran tradición en el uso de plantas medicinales, las cuales en muchos casos no han sido sometidas a estudios científicos rigurosos. Por eso es muy importante realizar investigaciones que corroboren la actividad que se les atribuye en la medicina tradicional y generar con esto la posibilidad de obtener nuevos compuestos con actividad farmacológica y que su administración genere menos efectos adversos que los fármacos utilizados en la terapéutica. Los resultados obtenidos en estudios previos con las plantas propuestas permiten suponer la posibilidad de aislar y caracterizar al menos una molécula con actividad antidiarreica, contribuyendo en las etapas de los procesos pretendidos y estipulados en el Programa de Medicina Tradicional de la OMS, principalmente en lo referente a eficacia y seguridad terapéutica de estas plantas en el tratamiento de la diarrea. Considerando que la secreción de agua y electrolitos se produce en las criptas del intestino delgado, en el presente proyecto se considera generar información de algunas de las plantas que se usan en el país y que muy poco se conoce de ellas, así como proponer el mecanismo a través del cual el compuesto activo ejerce su efecto antidiarreico, llegando también a la identificación de compuestos que sean de valor farmacológico.

Es pertinente mencionar que la OMS recopiló información científica de plantas que concentró en 4 volúmenes. La información científica involucró la participación de más de 200 expertos en el tema y la revisión de las distintas bibliografías como farmacopeas herbolarias, atlas de plantas medicinales, etc. En total suman 118 referencias bibliográficas publicadas entre 1975 y 2005. No obstante, en la información suficiente y completa, que va desde forma de uso, posología, compuestos aislados, mecanismo de acción, contraindicaciones y datos que garanticen que se está usando de forma eficiente y segura, únicamente se logró recopilar aproximadamente 100 plantas, que es un aproximado de menos del 10% de las usadas con fines terapéuticos alrededor del mundo (WHO, 2009B).

HIPÓTESIS

Bidens odorata y *Chrysactinia mexicana* se utilizan como tratamiento de trastornos digestivos en la medicina tradicional mexicana, por lo que si éstas poseen el efecto farmacológico que se les atribuye, podrá determinarse su efecto antidiarreico a nivel laboratorio y en su caso se aislará e identificará el o los compuestos responsables de la actividad biológica que se les atribuye de al menos una de estas especies.

OBJETIVO GENERAL

Identificar al menos un compuesto con actividad antidiarreica de *Bidens odorata* Cav. o de *Chrysactinia mexicana* Gray y sugerir su posible mecanismo de acción.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar un fraccionamiento químico biodirigido, purificar las fracciones activas y aislar compuestos con actividad farmacológica a partir de las plantas motivo de este estudio.
- Identificar los compuestos activos aislados utilizando métodos cromatográficos y espectrometría de masas.
- Sugerir un posible mecanismo de la actividad antidiarreica del compuesto aislado mediante estudios *in vivo* (utilizando diferentes agentes catárticos).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se usaron ratones albino, macho, cepa CD1 (20–25 g) y ratas cepa Wistar, macho (150–250 g), los cuales fueron suministrados por el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Los animales se mantuvieron en un ambiente de humedad relativa de 50%, a una temperatura de 21°C, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas, con acceso a agua y alimento para roedores “Pet Fuds 5001” *ad libitum*. El uso, cuidado y manejo de los mismos se apegó a la NOM–062–ZOO, 1999. Los animales se mantuvieron en ayuno de 10 a 16 horas antes de cada experimento.

Material vegetal

Bidens odorata Cav se colectó en Fortín de las Flores, Veracruz, y *Chrysactinia mexicana* Gray en San Luis Potosí, en el municipio de Guadalcazar (Zavala, 2006). Ambas fueron autenticadas por el taxónomo José García-Pérez; el número de registro de los especímenes es SLPM 21668 y SLPM 37571, respectivamente y fueron depositados en el herbario Isidro Palacios del Instituto de Investigaciones de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. La colecta de las plantas fue en etapa de floración entre los meses de agosto y septiembre. El material colectado se secó a la sombra hasta peso constante y posteriormente se trituró.

Obtención de los extractos de *B. odorata* (Zavala, 1998; Zavala y col., 2002 y 2003)

En un matraz balón de 2 L provisto de un refrigerante en posición de reflujo se colocaron 125 g de planta seca y 1500 ml del disolvente (cloroformo o agua). La mezcla se calentó a temperatura de ebullición durante 4 h. Posteriormente los extractos se dejaron enfriar y se filtraron. El cloroformo se eliminó a presión reducida en un evaporador rotatorio y el residuo se secó en una estufa de vacío a temperatura ambiente durante 24 horas. El extracto acuoso se liofilizó.

Separación, identificación y caracterización de compuestos activos

Los extractos crudos con actividad se sometieron a una separación por cromatografía en columna, utilizando sílica gel 60; para ello se utilizaron disolventes como cloroformo o hexano, al sistema se le fue incrementando la polaridad preparando con dichos disolventes mezclas en proporciones crecientes con acetato de etilo y en cuanto la separación ya no se realizaba, preparaba la mezcla con metanol. Se obtuvieron distintas fracciones y las fracciones activas fueron nuevamente fraccionadas en la misma forma, detectando la presencia de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM).

Obtención de aceite esencial de *C. mexicana* (AECM)

En un matraz de 5 L, al cual se le adaptó un refrigerante en posición horizontal, se agregaron 3 L de solución agua - etanol (1:1) y 1316.8 g de planta fresca (*C. mexicana*) recuperando por arrastre de vapor una porción (aceite esencial con agua), a la cual para eliminarle el agua, ésta se desecó con sulfato de sodio anhidro quedando el aceite esencial sin agua.

Detección de compuestos (Cromatografía de Gases - Espectroscopia de Masas)

La composición de la fracción activa de *B. odorata* (F4) y de los componentes del AECM se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Se realizó en un cromatografo de gases Agilent Technology modelo 6890N acoplado a un detector selectivo de masas modelo 5973. Para determinar la composición de F4 se utilizó una columna capilar DB-5HT de 15 m de largo 0.25 mm de diámetro interno y 0.10 μm de tamaño de partícula. Se inyectó 1 μL de cada muestra disuelta en isooctano al puerto de inyección a 320 °C, con una relación de Split de 25:1. El programa de temperatura en el horno fue de 100 °C por 3 min, con un incremento de 10 °C/min hasta 320 °C por 5 min. Los espectros se obtuvieron a 71 eV de voltaje de ionización y el rango de masas analizado fue de 20-800 uma.

Los compuestos se identificaron por comparación de sus espectros de masas con los espectros de masas de la biblioteca NIST 02.L y por comparación de los índices de retención lineal, relativos a una mezcla de n-alcanos entre C₁₁-C₂₈.

La composición del aceite esencial de *C. mexicana* se determinó con cromatografía de gases Agilent Technology modelo 6890N acoplado a un detector selectivo de masas modelo 5973, utilizando una columna capilar HP5-MS de 30 m de largo 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de tamaño de partícula. Se inyectó 1 µL de cada aceite esencial al puerto de inyección a 250 °C, en el modo Splitless. El programa de temperatura en el horno fue de 50 °C por 2 min, con un incremento de 3 °C/min hasta 240 °C por 2 min. Los espectros fueron obtenidos a 71 eV de voltaje de ionización y el rango de masas analizadas fue de 15-600 m/z. Los compuestos fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los espectros de masas de la librería Wiley09/NIST11, además por comparación de los índices de retención lineal obtenidos con base a n-alcanos de C₆- C₁₈, con los obtenidos de referencias o el estimado por la librería Wiley09/NIST11.

Determinación del efecto sobre la defecación normal (Zavala y col., 1998, 2002, 2003).

Se utilizaron 15 ratones divididos en tres grupos de cinco ratones cada lote. Al grupo 1 se le administró por vía oral (p.o.) una dosis de 100 mg/kg de F4 de *B. odorata* o el aceite esencial de *C. mexicana*; al segundo grupo loperamida (2.5

mg/kg p.o.) y al tercer grupo únicamente se le administró vehículo p.o. A los tres grupos el volumen total administrado fue de 0.1 ml.

Cada hora durante 4 horas se evaluó el número de heces y para calcular el porcentaje de modificación sobre la defecación se consideró el número de heces del grupo administrado sólo con vehículo y el número de heces en los grupos tratados con extracto, de acuerdo con la fórmula siguiente.

$$\text{Defecación normal} = \frac{\text{Heces de grupos tratados con extracto o loperamida} \times 100}{\text{Heces de grupos tratados con vehículo}}$$

Inducción de diarrea con aceite de ricino (Megens y Niemegeers, 1984; Melo y Mukherjee, 1988)

Se utilizaron lotes con 15 ratones cada uno. A uno de los grupos de animales se le administró por vía oral el extracto a las diferentes dosis a evaluar, a otro loperamida (2.5 mg/kg) como control positivo, utilizando vehículo hasta ajustar un volumen de 0.1 ml por animal; al último grupo únicamente se le administró vehículo también 0.1 ml por animal. Después de 30 minutos se administró via oral 3 ml/kg de aceite de ricino a cada uno de los grupos.

Posteriormente los animales se colocaron en cajas de acrílico transparente, con papel filtro blanco en el fondo; cada hora durante cuatro horas se contabilizó el número de heces, las que se clasificaron en tres grupos: heces duras, blandas y líquidas. Para calcular el porcentaje de inhibición de la diarrea sólo se consideró el número de heces líquidas del grupo tratado y se comparó con el número de heces líquidas en el control negativo. El cálculo del porcentaje de inhibición se realizó de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Heces diarreicas del lote de prueba} \times 100}{\text{Heces diarreicas del lote de control negativo}}$$

Inducción de diarrea con ácido araquidónico (Zavala, 1998)

Se utilizaron tres lotes de cinco ratones, la dosis empleada del ácido araquidónico fue de 3 mg/kg. A uno de los grupos de animales se les administró el compuesto o mezcla a evaluar, a otro grupo se le administró loperamida a 2.5 mg/kg disueltos en vehículo, al tercer grupo se le administró vehículo, las muestras empleadas se ajustaron en un volumen total de 0.1 ml, en éstos grupos la administración fue oral.

Después de 30 minutos a todos los grupos se les administró ácido araquidónico, el cual se preparó de la siguiente manera: 10 mg de ácido araquidónico se disolvieron en 1 ml de etanol, se adicionaron 0.6 ml de una solución de carbonato de sodio preparada a una concentración de 16 mg/ml. La solución se diluyó a 10 ml con solución salina y se administró por vía intraperitoneal (i.p.) el volumen equivalente a la dosis antes mencionada. Para la evaluación de la actividad antidiarreica se utilizó la misma metodología descrita en el modelo de inducción de diarrea con aceite de ricino.

Inducción de diarrea con prostaglandina E₂ (Zavala, 1998)

Se utilizaron lotes de quince ratones. A uno de los grupos de animales se les administró por vía oral el extracto a evaluar, a otro loperamida a 2.5 mg/kg y al último grupo únicamente se le administró el vehículo (agua purificada). Después de 30 minutos a todos los grupos se les administró prostaglandina E₂ (1 mg/kg), que se preparó de la siguiente manera: 1 mg de prostaglandina se disolvió en 1 ml de etanol y se adicionaron 1.8 ml de una solución de carbonato de sodio 0.1% p/v. La solución se diluyó a 6.5 ml con solución salina y se administró el volumen equivalente a la dosis antes mencionada, por vía i.p. La evaluación de la actividad se realizó según se describió en el modelo de inducción de diarrea con aceite de

ricino, sólo que el conteo de las heces diarreicas se hizo cada treinta minutos durante 2 horas.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la inhibición de diarrea fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA), seguido de comparación múltiple por medio de la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bidens odorata Cav.

En el modelo de la diarrea inducida con aceite de ricino, se determinó que los extractos acuoso y metanólico no tienen actividad antidiarreica, mientras que el extracto clorofórmico a dosis de 200 mg/kg inhibió la diarrea $46.3 \pm 4.2\%$. Posteriormente se hizo una separación por cromatografía de columna abierta de dicho extracto obteniendo 14 fracciones. Dichas fracciones se compararon por cromatografía de placa fina, resultando 6 fracciones diferentes. La actividad antidiarreica de las fracciones se evaluó a dosis de 100 mg/kg (Tabla 1). Las fracciones F3 y F4 resultaron con mayor actividad, con una inhibición de la diarrea inducida con aceite de ricino de $43.8 \pm 3.6\%$ y $90.1 \pm 0.7\%$, respectivamente. F3 y F4 tuvieron una consistencia amarillenta, semisólida, cerosa con un punto de fusión de 36°C . Considerando que la fracción F4 presentó un mayor efecto inhibitorio, se analiza por CG – EM. De dicho análisis los resultados se muestran en la Tabla 2, se observa que los compuestos mayoritarios son ácido palmítico (15.3%), ácido esteárico (13.12%), ácido linoleico (9.24%) y oleico (3.34). Los resultados de la actividad antidiarreica de éstos compuestos se muestran en la Tabla 3.

F4 se obtuvo en una relación de 20% de acetato de etilo en hexano. Posteriormente a dicha fracción se le hizo un fraccionamiento (cloroformo-acetato de etilo), obteniéndose 14 fracciones que, al compararlas por cromatografía de capa fina, resultaron 7 diferentes (Fracciones de F1 a F7 provenientes de F4). Se evaluó

la actividad antidiarreica de estas 7 fracciones. De las fracciones de F4, la fracción 5 (Fracción activa de F4), inhibió en $92.1 \pm 1\%$ la diarrea inducida con aceite de ricino.

Dicha F5 de F4 resultó con las mismas características organolépticas que F4 y se obtuvo con 90 – 10% cloroformo – acetato. Al realizar un análisis de CG-EM de ambas se obtuvo la composición que se presenta en la Tabla 2.

Tabla 1. Actividad antidiarreica del diferentes fracciones de *B. odorata* sobre ratones con diarrea inducida con aceite de ricino.

| Tratamiento | Dosis mg/kg | Inhibición de diarrea (%) |
|-------------|-------------|---------------------------|
| Vehículo | 0.1 ml | -- |
| F3 | 100 | $43.8 \pm 3.6^*$ |
| F4 | 100 | $90.1 \pm 0.7^{**}$ |
| F5 | 100 | 22.7 ± 5.3 |
| Loperamida | 2.5 | $81.5 \pm 4.5^*$ |

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$, n = 15

Nota. F1, F2, F6 y F7 no presentaron actividad antidiarreica

De F4 se detectaron 76 compuestos, pero sólo se identificaron 25 ácidos grasos, que resultaron ser los compuestos mayoritarios. En el caso de la fracción activa de F4 sólo se detectaron 7 compuestos e igualmente los compuestos mayoritarios son los ácidos grasos que se detectaron en F4, solo que en esta

fracción los ácidos linoleico y oleico se detectaron en mezcla, pero en dicha fracción están en una proporción porcentual un poco mayor que en F4.

Tabla 2. Composición de F4 y de F5 de F4, determinada por CG-EM.

| Número de compuesto | Tiempo de Retención | Compuesto | Porcentaje de composición F4 | Porcentaje de composición de la Fracción activa de F4 |
|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 2 | 5.424 | Ácido Laurico | 0.08 | -- |
| 5 | 6.427 | n-Eicosano | 0.03 | -- |
| 11 | 8.055 | Ácido Mirístico | 0.05 | -- |
| 15 | 9.041 | Ácido Pentadecanoico | 0.26 | -- |
| 20 | 9.829 | Ácido Palmitoleico | 0.25 | -- |
| 21 | 10.206 | Ácido Palmítico | 15.03 | 51.7 |
| 24 | 11.046 | Ácido Margarico | 1.27 | -- |
| 26 | 11.783 | Ácido Linoleico | 13.12 | 32.4 |
| 27 | 11.852 | Ácido Oleico | 9.24 | |
| 28 | 12.04 | Ácido estearico | 3.39 | 2.8 |
| 29 | 12.846 | Ácido nonadecanoico | 0.09 | -- |
| 30 | 13.386 | (11E,13E)-11,13-Ácido Icosadienoico | 0.20 | -- |

Tabla 2. Composición de F4 y de F5 de F4, determinada por CG-EM.

| Número de compuesto | Tiempo de Retención | Compuesto | Porcentaje de composición F4 | Porcentaje de composición de la Fracción activa de F4 |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 31 | 13.446 | (11E)-11- Ácido Icosanoico | 0.25 | -- |
| 32 | 13.72 | Ácido Eicosanoico | 1.89 | -- |
| 33 | 14.5 | Ácido Heneicosanoico | 0.48 | -- |
| 34 | 15.323 | Ácido Behenico | 3.23 | -- |
| 36 | 16.042 | Ácido Tricosanoico | 1.44 | -- |
| 45 | 18.776 | Ácido Heptacosanoico | 0.30 | -- |
| 46 | 19.205 | Hentriacontano | 0.20 | -- |
| 47 | 19.47 | Ácido Octacosanoico | 3.14 | -- |
| 54 | 20.687 | Ácido Melissico | 2.94 | -- |
| 59 | 21.416 | 3-Friedelanona | 0.83 | -- |
| 60 | 21.827 | Ácido Dotriacontanoico | 2.76 | -- |
| 64 | 22.324 | Ácido Tritriacontanoico | 0.07 | -- |
| 67 | 22.873 | Ácido Tetratriacontanoico | 1.13 | -- |

Tabla 2. Composición de F4 y de F5 de F4, determinada por CG-EM.

| Número de compuesto | Tiempo de Retención | Compuesto | Porcentaje de composición F4 | Porcentaje de composición de la Fracción activa de F4 |
|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 76 | 27.466 | Palmitato Octacosil | 0.11 | -- |

** Solo se presentan los compuestos identificados, de F4 los compuestos no identificados fueron 45.

En F5 de F4 se detectaron 7 compuestos y solo 4 se identificaron

Al evaluar el porcentaje de inhibición de diarrea inducida con aceite de ricino en ratones, F4 inhibió la diarrea $90.1 \pm 0.7\%$ y F5 en F4 $92.1 \pm 1\%$. Por lo tanto, considerando la presencia de ácidos grasos como compuestos mayoritarios en ambas fracciones, la actividad antidiarreica se atribuyó a la presencia de estos ácidos grasos y para completar el estudio se empleó F4 ya que el efecto entre ambas fracciones fue similar. Se realizó una curva del efecto antidiarreico de los ácidos grasos detectados a dosis de 1.56 hasta 100 mg/kg. Los resultados de esta curva se presentan en la Tabla 3.

La cantidad necesaria en la mezcla de ácidos según la dosis a probar se consideró como el 100% de la cantidad requerida. Para hacer el estudio de la mezcla de ácidos, la composición porcentual de cada ácido reportada en F4 se

ajustó con base en dicha relación porcentual; los resultados del porcentaje de inhibición de diarrea de la mezcla de éstos ácidos a las diferentes dosis mencionadas se presentan en la Tabla 4. En la cual sólo se muestra el resultado del porcentaje de inhibición de diarrea de la mezcla de ácidos a las dosis de 6.25 a 100 mg/kg ya que dicha mezcla de ácidos a las dosis de 1.56 y 3.12 mg/kg no se observó inhibición de diarrea.

El efecto máximo de esta mezcla de ácidos grasos no alcanzó el efecto mostrado por F4, que inhibió la diarrea en $90.1 \pm 0.7\%$ a dosis de 100 mg/kg. Se decidió determinar el porcentaje de inhibición de diarrea de la fracción F4 en las dosis de 1.56 a 100 mg/kg. En la Tabla 5 se muestran los resultados de las dosis que tuvieron actividad antidiarreica.

Tabla 3. Actividad antidiarreica de los ácidos grasos detectados en F4 sobre ratones con diarrea inducida con aceite de ricino.

| Dosis mg/kg | Inhibición de diarrea de 4 ácidos grasos (%) | | | |
|----------------|-------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| | Ácido linoleico | Ácido palmítico | Ácido esteárico | Ácido oleico |
| 6.25 | 44.8 ± 4.6 * | 60.3 ± 7.5 ** | 17.5 ± 9.3 | 54.5 ± 6.6 * |
| 12.5 | 44.9 ± 1.7 * | 58.6 ± 6 ** | 19.3 ± 4.7 | 52.7 ± 7.9 * |
| 25 | 53.2 ± 6.3 * | 60.8 ± 2.5 ** | 12.3 ± 4.7 | 50.9 ± 6.3 * |
| 50 | 46.8 ± 7.6 * | 56.9 ± 1.3 ** | 14.03 ± 3.6 | 52.7 ± 6.6 * |
| 100 | 42.1 ± 5.6 * | 67.5 ± 4.9 ** | 43.86 ± 0.8 * | 58.2 ± 7.3 * |

* p < 0.05; ** p < 0.01; n = 15

Como se muestra en la tabla 5, a dosis de 50 mg/kg, F4 inhibió en 74.7 ± 1%, que es mayor que la ejercida por la mezcla de ácidos o los ácidos probados individualmente. Debido a estos resultados se decidió continuar los estudios con F4 ya que fue la fracción con mayor efecto. F4 a partir de la dosis de 25 mg/kg exhibió un mayor efecto antidiarreico que el mostrado por los ácidos probados individualmente o la mezcla de éstos. A las dosis de 1.56 a 6.25 mg/kg F4 no inhibió la diarrea.

Tabla 4. Actividad antidiarreica de la mezcla de ácidos grasos a diferentes dosis en ratones con diarrea inducida con aceite de ricino.

| Dosis mg/kg | Inhibición de diarrea de mezcla de ácidos oleico, palmítico, esteárico y linoleico (%) |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12.5 | 53.2 ± 4.2 * |
| 25 | 46.8 ± 2.4 * |
| 50 | 47.7 ± 3.2 * |
| 100 | 70.6 ± 8.8 ** |

* p < 0.05; ** p < 0.01; n = 15

Tabla 5. Actividad antidiarreica de F4 a dosis de 12.5 a 100 mg/kg en ratones con diarrea inducida con aceite de ricino.

| DOSIS mg/kg | Inhibición de diarrea por F4 (%) |
|------------------------|---------------------------------------------|
| 12.5 | 50.5 ± 6.1 * |
| 25 | 67.7 ± 3.6 ** |
| 50 | 74.7 ± 1 ** |
| 100 | 90.1 ± 3.2 ** |

* p < 0.05; ** p < 0.01; n = 15

La diarrea inducida con aceite de ricino involucra la liberación de ácido araquidónico con su subsecuente biosíntesis de prostaglandinas, por lo que se decidió determinar el efecto inhibitorio en ratones con diarrea inducida con ácido araquidónico o con PGE₂, los resultados se muestran en la Tabla 6 para el ácido araquidónico y en la Tabla 7 para las PGE₂.

En los resultados mostrados en las Tablas 6 y 7, se observa que cuando se usan prostaglandinas como agente catártico, F4 no tuvo efecto, mientras que en la diarrea inducida con ácido araquidónico la inhibición fue de 72.9 ± 2.7%. Este resultado nos permite decir que el efecto antidiarreico de F4 probablemente involucra la inhibición de la biotransformación del ácido araquidónico a prostaglandinas.

Tabla 6. Actividad antidiarreica de la fracción F4 a 100 mg/kg sobre ratones con diarrea inducida con ácido araquidónico (3 mg/kg)

| Tratamiento | Inhibición de diarrea (%) |
|--------------------|----------------------------------|
| Loperamida 2 mg/kg | 81.25 ± 2.3 ** |
| Vehículo (0.1 ml) | 0 ± 0 |
| F4 100 mg/kg | 72.9 ± 2.7 ** |

** p < 0.01; n = 15

Tabla 7. Actividad antidiarreica de la fracción F4 100 mg/kg sobre ratones con diarrea inducida con PGE₂ (1 mg/kg)

| Tratamiento | Inhibición de diarrea (%) |
|--------------------|---------------------------|
| Loperamida 2 mg/kg | 78.0 ± 4.7 ** |
| Vehículo (0.1 ml) | 0 ± 0 |
| F4 100 mg/kg | 18.7 ± 2.5 |

** p < 0.01; n = 15

Como se mencionó previamente, la importancia farmacológica de los ácidos grasos es alta y de varios de ellos ya se conoce su mecanismo de acción. Así por ejemplo, el ácido linoleico conjugado disminuye la biosíntesis de eicosanoides, disminuyendo la producción de PGE₂ (Hayek y col., 1999). Hay reportes de que algunos ácidos grasos son antidiarreicos, ya que activan células intestinales vía receptores acoplados a proteínas G (GPRs), como GPR41 y GPR43 (Kim y col., 2013). La eficacia de ácidos grasos en la diarrea del viajero también ha sido confirmada a través de la modificación del pH intestinal y disminución de la virulencia de organismos patógenos, como *E. coli* (Zentek, 2013).

En los resultados obtenidos en el presente trabajo F4 inhibe la diarrea inducida con ácido araquidónico pero no la diarrea inducida con prostaglandinas lo que confirma que F4 interrumpe la biotransformación de dicho ácido a

prostaglandinas, ya que las prostaglandinas se producen por un incremento de la concentración intracelular de Ca^{++} (Park y col., 2011) el efecto farmacológico de AECM, también podría estar relacionado con la regulación de las concentraciones intracelulares de Ca^{++} .

***Chrysactinia mexicana* Gray**

En esta planta se determinó que los extractos acuoso, metanólico y clorofórmico tuvieron actividad antidiarreica en diarrea inducida con aceite de ricino, ya que a dosis de 100 mg/kg el extracto acuoso inhibió la diarrea en $51.9 \pm 6\%$, el extracto metanólico en $48.2 \pm 6\%$, el extracto clorofórmico en $59.6 \pm 3\%$.

Estos resultados, y el intenso olor a mentol – eucaliptol, en estado fresco de dicha planta permiten sospechar que su actividad se debe a la presencia de su aceite esencial (AECM), lo cual se describe en estudio realizado por Zavala, 1998. Se procedió a la obtención del AECM, del cual el rendimiento y sus propiedades físicas se presentan en la Tabla 8. El estudio de la actividad antidiarreica del AECM y de sus componentes mayoritarios se presenta en las Tablas 9 a la 13.

Tabla 8. Rendimiento y propiedades físicas del AECM antes de la floración.

| Peso (g) | AECM (g) | Rendimiento % (p/p) | Densidad (g/ml) | Índice de refracción |
|-----------------|-----------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| 1316.8 | 33.3 | 2.5 | 0.9305 | 1.465 |

Se determinó la actividad antidiarreica del AECM en ratones con diarrea inducida con aceite de ricino. Para determinar el comportamiento del efecto antidiarreico del AECM, se construyó una gráfica dosis-respuesta. Los resultados se

presentan en la Tabla 9. En las dosis de 1.56 a 6.25 mg/kg no se observa actividad antidiarreica; a la dosis de 100 mg/kg se obtuvo el mayor efecto ($63.6 \pm 5.9\%$).

Tabla 9. Actividad antidiarreica del AECM a dosis de 1.56 a 100 mg/kg sobre ratones con diarrea inducida con aceite de ricino.

| AECM Dosis mg/kg | INHIBICIÓN DE DIARREA (%) |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|
| 12.5 | 31.1 ± 0.4 |
| 25 | 33.3 ± 4 * |
| 50 | 57.6 ± 1.5 ** |
| 100 | 63.6 ± 5.9 ** |

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 15$

Para conocer la composición del AECM y poder determinar el compuesto responsable de la actividad, se realizó un análisis por CG-EM; se identificaron 17 compuestos, sólo se presentan los compuestos mayoritarios, considerando que estos tres compuestos representan 90.7%, como se muestra en la Tabla 10.

A los tres compuestos presentes en el AECM, se les determinó su actividad en diarrea inducida con aceite de ricino. En las dosis del AECM de 1.56, 3.12 y 6.35

mg/kg ninguno de los compuestos de AECM inhibe la diarrea. En la Tabla 11 se presentan los resultados de las dosis de 12.5 a 100 mg/kg. El porcentaje de inhibición de la diarrea por el AECM y dos de sus compuestos alcanza su mayor efecto a 100 mg/kg. A esta dosis el AECM inhibió la diarrea inducida con aceite de ricino $63.6 \pm 5.9\%$ de la piperitona mientras que el eucaliptol fue de $84.2 \pm 2.1\%$ y $63.8 \pm 3.7\%$.

Tabla 10. Composición del AECM, determinada por CG-EM.

| Número de compuesto | Tiempo de Retención | Compuesto | Porcentaje de composición de AECM |
|----------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------------------------|
| 1 | 7.52 | 1R- α -Pinene | 0.54 |
| 2 | 9.17 | (-)- β -Pinene | 0.11 |
| 3 | 9.91 | Myrcene | 0.20 |
| 4 | 10.37 | α -Phellandrene | 1.37 |
| 5 | 11.34 | m-Cymene | 1.30 |
| 6 | 11.68 | Eucalyptol | 28.68 |
| 7 | 12.43 | (Z)-Ocimene | 0.32 |
| 8 | 14.82 | Linalol | 1.23 |
| 9 | 15.71 | cis-p-Menth-2-en-1-ol | 0.78 |
| 10 | 16.58 | trans-4-Thujanol | 0.70 |
| 11 | 18.31 | Terpene-4-ol | 0.20 |

Tabla 10. Composición del AECM, determinada por CG-EM.

| Número de compuesto | Tiempo de Retención | Compuesto | Porcentaje de composición de AECM |
|---------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 12 | 18.67 | 3,9-Epoxy-1-p-menthene | 0.22 |
| 13 | 19.05 | α -Terpineol | 9.90 |
| 14 | 19.89 | <i>trans</i> -Piperitol | 0.24 |
| 15 | 22.23 | Piperitone | 52.12 |
| 16 | 34.33 | Elemol | 0.57 |
| 17 | 37.47 | gama.-eudesmol | 0.16 |

Considerando que tanto el eucaliptol como a la piperitona, se les han demostrado efectos relacionados con la inhibición de la diarrea que se mencionan más adelante, se decidió analizar el efecto de AECM sobre la diarrea induciéndola con ácido araquidónico o PGE₂, los resultados se presentan en las Tablas 12 y 13, respectivamente.

Tabla 11. Actividad antidiarreica de los compuestos mayoritarios del AECM de 12.5 a 100 mg/kg, sobre ratones con diarrea inducida con aceite de ricino.

| Dosis (mg/kg) | Inhibición de diarrea (%) | | |
|------------------|------------------------------|---------------------|-------------------|
| | Eucaliptol | α -Terpineol | Piperitona |
| 12.5 | 30.4 \pm 2.5 * | SA ⁺ | 27.7 \pm 1.4 |
| 25 | 50 \pm 0.9 * | SA ⁺ | 33.3 \pm 2.4 * |
| 50 | 78.9 \pm 7.6 * | SA ⁺ | 47.2 \pm 1.3 * |
| 100 | 84.2 \pm 2.1 * | SA ⁺ | 63.8 \pm 3.7 ** |

* p < 0.05; ** p < 0.01; n = 15

SA⁺ = Sin actividad

Analizando el resultado de las tablas 12 y 13, el AECM inhibió la diarrea 79 \pm 7.9%, cuando se usa el ácido araquidónico como agente catártico mientras que el AECM no inhibió la diarrea inducida por la PGE₂. Estos resultados nos permiten proponer que el efecto antidiarreico de AECM puede involucrar la inhibición de la biotransformación del ácido araquidónico a prostaglandinas, ya que las prostaglandinas se producen por un incremento de la concentración intracelular de Ca⁺⁺ (Park y col., 2011) el efecto farmacológico de AECM, también podría estar relacionado con la regulación de las concentraciones intracelulares de Ca⁺⁺.

Tabla 12. Actividad antidiarreica del AECM a dosis de 100 mg/kg sobre ratones con diarrea inducida con ácido araquidónico (3 mg/kg).

| Tratamiento | Inhibición de diarrea (%) |
|--------------------|----------------------------------|
| Loperamida 2 mg/kg | 72.9 ± 0.9 ** |
| Vehículo (0.1 ml) | 0 ± 0 |
| AECM 100 mg/kg | 79 ± 7.9 ** |

** p < 0.01; n = 15

Tabla 13. Actividad antidiarreica del AECM a dosis de 100 mg/kg sobre ratones con diarrea inducida con PGE₂ (1 mg/kg).

| Tratamiento | Inhibición de diarrea (%) |
|--------------------|----------------------------------|
| Loperamida 2 mg/kg | 87.7 ± 0.6 ** |
| Vehículo (0.1 ml) | 0 ± 0 |
| AECM 100 mg/kg | 8.4 ± 0.6 ^{NS} |

** p < 0.01; NS= Sin diferencia significativa; n = 15

El mecanismo de acción de los componentes mayoritarios del AECM ya ha sido reportado. Shah y col., (2011) encontraron que el eucaliptol inhibe las contracciones inducidas con carbacol o verapamilo. También que tiene actividad antidiarreica, antiasmática y antihipertensiva (Yvon y col., 2012).

El eucaliptol y otros 26 diterpenos se ha reportado que disminuyen citocinas IL-2 (Th1) e IL-10 (Th2), y que son antiinflamatorios, inhibiendo la respuesta de células T (Ku y Lin, 2013). El aceite esencial de *Ginger*, que tiene como componentes mayoritarios al citral, al eucaliptol y al canfeno, el cual suprime la contracción inducida por carbacol (Mangprayool y col., 2013). Finalmente, se ha reportado que el aceite esencial de *Cymbopogon proximus* contiene piperitona como compuesto mayoritario (73.8 %). Dicho compuesto antagoniza las acciones de la serotonina y de la histamina, por interacción con los receptores de éstas (Al-Taweel y col., 2013).

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos permiten asegurar que *Bidens odorata* Cav. y *Chrysactinia mexicana* Gray poseen la actividad antidiarreica que se les atribuye en la medicina tradicional mexicana.
- Los ácidos palmítico, linoléico, oleico y esteárico, son los componentes mayoritarios de la fracción activa de *Bidens odorata* Cav. (F4).
- Estos compuestos son los responsables de la actividad antidiarreica de *Bidens odorata* Cav.
- Los compuestos mayoritarios de *Chrysactinia mexicana* Gray son eucaliptol, α -terpineol y piperitona.
- El efecto antidiarreico de *Chrysactinia mexicana* Gray puede atribuirse a dos de los tres componentes mayoritarios que son el eucaliptol y piperitona.

- Los compuestos aislados e identificados actúan inhibiendo la biotransformación del ácido araquidónico a prostaglandinas.

- Si F4 y AECM inhiben la producción de prostaglandinas, podemos sugerir que ambas mezclas podrían participar en la regulación de las concentraciones intracelulares de Ca^{++} .

PERSPECTIVAS

Continuar los estudios del mecanismo de acción en la inhibición de la diarrea de la fracción activa de *Bidens odorata* Cav.

- Conocer las vías por las que el aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray inhibe la diarrea.
- Estandarizar la obtención de las mezclas activas para formular fitomedicamentos con actividad antidiarreica.
- Analizar la posibilidad para hacer el cultivo controlado de ambas plantas.
- Promover como tratamiento antidiarreico el uso de preparaciones a partir de *Bidens odorata* y *Chrysactinia mexicana*, sobre todo en las zonas en las que se dificulta la adquisición o distribución de medicamentos.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar A., Camacho J., Chino S., Jácques P.; (1998); Plantas medicinales del herbario del IMSS, 500 Especies, su Distribución por Enfermedades; 1ª Ed., México, IMSS – Grupo Roche.

Aikawa N., Kobayashi H., Ohmori K.; (2000A); Gender differences in the antidiarrheal effect of zaldaride maleato in rats; Biological & Pharmaceutical Bulletin; 23(1): 33 – 36.

Aikawa N., Kobayashi H., Ohmori K.; (2000B); Effect of zaldaride maleate, an antidiarrheal compound, on 16,16-dimethyl prostaglandin E₂-induced intestinal ion secretion in rats; Japanese Journal Pharmacology; 83: 269 – 272.

Al-Taweel A., Fawzy G., Perveen S., El Tahir K.; (2013); Gas Chromatographic Mass Analysis and Further Pharmacological Actions of *Cymbopogon proximus* Essential Oil.; Drug research; 63 (9): 484 – 488.

American Society of Health-System Pharmacist.

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a682672-es.html#side-effects>; Abril, 2014.

Argueta A., Cano L, Rodarte M.; (1994); México, Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I; México; Instituto Nacional Indigenista.

Ashkenazi, S., Pickering, L.K.; (1989); Pathogenesis and diagnosis of bacterial diarrhea; Eur Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases; 8 (3): 203 - 206.

Astudillo A. V., Dávalos V. H., De Jesús L., Herrera G. Navarrete A.; (2008); Investigation of *Alternanthera repens* and *Bidens odorata* on gastrointestinal disease; Fitoterapia; 79 (7-8): 577 – 580.

Athman R., Tsocas A., Pisset O., Robine S., Róze C., Ferrari E.; (2002); In vivo absorption of water and electrolites in mouse intestine application to villin -/- mice; American Journal Physiology and Liver Physiology; 282 (4): G634 – G639.

Awouters F., Megens A., Verlinden M., Schuurkes J., Niemegeers C., Janssen A.; (1993); Loperamide survey of studies on mechanism of its antidiarrheal activity; Digestive Diseases Sciences; 38 (6): 997 – 995.

Baird A., Skelly M., Donoghue D., Barrett K., Keely S. (2008) Bradykinin Regulates Human Colonic Ion Transport In Vitro; *B J of Pharmacol*; 155: 558 – 566.

Bafna P., Bodhankar S.; (2003); Gastrointestinal effects of Mebarid[®], an ayurvedic formulation, in experimental animals; *Journal of Ethnopharmacology*; 86 (2-3): 173 – 176.

Bakkali F.; Averbeck S .; Averbeck D., Idomar M.; (2008); Biological effects of essential oils – a review; *Food and Chemical Toxicology*; 46: 446 - 475.

Bhattacharya, S.K.; (2000); Therapeutic methods for diarrhea in children; *World Journal of Gastroenterology*; 6 (4): 497 - 500.

Billault I., Mantle P., Robins R.; (2004); Deuterium NMR used to indicate a common mechanism for the biosynthesis of ricinoleic acid by *Ricinus communis* and *Claviceps purpurea*; *Journal of the American Chemical Society*; 126 (10): 3250 – 3256.

Bian X., Galligan J. J.; (2007); α_2 – Adrenoceptores couple to inhibition of R – type calcium currents in myenteric neurons; Journal of Neurogastroenterology and Motility; 19(10), 845 –855.

Boettler R. B.; (2004); Plantas popularmente utilizadas para afecciones del aparato digestivo; diarrea y parásitos en México; <http://ag.arizona.edu/OALS/ICBG/mexico/afecciones.html>. Septiembre del 2013.

Boschi P. C., Velebit L., Shibuya K.; (2008); Bulletin of the World Health Organization; 86: 710 –717.

Cárdenas N., Zavala M., Aguirre R., Pérez S., Pérez C.; (2005); Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray; Journal of Agricultural Food Chemistry; 53 (11): 4347 - 4349.

Chen Y., Guarnieri M., Vasil A., Vasil M., Mant C., Hodges R.; (2007); Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 51(4): 1398 – 1406.

Cohen, D., Orr, N., Haim, M., Ashkenazi, S.; (2000); Safety and immunogenicity of two different lots of the oral, killed enterotoxigenic *Escherichia coli*—cholera toxin B subunit vaccine in Israeli young adults, *Infection and Immunity*; 68 (8): 4492 - 4497.

Diener, M., Knobloch, S. F., Rummel, W.; (1988); Action of loperamide on neuronally mediated and Ca^{2+} - or cAMP – mediated secretion in rat colon; *European Journal of Pharmacology*; 152(3): 217 – 225.

Dey I., Chadee K.; (2008); Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* binds to EP4 receptors and stimulates interleukin-8 production in human colonic cells; *infection and immunity*; 76 (11): 5158 – 5163.

De Luca A., Coupar I. M.; (1993); Difenoxin and loperamide: studies on possible mechanisms of intestinal antisecretory action; *Naunyn Schmiedeberg's Archives Pharmacology*; 347: 231 -237.

De Luca A., Coupar I.; (1996); Insights into opioid in the intestinal tract; *Pharmacology & Therapeutics*; 69 (2): 103 – 115.

Estrada S., González D., Castillo P., Aguirre F., Sánchez J.; (2009); Spasmolytic effect of *Mentha pulegium* L. involves ionic flux regulation in rat ileum strips; Journal Smooth Muscle Research; 46(2): 107 - 117.

Euser A., Cipolla M.; (2005); Resistance artery vasodilation to magnesium sulfate during pregnancy and the postpartum state; American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology; 288: H1521 – H1525.

Fichas técnicas del Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS – CIMA. Madrid, España: Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS) - [OCT 2012].
<https://sinaem4.agemed.es/consaem/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm>; Octubre del 2013.

Field M.; (2003); Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea; Journal of Clinical Investigation; 111(7): 931 – 943.

Flores S., Segura T.; (2005); Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico; Revista Mexicana de Neurociencias; 6(4): 315 - 326.

Forés R.; (1997); Atlas de las Plantas Medicinales y Curativas; 1^a ed., España;

Cultural S. A., pp. 8 – 14.

Forsberg B., Petzold M., Tomson G., Allebeck P.; (2007); Diarrhoea case

management in low- and middle-income countries — an unfinished agenda;

Bulletin of the World Health Organization; 85 (1): 42 – 49.

Fujii Y., Tsurumi K., Sato M., Takahashi E., Okamoto K.; (2008); Fluid secretion

caused by aerolysin-like hemolysin of *Aeromonas sobria* in the intestines is

due to stimulation of production of prostaglandin E₂ via cyclooxygenase₂ by

intestinal cells; Infection and Immunity; 76 (3): 1076 – 1082.

Ganong W., Gramlich D., Fernández G.; (1998); Fisiología Médica; 16^a ed,

México; Manual Moderno; pp. 80–95, 533–537, 565 – 568.

Guyton A. C., Hall. John E.; (2006); Tratado de Fisiología Médica; 10^a Ed., Mc

Graw Hill, pp. 865 – 873.

Hansen J., Koeppen B.; 2002; Netter's Atlas of Human Physiology; First Edition;

New Jersey; Icon Learning Systems; pp 61, 62.

Hardman J. G., Molinoff P. B, Goodman & Gilman's; (1996); The Pharmacological Basis of Therapeutics; Tenth Edition, London; McGraw-Hill; p. 1040.

Hayek M., Han S., Wu D., Watkins B., Meydani M., Dorsey J., Smith D., Meydani S.; (1999); Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice; Journal of Nutrition; 129 (1): 32 - 8.

Herken E., Celik A., Aslan M., Aydinlik N.; (2012); The constituents of essential oil: antimicrobial and antioxidant activity of *Micromeria congesta* Boiss. & Hausskn. Ex Boiss. from East Anatolia; Journal of Medicinal Food; 15 (9): 835 – 839.

Hsuan C.; Wang Y.; Nakatsuji T., Liu Y., Zouboulis C., Gallo R., Zhang L., Hsieh M.; (2011); An Innate Bactericidal Oleic Acid Effective Against Skin Infection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Therapy Concordant with Evolutionary Medicine; Journal of Microbiology and Biotechnology Research; 21 (4): 391 – 399.

- Kim M., Kang S., Park J., Yanagisawa M, Kim C.; (2013); Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on Intestinal Epithelial Cells to Promote Inflammatory Responses in Mice; *Gastroenterology*; 145 (2): 396 - 406.
- Khan M., Khan N., Qasmil I., Ahmad G., Zafar S.; (2004); Protective effect of *Arque-Ajeeb* on acute experimental diarrhoea in rats; *BMC Complementary and Alternative Medicine*; 4(8): 1 - 5.
- Kishino S., Ogawa J., Ando A., Amura Y., Shimizu S.; (2002); Ricinoleic acid and castor oil as substrates for conjugated linoleic acid production by washed cells of *Lactobacillus plantarum* (*Microbiology & Fermentation Technology*); *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*; 66(10): 2283 – 2286.
- Kots A., Choi B., Jimenez M., Warren C., Gilbertson S., Guerrant R., Murad F.; (2008); Pyridopyrimidine derivatives as inhibitors of cyclic nucleotide synthesis: Application for treatment of diarrhea; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 105(24): 8440 – 8445.

Ku C., Lin J.; (2013); Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes; Food Chemistry; 15, 141(2) : 1104 – 1113.

Lacy B.; (2003); Irritable bowel syndrome: a primer on management; Reviews in Gastroenterological Disorders; 3(3): S32 – S42.

Li Z., Pham T., Tamir H., Chen J., Gershon M.; (2004); Enteric dopaminergic neurons: Definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation; Journal of Neuroscience; 24(6): 1330 – 339.

Liu P., Shen S., Ruan H., Zhou Q., Ma L., He G.; (2011); Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented Chinese pickles; Biomed & Biotechnol; 12(11): 923 - 930.

Lin X., Paskaleva E., Chang W., Shekhtman K., Canki M.; (2011); Inhibition of HIV-1 infection in ex vivo cervical tissue model of human vagina by palmitic

acid; implications for a microbicide development; Public Library of Science
one PLoS 1; 6(9): e24803.

Lucak S.; (2010); Optimizing outcomes with alosetron hydrochloride in severe
diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; Therapeutic Advances in
Gastroenterology; 3(3) 165 – 172.

Mangprayool T., Kupittayanant S., Chudapongse N.; (2013); Participation of citral
in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action;
Fitoterapia; 17 (89C): 68 - 73.

Martínez M.; (1996); Las Plantas Medicinales de México, 6^a ed.; México;
Ediciones Botas; pp. 136 - 137.

McConnico R., Argenzio R., Roberts M.; (2002); Prostaglandin E₂ and reactive
oxygen metabolite damage in the cecum in a pony model of acute colitis;
Canadian Journal of Veterinary Research; 66(1): 50 – 54.

Mckeon T., Chen G., Lin J.; (2000); Biochemical aspects of castor oil
biosynthesis; Biochememical Society Transaction.; 28(6): 972 – 974.

Megens A., Niemegeer C.; (1984); Antagonism of the antidiarrhoeal effect of clonidine and lethal effect of noradrenaline in rats: a reliable procedure to evaluate the in – vivo alpha 1 – and alpha 2 – blocking activity of drugs; Journal of Pharmacy and Pharmacology; 36(8): 516 –520.

Melo M., Mukherjee R.; (1988); Antidiarrhoeal activity of bisnordihydrotoxiferine isolated from the root bark of *Strychnos trinervis* (Vell.) Mart (Loganiaceae); Journal of Pharmacy and Pharmacology; 40 (1): 79 – 82.

Mokřý J., Jakubesová M., Švihra J, Urdzik, Hudec M., Nosáľová G., Kliment J.; (2005); Reactivity of urinary bladder smooth muscle in guinea pigs to acetylcholine and carbachol: participation of acetylcholinesterase; Physiological Research /Academia Scientiarum; 54 (4): 453 - 458.

Mori H., Iwahashi H.; (2011); Formation of 7_carboxyheptyl radical induced by singlet oxygen in the reaction mixture of oleic acid, riboflavin and ferrous ion under the UVA irradiation; Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition; 49 (2): 141 – 146.

Nishikawa H., Kawai K., Nishimura S., Araki H., Bahjat A., Hallenberg M., Kuroda R., Kawabata A.; (2002); Suppression by protease – activated receptor – 2 activation of gastric acid secretion in rats; European Journal of Pharmacology, 447 (1): 87 – 90.

Norma Oficial Mexicana Nom – 062 – Zoo – 1999; Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio; 22 de Agosto 2001; Diario Oficial de la Federación; Segunda Sección; pp. 1 – 57.

Oliviera M., Marques R., Santana M., Santos A., Brito F., Barreto E., Sousa D., Almeida F., Badaue P., Antonioli A., Quintans J.; (2012); α -terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response; Basic & clinical pharmacology & toxicology; 111 (2): 120 - 125.

Park Y., Baek D., Kim W., Kim J., Yang S., Jung S., Jang B., Choi C., Han D., Kim Y., Chung Y., Kim S. W., Kim S.; (2011); Clinical characteristics of microscopic colitis in Korea: Prospective multicenter study by KASID; Gut and Liver; 5 (2): 181 - 186.

Pérez S., Zavala M., González M., Cárdenas N., Ramos M.; (2011); Bioactivity of *Carica papaya* (Caricaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae); *Molecules*; 16, 7502 - 7509.

Ping – L. H., Meras D., Atwater I., Rojas E., Cleemann L.; (2003); Loperamide mobilizes Ca^{2+} stores in insulin – secreting HIT – T15 cells; *British Journal of Pharmacology*; 139 (2): 351 -361.

Radanovic T., Wagner C., Murer H., Biber J.; (2005); Regulation of intestinal phosphate transport II. Metabolic acidosis stimulates Na^{+} - dependent phosphate absorption and expression of the Na^{+} - P_i cotransporter NaPi-lib in small intestine; *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*; 288 (3): G501 – G506.

Riverón R., (1999); Actualización de temas fisiopatología de la diarrea aguda; *Revista Cubana de Pediatría*; 71 (2): 86 – 115.

Rouf S. S. A., Islam S. M., Rahman T. M.; (2003); Evaluation of antidiarrhoeal activity *Rumex maritimus* Root; *Journal Ethnopharmacology*; 84 (2-3): 307 – 310.

Rozza A., Pellizzon C.; (2013); Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities; *Fundamental & Clinical Pharmacology*; 27 (1): 51 – 63.

Ryu S., Park C., Baek H., Baek S., Hwang S., Chung W.; (2004); Anti-diarrheal and spasmolytic activities and acute toxicity study of Soonkijangquebo™ a herbal anti-diarrheal formula; *Journal of Ethnopharmacology*; 91 (1): 75 – 80.

Rzedowski J., Rzedowski G.; (1979); *Flora Fanerogámica del Valle de México*; 3ª ed; México; Editorial CECSA; p. 210.

Sametz W., Hennerbichler S., Glaser S. Wintersteiger R., Heinz J.; (2000); Characterization of prostanoid receptors mediating actions of the isoprostanes, 8-iso-PGE2 and 8-iso-PGF2 α , in some isolated smooth muscle preparations; *British Journal of Pharmacology*; 130 (8): 1903 – 1910.

Sandhu B., Tripta J., Candy C., Harries J.; (1981); Loperamide: studies on its mechanism of Action; *Gut*; 22 (8): 658 – 662.

Sánchez O.; (1978); *La Flora del Valle de México*; 4ª ed.; México; Editorial Herrera; p. 460.

Sanger G., Alpers D.; (2008); Development of drugs for gastrointestinal motor disorders: translating science to clinical need; *Neurogastroenterology and Motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*; 20 (3): 177 – 184.

Scarlett Y.; (2004); Medical management of fecal incontinence; *Gastroenterology*; 126 (1): S55 –S63.

Shah A., Gilani A., Abbas K., Rasheed M., Ahmed A., Ahmad V.; (2011); Studies on the chemical composition and possible mechanisms underlying the antispasmodic and bronchodilatory activities of the essential oil of *Artemisia maritima* L.; *Archives of Pharmacol Research*; 34 (8): 1227 - 1238.

Sharkey K. y Kroese A.; (2001); Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators; *The Anatomical record*; 262 (1): 79 – 90.

Shunmugaperumal T., Sharma D., Thakur A., Vinaykumar; (2013); Effect of production variables on the physicochemical characteristics of celecoxib-

loaded stearic and alginic acids-based microparticles; *Interventional medicine & applied science*; 5 (4): 175 - 181.

Sayegh A. y Ritter R; (2003); Morphology and distribution of nitric oxide synthase-neurokinin-1 receptor-, calretinin-, calbindin-, and neurofilament-M-immunoreactive neurons in the syenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine; *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*; 271A, 1; 209 - 216.

Shoba G., Molly T.; (2001); Study of antidiarrhoeal activity of four medicinal plants in castor - oil induced diarrhea; *Journal of Ethnopharmacology*; 76 (1): 73 - 76.

Sparkes B., Slonec E., Roth M., Welti R., Fleming S.; (2010); Intestinal lipid alterations occur prior to antibody-induced prostaglandin e2 production in a mouse model of ischemia/reperfusion; *Biochimica et Biophysica Acta*; 1801 (4): 517 - 525.

Tangpu V., Yadav K. A. (2004); Antidiarrhoeal Activity of *Rhus javanica* Ripen Fruit in Albino Mice; *Fitoterapia*; 75: 39 – 44.

Venegas R., Pérez S., Ferrer R., Moreno J.; (2006); Arachidonic acid cascade and epithelial barrier function during caco-2 cell differentiation; Journal of Lipid Research; 47 (7): 1416 –1423.

Vibrans H.; (1995); *Bidens pilosa* L. y *Bidens odorata* Cav (Asteracea: Heliantheae) en la vegetación urbana de la ciudad de México; Acta Botánica Mexicana; 32: 85 – 89.

Vibrans H.; (1997); Lista florística comentada de plantas vasculares silvestres en San Juan Quetzalcoapan Tlaxcala, México; Acta Botánica Mexicana; 38: 21 - 67.

Vibrans H.; (1998); Urban weeds of México City: floristic composition and important families; Anales Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México; 69 (1): 37 – 69.

Voet D., Voet J.; (1992); Bioquímica; Ediciones Omega, Barcelona; pp 509, 783, 1217 – 1225.

WHO (1998): http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TRM_98.1.pdf. Consultada en Abril 2010.

WHO (2001): Especialidades Farmacéuticas: Restricciones en Uso y Disponibilidad; Abril 2010.

WHO (2005): http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diseasefact/es/; Abril 2010.

WHO (2008): <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/9/07-050054/en/>; Bulletin of the World Health Organization, 2008; 86: 710-717; Abril 2014.

WHO (2009A): http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/childhood_deaths_diarrhoea_20091014/es/index.html; Abril 2014.

WHO (2009B): *WHO monographs on selected medicinal plant*, Volumes 1, 2, 3 y 4

WHO(2010):http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/diarrhoea_research_20090310/es/; Abril 2014.

Xiaorui D.; (2000); Situación reglamentaria de los medicamentos herbarios
Reseña Mundial.

2014.

Yvon Y., Raelison E., Razafindrazaka R., Randriantsoa A., Romdhane M., Chabir N., Mkaddem M., Bouajila J.; (2012); Relation between chemical composition or antioxidant activity and antihypertensive activity for six essential oils; *Journal of Food Science*; 77 (8): H184 – H191.

Zavala D., (2006), Estudio químico y farmacológico de *Bidens odorata* Cav, *Heliotropium curassavicum* L y *Chrysactinia mexicana* Gray, Tesis de maestría UAM- X. pp. 37 - 52.

Zavala D., Alarcon F., Pérez S., Escobar M., Zavala M.; (2013); Composition and Antidiarrheal Activity of *Bidens odorata* Cav.; *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; 2013, (1 - 7).

Zavala M., Pérez S., Pérez C., Sánchez D., Arias L.; (2002); Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde Isolated from *Artemisa ludoviciana*; *Pharmaceutical Biology*; 40 (4): 263 – 268.

Zavala M.; (1998); Estudio Químico – Farmacológico de Plantas con Actividad Antidiarreica; Tesis doctoral UAM-X. pp. 87 – 103.

Zentek J., Ferrara F., Pieper R., Tedin L., Meyer W., Vahjen W.; (2013); Effects of dietary combinations of organic acids and medium chain fatty acids on the gastrointestinal microbial ecology and bacterial metabolites in the digestive tract of weaning piglets; Journal of animal science; 91 (7): 3200 - 3210.

Zhu Y., Hua P., Rafiq S., Waffner E., Duffey M., Lance P.; (2001); Ca²⁺ and PKC-dependent stimulation of PGE₂ synthesis by deoxycholic acid in human colonic fibroblasts; American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology; 283: G503 – G510.

ANEXOS

Research Article

Composition and Antidiarrheal Activity of *Bidens odorata* Cav.

Daniel Zavala-Mendoza,¹ Francisco J. Alarcon-Aguilar,² Salud Pérez-Gutierrez,³
M. Carmen Escobar-Villanueva,² and Miguel A. Zavala-Sánchez³

¹ Experimental Biology Ph.D Program, D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 México, DF, Mexico

² Departamento Ciencias de la Salud, D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco No. 186, Colonia Vicentina, Iztapalapa, 09340 México, DF, Mexico

³ Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, 09340 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Miguel A. Zavala-Sánchez; mzavala@correo.xoc.uam.mx

Received 19 June 2013; Revised 30 August 2013; Accepted 7 September 2013

Academic Editor: Mohd Roslan Sulaiman

Copyright © 2013 Daniel Zavala-Mendoza et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The antidiarrheal effects of chloroform, methanol, and aqueous extracts of *Bidens odorata* Cav. were investigated at doses of 200 mg/kg on castor-oil-induced diarrhea. The chloroform extract of *B. odorata* (CBO) reduced diarrhea by 72.72%. The effect of CBO was evaluated on mice with diarrhea induced by castor oil, MgSO₄, arachidonic acid, or prostaglandin E₂. CBO inhibited the contraction induced by carbachol chloride on ileum (100 µg/mL) and intestinal transit (200 mg/kg) in Wistar rats. The active fraction of CBO (F4) at doses of 100 mg/kg inhibited the diarrhea induced by castor oil (90.1%) or arachidonic acid (72.9%) but did not inhibit the diarrhea induced by PGE₂. The active fraction of F4 (FR5) only was tested on diarrhea induced with castor oil and inhibited this diarrhea by 92.1%. The compositions of F4 and FR5 were determined by GC-MS, and oleic, palmitic, linoleic, and stearic acids were found. F4 and a mixture of the four fatty acids inhibited diarrhea at doses of 100 mg/kg (90.1% and 70.6%, resp.). The results of this study show that *B. odorata* has antidiarrheal effects, as is claimed by folk medicine, and could possibly be used for the production of a phytomedicine.

1. Introduction

Diarrheal diseases are among the most common gastrointestinal disorders and a major cause of morbidity and mortality in children under 5 years of age, particularly in underdeveloped countries. The reported global mortality due to diarrhea in children under 5 years is approximately 1.87 million, representing 19% of all childhood deaths [1].

Medicinal plants are commonly used in Mexico to treat diarrhea and other diseases; these plants are therefore considered potential sources of antidiarrheal drugs. Among them, *Bidens odorata* Cav., commonly known as "Mozoquelite" or "Aceitilla," is used to treat gastrointestinal discomforts such as diarrhea [2, 3], as well as headaches and pain of the lumbar region [2, 4]. It has also been found that aqueous extracts of this plant have a diuretic effect [5]. However, there have been

no reports regarding the antidiarrheal activity of this plant. For this reason, we decided to study the antidiarrheal activity of *B. odorata* and determine the composition of the active extract.

2. Experimental

2.1. Plant Material. *Bidens odorata* was collected at Fortín de las Flores, Veracruz State, in September of 2010. The material was authenticated by taxonomist José García-Pérez, and a voucher specimen (SLPM 21668) was deposited in the Herbarium Isidro Palacios of the Instituto de Investigaciones de Zonas Deserticas of the Universidad Autónoma de San Luis Potosí. The aerial parts of the plant (leaves and branches) were dried in the shade and powdered.

2.2. Extracts Preparation. In a two-litre flask fitted with a reflux condenser, 125 g of dried, powdered *B. odorata* was extracted at boiling temperature for 4 h with 1500 mL of solvent (chloroform, methanol, or water), after which the mixture was cooled to room temperature and filtered. The chloroform and methanol extracts were dried under vacuum in a rotatory evaporator followed by a vacuum oven at room temperature for 12 h. The aqueous extract was lyophilised. The yields of the chloroform, methanol, and aqueous extracts were 5.88, 10.40, and 9.04%, respectively.

2.3. Separation of CBO and Component Identification of Active Fractions. The CBO was separated by column chromatography using a column packed with silica gel (Kieselgel 60, 70–230 mesh ASTM) and prepared in hexane as the mobile phase. The polarity was increased with ethyl acetate, and 100 mL fractions were collected and compared by thin layer chromatography; subsequently, those with the same pattern were pooled, resulting in 6 fractions. The active fraction (F4) was a waxy semisolid with a melting point (mp) of 36°C that was obtained with a hexane/ethyl acetate ratio of 8:2. F4 was separated by column chromatography using a column packed with silica gel (Kieselgel 60, 70–230 mesh ASTM) and prepared in chloroform as the mobile phase. The polarity was increased with ethyl acetate, and 100 mL fractions were collected and compared by thin layer chromatography; subsequently, those with the same pattern were pooled, resulting in 7 fractions. The active fraction (FR5) had an mp of 34°C and was obtained with chloroform/ethyl acetate (9:1 v/v).

2.4. Identification of the Active Compounds of F4 and FR5. The analysis of F4 and FR5 was performed on a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (Agilent Technology models 6890N and 5973) using a capillary column (DB-5HT) 15 m in length with a 0.25 mm internal diameter and 0.10 µm film thickness. We used a temperature program starting at 100°C for 3 min, followed by a heating rate of 10°C per min to 320°C, at which point the temperature was maintained for 5 min. Splitless injection was used with a ratio of 1:100, and the injector temperature was 320°C. The spectra were determined at 70 eV, and the mass range was analysed from 33 to 800 *m/z*. The compounds were identified from mass spectra and compared to spectra reported in the NIST database (Wiley09/NIST11).

2.5. Animals. Male CD1 mice (20–25 g) and male Wistar rats (180–250 g) from the Unidad de Produccion y Experimentacion de Animales de Laboratorio (UPEAL) of the Universidad Autónoma Metropolitana animal facility were housed in isolated cages under standardised conditions (dark/light 12/12 h) at 30°C and 50–55% humidity. The animals were supplied with rodent food (Pet Foods 5001) and water *ad libitum*. Prior to the study, the animals were submitted to a fasting period of 18–24 h with free access to water.

All experiments were performed according to the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigation in conscious animals [6].

2.6. Evaluation of the Effects of the Extract on Normal Defecation. Groups of five mice were individually placed in acrylic cages containing filter paper at the bottom [7]. CBO at a dose of 200 mg/kg or loperamide at 2.5 mg/kg was administered to the test groups, and a separate control group received only the vehicle. The total amount of faeces in each group was assessed every hour for the next 4 h. The percent reduction in the amount of faeces in the treated groups was calculated in comparison to the control animals (0% reduction).

2.7. Evaluation of Antidiarrheal Activity on Castor-Oil-Induced Diarrhea. Groups of 15 mice were administered the methanol or aqueous extract (200 mg/kg); loperamide (2.5 mg/kg); CBO (300, 200, 100, and 50 mg/kg); F4, a mixture of palmitic, linoleic, oleic, and stearic acid or each individual acid (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, and 1.55 mg/kg); or vehicle (0.1 mL) 30 min before the administration of castor oil (4 mL/kg). All administrations were *p.o.*

Following treatment, five animals of each group were placed separately in acrylic cages lined with filter paper that was changed every hour. The severity of the diarrhea was assessed each hour for 4 h. The total number of watery faeces excreted was scored and compared with the score from the control group. The total score of the diarrheic faeces of the control group was considered to be 100%, in accordance with the model described by Melo et al. [8], Litchfield and Wilcoxon [9], and Douglas et al. [10]. The results are expressed as a percentage of inhibition.

2.8. Evaluation of Antidiarrheal Activity on MgSO₄-Induced Diarrhea. Groups of 15 mice, separated into boxes of five animals each, were administered the CBO (200, 100, and 50 mg/kg), loperamide (2.5 mg/kg), or vehicle (0.1 mL) 30 min before the administration of MgSO₄ (4 mL/kg). The results are expressed as a percentage of inhibition.

2.9. Evaluation of Antidiarrheal Activity on AA- and PGE₂-Induced Diarrhea. The antidiarrheal activity of CBO (100 and 200 mg/kg) and F4 (100 mg/kg) was evaluated on diarrhea induced with AA (3 mg/kg) and PGE₂ (1 mg/kg). Three groups of 15 mice, separated into cages of five animals each, were administered the following treatments *p.o.*: group 1, CBO (200 mg/kg) or F4 (100 mg/kg); group 2, loperamide (2.5 mg/kg); and group 3, vehicle (0.1 mL). The treatments were administered 30 min after the three groups received L.P. AA or PGE₂.

Following treatment, the groups were separated into subgroups of five animals, which were placed separately in acrylic cages lined with filter paper that was changed every half an hour. The severity of the diarrhea was assessed every 30 min for 2 h. The total number of watery faeces excreted was scored and compared with the score from the control group. The total score of the diarrheic faeces of the control group was considered to be 100%, in accordance with the model described by Melo et al. [8].

2.10. Small Intestinal Transit. The inhibitory activity of CBO on intestinal transit was tested using the following procedure

[11]. Each group was administered vehicle, CBO (200 mg/kg), or loperamide (2.5 mg/kg) in a volume of 1.5 mL/animal, followed 30 min later by treatment with castor oil (4 mL/kg). A 2% suspension of graphite in 1.5% agar was orally administered to groups of 15 rats (1.5 mL/animal). At 30, 60, and 90 min after the administration of the graphite-agar suspension plus the castor oil, the rats were killed in groups of five, and the gastrointestinal tract was removed and opened. The distance travelled by the marker was measured and expressed as a percentage of the total length of the intestine from the pylorus to caecum. The results are expressed as percentages of intestinal transit and were subsequently compared to the results of the control group.

2.11. Evaluation of Effects on Ileum Contraction. Wistar male rats (300 g) were sacrificed by cervical dislocation. The abdomen was opened, and segments of ileum (10 cm proximal to the caecum) were flushed twice with aerated physiological salt solution (PSS) to remove the contents. The ileum was cut into segments approximately 1 cm long and placed in a 2 mL organ bath containing PSS with the following composition (mM): NaCl (118), NaHCO₃ (25), KCl (4.7), KH₂PO₄ (1.2), MgSO₄ (1.2), CaCl₂ (2.5), and D-glucose (11). The organ bath was maintained at 36°C with aeration through bubbling with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.4). Contractions of the ileum tissues were isometrically recorded through a force displacement transducer (Grass FT03) connected to a TBRS2 Grass polygraph. The tissues were allowed to equilibrate for 60 min, during which the PSS was changed every 20 min. The tissues were maintained under an optimal tension of 1 g prior to initiation of the experimental protocol. To expose the tissues to a single submaximal concentration of KCl (23 mM) and to elicit contractile activity, the ileum rings were bathed in a depolarisation solution (23 mM KCl) prepared by the equimolar substitution of NaCl for KCl. Control contractile responses were considered to be two successive similar responses after a group of tissues ($n = 6$, two tissues per rat) were incubated with CBO dissolved in 20 μ L ethanol-dimethyl sulphoxide (1:1) or distilled water for 10 min. According to the model described by Estrada-Soto et al. [12], each tissue was stimulated with a different concentration of carbachol chloride (0.01, 0.1, 1.0, 10, or 100 μ M), and the amplitude was measured.

The contractile response for the group treated with solvent alone was considered to be a response of 100% and was compared with the contractile response in tissues pretreated with 100 μ g/mL CBO, based on the method described by Estrada-Soto et al. [12].

2.12. Acute Toxicity. CBO was orally administered to groups of mice ($n = 3$) at single doses of 2500, 3750, or 5000 mg/kg. This range of doses used in mice followed the method presented by Lorke, D. and OECD/OCDE 420 [13, 14]. After administration, the animals were observed under open-field conditions for a 72-hour period. The number of animal deaths and signs of clinical toxicity were recorded. The median lethal dose (LD₅₀) was calculated by the method described by Litchfield and Wilcoxon [9].

TABLE 1: Antidiarrheal effect of the aqueous, chloroform, and methanol extracts of *B. odorata* on mice with castor-oil-induced diarrhea^a.

| Treatment | Doses mg/kg | Percentage of inhibition \pm s.e. |
|------------------|-------------|-------------------------------------|
| Vehicle | 0.1 mL | — |
| Aqueous extract | 200 | 43.8 \pm 3.6* |
| Methanol extract | 200 | 35.6 \pm 5.8* |
| CBO | 200 | 72.7 \pm 5.3* |
| Loperamide | 2.5 | 81.5 \pm 4.5 |

^aThe results are the mean of 15 animals \pm standard error.

* Significant difference was found: $P < 0.05$.

3. Statistics

The results are expressed as the means \pm s.e.m.

The differences between the mean values of intestinal transit were evaluated by Student's *t*-test, which is used in the analysis of equal variance of two groups with normal distribution [15]. The antidiarrheal activity and the effect on inhibition of ileum contractile activity were analysed using ANOVA and Tukey's post hoc test. These tests were used to compare the mean values of the antidiarrheal activity with the control group. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

4. Results and Discussion

The pharmacological activities of the chloroform, methanol, and aqueous extracts of *B. odorata* at doses of 200 mg/kg on mice with diarrhea induced by castor oil are shown in Table 1. The results indicated that the aqueous and methanol extracts of *B. odorata* inhibited the diarrhea induced by castor oil by less than 50%. A previous study [10] reported the antidiarrheal activity of chloroform, methanol, and aqueous extracts at doses of 100 mg/kg and the % of inhibition was 45.6, 26.1, and 22.4%, respectively; for this reason we decided to test a higher dose (200 mg/kg).

However, CBO extract significantly diminished the induced diarrhea by 72.72% in this model. The results of CBO on castor-oil- or MgSO₄-induced diarrhea are shown in Table 2. At a dose of 100 mg/kg, the extract reduced the diarrhea induced by MgSO₄ by 84.85%; this antidiarrheal effect was decreased at a dose of 200 mg/kg. Additionally, it was observed that the greatest effect of this extract in animals with castor-oil-induced diarrhea occurred at doses of 200 and 300 mg/kg (72.7 and 77.1%, resp.), indicating that the activity of CBO was not dose dependent at the doses tested when castor oil or MgSO₄ was used as the cathartic agent. The castor-oil-induced diarrhea model is suitable for the study of both secretory diarrhea and intestinal motility. Castor oil or its active component, ricinoleic acid, increases peristaltic activity and causes changes in the permeability of the intestinal mucosal membrane to electrolytes and water [16]. Additionally, the diarrhea induced by castor oil has been found to release prostaglandins [17] and to act on tachykinin receptors (NK1 and NK2) [16] and nitric oxide [18–20].

The osmotic properties of MgSO₄ prevent the reabsorption of water and ions, leading to increases in the volume of the intestinal content. This compound also promotes the

TABLE 2 Antidiarrheal activity of CBO on mice with castor-oil-, $MgSO_4$ -, arachidonic-acid-, and prostaglandin- E_2 -induced diarrhea^a.

| Cathartic agent | Treatment | Doses mg/kg | Percentage of inhibition |
|----------------------|-----------|-------------|--------------------------|
| Magnesium sulphate | Vehicle | 1 mL | 0.0 |
| | | 50 | 66.7 ± 6.7* |
| | CBO | 100 | 84.9 ± 3* |
| | | 200 | 69.7 ± 6.0* |
| | | Loperamide | 2.5 |
| Castor oil | Vehicle | 1 mL | 0.0 |
| | | 50 | 17.54 ± 4.6 |
| | CBO | 100 | 45.6 ± 6.3* |
| | | 200 | 72.7 ± 5.3* |
| | | Loperamide | 2.5 |
| Arachidonic acid | Vehicle | 0.1 mL | 0.0 |
| | | 100 | 45.8 ± 4.8* |
| | CBO | 200 | 62.5 ± 4.5* |
| | | Loperamide | 2.5 |
| Prostaglandins E_2 | Vehicle | 0.1 mL | 0.0 |
| | | 100 | 0.0 |
| | CBO | 200 | 0.0 |
| | | Loperamide | 2.5 |

^aThe results are the mean of 15 animals ± standard error.

^bSignificant difference was found: * $P < 0.05$.

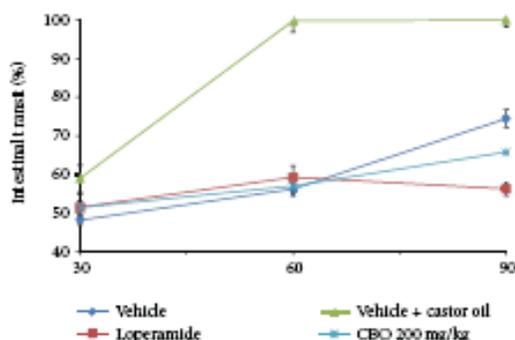


FIGURE 1 Effect of CBO (200 mg/kg) on intestinal transit in rats. The results are expressed as the mean of 5 determinations ± standard error. * $P < 0.05$ with respect to the castor-oil-treated group.

production of cholecystokinin from the duodenal mucosa [21], further increasing the secretions and exerting a positive motor effect on the small intestine [8, 21]. The activity of CBO in mice with diarrhea induced with AA or PGE_2 is shown in Table 2. The effect of a 200 mg/kg dose of CBO on diarrhea induced by AA was 62.5%, an effect that diminished at 100 mg/kg (45.8%). CBO at these two doses had no effect on diarrhea induced by PGE_2 . The results of this inhibition study suggest that CBO affects the release of prostaglandins [22].

CBO did not demonstrate any effect on the defecation of untreated mice.

The intestinal transit of untreated rats, castor-oil-treated rats, and CBO-treated (200 mg/kg) rats is shown in Figure 1.

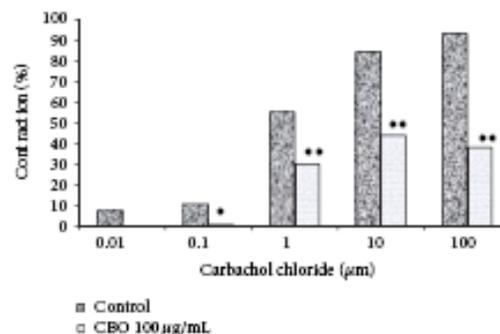


FIGURE 2 Effect of CBO (100 µg/mL) on ileum contractions stimulated with carbachol chloride. The results are expressed as the mean of 5 determinations ± standard error. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ with respect to the carbachol-chloride-treated group.

The percentage of intestinal transit observed in CBO-treated rats with respect to castor-oil-treated rats after 30, 60, and 90 min was 51.4%, 57%, and 68.4%. These results indicate that CBO inhibited intestinal motility.

Carbachol chloride, at micromolar concentrations, causes a concentration-dependent contraction of the ileum isolated from rats. CBO (100 µg/mL) had a significant inhibitory effect on the ileum stimulated with carbachol chloride at concentrations of 0.1 to 100 µg/mL (Figure 2), possibly due to the interaction of this extract with the carbachol chloride muscarinic receptor (μ_3) [23, 24]. The results of the present investigation demonstrate that CBO has antidiarrheal and antimotility activity in the experimental models studied.

TABLE 3: CG/MS results for the composition of F4 and FR5**.

| Compound number | Retention time | Compound | Percentage composition F4 | Percentage composition FR5 |
|-----------------|----------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 2 | 5.424 | Lauric acid | 0.08 ± 0.03 | |
| 5 | 6.427 | n-Eicosane | 0.03 ± 0.00 | |
| 11 | 8.055 | Myristic acid | 0.05 ± 0.01 | |
| 15 | 9.041 | Pentadecanoic acid | 0.26 ± 0.04 | |
| 20 | 9.829 | Palmitoleic acid | 0.25 ± 0.04 | |
| 21 | 10.206 | Palmitic acid | 15.03 ± 1.08 | 51.6540.977 |
| 24 | 11.046 | Margaric acid | 1.27 ± 0.07 | |
| 26 | 11.783 | Linoleic acid | 13.12 ± 0.39 | 32.379 |
| 27 | 11.852 | Oleic acid | 9.24 ± 1.73 | |
| 28 | 12.04 | Stearic acid | 3.39 ± 0.11 | 2.76 |
| 29 | 12.846 | Nonadecanoic acid | 0.09 ± 0.00 | |
| 30 | 13.386 | (11E,13E)-11,13-Icosadienoic acid | 0.20 ± 0.01 | |
| 31 | 13.446 | (11E)-11-Icosenoic acid | 0.25 ± 0.00 | |
| 32 | 13.72 | Eicosanoic acid | 1.89 ± 0.09 | |
| 33 | 14.5 | Heneicosanoic acid | 0.48 ± 0.01 | |
| 34 | 15.323 | Behenic acid | 3.23 ± 0.26 | |
| 36 | 16.042 | Tricosanoic acid | 1.44 ± 0.08 | |
| 37 | 16.531 | n-Heptacosane | 0.05 ± 0.01 | |
| 38 | 16.797 | Lignoceric acid | 3.55 ± 0.22 | |
| 40 | 17.388 | Squalene | 1.01 ± 0.08 | |
| 41 | 17.456 | Pentacosanoic acid | 0.63 ± 0.12 | |
| 43 | 18.159 | Hexacosanoic acid | 1.92 ± 0.11 | |
| 45 | 18.776 | Heptacosanoic acid | 0.30 ± 0.02 | |
| 46 | 19.205 | Hentriacontane | 0.20 ± 0.00 | |
| 47 | 19.47 | Octacosanoic acid | 3.14 ± 0.27 | |
| 54 | 20.687 | Melissic acid | 2.94 ± 0.19 | |
| 59 | 21.416 | Friedelan-3-one | 0.83 ± 0.39 | |
| 60 | 21.827 | Dotriacontanoic acid | 2.76 ± 0.23 | |
| 64 | 22.324 | Tritriacontanoic acid | 0.07 ± 0.01 | |
| 67 | 22.873 | Tetatriacontanoic acid | 1.13 ± 0.11 | |
| 76 | 27.466 | Octacosyl palmitate | 0.11 ± 0.01 | |

** Only identified compounds are presented. In F4, forty-five compounds were not identified; in FR5 seven compounds were detected and only four were identified.

TABLE 4: Effect of F4, palmitic, oleic, linoleic, and stearic acids, and their mixture at doses of 1.56 to 100 mg/kg on castor-oil-induced diarrhea.

| Doses mg/kg | Diarrhea inhibition (%) | | | | | |
|-------------|-------------------------|---------------|---------------|--------------|-------------|---------------|
| | F4 | Linoleic acid | Palmitic acid | Stearic acid | Oleic acid | Acids mixture |
| 1.56 | 10.6 ± 4.7 | 31.7 ± 5.7 | 22.2 ± 6.9 | 26.3 ± 12.1 | 27.3 ± 1.8 | 29.3 ± 3.3 |
| 3.12 | 22.4 ± 3 | 38.1 ± 4.8* | 30.2 ± 6.3 | 19.3 ± 4.6 | 20 ± 7.9 | 31.2 ± 1.5 |
| 6.25 | 20 ± 4.2 | 44.8 ± 4.6* | 60.3 ± 7.5* | 17.5 ± 9.3 | 54.5 ± 7.9* | 27.5 ± 2.1 |
| 12.5 | 50.5 ± 6.1* | 44.9 ± 1.7* | 58.6 ± 6* | 19.3 ± 4.7 | 52.7 ± 6.3* | 53.2 ± 8.3* |
| 25 | 67.6 ± 3.6** | 53.2 ± 6.3* | 60.8 ± 2.5* | 12.3 ± 4.7 | 50.9 ± 6.5* | 46.7 ± 4.2* |
| 50 | 74.7 ± 1.0** | 46.8 ± 7.6* | 56.9 ± 1.3* | 14.0 ± 3.6 | 52.7 ± 6* | 47.7 ± 3.6* |
| 100 | 90.1 ± 3.2** | 42.1 ± 5.6* | 67.5 ± 4.9* | 43.9 ± 0.8* | 58.2 ± 7.2* | 70.6 ± 8.7** |

The results are expressed as the mean of 15 animals ± standard error. *P < 0.05 and **P < 0.01 with respect to the C-group.

CBO did not demonstrate toxic effects at the doses tested.

For this reason, CBO was separated by column chromatography. Eighteen fractions were obtained and compared by thin layer chromatography, which reduced the extract to 6 fractions. The antidiarrheal effect of these six fractions was tested on mice with castor-oil-induced diarrhea and the major effect was observed with F4 (90.1%), which was separated by chromatography, obtaining 14 fractions, which were compared by thin layer chromatography to obtain 7 fractions. The active fraction was FR5, which inhibited diarrhea induced by castor oil by 92.1%. These results are similar to those of F4, and the yield of FR5 was very low, so we proceeded with the study with F4.

The antidiarrheal effect of F4 on mice with diarrhea induced by AA or prostaglandin E₂ was also tested. We found that F4 at doses of 100 mg/kg did not have an effect on diarrhea induced by prostaglandin E₂; however, in diarrhea induced by AA, the inhibition was 72.9%. These results suggest that F4 inhibits the biotransformation of arachidonic acid to prostaglandin, as suggested by Manning et al. and Rodríguez-Lagunas et al., as AA is a substratum of prostaglandins [25, 26].

The composition of F4 and FR5 was obtained by CG-MS, and the results are shown in Table 3. We found that F4 has 76 components, the main compounds of which are palmitic acid (9.14%), linoleic acid (13.12%), trans-oleic acid (9.24%), stearic acid (3.39%), lignoceric acid (3.55%), octacosanoic acid (3.14%), and behenic acid (3.23%). FR5 has 7 compounds, four of which are palmitic acid, linoleic acid, trans-oleic acid and stearic acid; for this reason, we tested only these four fatty acids.

The results of the antidiarrheal activities of these four components individually, a mixture of all four components, and F4 are shown in Table 4. At a dose of 25 mg/kg, linoleic acid inhibited diarrhea by 53.2%; this effect is the same as what is found at doses of 50 and 100 mg/kg. Similar results were observed at doses of 6.25 to 100 mg/kg when palmitic acid was tested; the maximum effect was at a dose of 100 mg/kg (67.5% inhibition). Stearic acid showed activity only at a dose of 100 mg/kg (43.9%). Oleic acid at doses of 1.56 and 3.12 mg/kg had no effect. The effect of oleic acid was 54.5% at a dose of 6.25 mg/kg, which did not change when the dose was further increased. For the mixture of the four acids (at the relative proportions detected in F4) at a dose of 1.56 mg/kg, the inhibition was 29.3%, reaching 70% at a dose of 100 mg/kg, which is higher than that obtained with any other fatty acid tested. These results suggest that there could be a synergic effect of the components of F4.

Linoleic acid has been previously reported to have activity on coronary diseases, hypertension, cancer, and rheumatoid arthritis [27]. Palmitic acid helps to maintain low blood levels of serum cholesterol and low-density lipoproteins and can help avoid some immunological responses [28]. There are no scientific reports regarding the antidiarrheal activity of these two acids, and we also did not find any reports about the pharmacological activities of stearic or oleic acid with respect to *B. odorata*.

5. Conclusions

The present study validates the use of *B. odorata* in folk medicine as a remedy for intestinal cramps and diarrhea and suggests that this plant could possibly be used for the production of a phytomedicine.

Further pharmacological studies will be necessary to propose the exact mechanism of action.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank Drs. Norma C. Cardenas Ortega and Marco Martín Gonzalez Chavez for their comments and support.

References

- [1] C. Boschi-Pinto, L. Velebit, and K. Shibuya, "Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 86, no. 9, pp. 710–717, 2008.
- [2] Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana, 2012, <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>.
- [3] A. Argueta, L. Cano, and M. Rodarte, *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I*, Instituto Nacional Indigenista, México City, Mexico, 1994.
- [4] M. Martínez, *Las plantas medicinales de México*, Ediciones Botas, 6th edition, 1968.
- [5] M. E. Meléndez Camargo, B. Berdeja, and G. Miranda, "Diuretic effect of the aqueous extract of *Bidens odorata* in the rat," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 95, no. 2-3, pp. 363–366, 2004.
- [6] *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*, Academia Nacional de Medicina, Academy Press, Edición mexicana edition, 1999.
- [7] J. Galvez, A. Zarzuelo, M. E. Crespo, M. D. Lorente, M. A. Ocete, and J. Jimenez, "Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent," *Planta Medica*, vol. 59, no. 4, pp. 333–336, 1993.
- [8] M. D. F. F. Melo, G. Thomas, and R. Mukherjee, "Antidiarrhoeal activity of bisnordihydrotoxiciferine isolated from the root bark of *Strychnos trinervis* (Vell.) Mart. (Loganiaceae)," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 40, no. 1, pp. 79–82, 1988.
- [9] J. Litchfield and F. Wilcoxon, "A simplified method of evaluating dose-effect experiments," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 96, pp. 99–113, 1949.
- [10] C. Douglas, *Design and Analysis of Experimental*, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, Arizona State University, Phoenix, Ariz, USA, 5th edition, 2001.
- [11] P. Vischer and J. Casals Stenzel, "Influence of prostacyclin and indomethacin on castor oil-induced gastrointestinal effects in rats," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 35, no. 3, pp. 152–156, 1983.
- [12] S. Estrada-Soto, D. González-Maldonado, P. Castillo-España, F. Aguirre-Crespo, and J. C. Sánchez-Salgado, "Spasmodic effect of *Mentha pulegium* L. involves ionic flux regulation in rat ileum strips," *Journal of Smooth Muscle Research*, vol. 46, no. 2, pp. 107–117, 2010.

- [13] D. Lorke, "A new approach to practical acute toxicity testing," *Archives of Toxicology*, vol. 54, no. 4, pp. 275–287, 1983.
- [14] OECD/OCDE 420, "Guideline for testing of chemicals, Acute oral toxicity-fixed dose procedure," 2001.
- [15] D. Zavala, *Estudio Fitoquímico y Farmacológico de Bidens odorata Cav., Heliotropium curassavicum L y Chrysactinia mexicana Gray [Tesis de Maestría]*, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Coyoacan Ciudad de México, México City, Mexico, 2006.
- [16] T. Croci, M. Landi, X. Emonds-Alt, G. Le Fur, J.-P. Maffrand, and I. Manara, "Role of tachykinins in castor oil diarrhoea in rats," *British Journal of Pharmacology*, vol. 121, no. 3, pp. 375–380, 1997.
- [17] F. Awouters, C. J. E. Niemegeers, F. M. Lenaerts, and P. A. Janssen, "Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 30, no. 1, pp. 41–45, 1978.
- [18] N. Mascolo, A. A. Izzo, G. Autore, F. Barbato, and E. Capasso, "Nitric oxide and castor oil-induced diarrhea," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 268, no. 1, pp. 291–295, 1994.
- [19] A. A. Izzo, T. S. Gaginella, N. Mascolo, and E. Capasso, "Recent findings on the mode of action of laxatives: the role of platelet activating factor and nitric oxide," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 19, no. 10, pp. 403–406, 1998.
- [20] M. Uchida, Y. Kato, K. Matsueda, R. Shoda, A. Muraoka, and S. Yamato, "Involvement of nitric oxide from nerves on diarrhea induced by castor oil in rats," *Japanese Journal of Pharmacology*, vol. 82, no. 2, pp. 168–170, 2000.
- [21] M. Shahriar, M. S. Bhuiya, M. T. H. Khan, M. A. Gafur, and M. S. K. Choudhri, "Pharmacological study of *Symplocos racemosa* Roxb," *Hamdard Medicus XLIII*, vol. 2, pp. 8–18, 2000.
- [22] R. Martín-Venegas, S. Roig-Pérez, R. Ferrer, and J. J. Moreno, "Arachidonic acid cascade and epithelial barrier function during Caco-2 cell differentiation," *Journal of Lipid Research*, vol. 47, no. 7, pp. 1416–1423, 2006.
- [23] W. Hu, S. Mahavadi, F. Li, and K. S. Murthy, "Upregulation of RGS4 and downregulation of CPI-17 mediate inhibition of colonic muscle contraction by interleukin-1 β ," *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 293, no. 6, pp. C1991–C2000, 2007.
- [24] X. Bian and J. J. Galligan, " α 2-Adrenoceptors couple to inhibition of R-type calcium currents in myenteric neurons," *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 19, no. 10, pp. 845–855, 2007.
- [25] B. P. Manning, K. A. Sharkey, and G. M. Mawe, "Effects of PGE₂ in guinea pig colonic myenteric ganglia," *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 283, no. 6, pp. G1388–G1397, 2002.
- [26] M. J. Rodríguez-Lagunas, R. Martín-Venegas, J. J. Moreno, and R. Ferrer, "PGE₂ promotes Ca²⁺-mediated epithelial barrier disruption through EP₁ and EP₄ receptors in Caco-2 cell monolayers," *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 299, no. 2, pp. C324–C334, 2010.
- [27] L. Li, H. Li, Q. Li et al., "An 11-bp insertion in *Zea mays* fatb reduces the palmitic acid content of fatty acids in maize grain," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, Article ID e24699, 2011.
- [28] P. Liu, S.-R. Shen, H. Ruan, Q. Zhou, L.-L. Ma, and G.-Q. He, "Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented Chinese pickles," *Journal of Zhejiang University B*, vol. 12, no. 11, pp. 923–930, 2011.