

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE *MELIA AZEDARACH*, *SYZGIUM AROMATICUM* Y *CINNAMOMUM ZEYLANICUM* CON EFECTO INHIBITORIO SOBRE BACTERIAS Y HONGOS

BEATRIZ PADRÓN MÁRQUEZ, AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS, CATALINA RIVAS MORALES, MARIA JULIA VERDE STAR*

En la actualidad, las enfermedades gastrointestinales son frecuentes en la población. En la literatura internacional aparece información cada vez más inquietante sobre la elevada frecuencia de enfermedades infecciosas por estafilococos penicilinorresistentes y por bacilos Gram-negativos pertenecientes las enterobacterias, muchos de éstos aunque forman parte de la flora intestinal, al igual que hongos que normalmente no son patógenos, pueden serlo de forma oportunista e incluso causar infecciones fatales cuando las defensas normales del huésped son insuficientes.¹

En otro tiempo las plantas eran la base principal para la preparación de medicamentos y, en vista de la gran resistencia de los microorganismos a los fármacos ya existentes, pueden seguir siendo la fuente principal de principios activos.

La importancia de los productos naturales en medicina se basa no solamente en sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos sino en la posibilidad que ofrecen para poder desarrollar a partir de sus estructuras nuevas drogas.² Sin embargo, tantos años de terapéutica antibiótica han producido profundas modificaciones de la microflora patógena, sobre todo en el ambiente hospitalario, donde el uso continuo de fármacos antibacterianos ha favorecido la selección de las cepas menos sensibles o de las cepas portadoras de resistencia contra uno o más antibióticos, y la toxicidad selectiva de los ya existentes se ve limitada por la similitud de las estructuras eucarióticas de los hongos filamentosos y levaduras con células del organismo;^{3,4} por lo cual es necesaria la búsqueda constante de nuevos fár-

macos antibióticos que contrarresten la resistencia de los microorganismos a los ya existentes.

Metodología

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de Química Analítica y Química de Productos Naturales del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Material microbiológico

Cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* y *Enterobacter aerogenes*.

Cepas fúngicas: *Trichophyton tonsurans*, *Cryptococcus neoformans* y *Sporotrix schenckii*.

Material vegetal:

Familia:

Meliaceae

Myrtaceae

Lauraceae^{5,6}



* Laboratorios de Química Analítica y Productos Naturales del Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. E-mai: beatrizpadron@hotmail.com

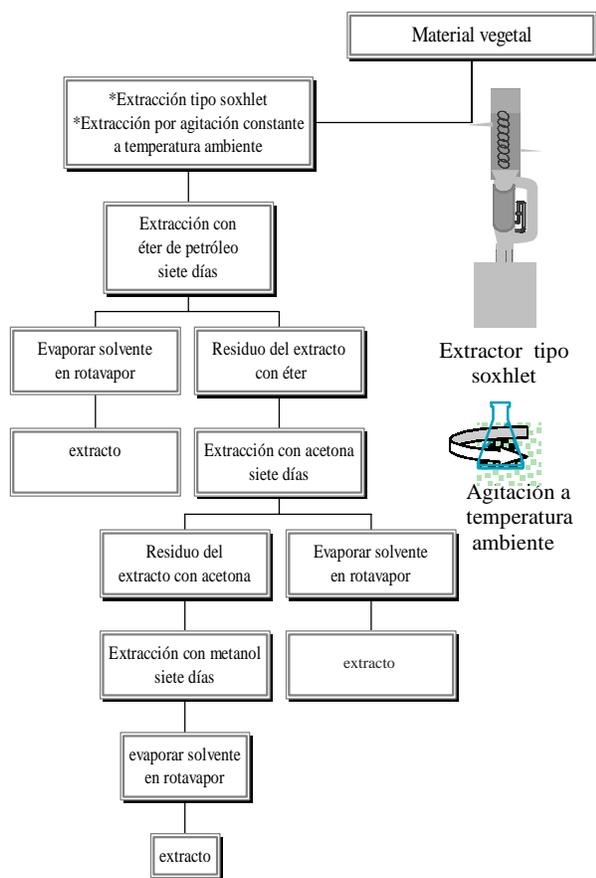


Fig.1 Metodología de obtención de los extractos.

Preparación del material vegetal y obtención de los extractos

Las hojas de *Melia azedarach* (canelo) fueron recolectadas al sur del área metropolitana de Monterrey, N. L., en agosto de 1998, se secaron a la sombra durante ocho días; *Syzygium aromaticum* (clavo) y *Cinnamomum zeylanicum* (canela) se compraron en el mercado Juárez de Toluca en el estado de México en septiembre del mismo año, posteriormente se dejó un espécimen de cada planta en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, donde fueron identificadas y se les otorgaron los números de herbario 023492, 023493 y 023494, respectivamente. Después fueron molidas cada una por separado en un molino, para extraerse después por medio de dos técnicas: maceración a temperatura ambiente y extracción continua tipo soxhlet (Fig. 1).

Pruebas microbiológicas

Se utilizó el medio líquido C. Rivas (patente en trámite No. 9810892) para la activación de las cepas bacterianas, incubándolas por 18-24 h a 37°C; los hongos fueron activados en caldo Sabouraud modificado (patente en trámite No. 9810892) con un tiempo de incubación de dos días para *C. neoformans* y de 7-15 días para *T. tonsurans* y *S. schenckii*.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos se utilizó el método de difusión en placa de agar y los medios de cultivo antes mencionados; se colocaron 100 µl del inóculo con una micropipeta Eppendorf (estandarizado a 6×10^6 UFC por el método turbidimétrico de Mac Farland) difundiendo homogéneamente con un asa Driblasky, luego se colocaron discos de papel filtro impregnados con 10 ml del extracto (previamente estéril con membranas de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µl) y un control negativo con etanol, después se incubaron durante 18-24 h a 37°C (bacterias) y a temperatura ambiente de 2-15 días (hongos). Después de este período se midió el halo de inhibición formado. ⁷

Separación cromatográfica de los extractos activos

Se realizaron cromatografías en capa fina, usando como adsorbente Sílica Gel 7 G, en una proporción de 10 g de Sílica en 40 mL de agua, la mezcla anterior se vertió sobre placas de vidrio previamente desengrasadas, se les dejó secar al aire y enseguida se activaron en una estufa durante 1h a 115°C. Luego, mediante un capilar, se distribuyó una porción del extracto y se dejó evaporar el solvente para efectuar el corrimiento dentro de una cámara de vidrio con la mezcla de solventes elegidos, los solventes con los que se logró una mejor separación cromatográfica fueron el éter de petróleo, el benceno y la acetona mezclados en diferentes proporciones entre sí o con otros solventes. Para localizar los componentes que no son apreciables al visible, se usaron luz UV y vapores de yodo, se marcaron y se les tomó el Rf a cada uno. ⁸

Evaluación de las fracciones activas

Se utilizó una técnica de bioautografía modificada, la cual puede detectar concentraciones mínimas del

compuesto responsable de la actividad biológica y se observa a simple vista la zona de inhibición.^{9, 10} Para esto se hicieron cromatogramas en capa fina utilizando placas de vidrio de 2.5 x 7.5 cm con las manchas ya localizadas. Se colocó el cromatograma en una caja petri y se esterilizó con luz UV por dos horas; después de esto bajo el mechero se colocó un trozo largo, angosto y de unos 3 mm de espesor de medio sólido C. Rivas (se colocó un algodón húmedo a un lado del cromatograma para evitar la deshidratación del medio). Luego se sembró el microorganismo con una micropipeta y se distribuyó uniformemente con una asa bacteriológica. Se incubó durante el tiempo necesario para cada microorganismo y se midió el área sin crecimiento microbiano.^{7, 9}

Identificación de grupos funcionales

A los extractos se les realizaron las siguientes pruebas químicas para determinar su naturaleza química: Shinoda (flavonoides), esteroides y terpenoides (Liebermann- Buchard), alcaloides (Dragendorff), Insaturaciones (Br_2/CCl_4), oxhidrilos fenólicos (FeCl_3 5%), cumarinas (NaOH 10%) y sesquiterpenlactonas (Baljet).^{11, 12, 13} Se separó la fracción activa utilizando CCF preparativa con placas de 20 x 20 cm y sílica gel 7 G como soporte, esta fracción se raspó de la sílica, se resuspendió en etanol, se centrifugó, se decantó el líquido con la fracción y se le realizó un análisis espectroscópico (IR) para confirmar la presencia de esteroides.

Resultados

Los resultados obtenidos que se muestran en la tabla I indican que de los extractos del canelo (*Melia azedarach*) el etéreo en soxhlet (1.1) presentó una fuerte actividad antimicrobiana contra *S. typhi*, *B. cereus* y el acetónico en soxhlet (2.1), inhibió fuertemente a *T. tonsurans*; se observó menor actividad de los extractos de mayor polaridad y por el método de maceración, en el metanólico por agitación (3.2) se observa una actividad casi nula.

Se comprobó la efectividad contra todos los microorganismos probados con los extractos de canela (*C. zeylanicum*) excepto los realizados con metanol por los dos métodos; *Bacillus cereus* y *Trichophyton tonsurans* fueron los más sensibles con los extractos etéreo y acetónico por agitación; los

menos sensibles *Salmonella typhi* y *Cryptococcus neoformans* (tabla II).

Tabla I. Actividad biológica de los extractos de *Melia azedarach* (canelo)

Microorganismos	Número de extracto					
	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2
<i>Escherichia coli</i>	-	-	++	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+	++	-
<i>Salmonella typhi</i>	+++	-	+++	-	++	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	++	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+++	-	+++	-	++	-
<i>Trichophyton tonsurans</i>	-	-	+++	++	+	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+ -	+ -	+	+	-	++
<i>Sporotrix schenckii</i>	-	-	+	+	-	-

1.1, 2.1, 3.1= extractos hechos en soxhlet con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

1.2, 2.2, 3.2= extractos hechos en agitación continua a temperatura ambiente con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

N=3 + halo de hasta 20mm, ++ halo de 20-30 mm, +++ halo > 30mm, + fungistático o bacteriostático

Por otra parte, los realizados con clavo (*Syzygium aromaticum*) presentaron inhibición tanto en los extractos no polares como con los polares por los dos métodos excepto contra *E. aerogenes* que sólo fue fuertemente afectado por el etéreo con soxhlet (7.1), como se puede observar en la tabla No. 3 los extractos de éter de petróleo y acetona tuvieron una actividad relevante contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Trichophyton tonsurans*, *Cryptococcus neoformans* y *Sporotrix schenckii*.

En las pruebas químicas de los extractos más activos se observó que la mayoría de los extractos activos fueron positivos para flavonoides, cumarinas y oxhidrilos fenólicos. El extracto más activo (canela soxhlet –éter de petróleo) fue positivo para las pruebas de Liebermann- Burchard (para esteroides y triterpenoides), de shinoda (para flavonoides) y de dragendorff (para alcaloides).

Los extractos de *C. zeylanicum* con éter de petróleo con soxhlet (4.1) y el *S. aromaticum* con éter de petróleo con agitación (7.2) presentaron el ma-

por número de fracciones con actividad y el extracto 4.1 sobre mayor cantidad de microorganismos tanto bacterias como hongos.

Tabla II. Actividad biológica de los extractos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela)

Microorganismos	Número de extracto					
	4.1	4.2	5.1	5.2	6.1	6.2
<i>Escherichia coli</i>	+++	+	++	++	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+	-	+++	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	++	+	++	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+++	+++	-	+	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	+++	+	+	+++	-	++
<i>Trichophyton tonsurans</i>	+++	+++	+++	+++	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	++	++	+	++	-
<i>Sporotrix schenckii</i>	+++	+++	++	+++	-	-

4.1, 5.1, 6.1= extractos hechos en soxhlet con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

4.2, 5.2, 6.2= extractos hechos en agitación continua a temperatura ambiente con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

N=3 + halo de hasta 20mm, ++ halo de 20-30 mm, +++ halo > 30mm, + fungistático o bacteriostático

Tabla III. Actividad biológica de los extractos de *Syzgium aromaticum* (clavo)

Microorganismos	Número de extracto					
	7.1	7.2	8.1	8.2	9.1	9.2
<i>Escherichia coli</i>	++	-	++	++	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+++	+	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	++	+	-	++	-	++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+++	+-	+	-	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	++	-	++	+++	-	+
<i>Trichophyton tonsurans</i>	+++	-	+++	+++	+++	+++
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+++	+	++	+	+++	++
<i>Sporotrix schenckii</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++

7.1, 8.1, 9.1= extractos hechos en soxhlet con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

7.2, 8.2, 9.2= extractos hechos en agitación continua a temperatura ambiente con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

N=3 + halo de hasta 20mm, ++ halo de 20-30 mm, +++ halo > 30mm, + fungistático o bacteriostático

Discusión

Los extractos de las hojas de *M. azedarach*, corteza de *C. zeylanicum* y los capullos de *S. aromaticum* mostraron inhibición del crecimiento al menos uno de los microorganismos probados. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Hamer-Schmidt y cols.(1993)¹⁷ en *C. zeylanicum* y *S. aromaticum*, quienes también observaron mayor inhibición en hongos que en bacterias.¹⁴ En este trabajo se encontró que *B. cereus* fue el más sensible y *E. aerogenes* el menos, los mismos resultados obtuvo Sánchez, (1995),³ *M. azedarach* presenta actividad contra diferentes microorganismos,⁴ en este trabajo el extracto etéreo en soxhlet (1.1) presentó actividad contra *S. typhi* y *B. cereus* al igual que el acetónico que además inhibió a *T. tonsurans* contrario a lo esperado, puesto que el calor es considerado como un agente destructor de algunos principios y sólo se ha reportado actividad bactericida en los extractos acuosos de los frutos.⁶ En *C. zeylanicum* no hubo diferencia significativa entre ambos métodos, pero sí hubo una disminución de la actividad conforme se aumenta la polaridad del solvente; *C. zeylanicum* es igualmente activo sobre hongos y bacterias con los extractos etéreos por agitación y soxhlet (4.1, 4.2) y el acetónico por agitación (5.2). Sánchez, (1995)³ trabajó con extractos etanólicos de *C. zeylanicum* y *S. aromaticum* donde reportó una fuerte inhibición de *B. cereus* y *S. aureus*, resultados similares a los mostrados por los extractos 4.1, 5.2, 7.2 y 8.2. *S. aromaticum* es moderadamente activo sobre bacterias y mayor en hongos, esta actividad también se ha publicado por Hammer-Schmidt, (1993)¹⁷ y por P. Hilli en 1997.¹⁴ Se encontraron flavonoides en *C. zeylanicum* en el extracto etéreo por ambos métodos de extracción, al igual que Aguilar, (1982)⁵ reportó flavonoides en esta misma especie; además dieron positivas las pruebas para alcaloides, triterpenoides y esteroides en el extracto etéreo en soxhlet, este último grupo se confirma con el espectro infrarrojo, la fracción activa presenta absorciones características de OH en 3438 cm⁻¹, en 2920 cm⁻¹ para C-H y en 1098 cm⁻¹ característico de C-O.

En *S. aromaticum* en el extracto etéreo encontramos flavonoides y en el extracto metanólico esteroides, como reportó Wren, (1994);⁶ además encontramos cumarinas y alcaloides en el extracto acetónico con agitación y oxhidrilos fenólicos en

todos sus extractos por ambos métodos, los compuestos fenólicos ya habían sido mencionados por Coleman & Anderson, (1985)¹⁵ como respuesta de las plantas en asociaciones incompatibles entre planta y hongo.

En *Melia azedarach* se ha reportado la presencia de alcaloides Aguilar, (1993)¹⁰ triterpenoides y esteroides Wren, (1994)⁶, los cuales no fueron detectados con las pruebas químicas realizadas. Se encontró presencia de flavonoides y cumarinas en el extracto etéreo por soxhlet.

De los 11 extractos activos que se obtuvieron la mejor separación se llevó a cabo con éter de petróleo, benceno y acetona, en la mayoría de ellos.

El extracto etéreo de *C. zeylanicum* por el método de soxhlet mostró una actividad relevante sobre *E. coli*, *S. aureus*, *E. aerogenes*, *B. cereus*, *T. tonsurans* y *S. schenckii*, en cuatro fracciones separadas por CCD con Rf de 0.52, 0.59, 0.64 y 0.82, lo cual indica que el extracto no polar contiene compuestos con actividad biológica de amplio espectro que en concentraciones muy pequeñas pudieron ser detectadas por el método de bioautografía modificado por Verástegui (1999)¹¹, lo cual concuerda con reportes de Oranday (1998)¹⁶ sobre compuestos no polares extraídos de plantas que tienen esta actividad.

Conclusiones

El método de extracción en soxhlet para *Melia azedarach* fue mejor que el método de agitación, la diferencia no es significativa en las otras dos plantas.

El extracto etéreo en soxhlet de *M. azedarach* presentó actividad relevante sobre *S. typhi* y *B. cereus* y dio positiva para las pruebas de flavonoides y cumarinas; en el acetónico contra *S. typhi*, *B. cereus* y *T. tonsurans*. Por separación cromatográfica del extracto etéreo en soxhlet obtuvimos 11 fracciones con un eluyente de éter de petróleo-benceno-acetona (40:20:5), las cuales por el método de bioautografía mostraron actividad sobre *S. typhi* y *B. cereus*, mientras que en el extracto acetónico en ninguna de las fracciones se observó actividad inhibitoria.

S. aromaticum fue la especie que presentó mayor actividad contra todos los microorganismos estudiados aún con los extractos metanólicos. El extracto etéreo con soxhlet dio pruebas positivas para flavonoides, insaturaciones, oxhidrilos fenólicos y cumarinas.

Al realizar el corrimiento cromatográfico de este extracto con éter de petróleo y metanol (30:5), se obtuvieron cinco fracciones, que evaluadas por el método bioautográfico, dos de ellas presentaron actividad considerable contra el 50 % de los microorganismos probados.

El extracto etéreo de *C. zeylanicum* por soxhlet (4.1) y el extracto acetónico por agitación (5.2) inhibieron a la mayoría de los microorganismos probados. El etéreo dio positivo para las pruebas de flavonoides, alcaloides, esteroides y triterpenoides.

La separación cromatográfica de dicho extracto se llevó a cabo con éter de petróleo-benceno-acetona (40:20:5) y dio 12 fracciones de las cuales cuatro presentaron actividad por el método de bioautografía en los microorganismos probados, excepto contra *S. typhi*.

El extracto etéreo de *C. zeylanicum* fue el que presentó la mayor actividad de todos los extractos probados.

Resumen

Se hicieron preparaciones de extractos, pruebas microbiológicas contra ocho microorganismos y caracterización de los compuestos activos de seis extractos obtenidos por dos métodos de extracción, de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum*, teniendo como objetivos comparar la eficacia de las técnicas de extracción, y evaluar la actividad antimicrobiana de estas plantas, partiendo del antecedente de que son utilizadas como remedios caseros. Se observó mayor actividad en el extracto etéreo de *Cinnamomum* con soxhlet; encontrando flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides. Se localizaron las bandas con actividad y se confirmó la presencia de esteroides por medio del espectro infrarrojo.

Palabras clave: Meliaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Patógenos gastrointestinales, Dermatofitos.

Abstract

Six plant extracts of *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum*, respectively, were made, extracts being obtained through two methods. Microbiological tests against eight microorganisms and active compound characterization were performed. Our aim was to compare the

effectiveness of two extraction methods and to evaluate these plants' activity because of reports of their being used as home remedies. Higher activity was observed in ether extracts of *Cinnamomum* by soxhlet, which had flavonoids, alkaloids, triterpenes and esters. Active bands were found and esterol presence was confirmed through infrared spectroscopy.

Keywords: Meliaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Gastrointestinal and dermatophyte pathogens.

Referencias

- Ríos J. L., Recio M.C. and Villar A. 1988. Screening Methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, No. 23. pp 127-149.
- Becker J. M., Covert N.L., Shebagamurthi., Steinfeld A.S. and Naider F. 1983. Polyoxin D Inhibits Growth of Zoopathogenic Fungi. *American Society for Microbiology*. Vol 23. No. 6. pp 926-929.
- Sánchez G. C. 1995. Efecto de extractos de 33 plantas sobre el crecimiento de 11 especies bacterianas causantes de enfermedades gastrointestinales. Tesis F.C.B., UANL, pp 7-30.
- Watt J. M., Breyer-B. M. G. 1962. *Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. Editorial Livingstone. pp 745-751.
- Aguilar C. A., Zolla C. 1982. *Plantas tóxicas de México*. Talleres de La Fuente Impresores. pp 146-147.
- Wren R. C. 1994. *Enciclopedia de medicina Herbolaria preparados Botánicos*. Tomo 1 y 2. Editorial Grijalvo.
- Jawetz. 1990. *Microbiología médica*. Editorial Manual Moderno. 13° edición. Cap. 3-7
- Muñoz M. 1981. *Prácticas de instrumentación analítica III*. Editorial LIMUSA. Primera edición. pp 42-44.
- Symonds N. 1972. La resistencia bacteriana. *C. M. A. Journal*. pp. 105, 587.
- Verástegui M. 1998. Bioautografía para detectar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas. *Revista Sociedad Química de México*. Vol. 42.
- Villarreal S. D. 1987. Estudio fitoquímico y actividad biológica de *Cassia greggii*. Tesis F.C.B., UANL, pp 12 - 16.
- Quintanilla L. G. 1998. Contribución al estudio fitoquímico y efecto fisiológico de *Abutilon malacum*. Tesis F.C.B., U.A.N.L. pp 7-20
- Velázquez G. C. 1997. Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de *Tiquila canescens*. Tesis F.C.B., U.A.N.L. pp 12 -14.
- Hilli P., Evans C. S. y Veness R. G. 1997. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *The Society for applied bacteriology*. Vol. 24. pp 269-275.
- Coleman, M.E. y Anderson, A.J. 1985. Plant Responses to *Rizopogon vinicolor* elicitora. *Phytopatol*. Vol. 75. 1283. (Abstract).
- Oranday C. A. 1998. Compuestos de algas marinas del estado de Tamaulipas y su actividad farmacológica. Tesis Facultad de Medicina, U.A.N.L. pp 102.
- Hammerschmidt, P.J., Clark, A.M. and Soliman, F.M. 1993. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Jasonia candicans* and *Jasonia montana*. *Planta Medica* Vol. 59. pp 68-78.