

**Universidad Autónoma Metropolitana**  
*Unidad Iztapalapa*

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
ESPECIALIZACIÓN EN ACUPUNTURA Y FITOTERAPIA



**EFFECTO DE UN EXTRACTO DE *CINNAMOMUN VERUM*  
SOBRE LA PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE BACTERIAS Y  
LEVADURAS**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS  
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:

ESPECIALISTA EN ACUPUNTURA Y FITOTERAPIA

**PRESENTA:**

**MED. CIR. VICTOR ERICK SAUCEDO GONZÁLEZ**

DIRECTOR

DR. RODOLFO VELASCO LEZAMA

ASESOR

DR. FERMÍN AGUIRRE GARCÍA

**MÉXICO, D.F.**

**Junio 20, 2014.**

EL JURADO DESIGNADO POR LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIDAD IZTAPALAPA APROBÓ LA IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS QUE PRESENTÓ:

**VICTOR ERICK SAUCEDO GONZÁLEZ**

El día 20 de junio del año 2014.

**Sinodales:**

PRESIDENTE:

DR. JOSÉ FEDERICO RIVAS VICHIS



SECRETARIO:

DR. FERMÍN AGUIRRE GARCÍA



VOCAL:

DR. RODOLFO VELASCO LEZAMA



## **COMITÉ TUTORIAL**

### **DIRECTOR DE LA IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS**

**DR. RODOLFO VELASCO LEZAMA**

Profesor Titular C, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana.

### **ASESOR DE LA IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS**

**DR. FERMÍN AGUIRRE GARCÍA**

Profesor Titular C, Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana.

## **La presente investigación se realizó en:**

El Laboratorio de Tecnología Farmacéutica del Área de Investigación de Productos Naturales del Departamento de Biotecnología y en el Laboratorio de Microbiología del Área de Investigación de Diferenciación y Proliferación Celular del Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana.

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Rodolfo Velasco Lezama por haberme dirigido en el desarrollo de la presente idónea comunicación, por su paciencia, tiempo y dedicación para que este proyecto fuese posible.

Al Dr. Fermín Aguirre García por haberme motivado a continuar con esta idea que surgió a lo largo de la Especialización, así como las facilidades que me otorgó para la realización en el procesamiento de la canela.

A mi esposa y a mis hijas por motivarme a seguir adelante con mis metas y proyectos de mi vida, sin ellas sería más difícil la realización de todos mis sueños y triunfos.

Finalmente agradezco a Dios por haberme guiado en la vida a ser un hombre de bien y a mi abuela por ayudarme a mantenerme de pie en los momentos más difíciles de mi vida y también en mis alegrías, por siempre estarás en mi corazón (Leonor Fuentes).

Agradecimientos a los biólogos Reyna Cerón y Jorge Santana C. por la identificación taxonómica de la planta en estudio y por la incorporación de dicho ejemplar a la colección del Herbario de la

Unidad Iztapalapa de la UAM. A la Q.B.P. Rafaela Tapia Aguilar del Laboratorio de Hematología Experimental, por su ayuda en los ensayos de actividad antimicrobiana.

A todos ellos doy las gracias por su tiempo, paciencia y apoyo.

## RESUMEN

**Introducción.** Las plantas medicinales han sido utilizadas desde épocas previas a la invasión española y por las diferentes culturas que forman la humanidad para curar diversos padecimientos, describiendo sus propiedades analgésicas, antipiréticas, antibacterianas, entre otras. En la literatura se ha reportado que el aceite de canela (*Cinnamomun verum*) tiene propiedades antibacterianas y antifúngicas, tales preparados se han obtenido con disolventes orgánicos no polares, nuestro interés es conocer si los materiales extraídos con disolventes químicamente polares como el etanol y el agua tienen efecto antimicrobiano.

**Objetivo.** Evaluar el efecto bactericida y fungicida *in vitro* de un macerado hidro alcohólico de la corteza de canela.

**Materiales y métodos.** El estudio realizado es de tipo experimental, donde fueron incluidas las cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, cultivadas en presencia de diferentes concentraciones del macerado de canela y su viabilidad evaluada por el método de resazurina. Además, se probó la actividad antibacteriana del macerado en cepas de *S. aureus* y *E. coli* provenientes de exudado faríngeo y de orina, de manera respectiva, de pacientes de un laboratorio clínico.

**Resultados:** El macerado de canela, no inhibió el desarrollo de las de las bacterias y la levadura mantenidas en el laboratorio mediante

resiembras. Tampoco se observó efecto antibacteriano sobre *S. aureus* y *E. coli* de muestras clínicas.

**Discusión y conclusiones:** El macerado de canela no tuvo efecto bactericida o fungicida *in vitro* en las condiciones experimentales de este trabajo. Se propone realizar estudios con otras técnicas para examinar los efectos antibacterianos o antifúngicos de la canela o bien con otros métodos de preparación de los extractos de prueba.

## ABSTRACT

**Introduction.** Medicinal plants have been used since times before hispanic invasion and by different human cultures for several ailments, discovering its analgesic, antipyretic, antibacterial properties, etcetera. It has been reported that the cinnamon oil (*Cinnamomun verum*) has antibacterial and antifungal properties, in preparations obtained with non-polar organic dissolvent. Our interest is to know if a macerate prepared with chemically polar dissolvent as ethanol and water has antimicrobial effect.

**Objective.** To evaluate the bactericidal and fungal effect *in vitro* of an alcohol-water macerate of the bark of *cinnamon verum*.

**Materials and methods.** The study is experimental. Bacterial strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and yeast as *Candida albicans*, were cultured in the presence of different concentrations of the cinnamon macerated and the viability was evaluated by the resazurine method. In addition, the antibacterial activity of the macerated was tested on *S. aureus* and *E. coli* from exudates pharyngeous and urine, respectively and obtained from clinical samples.

**Results.** The macerated of cinnamon did not inhibit the growth of the microorganisms tested. Also no effect was observed on *S. aureus* and *E. coli* obtained from clinical samples.

**Discussion and conclusions.** The macerated of *Cinnamomun verum* did not have effect bactericidal, or fungicide *in vitro*. It will be necessary to conduct additional studies with other techniques to verify the effects of the cinnamon or with other methods of preparation of extracts for testing.

## ABREVIATURAS

---

mm	milímetros
msm	metros sobre el nivel del mar
g	gramos
mg	miligramos
h	horas
DL	dosis letal
kg	kilogramo
DE	Desviación estándar
EE	Error estándar

---

# ÍNDICE GENERAL

Resumen	
Abstract	
Abreviaturas	
1. Introducción	1
Concepto de infección	1
Evolución	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Candida albicans</i>	6
<i>Cinnamomun verum</i>	7
Composición química	9
Usos etnomédicos	10
2. Hipótesis	12
3. Objetivo general	13
4. Objetivos específicos	13
5. Materiales y métodos	14
6. Resultados	21
7. Discusión	22
8. Conclusiones	25
9. Bibliografía	26

## Índice de figuras

Figura 1. Fotografía del árbol de canela. ( <i>Cinnamomun verum</i> J. Presi.) Jalapa, Tabasco.	22
Figura 2. Procedimiento de evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica.	31

# **INTRODUCCIÓN**

## **Concepto de infección**

Infección es un término clínico que indica la contaminación con respuesta inmunológica y daño estructural de un hospedero, causada por un microorganismo patógeno, es decir, invasión microbiana con lesión tisular por estos mismos gérmenes (hongos, bacterias, protozoarios, virus, priones) sus productos (toxinas) o ambos a la vez. La infección puede ser local o sistémica. Usualmente suele confundirse con los términos colonización y enfermedad. Sin embargo, los microorganismos que colonizan al ser humano (sea por un periodo breve, como horas o días o permanentemente) no alteran las funciones normales del hospedero y la enfermedad es la interacción entre el microorganismo y el ser humano que ocasiona daños en este último. Las infecciones suelen ser más comunes en partes muy sensibles del cuerpo como cara, manos y muslos, estas infecciones por pequeñas que sean si no son tratadas a tiempo pueden tornarse graves e inclusive evolucionar a gangrena o sepsis y causar la muerte (1).

## **Evolución**

Los microorganismos, en particular las bacterias, fueron las primeras formas de vida en colonizar a la flora y fauna. Su evolución ha resultado de una versatilidad metabólica tan grande que las bacterias pueden sobrevivir en las condiciones más adversas. Los microorganismos pueden tener vida libre, ocupar un ambiente sin relación metabólica con el anfitrión (inquilino), utilizar en ocasiones las fuentes

energéticas del hospedero (comensalismo y saprofitismo), asociarse con el anfitrión para obtener un beneficio mutuo (simbiosis) o depender totalmente del anfitrión causando enfermedad (parasitismo). El género *homo* que aparece hace 3 millones de años, con la especie *habilis* después de un *Australopithecus boisei bipedal*. La evolución se asoció a un cambio del hábitat arbóreo y terráqueo al casi ilimitado que otorga el bipedismo lo que provocó un cambio de la dieta vegetariana a la omnívora y condicionó el carácter cazador y recolector, la organización de los homínidos durante la época del descubrimiento del fuego hace 100,000 años consistió en bandas de aproximadamente 50 individuos que eran nómadas (2). En esos tiempos y bajo estas condiciones, las enfermedades infecciosas fueron las de sus primates antecesores, por ejemplo: infecciones de latencia prolongados, capacidad de transmisión muy elevada, relativamente benignas asintomáticas o latentes como el herpes simple, varicela zoster, hepatitis B, esto se planteó a raíz de un estudio en amerindios amazónicos completamente aislados de la civilización, no tenían conocimiento de la agricultura o el pastoreo donde se encontraron anticuerpos contra los virus de la hepatitis, Epstein-Barr, citomegalovirus o bacterias como *Treponema pallidum* (3).

Estas infecciones permanecieron así hasta la agricultura y la domesticación de los animales, cuando aparecen las zoonosis. Con los perros los humanos adquirieron la rabia y el sarampión; los gatos propiciaron la toxoplasmosis, las cabras la brucelosis, los cerdos las teniasis, los bovinos la tuberculosis y difteria, los pericos la ornitosis, entre otros ejemplos. No obstante, existen claras diferencias entre las infecciones en estos animales y el hombre.

## *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus*, conocido como estafilococo áureo, o comúnmente estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, gram positiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas están colonizadas, aunque no infectadas, por ella. Puede producir una amplia variedad de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar el aparato gastrointestinal, ya sea por la presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria (4).

En la actualidad, este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida porque esta especie habita en las mucosas y en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente. Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, dejando como los antibióticos más eficaces para combatirlos a los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina. Además de la administración del

tratamiento antimicrobiano correspondiente puede ser conveniente para el control de puertas de entradas de microorganismos como catéteres venosos permanentes o drenajes quirúrgicos (5).

El nombre binominal de esta bacteria proviene de la raíz griega que se compone de *staphyle*, que significa racimo y *coccus* que significa grano, baya o uva; y del latín *áureas* que significa dorado. Este nombre significa racimo de uvas dorado y lo lleva en función de su morfología microscópica y su color dorado en el cultivo de *agar sal manitol*.

*Staphylococcus aureus* es un agente patogénico ubicuo que es considerado como parte de la microflora normal, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel son insuficientes pueden causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo.

Los seres humanos son un reservorio natural de *S. aureus*. Del 30 al 50% de los adultos sanos están colonizados, y entre el 10 y 20 % se mantienen colonizados de manera permanente. Esta bacteria forma parte de la microbiota normal en el ser humano y produce colonización selectiva de narinas (20-40% en adultos), pliegues intertriginosos, perineo, axilas y vagina; de esta manera, las personas colonizadas tienen un riesgo mayor de sufrir infecciones (6).

## *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es quizás el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero se lo puede encontrar en todos lados, dado que es un organismo ubicuo. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*; posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.

Esta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo además de producir las vitaminas B y K. *Es un* cocobacilo gram negativo, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos, no forman esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba IMVIC es +++-. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biología molecular (7).

*Escherichia coli*, en su hábitat natural vive en los intestinos de la mayor parte de los mamíferos sanos. Es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo. En individuos sanos, si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, la bacteria actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes. En humanos, *Escherichia coli* coloniza el tracto gastrointestinal de un neonato adhiriéndose a las mucosidades del intestino grueso en el plazo de 48 h después de la primera comida.

*Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía gram negativa.

#### Tratamiento

El uso de antibióticos es poco eficaz y casi no se prescribe para la diarrea, se sugiere el consumo abundante de líquidos para evitar la deshidratación. Sin embargo, en algunas patologías como la pielonefritis hay que considerar el uso de algunas cefalosporinas por vía endovenosa (8).

#### *Candida albicans*

La especie de levaduras del género *Candida*, más significativa por su importancia clínica es *Candida albicans*, la cual es un comensal de las mucosas humanas, sobre todo de la mucosa oral, digestiva y genital. Las infecciones causadas por *Candida albicans* o por otras especies de *Candida* en humanos y otros animales, se denominan (candidiasis), la infección se desarrolla con facilidad en pacientes con inmunosuprimidos. El crecimiento de *Candida in vitro*, se manifiesta como colonias grandes redondas, blanco o crema (*albicans* en latín significa “blanquecino”). La más común infección por candida es la candidiasis oral por dentaduras postizas, especialmente con su uso en gerontes. La colonización del tracto gastrointestinal por *C. albicans* puede resultar debido a la ingesta de antiácidos u otras drogas semejantes. Esta colonización puede interferir con la

absorción de la coenzima Q10. Las candidiasis son las infecciones por hongos más frecuentes en pacientes con SIDA o con enfermedades inmunológicas (9).

Referencias populares mencionan que la extracto de *Cinnamomum verum* tiene propiedades antibacterianas y antimicóticas, se ha utilizado en la medicina tradicional como tratamiento de padecimientos causados por estos microorganismos y sería una opción en un futuro contar con dicha planta para atender enfermedades.

Con base en lo anterior se decidió probar el efecto que tiene *Cinnamomun verum* sobre el desarrollo en cultivo dos bacterias y un hongo que se encuentran frecuentemente en la cavidad oral.

### *Cinnamomun verum*

Nombre científico: *Cinnamomum verum*. Familia: Lauraceae

Descripción. Es un árbol de unos 10 metros de altura pero que en cultivo suele ser más pequeño, adoptando forma de arbusto siempre verde. Su corteza, la parte más importante, es marrón grisáceo y tiene un ciclo perenne. Su tallo es de consistencia leñosa. Las hojas miden de 7-25 x 3-8 cm, tienen forma ovalada y puntiaguda, de color verde y brillante por la cara superior con 5 nervios rojizos uno medial y dos por lado arqueada que convergen en la base y el ápice, y otro conjunto de nervios que forman un ángulo recto con este; el peciolo de unos 10-20 mm, robusto con una sinuosa forma cóncava sus flores son hermafroditas

(contiene el androceo y gineceo en la misma flor), de color blanco o amarillo verdoso y recubiertas de pelos, bracteadas y actinomorfas. El perianto es indiferenciado, formado por 6 *pétalos* libres. El gineceo es bicarpelar y su androceo está formado por 9 más 3 estambres distribuidos en 3 ó 4 verticilos, que cuando se produce la dehiscencia de las anteras lo hace por el viento. Las flores de 0.5 cm se agrupan en panículas que nacen en la axila de la hoja o también en la parte terminal y llegan a tener una longitud similar al de las hojas (10).

Distribución. Actualmente se cultiva además de Sri Lanka, en la India, sur de China, Madagascar y Brasil. Crece a un altitud entre 0 y 600 msnm.

Tipos de vegetación. Requiere un clima caliente y húmedo, con temperatura media anual entre 24 y 30°C y una precipitación entre 2000 y 4000 mm anuales bien distribuidos durante todo el año, las mejores plantaciones crecen en terrenos lluviosos con textura arenosa y fangosa.

Usos. La corteza del árbol molida se utiliza ampliamente en postres, pasteles, dulces, etcétera. Entera se utiliza para adornar y sazonar algunos platos. En México, Ecuador y Colombia se usa en infusión.

La utilizació de la infusión de canela está muy extendido en Colombia, Bolivia, Panamá, Chile, México, sur de EUA y América Central, al grado que compite en uso con que otras bebidas calientes como el café y chocolate. Es también ingrediente de muchas salsas *curry* y otros platos de oriente en donde se emplean

las variedades de Sri Lanka y China además del polvo y las hojas de canela en una cata organoléptica se puede decir que la canela tiene un sabor astringente (11).



Figura 1. Árbol de canela (*Cinnamomum verum* J. Presl.). Municipio de Francisco J. Santamaría, Jalapa, Tabasco. Número de registro en el Herbario Metropolitano de la Unidad Iztapalapa de la UAM 74133, 74134 y 74135.

## Composición Química

Su aroma se debe al aceite esencial aromático que constituye un 0.5-2.5% de su composición. El componente mayoritario es el aldehído cinámico, también el eugenol y el alcohol cinámico. En menor proporción encontramos el ácido trans-cinámico, el aldehído hidroxicinámico, el aldehído metoxicinámico, acetato cinámico, terpenos, taninos, mucilago, proantocianidinas oligoméricas, carbohidratos y trazas de cumarinas (12).

## Usos etnomédicos

En la literatura popular y en reportes científicos se menciona que combate las infecciones dentales y bucales, es antiséptica, bacteriostática, hipoglucemiante, hipocolesterolemiante y analgésica. Se usa también contra resfriados y bronquitis. Además se le emplea como tónico estomacal para el buen funcionamiento del sistema digestivo, combate las náuseas, vómito y diarrea (13).

Con base en las propiedades medicinales atribuidas a la canela y en diversos reportes de actividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, inferimos los potenciales beneficios y posibles usos terapéuticos de esta planta, los cuales aun no han sido del todo aprovechados. Es importante mencionar que la actividad antiséptica de la corteza de canela se asocia a componentes presentes en el aceite esencial, los cuales se obtienen con disolventes químicamente no polares. Sin embargo, es importante mencionar, que en el presente estudio se pretende obtener un preparado para ser utilizado como enjuague bucal, por lo que deberá

ser soluble en agua, es por ello que se utilizó una mezcla hidroalcohólica (químicamente polar) para la preparación del macerado.

## **HIPÓTESIS**

La corteza de la canela tiene propiedades antisépticas, por lo que la infusión, decocción o el macerado de la planta adicionadas a cultivos de bacterias y de hongos pueden inhibir el desarrollo de estos microorganismos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de un macerado hidro alcohólico de la corteza de *Cinnamomum verum* sobre la proliferación *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* mediante el método de resazurina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer una curva dosis-respuesta para conocer el efecto de un macerado de canela, sobre el desarrollo de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans in vitro*.
- Determinar la dosis óptima de trabajo que inhiba el desarrollo de los microorganismos del ensayo.
- Comparar el efecto de la canela contra el que presente una mezcla de penicilina-estreptomicina y anfotericina B como controles positivos de inhibición del crecimiento bacteriano y fúngico, de manera respectiva.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico:

Extracto acuoso de *Cinnamomun verum*

*Cepas microbianas*

- *Staphylococcus aureus* ATTC6538
- *Escherichia coli* ATTC8739
- *Candida albicans*

### Material y equipo

- Cajas de Petri
- Incubadora a 28 °C y 37 °C
- Mecheros de Bunsen
- Placas de multipozos de 96 pozos (Costar)
- Puntas estériles 100 y 200 µl para pipetas Eppendorf
- Pipeta multicanal (Eppendorf)

*Soluciones y medios de cultivo*

- Resazurina (Laboratorio BDH)
- Solución salina fisiológica
- Caldo de isosentitest estéril (Oxoid)
- DMSO (dimetilsulfóxido al 10%) Baker.
- Medio RPMI-1640

## **Procedimiento**

Se utilizaron dos cepas bacterianas y una de hongo, las cuales fueron seleccionados por ser de las más comunes en el organismo humano.

La información se obtuvo realizando pruebas en placa multipozos por el método de resazurina, cuantificando la actividad antimicrobiana del extracto de *Cinnamomun verum* en su concentración mínima inhibitoria observando como un indicador de viabilidad, ya que se produce un proceso de óxido-reducción llevado a cabo por las enzimas oxido-reductasas de estos microorganismos, que reducen químicamente a la resazurina en resofurina. Es importante resaltar que estas enzimas solo están activas en células vivas, como resultado de la reducción cambia el color de la resazurina oxidada (azul) a su producto reducido resofurina (azul), después de incubar a 37°C durante 20 h los microorganismos con los extractos de prueba. Un color azul indicará que el microorganismo no está vivo y que por lo tanto no redujo a la resazurina.

## **Colecta de la planta y preparación del macerado**

Se recolectaron ramas del árbol de canela en el poblado de Francisco J. Santa María, en el Estado de Tabasco, se prepararon ejemplares de ramas con hojas para su identificación taxonómica en el Herbario Metropolitano "Ramón Riba" de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Iztapalapa. En el que se le identificó como *Cinnamomun verum* J. Presl, asignándole los números de registro: 74133, 74134 y 74135.

Las ramas se dejaron secar en una estufa a 40°C. La corteza se separó y se molieron hasta su pulverización. Se colocaron 500 gramos del material pulverizado en un frasco ámbar de dos litros, desinfectado previamente con etanol de 96°. Se adicionó una mezcla de alcohol-agua al 20% hasta cubrir completamente el material pulverizado, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 días, agitando manualmente cada tercer día. Al final se filtró al vacío con papel Whatman con membrana del número 4. Posteriormente, el material se filtró con membranas *Millipore* de 0.80, 0.45 y 0.22 µm. El material filtrado se colocó en frasco ámbar estéril. Como producto final se obtuvieron 850 ml, se separaron 50 ml y se colocaron en un vaso que se calentó en una estufa a 70°C durante tres días, hasta obtener un material completamente seco.

#### **Determinación de actividad antibacteriana**

Se determinó la actividad antibacteriana del macerado al establecer la *Concentración Mínima Inhibitoria* (CMI), siguiendo el protocolo establecido por Drummond y Waigh modificado por Satyajit en el que utilizan placas multipozos de 96 y resazurina como indicador de viabilidad. La prueba consiste en realizar diluciones dobles de cada uno de los materiales con solución salina fisiológica, utilizando una serie de 8 pozos consecutivos (14).

Se inició con una concentración del macerado de 10 mg/mL en dimetilsulfóxido al 10% (DMSO 10%). Las diluciones se pusieron en contacto con concentración estándar de bacterias viables ( $4 \times 10^6$  UFC/mL) y resazurina sódica (0.675% p/v en

agua) en medio de cultivo Mueller-Hinton. De esta forma, en cada pozo quedaron 50 µl de la dilución del macerado + 10 µl de solución de resazurina + 30 µl de medio RPMI-1640x + 10 µl suspensión bacteriana por pozo. En la placa se probó cada macerado por triplicado. El ensayo se realizó al menos cuatro ocasiones diferentes, produciendo un total de 12 datos para cada concentración del macerado. Las placas preparadas se incubaron a 37°C durante 20 horas.

En cada placa se colocó como control negativo una serie con DMSO al 10 % en lugar del macerado y como control positivo una serie con una mezcla de antibióticos (10,000 UI de penicilina/mL y 10 mg de estreptomicina/mL).

### **Determinación de la actividad antifúngica**

Se siguió el protocolo M27-A2 establecido por la NCCLS (Siglas en inglés del *National Committee for Clinical Laboratory Standards*), determinando colorimétricamente la CMI de resazurina (15).

La prueba consistió en realizar una serie de diluciones dobles del macerado en 8 pozos consecutivos, por triplicado en una placa multipozos de 96, utilizando como solvente medio RPMI-1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico, amortiguado con ácido  $\alpha$ -morfolinpropanosulfónico [ (MOPS) (GIBCO/BRL)] 0.164 M, ajustado a pH de  $7 \pm 0.1$ . Se inició con una concentración del macerado de 1 mg/mL en dimetilsulfóxido al 1% (DMSO 1%), cada pozo quedó con un volumen final de 100 µL del material de ensayo. Las diluciones del macerado se adicionaron un cultivo de células en concentración de 1 a  $5 \times 10^3$  UFC/mL, en el mismo medio suplementado con 0.1 % v/v de solución estéril de resazurina sódica (20 mg/mL en

agua). Todo ello en condiciones de esterilidad. Además, en cada placa se colocó como control negativo una serie con DMSO al 1% en vez del macerado y como control positivo una serie con una mezcla de 10,000 UI de penicilina, 10 mg de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina /mL, en sustitución del macerado. Las placas preparadas con bacterias se incubaron a 37°C durante 48 horas, las placas con levadura se incubaron a 28 °C. Las concentraciones ensayadas del macerado fueron; 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 y 0.039 mg/mL. Se realizaron cuatro experimentos por triplicado, dando un total de doce lecturas para cada concentración del macerado.

Finalmente, se determinó la concentración del extracto que inhibe el crecimiento de cada cepa, esto es, la CMI.

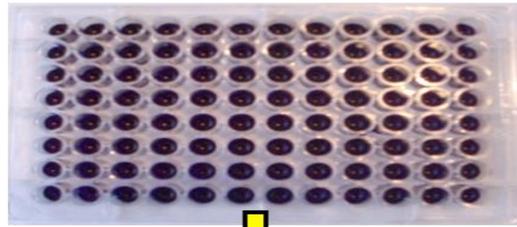
En la figura 2. Se muestra en forma esquemática el procedimiento para los ensayos de actividad antibacteriana y antifúngica.

### DILUCIÓN DEL EXTRACTO

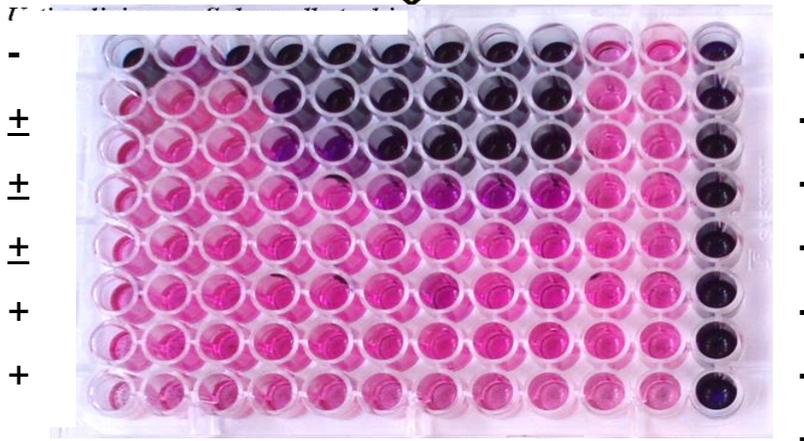
Diluciones dobles secuenciales del extracto (50 µl/pozo), en triplicado

CONCENTRACIÓN mg/mL	EXTRACTO I	EXTRACTO II	EXTRACTO III		T -	T +
5						
2.5						
1.25						
0.625						
0.312						
0.156						
0.078						
0.039						

+ 10 µl suspensión bacteriana  
+ 30 µl Medio Mueller-Hinton 3X  
+ 10 µl solución de resazurina



Incubación a  
37 ° C/20 hours



### Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Figura 2. Procedimiento para la evaluación de actividad antibacteriana y antifúngica del macerado de canela.

Adicionalmente, el macerado se envió a un laboratorio clínico para la evaluación de actividad antibacteriana en bacterias aisladas de pacientes.

### **Método de recolección de datos**

1. Se recopilaron los datos del procedimiento empleando resazurina de las cepas mencionadas a 37°C durante 20 horas en la incubadora.
2. Una vez obtenidos los resultados se procedió a la tabulación y clasificación de los datos para su análisis posterior.
3. Después de organizada la información recolectada, se procedió al análisis de la misma para la cual se tomaron en consideración las dimensiones de la variable estudiada, así como el objetivo formulado, procedimiento que terminó con la elaboración del informe final de la investigación.

## RESULTADOS

El extracto de canela no inhibió la proliferación de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respecto al testigo positivo de la mezcla penicilina $10^4$  UI/mL-estreptomicina  $10^4$   $\mu$ g/mL. Tampoco mostró capacidad para inhibir el desarrollo de *Candida albicans* frente al testigo positivo de anfotericina B de 8 mg/mL.

La actividad antimicrobiana del macerado también fue evaluada en un laboratorio de análisis clínicos, donde se estudio el efecto que tenía dicho material sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*, aisladas de pacientes. Esta prueba se hizo mediante el método de difusión de Kirby Bauer sembrando las bacterias en medio de Agar Mueller-Hinton. Las bacterias. El macerado se probó en volúmenes de 5, 10, 15 y 20  $\mu$ l, En contraparte, la *E. coli* fue sensible a los antibióticos amikacina, cloranfenicol, gentamicina y netilmicina, lo que confirma la inactividad del macerado.

## DISCUSIÓN

En los últimos años ha habido un interés creciente en la utilización de productos de origen natural y surgen dudas con respecto a la seguridad y eficacia de los mismos, esta es una de las razones por la que más que trabajar con mezclas complejas de las plantas con escaso procesamiento químico (preparaciones galénicas), los investigadores han optado por el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial, que son compuestos volátiles de amplia aplicación en la industria de las fragancias, como condimento alimentario y en la medicina popular. En los años recientes (1987-2001), debido a que se ha reportado que tienen propiedades antimicrobianas (16), se ha investigado una gran cantidad de compuestos presentes en el aceite esencial.

El aceite esencial de canela es benéfico para la salud por sus propiedades antimicrobianas, por esta razón, ya sea la canela o su aceite son empleados como preservativos de alimentos.

El aceite esencial de la corteza de *Cinnamomun verum* contiene 68% de cinamaldehído, 6.7 % de eugenol, 0.8 % de linalol y 0.45% de benzoato de etilo y otros componentes de menor proporción (17). Mayaud y colaboradores (18) demostraron que el aceite tiene actividad inhibitoria *in vitro* sobre el desarrollo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en concentraciones mínimas de 0.07 y 0.1 %, respectivamente. Estos autores obtuvieron el aceite mediante destilación por arrastre de vapor, lo que evita el calentamiento directo de la muestra y con ello

la pérdida por evaporación de algunos de los componentes del aceite esencial de la planta.

A la actividad antibacteriana de los compuestos presentes en el aceite esencial de *C. verum*, se le suma el efecto citotóxico sobre células 5RP7 de fibroblastos transformados y células F2408 de fibroblastos normales, siendo la mayor toxicidad en las primeras, induciéndolas a la apoptosis (19). También se ha demostrado que el aceite de la corteza de canela (*C. syzygium*) y *C. cymbopogon*) presenta actividad de anti-elastasa y anti-keratinasa y con ello inhibe el desarrollo de hongos filamentosos causantes de la tiña como *Trichophyton rubrum* (20).

Es importante mencionar, que lo que motivó la realización del presente estudio, fue el interés por desarrollar una preparación de canela que pudiera ser ampliamente soluble en agua, para poder utilizarla como antiséptico bucal. Es por este motivo que no se siguieron los métodos recomendados en la literatura para la obtención de los componentes del aceite esencial, ya que son parcialmente miscibles o inmiscibles en agua y por tanto no útiles en la formulación de un enjuague bucal con base acuosa.

En este trabajo se pretendió obtener los compuestos solubles en disolventes de polaridad química alta y por eso se empleó la mezcla etanol-agua, para conocer los compuestos presentes en ella que tuvieran actividad antibacteriana y antifúngica, como la demostrada en preparaciones obtenidas con solventes de baja polaridad química. Sin embargo, el macerado preparado en este trabajo no

presentó actividad antibacteriana o antifúngica. No obstante que esta preparación no mostró la actividad biológica esperada, es necesario evaluar si tiene efectos citotóxicos sobre células transformadas, ya que los extractos de otras plantas obtenidos con disolventes de polaridad química alta inhiben la proliferación *in vitro* de células provenientes de carcinomas humanos.

## CONCLUSIONES

- El macerado hidro alcohólico de *Cinnamomun verum* no afecta la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* o *Candida albicans*.
- La actividad antibacteriana de *Cinnamomun verun* se asocia con su aceite esencial.
- El aceite esencial de la planta es parcialmente miscible en agua y el que está presente en el macerado puede perderse durante la evaporación del macerado.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks GF, Carroll CK, Butel SJ, Morse AS. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. El Manual Moderno. (2007), México.
2. Tudge C. La variedad de la vida. Editorial Crítica. (2001), Barcelona.
3. Slonczewski LJ, Foster WJ. Microbiology. An evolving science. WW. Worton & Company, Inc. (2009), New York.
4. Chambers HF, De Leo FR. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* on the antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol* 7, 629-641.
5. Wanger A. Antibiotic susceptibility testing. In: Goldman E, Green LH. Handbook of microbiology.<sup>2nd</sup> edition. CRC Press. Taylor and Francis Group. (2009), Boca Raton. pp. 149-158.
6. Thwaites G, Edgeworth JD, Gkrania-Klotsas E, Kirby A, Tilley R, Török ME, Walker S, Wetheim H, Wilson P, Llewelyn MJ. (2011). Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *The Lancet Infect Dis* 11, 208-222.
7. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. (2004). Pathogenic of *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123-140.

8. Farmer JJ III. (2003). Enterobacteriaceae. Introduction and identification. In: Murray PR. (editor). Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. Washington, D. C.
9. Kabir MA, Hussain A, Ahmad Z. (2012). *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. ISRN Microbiology ID 538694, doi:10.5402/2012/538694.
10. Argueta VA, Cano AIM, Rodarte ME. Atlas de las Plantas de la medicina tradicional mexicana. I. Instituto Nacional Indigenista. (1994), México.
11. Alsaid M, Daud H, Bejo S, Abuseliana A. (2010) Antimicrobial activities of some culinary spice extracts against *Streptococcus agalactiae* and Its prophylactic uses to prevent *Streptococcal infection* in red hybrid tilapia (*Oreochromis*). *World J Fish Marine Sc* 2, 532-538.
12. Kamaliroosta L, Gharachorloo M, Mamalroosta Z, Alimohammad Z. (2012). Extraction of *Cinnamon* essential oil and identification of its chemical compounds. *J Med Plants Res.* 6, 609-614.
13. Aguilar CA, Camacho JR, Jacques RP, López ME. Plantas medicinales del herbario del IMSS. Su distribución por enfermedades. Instituto Mexicano del Seguro Social. (1998), México.

14. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening *phytochemicals*. *Methods* 42, 321–324.
15. Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray IA, (2007). Colorimetric broth microdilution method for the fungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods* 42, 325-329.
16. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituent against respiratory tract pathogens by gaseous contact . *J Antimicrob Chemother* 47, 565-573.
17. Kamaliroosta L, Gharachorloo M, Kamaliroosta Z, Zadeh A. (2012). Extraction of Cinnamon essential oil and identification of its chemical compounds. *J Med Plants Res.* 6, 609-614.
18. Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters Appl Microbiol* 47, 63.
19. Unlu M, Ergene E, Unlu GV, Zeytinoglu HS, Vural N. (2010). Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity *in vitro* of essential oils from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) *Food Chem Toxicol.* 48,

3274-3280.

20. Khana A. (2011). Antifungal activity, anti-elastase, anti keratinase in vitro of essential oils from *Cinnamomum*, *Syzygium aromaticum* against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Fitomedicine* 1, 48-55.