

Actividad antibacteriana *in vitro* de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné

In vitro antibacterial activity of nineteen essential oils against acne-associated bacteria

Dr. C. Germán Eduardo Matiz Melo, Lic. Glicerio León Méndez, MSc. María del Rosario Osorio Fortich

Grupo de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimentos-GITFCA.

RESUMEN

Objetivos: evaluar la actividad antibacteriana de 19 aceites esenciales sobre tres cepas asociadas al desarrollo del acné, (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*) y seleccionar los más promisorios con base en sus respectivas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y su composición química, con el propósito de diseñar formas farmacéuticas de uso tópico para tratamiento antiacné.

Métodos: las bacterias se replicaron en medios de agar y caldos específicos. Se determinó el momento de máxima densidad óptica (DO₆₂₀) para emplearlo como tiempo de incubación; luego se hicieron pruebas de evaluación de sensibilidad con la exposición de las cepas a concentraciones a 1000 ppm de cada uno de los aceites en caldo. Para solubilizarlos se empleó la mezcla 95:4:1 de caldo:etanol:polisorbato-80. A los aceites que inhibieron el crecimiento en más de un 90 %, se les determinó la concentración mínima inhibitoria mediante metodologías de microdilución en caldo y su composición química por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.

Resultados: de los 19 aceites, siete fueron capaces de inhibir el crecimiento en más del 90 % para las tres cepas a 1000 ppm. Las concentración mínima inhibitoria determinadas oscilaron entre 300 y 900 ppm. La composición química de todos los aceites fue consistente con la reportada en la literatura.

Conclusiones: los aceites de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), canela (*Cinnamomum verum* J. Presl) y clavo (*Eugenia caryophyllata* T.), en ese orden, alcanzaron las más bajas de concentración mínima inhibitoria; adicionalmente, de acuerdo con la literatura, los componentes más abundantes de los aceites promisorios, tienen

reconocida actividad antiinflamatoria, y por tanto, es factible el diseño de formas farmacéuticas tópicas con base en ellos, para el tratamiento del acné.

Palabras Clave: aceites esenciales, acné, actividad antibacteriana, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Objectives: to assess the antibacterial activity of 19 essential oils against three bacterial strains associated with acnes occurrence, (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*), and to select the most promising oils on the basis of their minimum inhibitory concentrations and chemical composition, in order to design pharmaceutical dosage forms for topical acne treatment.

Methods: bacteria were replicated using specific agars and broths. Time of maximum optical density (OD₆₂₀) was determined to use it as the incubation time. Then susceptibility evaluation tests were made by exposing strains to 1000 ppm concentrations of each of the oils in broth. The 95:4:1 broth:ethanol:polysorbate-80 mixture was used to make oils soluble. For those oils which inhibited growth by more than 90 %, their minimum inhibitory concentrations were determined by broth microdilution methodology and its chemical composition through gas chromatography /mass spectroscopy.

Results: out of the 19 oils, seven were able to inhibit growth by more than 90 % at 1000 ppm for the three strains. Estimated minimum growth concentrations ranged 300 to 900 ppm. The chemical composition of all oils was consistent with that reported in the literature.

Conclusions: the thyme (*Thymus vulgaris* L.), cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) and clove (*Eugenia caryophyllata* T.) oils, reached the lowest minimum inhibitory concentrations; additionally, according to the literature, the most abundant components of the promising oils are well known by its anti-inflammatory activity and therefore it is feasible to design topical pharmaceutical forms for the treatment of acne.

Keywords: essential oils, acne, antibacterial activity, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCION

El acné, aunque tiene un componente microbiano, fundamentalmente es un proceso inflamatorio. Se caracteriza por presentar comedones, pápulas y pústulas, aunque eventualmente puede haber abscesos, quistes y cicatrices. En la patogénesis del acné confluyen fundamentalmente cuatro procesos: incremento en la producción de sebo, hiperqueratinización perifolicular y obstrucción folicular, colonización por *P. acnes* y otras bacterias oportunistas (*S. aureus*, *S. epidermidis*) y liberación de enzimas.¹ Esto produce un cambio en el patrón de la queratina pilosebácea, que se hace más densa, bloquea la salida del sebo formando un tapón que se denomina comedón, el cual se compone de queratina, sebo, restos celulares y bacterias, y es

la más importante la *P. acnes*; esta última, libera lipasas y proteasas capaces de generar ácidos grasos libres irritantes, además de mediadores proinflamatorios que afectan a la unidad pilosebácea, genera una respuesta inflamatoria y de cuerpo extraño, provoca la aparición de las manifestaciones más comunes del acné: la pápula, la pústula y el nódulo. Los tratamientos más comunes se basan en antimicrobianos (clindamicina, eritromicina, nadifloxacino, etc.), retinoides (tretinoína, resorcinol, adapaleno, tazaroteno), y otros (ácido azelaico, azufre, peróxido de benzoílo), útiles en el tratamiento del acné inflamatorio (noduloso) y no inflamatorio (comedónico).² No obstante la disponibilidad de numerosos productos de síntesis para enfrentar esta condición, las reacciones adversas a los tratamientos y a la aparición de cepas bacterianas resistentes, obligan a la búsqueda permanente de nuevos agentes terapéuticos, por otra parte, muchos pacientes recurren a terapias alternativas de tratamiento del acné mediante el empleo de productos botánicos y fitoquímicos.³

Dado que el acné inicia con una afección inflamatoria a la que le sobreviene un proceso infeccioso, se evaluaron 19 aceites esenciales de plantas de uso común en medicina popular para patologías asociadas al dolor, la inflamación, la gastritis, la congestión respiratoria, etc., se abordan los más promisorios que combinen la actividad antibacteriana con la antiinflamatoria, y así poder proponer, formular y evaluar nuevos productos de uso tópico para la prevención/tratamiento del acné como geles y productos cosméticos de aplicación.

MÉTODOS

Los reactivos y otros materiales se adquirieron a entidades reconocidas. El Etanol y Tween 80® fueron adquiridos de JT Baker (Phillipsburg, USA). El Caldo Müller Hinton (caldo MH), agar Müller Hinton (agar MH), caldo Trypticase Soya (caldo TSA), agar Trypticase Soya (agar TSA), caldo Luria Bertani (caldo LB) y agar Luria Bertani (agar LB) se obtuvieron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). La Gentamicina sulfato de Biopex SAC (Estándar Secundario Lote: 10C256). Las cepas bacterianas provinieron de la American Type Culture Collection (ATCC): *Propionibacterium acnes* (ATCC 11827), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC) 12228.

Los aceites esenciales (tabla 1) se adquirieron ya purificados a Green Andina Colombia Ltda. (Bogotá, Colombia).

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO

Los inóculos bacterianos se prepararon de acuerdo a las indicaciones establecidas por la CLSI⁴, tomando entre 3-4 colonias bien diferenciadas y morfológicamente similares de las bacterias previamente sembradas en placas de Petri con el agar específico, y luego suspendiéndolas en tubos de ensayo en caldo homólogo estéril. Para *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. acnes* se utilizaron, MH, LB, TSA respectivamente, se incuban a 35 ± 2 °C y se verifica sistemáticamente la densidad óptica (DO) a 620 nm en lector de microplacas (Multiscan EX Thermo®, USA), hasta que la suspensión bacteriana alcanzara una DO₆₂₀ entre 0,08-0,1 unidades, equivalente a 0,5 en la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL);⁵ la cual fue diluida a fin de obtener una suspensión de trabajo de 5×10^5 UFC/mL en los ensayos biológicos.⁶

Tabla 1. Aceites esenciales empleados en el estudio

Nombre Científico	Nombre Vulgar	Familia	Órgano de obtención	Lote
<i>Calendula officinalis</i>	Caléndula	Asteraceae	Flores [†]	EXCDGAC-1301-01
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl	Canela	Lauraceae	Corteza del tronco [†]	EXCNGAC-1304-01
<i>Citrus limon</i> L	Limón	Rutaceae	Cáscara del fruto [‡]	ALIGAC-1301-01
<i>Citrus reticulata</i> L.	Mandarina	Rutaceae	Cáscara del fruto [‡]	AMDGAC-1302-01
<i>Citrus sinensis</i> L	Naranja	Rutaceae	Cáscara del fruto [‡]	ANAGAC-1301-01
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Limonaria	Poaceae	Hojas [†]	ALMGAC-1303-01
<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle	Citronela	Poaceae	Hojas [†]	ACTGAC-1302-01
<i>Elettaria cardamomum</i> (L.) Maton	Cardamomo	Zingiberaceae	Frutos (semillas) [†]	ACMGAC-1303-01
<i>Eucalyptus globulus</i> L	Eucalipto	Myrtaceae	Hojas [†]	AEU70-1304-01
<i>Eugenia caryophyllata</i> T.	Clavo de olor	Myrtaceae	Pedúnculo floral [†]	EXCLGAC-1304-01
<i>Matricaria chamomilla</i> L	Manzanilla	Asteraceae	Flores [†]	EXMZGAC-1302-01
<i>Mentha piperita</i> L.	Menta	Lamiaceae	Hojas [†]	AMEGAC-1301-01
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Albahaca	Lamiaceae	Hojas [†]	AABGAC-1304-01
<i>Origanum vulgare</i> L	Orégano	Lamiaceae	Hojas [†]	AORGAC-1304-01
<i>Pimpinella anisum</i> L	Anís	Umbelliferae	Frutos [†]	EXANGAC-1304-01
<i>Pinus sylvestris</i> L	Pino	Pinaceae	Hojas [†]	APIGAC-1302-01
<i>Rosa spp</i>	Rosa	Rosaceae	Pétalos [†]	ARSGAC-1303-01
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Romero	Lamiaceae	Hojas [†]	AROGAC-1303-01
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomillo	Lamiaceae	Hojas [†]	ATMGAC-1304-01

[†]Obtención por arrastre de vapor (hidrodestilación) [‡]Obtención por expresión

Las cepas se inocularon en el momento de mayor densidad óptica. Para ello; 0,1 mL de inóculo diluido fue adicionado a 9.9 mL del caldo específico, se incubó a 35 ± 2 °C y se verificó, a intervalos regulares, la DO₆₂₀ de la suspensión bacteriana en lector de

microplacas.⁷ El tiempo en el que se logró el mayor valor, se empleó posteriormente como tiempo de incubación en todos los ensayos.

Debido a la escasa solubilidad de los aceites en estudio, fue necesario encontrar una mezcla de caldo: etanol:polisorbato-80 inocua y capaz de solubilizarlos. Mezclas de esta composición se emplean comúnmente,⁸⁻¹⁰ pero requieren ajustarse para cada ensayo específico. Para ello, mezclas de los tres componentes en diferentes proporciones se incubaron con las cepas en placas de 96 pozos a 35 ± 2 °C. Se compararon los porcentajes de viabilidad frente al blanco (caldo con inóculo), con el objeto de seleccionar la mezcla más adecuada, que se empleó en todos los ensayos.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA

La prueba de sensibilidad bacteriana se puede considerar como un ensayo de tamizaje, que generalmente se realiza previa a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), para establecer si una sustancia en evaluación es promisorio frente a determinados microorganismos, y tiene por objeto ahorrar tiempo y recursos. Esta se realizó exponiendo las cepas frente a los aceites, a concentraciones de 1 000 ppm,^{11,12} se utiliza gentamicina sulfato a concentración de 0,016 mg/mL (16 ppm) como control positivo. Una vez incubadas, las placas se agitaron en vórtex durante 5 min a 100 rpm. Se determinó la DO_{620} en lector de microplacas y se estimó la viabilidad por comparación frente al blanco de máximo crecimiento. Inhibiciones superiores al 90 % se consideraron promisorias y a estas se les determinó la CMI.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Cincuenta μ L de las suspensiones de las cepas fueron incubadas en placas de 96 pozos, con 50 μ L de concentraciones seriadas entre 1000 y 50 partes por millón (ppm) de los aceites esenciales evaluados. Las placas fueron selladas durante la incubación para reducir la evaporación. Al finalizar, se agitaron (100 rpm, 5 min) y se determinó la DO_{620} en lector de microplacas. La CMI (ppm) se calculó como la mínima concentración del aceite esencial que inhibió completamente el crecimiento, al comparar contra pozos de caldo puro. Se emplearon como control pozos con caldo inoculado (máximo crecimiento) y con gentamicina (30 ppm).

ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTRÓMETRO DE MASA (GC/MS)

Los aceites esenciales que presentaron los mejores resultados frente a las cepas evaluadas, se analizaron respecto de su composición mediante técnica instrumental de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masa (GC/MS), en un equipo GC/MS 7890A/5975C *Agilent* (USA), en interfase con un detector selectivo de masas *HP5973 Network* conectado en línea con un sistema *HP-MS ChemStation* y la base de datos *NIST-2008*. Condiciones: columna capilar *HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox* (30m x 250 μ m x 0.25 μ m), temperatura inicial 45 °C, temperatura de la línea de transferencia de 280 °C y volumen de inyección 1,0 μ L en modo *split* (20:1), con temperatura del inyector de 250 °C.^{13,14} La identidad de los componentes se asignó por comparación de los espectros de masas obtenidos con los presentes en la base de datos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados correspondientes a tres ensayos independientes se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (ESM) y se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de test *Dunnet post hoc* para

comparaciones múltiples. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos. Para la organización de los datos se empleó la hoja de cálculo MS Excel 2010 y para los análisis estadísticos el paquete *GraphPad Prism V5.00 para Windows*.

RESULTADOS

Los ensayos de crecimiento revelaron que las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* alcanzaron la mayor DO_{620} a las 20 horas, mientras que *P. acnes* la alcanzan a las 48 horas; por tanto, estos fueron los tiempos de punto final de incubación en los bioensayos de actividad antibacteriana. Para solubilizar los aceites, se demostró que las mezclas que contenían etanol al 4 % y polisorbato-80 al 1 % no inhibieron el crecimiento de ninguna de las cepas, por tanto, se eligió utilizar un sistema caldo:etanol:polisorbato-80 en proporción 95:4:1, para solubilizar todos los aceites esenciales evaluados en este trabajo.

Los resultados de la evaluación de la sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales (tabla 2), permitieron escoger 7 de los 19 aceites en estudio, tomando como criterio de selección, aquellos que fueron capaces de inhibir en más de un 90 % a las tres cepas. La cepa menos sensible a los aceites fue la *P. acnes*, vulnerable a 7 de los 19, seguida de 9 para *S. epidermidis* y 11 de *S. aureus*. A los 7 aceites eficaces contra las tres cepas se les determinó la CMI y su composición.

La CMI se determina con la utilización de caldo inoculado y estandarizado, al que se adicionan soluciones de aceites a diferentes concentraciones, provocando una dilución; esto explica el por qué la absorbancia (DO_{620}) del caldo puro es mayor que la de los demás pozos al tiempo inicial de incubación. Al final de la misma, se leen las absorbancias de todos los pozos. Se considera inhibición total, en aquellos con valores inferiores al del caldo puro. La mayor concentración de aceite capaz de lograr esto, se denomina CMI. Los valores se presentan en las tablas 3a y 3b. El perfil de composición de los aceites se presenta en las Tablas 4a y 4b.

Tabla 2. Sensibilidad de *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *P. acnes* ATCC 11827 frente a los aceites esenciales (1000 ppm)

Porcentaje de inhibición del crecimiento ± ESM			
Aceite Esencial	<i>P. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
Gentamicina (control)	97,6 ± 0,25	98,8 ± 0,25	98,9 ± 1,35
<i>C. officinalis</i>	41,7 ± 1,12	61,6 ± 0,63	65,0 ± 0,68
<i>C. verum</i> *	96,3 ± 0,42	98,0 ± 0,60	97,0 ± 0,38
<i>C. limon</i>	41,7 ± 0,44	43,0 ± 0,48	60,7 ± 4,13
<i>C. reticulata</i>	42,1 ± 1,46	70,3 ± 0,71	92,7 ± 0,65
<i>C. sinensis</i>	59,7 ± 0,87	63,4 ± 1,55	95,3 ± 0,76
<i>C. citratus</i> *	94,5 ± 0,35	96,7 ± 0,84	94,9 ± 3,86
<i>C. nardus</i>	39,4 ± 0,74	55,8 ± 0,71	54,5 ± 0,98
<i>E. cardamomum</i> *	94,5 ± 0,43	97,5 ± 0,38	96,8 ± 2,21
<i>E. globulus</i>	35,1 ± 0,38	36,6 ± 0,73	51,1 ± 1,21
<i>E. caryophyllata</i> *	96,7 ± 0,47	97,3 ± 0,66	98,2 ± 0,65
<i>M. chamomilla</i>	46,8 ± 1,09	49,2 ± 1,22	52,2 ± 0,46
<i>M. piperita</i>	64,8 ± 1,07	91,4 ± 1,08	91,7 ± 0,95
<i>O. basilicum</i> *	92,1 ± 1,25	94,8 ± 0,71	96,3 ± 0,48
<i>O. vulgare</i>	74,9 ± 0,84	92,5 ± 0,27	91,6 ± 0,84
<i>P. anisum</i> *	93,0 ± 0,65	95,2 ± 0,41	96,7 ± 0,59
<i>P. sylvestris</i>	43,5 ± 0,53	45,0 ± 0,57	58,9 ± 2,5
<i>Rosa spp</i>	55,1 ± 0,85	57,5 ± 1,03	68,1 ± 5,37
<i>R. officinalis</i>	44,0 ± 0,81	45,7 ± 0,84	56,1 ± 2,32
<i>T. vulgaris</i> *	97,1 ± 0,40	98,7 ± 0,30	99,8 ± 0,73

*Aceites esenciales que inhibieron más de un 90% a las tres cepas. Los valores corresponden a la media de tres ensayos independientes ± desviación estándar.

Tabla 3a. Densidades ópticas (620nm) de los caldos de cultivo puros y de los pozos de máxima inhibición (MI) de los aceites esenciales frente a *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *P. acnes* ATCC 11827

Especie	Densidad óptica (DO ₆₂₀)					
	<i>P. acnes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	CALDO	MI [†]	CALDO	MI [†]	CALDO	MI [†]
<i>T. vulgaris</i>	0,034 ± 0,001	0,029 ± 0,000	0,036 ± 0,003	0,023 ± 0,005	0,035 ± 0,002	0,0031 ± 0,002
<i>C. verum</i>	0,034 ± 0,001	0,029 ± 0,002	0,038 ± 0,002	0,016 ± 0,002	0,037 ± 0,002	0,026 ± 0,004
<i>E. caryophyllata</i>	0,034 ± 0,001	0,028 ± 0,002	0,038 ± 0,002	0,013 ± 0,002	0,036 ± 0,001	0,033 ± 0,002
<i>P. anisum</i>	0,034 ± 0,001	0,023 ± 0,002	0,036 ± 0,003	0,017 ± 0,002	0,035 ± 0,002	0,022 ± 0,002
<i>C. citratus</i>	0,035 ± 0,002	0,025 ± 0,01	0,037 ± 0,002	0,019 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,022 ± 0,002
<i>O. basilicum</i>	0,035 ± 0,002	0,026 ± 0,001	0,038 ± 0,002	0,020 ± 0,005	0,038 ± 0,002	0,022 ± 0,002
<i>E. cardamomum</i>	0,035 ± 0,001	0,021 ± 0,002	0,038 ± 0,002	0,024 ± 0,010	0,035 ± 0,001	0,030 ± 0,002

Los valores corresponden a la media de tres ensayos independientes ± desviación estándar. [†]Corresponde a la máxima DO₆₂₀ estadísticamente menor (ANOVA) a la lectura del caldo.

Tabla 3b. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales frente a *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *P. acnes* ATCC 11827

Concentración Mínima Inhibitoria (ppm)			
Especie	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>T. vulgaris</i>	600	200	500
<i>C. verum</i>	800	500	500
<i>E. caryophyllata</i>	800	600	700
<i>P. anisum</i>	900	500	600
<i>C. citratus</i>	900	800	900
<i>O. basilicum</i>	900	900	900
<i>E. cardamomum</i>	900	900	900

Tabla 4a. Principales componentes de los aceites esenciales con mejor actividad identificados por GC/MS

Componente	<i>T. vulgaris</i>		<i>C. verum</i>		<i>E. caryophyllata</i>	
	Rt	%	Rt	%	Rt	%
Timol*	21519	55,65				
Cinnamaldehido*			20912	80,64		
m-Eugenol*					23310	92,32
Limoneno*	13339	4,5	13382	5,15	13334	1
Eucaliptol*	13417	0,22	13464	1,13	13412	0,38
Carvacrol*	23175	10,3				
Eugenol			23288	2,26		
Eugenol acetato					27532	3,56
Mentol			18047	1,93		
Linalool	15749	1,12				
o-Cimeno	13204	15,74				
4-Careno	12922	0,68				
Cariofileno	24953	1,62			24949	2,25
γ-Terpineno	14383	6,79				
Terpinen-4-ol	18168	0,99				
β-Pineno	12073	0,61				
α-Pineno	9922	0,41				
Eugenol	23279	0,43				
Endo-Borneol	17817	0,28				
Ref.	27		28		29	

Tiempo de retención (Rt) y composición (%) de los aceites esenciales, identificados por comparación con espectro de masas de referencia de la base de datos NIST-2008

Tabla 4b. Principales componentes de los aceites esenciales con mejor actividad identificados por GC/MS

Componente	<i>P. anisum</i>		<i>C. citratus</i>		<i>O. basilicum</i>		<i>E. cardamomum</i>	
	Rt	%	Rt	%	Rt	%	Rt	%
Anetol*	21307	81,91						
Metil chavicol	10,59	13,24						
Limoneno*			13313	68,26			13330	1,08
Acido Cinámico					23913	36,58		
Eucaliptol					13391	2,74	13399	72,06
Linalool			15719	0,55			15736	3,15
β-Linalool					15715	27,76		
o-Cimeno							13191	0,92
β-Ocimeno			13677	0,17				
Ocimeno							20449	1,3
2-Careno							23050	14,61
α-Citral			20852	13,25				
β-Citral			20011	9,69				
Copaeno					30216	6,76		
Oxido de Cariofileno			24914	0,17				
Estragol					18771	3,8		
β - Felandreno							11379	1,55
Terpinen-4-ol							18160	1,09
Terpineol							18567	0,85
β - Terpineno			11366	0,14				
β-Tujeno			12042	3,15				
α-Pineno			9896	0,25			9909	0,51
β-Cadinene					27259	3,63		
α-Bulnesene					27064	2,65		
α-Bergamotene					25287	2,4		
Geraniol			20388	0,49				
γ-Selineno			29739	0,26				
Ref.	30		31, 32		33		34	

Tiempo de retención (Rt) y composición (%) de los aceites esenciales, identificados por comparación con espectro de masas de referencia de la base de datos NIST-2008

DISCUSIÓN

La determinación de la actividad antiséptica de los aceites esenciales es un tema inagotable, pues a pesar de que esta es bien conocida desde tiempos primigenios,

emplearlos de manera específica seleccionando una especie, ajustando una dosis, estabilizando una formulación basada en su composición, es una labor que no se puede realizar con información genérica. El diseño de una forma farmacéutica de uso tópico para el tratamiento de una condición infecciosa específica, requiere datos específicos. Por ejemplo, para el acné vulgar, el diseño de un gel, un jabón líquido, una crema, etc. basado en estos productos naturales, inicia con información precisa respecto de la composición que demuestre eficacia y los términos cuantitativos de dicha eficacia, puesto que la composición de un aceite esencial varía significativamente dependiendo de múltiples factores, como la época de recolección, la zona geográfica y el almacenamiento entre muchos otros.

La eficacia de los aceites esenciales necesariamente se corresponde con su composición. El análisis CG/MS permitió confirmar la composición porcentual de los 7 aceites más promisorios, tal composición (cualitativa) es consistente con la reportada en la literatura (Ref. Tablas 4a y b).

Los componentes más abundantes en sus respectivos aceites, indicados con (*) en las tablas 4a y b, son reconocidos agentes antisépticos con abundante literatura que sustenta dicha afirmación,¹⁵ de hecho, existen numerosas referencias de usos específicos de los aceites esenciales o alguno de sus componentes en aplicaciones comerciales como preservantes en alimentos y cosméticos;¹⁶⁻²⁶ adicionalmente, todos ellos también tienen múltiples reportes en la literatura especializada que soportan estudios que evalúan su actividad antiinflamatoria, que son justamente las actividades (antiséptica-antiinflamatoria) que se requieren para el tratamiento antiacné. La tabla 5 presenta las referencias más relevantes.

Tabla 5. Componentes principales de los aceites esenciales más promisorios para el tratamiento del acné y referencias especializadas de su actividad biológica

Componente	Referencias Antiséptico	Referencias Antiinflamatorio	Conc. de Actividad Antiinflamatoria (ppm)
Timol	21, 22, 26, 35, 36	37-40	100 39
Cinnamaldehido	17, 20, 23, 41	42-45	Entre 50 y 100 44
m-Eugenol	16, 46-48	49-51	10 49
Eucaliptol	19, 52, 53	54-57	100 56
Carvacrol	18, 25, 58	59-63	100 61
Anetol	64, 65	66-69	30 69
Limoneno	24, 70-73	74-77	Entre 25 y 50 74
Linalool	78-82	83-85	100 84

Al hacer diluciones seriadas de los aceites entre 1 000 y 50 ppm, se evidencia que dentro de los 7 aceites más eficaces, se destacan los de *T. vulgaris* (tomillo), *E. caryophyllata* (clavo) y *C. verum* (canela), que son activos entre las 600 y las

800 ppm sobre *P. acnes*, la más importante de las 3 bacterias en el desarrollo del componente infeccioso del acné y la más resistente. Los componentes principales de estos tres aceites son timol, cinamaldehído y m-eugenol. En términos cuantitativos, respecto de su abundancia relativa, estos componentes se encuentran en el orden de las 330, 400 y 736 ppm respectivamente, produciendo inhibición sobre *P. acnes*, por lo que se puede proponer su empleo como marcadores analíticos en posibles formulaciones medicadas. En términos porcentuales, una formulación antiacné deberá llevar al menos 0,03 % de timol, 0,04 % de cinamaldehído o 0,07 % de m-eugenol para inhibir el desarrollo de dicha bacteria. Estudios funcionales se necesitan para confirmar esta propuesta. Amén de lo anterior, no se debe ignorar la presencia de otros componentes menos abundantes pero probadamente activos (limoneno, carvacrol, eucaliptol, etc.), que pueden estar actuando de manera sinérgica; no obstante que para estandarizar una formulación, el empleo de aquellos componentes como marcadores analíticos sería suficiente.

Adicionalmente, múltiples reportes de actividad antiinflamatoria indican actividad en diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* a concentraciones inferiores a las 100 ppm para todos estos componentes (tabla 5, 4ª columna). Necesariamente se requieren estudios confirmatorios, pero estos valores son indicativos y muy inferiores a las CMI, por lo que se puede teorizar, que a las concentraciones de uso (CMI), podrían tener actividad antiinflamatoria.

De los 19 aceites evaluados, 7 mostraron la capacidad de inhibir en más de un 90 % a las tres cepas evaluadas a concentraciones inferiores a las 1000 ppm. Se destacan los aceites de *T. vulgaris*, *E. caryophyllata* y *C. verum*, que alcanzaron las CMI más bajas, entre 300 y 800 ppm. El análisis por GC/MS, reveló que la composición cuali/cuantitativa de los aceites evaluados es consistente con la reportada en la literatura especializada, entre ellos, timol, m-eugenol y cinamaldehído, de reconocida actividad antiséptica, por lo que se podría esperar que formulaciones tópicas diseñadas con ellos, posean buena actividad para tratamiento del acné con base en estos recursos naturales. Estudios controlados que lo demuestren se necesitan.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Cartagena por el apoyo recibido para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matiz G, Osorio MR, Camacho F, Atencia M, Herazo J. Diseño y evaluación *in vivo* de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum* L) y ácido acético. Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud. 2012;32(1).
2. Williams HC, Dellavalle RP, Garner S. Acne vulgaris. Lancet. 2012;379(9813):361-72.
3. Fisk WA, Lev-Tov HA, Sivamani RK. Botanical and Phytochemical Therapy of Acne: A Systematic Review. Phytother Res. 2014;In Press:1-16.

4. CLSI. Performance standards for Antimicrobial susceptibility testing, 21st international supplements. CLSI Document M100-S21. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
5. Sutton S. Measurement of cell concentration in suspension by optical density. *Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter*. 2006;12(8):3-13.
6. Bogut A, Niedźwiadek J, Kozio-Montewka M, Strzelec-Nowak D, Blacha J, Mazurkiewicz T, et al. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus warneri* small-colony variants associated with prosthetic-joint infections. *J Med Microbiol*. 2014;63(Pt 2):176-85.
7. Pérez JE, Isaza G, Acosta S. Actividad antibacteriana de extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*. *Biosalud*. 2007;6:59-68.
8. Rojas J, García A, López A. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 2005;4(2):28-32.
9. Ramírez A, Stella L, Marín D. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 2009;15(42):263-8.
10. López A, García A, Rojas J. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 2005;4(002):28-32.
11. Gibbons S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochem Rev*. 2005;4(1):63-78.
12. Franco L, Matiz G, Pájaro Bolívar I, Gómez H. Actividad Antibacteriana *in vitro* de Extractos y Fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 2013;12(3):230-7.
13. Baharum SN, Bunawan H, Ghani MaA, Mustapha WAW, Noor NM. Analysis of the chemical composition of the essential oil of *Polygonum minus* Huds. using two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF MS). *Molecules*. 2010;15(10):7006-15.
14. Tomy GT, Stern GA, Muir DC, Fisk AT, Cymbalisty CD, Westmore JB. Quantifying C10-C13 polychloroalkanes in environmental samples by high-resolution gas chromatography/electron capture negative ion high-resolution mass spectrometry. *Anal Chem*. 1997;69(14):2762-71.
15. Akthar MS, Degaga B, Azam T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*. 2014;2(1):1-7.
16. Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;114:392-7.

17. Gomes C, Moreira RG, Castell-Pérez E. Poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) Nanoparticles with Entrapped *trans*-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. J Food Sci. 2011;76(2):N16-N24.
18. Kavooosi G, Dadfar SMM, Mohammadi Purfard A, Mehrabi R. Antioxidant and antibacterial properties of gelatin films incorporated with carvacrol. J Food Saf. 2013;33(4):423-32.
19. Moreira A, Carmo E, Wanderley P, de Souza E, de Oliveira E. Inhibitory effect of the essential oil from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit on the growth and aflatoxins synthesis of *Aspergillus flavus*. J Life Sci. 2013;7(3):276-81.
20. Nostro A, Scaffaro R, D'Arrigo M, Botta L, Filocamo A, Marino A, et al. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. J Microbiol Biotechnol. 2012;96(4):1029-38.
21. Ramos M, Jiménez A, Peltzer M, Garrigós MC. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. J Food Eng. 2012;109(3):513-9.
22. Reddy B, Angers P, Gosselin A, Arul J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochemistry. 1998;47(8):1515-20.
23. Sanla-Ead N, Jangchud A, Chonhenchob V, Suppakul P. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films. Packag Technol Sci. 2012;25(1):7-17.
24. Sundrarajan M, Rukmani A. Durable antibacterial finishing on cotton by impregnation of limonene microcapsules. Advanced Chemistry Letters. 2013;1(1):40-3.
25. Ye H, Shen S, Xu J, Lin S, Yuan Y, Jones GS. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. Food Control. 2013;34(2):619-23.
26. Wattanasatcha A, Rengpipat S, Wanichwecharungruang S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. Int J Pharm. 2012;434(1):360-5.

Recibido:7 de marzo de 2014
Aprobado:24 de abril de 2014

Germán Eduardo Matiz Melo Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Campus de Ciencias de la Salud Barrio Zaragocilla, Cartagena, Colombia. Teléfono: (575)6699771. Celular: (57)300215395. Correo electrónico: gmatizm@unicartagena.edu.co