

Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné

In vitro antibacterial activity of the essential oil against microorganisms involved in acne

MSc. Miladys Esther Torrenegra Alarcón,^I Dr. C. Germán Eduardo Matiz Melo,^{II} Dr. C. Jesús Gil González,^{III} QF Glicerio León Méndez^I

^I Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena. Grupo de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimentos (GITFCA), Campus de Ciencias de la Salud Barrio Zaragocilla. Cartagena, Colombia.

^{II} Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

^{III} Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional sede Medellín, Campus Núcleo el Volador. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Objetivo: evaluar la composición química, la sensibilidad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de tres aceites esenciales de las especies vegetales *Origanum vulgare L*, *Origanum vulgare ssp* y *Lippia alba Mill* cultivadas en el norte del departamento de Bolívar (Colombia), obtenidos mediante hidrodestilación e hidrodestilación asistida por la radiación con microondas.

Métodos: los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación e hidrodestilación asistida por radiación con microondas, a partir de las hojas; se determinó densidad relativa a 20 °C, índice de refracción, solubilidad de los aceites esenciales en etanol (70 % v/v) y rotación óptica. La composición química se evaluó mediante cromatografía de gases/espectrómetro de masa (CG/EM). La actividad se realizó sobre tres bacterias implicadas en el desarrollo del acné: *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Para determinar la sensibilidad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria, los aceites se diluyeron hasta la concentración deseada (1 000–50 µg/mL) empleando el método de microdilución en caldo, y se empleó el lector de microplacas para la cuantificación del crecimiento bacteriano.

Resultados: los rendimientos oscilaron entre 0,04 y 0,16 %, dependiendo de la especie vegetal y el método de extracción utilizado. Los resultados de la prueba de sensibilidad mostraron que las bacterias fueron más sensibles al aceite esencial de orégano "borde blanco" (*Origanum vulgare ssp*) obtenido mediante ambos métodos de extracción; además, este aceite presentó el mayor contenido de monoterpenos oxigenados con reconocida actividad antibacteriana, como son el carvacrol y el timol.

Conclusiones: el aceite esencial de orégano "borde blanco" (*Origanum vulgare ssp*) es considerado como promisorio para el control del componente bacteriano del acné vulgar.

Palabras clave: actividad antibacteriana, aceites esenciales, concentración mínima inhibitoria, acné.

ABSTRACT

Objective: to assess the chemical composition, antibacterial sensitivity and the in vitro minimum inhibitory concentration of essential oils from plant species *Origanum vulgare L*, *Origanum vulgare ssp* y *Lippia alba Mill* cultured in the North of the Department of Bolívar (Colombia), obtained by hydrodistillation and by microwave radiation-assisted hydrodistillation.

Methods: essential oils were extracted by distillation and microwave radiation-assisted hydrodistillation from the leaves; relative density at 20 °C, refractive index; solubility of the essential oils in ethanol (70 % v/v) and optical rotation were all determined. The chemical composition was assessed using gas chromatography/mass spectrometer. The event was performed over three bacteria involved in the development of acne: *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. For the purpose of determining the antibacterial sensitivity and the minimum inhibitory concentration, oils were diluted up to reaching the desired concentration (1000-50 µg/mL) using broth microdilution method, and microplate reader for the quantification of bacterial growth.

Results: Yields ranged from 0,04 to 0,16 %, depending on the plant species and the extraction method used. The sensitivity test results showed that the bacteria were more sensitive to the essential oil oregano "white border" (*Origanum vulgare ssp*) obtained by both methods of extraction; in addition, this oil showed the greatest content of oxygenated monoterpenes, with known antibacterial activity, such as carvacrol and thymol.

Conclusions: the essential oil of oregano "white border" (*Origanum vulgare ssp*) is considered as promising for the control of the bacterial component of acne vulgaris.

Keywords: antibacterial activity, essential oils, minimum inhibitory concentration, acne.

INTRODUCCIÓN

Una de las afecciones más frecuentes en el mundo entero es el acné; esta patología es una de las enfermedades más comunes de la piel que se inicia en la adolescencia

(11 a 13 años) afectando entre el 60–80% de los varones y el 30 a 50 % de las mujeres en esta edad; aunque puede presentarse, en algunos casos, a edades más tardías.¹ Además, el acné es una condición que con frecuencia afecta psicológicamente a quien la padece, especialmente en los casos más graves. Aunque la afección tiene un componente microbiano, es fundamentalmente un proceso inflamatorio de origen multifactorial que es propio de cada paciente. Esta entidad dermatológica se asocia principalmente con proliferaciones bacterianas de *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, además de otras bacterias que conforman la flora normal del folículo sebáceo.²

En la actualidad, existen diversos procedimientos útiles para controlar el acné inflamatorio e infeccioso; no obstante, se presenta frecuentemente resistencia a los antibióticos empleados, e irritaciones y resequedad con la utilización de otras alternativas farmacológicas. Debido a los inconvenientes que se han presentado los tratamientos con el transcurrir del tiempo, se hace necesario desarrollar nuevas alternativas para contra restar las bacterias involucradas en el acné.^{3,4}

La tendencia actual de volver a lo natural para llevar una vida más sana, induce a quienes se dedican a la tecnología farmacéutica a investigar y desarrollar formulaciones innovadoras que permitan el empleo de productos naturales de origen vegetal para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por agentes patógenos.⁵ Los aceites esenciales (AE) de plantas aromáticas y medicinales contienen principios activos que exhiben bioactividades como la antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, entre otras.⁶ En particular, los AE de los géneros *Thymus*, *Origanum* y *Lippia* contienen compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol, a los cuales se les atribuye propiedades antisépticas y bactericidas.⁷⁻⁹

En este trabajo, se obtuvieron AE, mediante hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (MWHd), de las especies vegetales *Origanum vulgare* L, *Origanum vulgare* ssp y *Lippia alba* Mill, cultivadas en el norte del departamento de Bolívar (Colombia); y se determinó la composición química, la sensibilidad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* de los AE sobre tres bacterias implicadas en el desarrollo del acné: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

MÉTODOS

El *Tween 80* (polioxietilensorbitanmonooleato, BHL=15), caldo *Müller Hinton* (caldo MH), agar *Müller Hinton* (agar MH), caldo *Tripticasa Soya* (caldo TSA), agar *Tripticasa Soya* (agar TSA), caldo *Lutia Bertani* (caldo LB) y agar *Lutia Bertani* (agar LB) fueron adquiridos de *Merck KGaA* (*Darmstadt*, Alemania); el etanol de *JT Baker* (*Phillipsburg*, Estados Unidos) y la gentamicina sulfato de *Biopex SAC* (Estándar Secundario Lote: 10C256). Todas las cepas bacterianas fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC): *P. acnes* ATCC 11827, *S. aureus* ATCC 25923 y *S. epidermidis* ATCC 12228.

RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las hojas de las plantas orégano (*O. vulgare*), orégano "borde blanco" (*P. amboinicus*), y oreganito (*L. alba*), fueron recolectadas en el barrio Membrillal, cerca de la carretera que conduce a la zona industrial de la ciudad de Cartagena (Colombia), aproximadamente a 12 kilómetros de la región sur-oriental. De cada una de las especies se tomaron 1 000 g de hojas por semana, en el periodo

comprendido de enero a marzo del 2014. El material vegetal fue identificado en el Herbario Gabriel Gutiérrez V. (MEDEL) de la Universidad Nacional de Colombia,

Sede Medellín (Colombia), registro nacional de colecciones biológicas. Los números de colección de dichas plantas fueron: Torrenegra M. N°01, N°02 y N°03 para *O. vulgare*, *P. amboinicus*, y *L. alba* respectivamente.

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Las hojas colectadas fueron lavadas con agua y seleccionadas para garantizar buen estado; seguidamente se trocearon, pesaron y procesaron inmediatamente. La extracción del AE de las hojas se realizó por dos métodos: hidrodestilación por arrastre con vapor de agua convencional (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWH). Se empleó un equipo de hidrodestilación con capacidad para 4 L, 500 g del material vegetal, seleccionado y troceado, se introdujeron en el balón de extracción, el cual contenía 500 mL de agua destilada; para ambos métodos el tiempo de extracción fue de 3–4 horas. Como fuente de radiación microondas se empleó un horno convencional (Samsung, Estados Unidos) modificado, con un ciclo de irradiación de 60 minutos y a una potencia del 70 %.¹⁰ En ambos casos, el AE se colectó en un recipiente tipo *Dean Stark*. El AE se separó por decantación e inmediatamente fue almacenado en un vial ámbar de 4 mL.

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS DEL AE

A cada muestra de AE se le midieron las siguientes propiedades físicas: a) densidad relativa a 20 °C; b) índice de refracción; c) solubilidad del AE en etanol (70 % v/v): en un tubo de plástico con tapa de 1,5 mL se adicionaron 100 µL de etanol al 70 % (v/v) y 2 µL del AE. La mezcla se homogenizó en un *vórtex* a 200 rpm hasta obtener una solución homogénea; d) rotación óptica: se preparó una disolución al 10 % (p/v) del AE en etanol (96 %). El análisis fue realizado utilizando un polarímetro (*Sper Scientific*, Estados Unidos) provisto de una celda de 10 mL, a una temperatura de 20 °C y la línea D del sodio (589 nm).

ANÁLISIS DEL AE POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTRÓMETRO DE MASA (CG/EM)

Se empleó un equipo CG/EM 7890A/5975C *Agilent* (Estados Unidos) 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. Las condiciones de operación fueron: columna capilar HP-5MS (5 % *phenyl methyl silox*, 30 m x 250 µm x 0.25 µm), temperatura inicial 45 °C, temperatura de la línea de transferencia de 280 °C y volumen de inyección 1,0 µL en modo *split* (20:1), con temperatura del inyector de 250 °C.^{11,12} La detección de los compuestos se realizó por comparación del espectro de masas, en cada tiempo de retención, con los reportados en la base de datos NIST-2008.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO*

Los inóculos bacterianos se prepararon de acuerdo a las indicaciones establecidas por el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI),¹³ tomando entre 3–4 colonias bien diferenciadas y morfológicamente similares de las bacterias previamente sembradas en placas Petri con el agar específico, y luego suspendiéndolas en tubos de ensayo en caldo homólogo estéril, para *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. acnés* se utilizaron MH, LB y TSA, respectivamente.

La incubación se realizó a 35 ± 2 °C y se verificó sistemáticamente la densidad óptica (DO) a 620 nm en lector de microplacas (*Multiscan EX Thermo*[®], Estados Unidos) hasta que la suspensión bacteriana alcanzara una DO_{620} entre

0,08–0,1 unidades, equivalente a 0,5 en la escala de *McFarland* (1×10^8 UFC/mL); la suspensión fue diluida a fin de obtener una suspensión de trabajo de 5×10^5 UFC/mL en los ensayos biológicos.

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, e incubado a 35 ± 2 °C y verificando, a intervalos regulares la DO_{620} de la suspensión bacteriana en lector de microplacas.¹⁴ El tiempo en el que se logró el mayor valor, se empleó como tiempo de incubación en todos los ensayos. Debido a la insolubilidad en agua de los AE, se utilizaron mezclas de caldo:etanol:*Tween*-80.^{15,16} Para este estudio, diferentes mezclas de etanol:caldo:*tween*-80 se incubaron con las cepas bacterianas en placas de 96 pocillos a 35 ± 2 °C por el tiempo definido para cada bacteria según las curvas de crecimiento; posteriormente, se determinaron los porcentajes de viabilidad frente al blanco de máximo crecimiento (caldo con inóculo), con el objeto de seleccionar la mezcla más adecuada. Para la evaluación de la sensibilidad antibacteriana se prepararon soluciones de AE a concentración de 1000 µg/mL, acorde con el criterio de *Gibbons*¹⁷ que considera como promisorios los productos que presenten valores de CMI inferior a 1 000 µg/mL. Estas soluciones se incubaron con las suspensiones bacterianas a 35 ± 2 °C, utilizando gentamicina sulfato (0,016 mg/mL) como control positivo de actividad antibacteriana. Al final del periodo de incubación, las placas se agitaron 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.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Cincuenta µL de las suspensiones de las cepas fueron incubadas en placas de 96 pozos, con 50 µL de concentraciones seriadas entre 1 000 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, comparando contra pozos de caldo puro. Pozos con caldo inoculado (máximo crecimiento) y con gentamicina (30 ppm) se emplearon como control.¹³

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 pruebas *t* y análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de prueba de *Dunnet* o *Tukey 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

La eficiencia de la extracción, las propiedades físicas y el análisis de la composición química de los AE por CG/EM se presentan en la tabla 1 y 2.

Las curvas de crecimiento mostraron que las cepas bacterianas del género *Staphylococcus* se encuentran en la etapa final de la fase exponencial a las 20 horas; mientras que para *P. acnes*, es a las 48 horas; por lo tanto, en este trabajo, se consideró el punto final de incubación en los bioensayos de actividad antibacteriana a las 48 h. Para incorporar los AE al medio de cultivo se estableció que la mezcla de solventes que contenía etanol al 4 % y polisorbato-80 al 1 % no inhibieron el crecimiento de ninguna de las cepas: por esta razón se seleccionó el sistema solvente caldo:etanol:polisorbato-80 en proporción 95:4:1.

Los resultados de la evaluación de la sensibilidad antibacteriana de los AE (tabla 3), permitieron elegir al AE de orégano "borde blanco" como promisorio, tomando como criterio de selección aquellos que fueron capaces de inhibir en más de un 90 % a las tres cepas a una concentración de 1000 µg/mL .

La CMI se determina utilizando caldo inoculando y estandarizado, al que se adicionan soluciones de aceites a diferentes concentraciones, provocando una dilución; esto explica el porqué la absorbancia (DO₆₂₀) 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. 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 4a y 4b.

Tabla 1. Rendimiento y propiedades físicas de los AE de las especies *Origanum* y *Lippia*, obtenidos a través del método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD)

ANÁLISIS	<i>O. vulgare</i>		<i>O. vulgare ssp</i>		<i>L. alba</i>	
	HD	MWHD	HD	MWHD	HD	MWHD
Rendimiento (%)	0,09 ± 0,00 a	0,07 ± 0,01 b	0,05 ± 0,00 c	0,04 ± 0,00 d	0,16 ± 0,00 e	0,10 ± 0,10 f
Índice de refracción 20 °C	1,4766±0,0002 a	1,5030±0,0010 b	1,4753±0,0004 a	1,5065±0,00045 c	1,4617±0,0001 d	1,5023±0,0003 b
Solubilidad EtOH (70 % v/v)	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Rotación óptica	-0,200±0,0002 a	-0,200±0,0002 a	0,283±0,02887- b	0,267±0,02887 b	0,117±0,02887 c	0,133±0,02887 -d
Densidad (g/mL) a 20 °C	0,9259±0,0037 a	0,9539±0,0003 b	0,9471±0,0052 b	0,9473±0,0043 b	0,9454±0,0051 b	0,9449±0,0087 b

Filas sin ninguna letra en común presentaron diferencias estadísticas significativas a un nivel de confianza p<0,05

Tabla 2. Componentes mayoritarios detectados en los AE obtenidos mediante HD y MWHD

Compuesto	% Abundancia relativa , (t _R , min)					
	<i>O. vulgare</i>		<i>O. vulgare ssp</i>		<i>L. alba</i>	
	HD	HDM	HD	HDM	HD	HDM
p-Cimeno	N.P	8,51 (5,912)	N.P	2,31 (5,957)	N.P	5,50 (6,198)
α-pineno	N.P	N.P	0,59 (9,957)	N.P	N.P	0,29 (4,217)
β-Mirceno	N.P	0,40 (5,173)	N.P	N.P	1,04 (12,103)	0,71 (5,173)
o-cimeno	N.P	N.P	6,71 (13,464)	N.P	3,05 (13,438)	12,17 (5,942)
Limoneno	N.P	N.P	N.P	N.P	0,55 (13,508)	N.P
γ-Terpineno	9,81 (14,691)	13,43 (6,545)	6,25 (14,709)	0,91 (6,485)	1,49 (14,479)	12,07 (6,575)
Linalool	N.P	N.P	N.P	N.P	0,42 (15,896)	N.P
Timol	13,77 (22,764)	N.P	10,11 (22,148)	10,74 (20,854)	N.P	N.P
Citral	N.P	N.P	N.P	6,49 (10,102)	5,24 (20,522)	N.P
Carvacrol	65,63 (11,852)	65,01 (11,360)	64,55 (22,521)	69,97 (11,684)	0,14 (22,616)	44,74 (11,383)
Eugenol	N.P	N.P	N.P	N.P	N.P	5,21 (12,679)
Cariofileno	7,49 (25,248)	N.P	4,00 (25,361)	2,75 (12,58)	N.P	4,38 (12,762)
Fenil isoprenos	82,11 %	74,52 %	80,97 %	86,63 %	1,17 %	52,59 %
Monoterpenos	10,14 %	25,58 %	14,69 %	10,42 %	98,83 %	42,26 %
Sesquiterpenos	7,75 %	0 %	4,34 %	2,95 %	0%	5,15 %
Total compuestos identificados	96,7 %	87,35 %	92,21 %	93,17 %	11,93 %	85,07 %

Tiempo de retención (tr) y abundancia relativa (%) de los aceites esenciales, No presente (NP), identificados por comparación con espectro de masas de referencia de la base de datos NIST-2008.

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de crecimiento obtenidos en la prueba de sensibilidad bacteriana de los aceites esenciales (1000 µg/mL) frente a tres cepas bacterianas

Aceites esenciales	Método de extracción	Cepas bacterianas		
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. acnes</i>
Gentamicina (Control)		98,1±0,3	98,0±0,2	98,0±0,3
<i>O. vulgare</i>	HD	92,2±0,8	92,9±0,2	79,7±0,6
	MWHD	94,2±0,5	93,1±0,1	79,9±0,2
<i>L. alba</i>	HD	89,9±0,9	87,4±0,5	78,2±0,2
	MWHD	90,1±0,2	88,4±0,6	79,1±0,4
<i>O. vulgare ssp</i>	HD	95,2±0,9	94,9±0,3	94,2±0,6
	MWHD	96,3±0,3	95,2±0,2	95,1±0,5

Tabla 4a. Densidades ópticas (620 nm) 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>O. vulgare</i>	0,034 ± 0,001	0,027 ± 0,002	0,037 ± 0,001	0,023 ± 0,002	0,037 ± 0,002	0,026 ± 0,004
<i>L. alba</i>	0,034 ± 0,001	0,029 ± 0,002	0,037 ± 0,002	0,024 ± 0,002	0,037 ± 0,001	0,027 ± 0,002
<i>O. vulgare ssp</i>	0,034 ± 0,001	0,025 ± 0,002	0,037 ± 0,001	0,021 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,025 ± 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 4b. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales frente a *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *P. acnés* ATCC 11827

Aceites esenciales	Método de extracción	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (µg/mL)		
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. acnes</i>
<i>O. vulgare</i>	HD	900	900	N.P
	MWHD	900	900	N.P
<i>L. alba</i>	HD	1000	1000	N.P
	MWHD	1000	1000	N.P
<i>O. vulgare ssp</i>	HD*	800	800	900
	MWHD*	700	700	800

No presente (NP)

DISCUSION

Los AE de las tres especies vegetales presentaron propiedades físicas en común, tales como: olor intenso y característico, líquido a temperatura ambiente, arrastrables por vapor de agua e insoluble en ella, rango de color amarillo pálido a intenso.

En la tabla 1 se encontraron diferencias estadísticas significativas para el rendimiento según el método de extracción empleado. Los rendimientos alcanzados por el método de *MWHD* y *HD* oscilaron entre 0,04-0,10 % y 0,05-0,16 %, respectivamente.

En la técnica *MWHD*, se utiliza menos tiempo de extracción, esto se atribuye al rompimiento de las estructuras de los componentes principales de mayor abundancia en el AE por medio de las radiaciones electromagnéticas aplicadas en la extracción; las microondas involucran un flujo de calor más eficiente, y pueden calentar toda la muestra casi simultáneamente a un ritmo alto, generando un menor rendimiento en el método de *MWHD* respecto a la *HD*.¹⁸ También existen otros factores que probablemente pudieron influir sobre el rendimiento de los AE de las diferentes especies como son: los métodos de cultivo y las condiciones geobotánicas: clima, altitud, tipo de suelo, luminosidad, pluviosidad, temperatura; época de recolección y edad de las plantas.¹⁹

Es importante resaltar que todos los AE obtenidos por los dos métodos de extracción, poseen como componente mayoritario el carvacrol, excepto el AE de *L. alba* obtenido por *HD*. Los AE obtenidos por *HD* mostraron una menor cantidad de monoterpenos oxigenados, en contraste con los AE extraído por el método de *MWHD*; posiblemente, este hecho podría estar relacionado con a una baja eficiencia de la extracción. Otro factor que puede tener un papel importante durante la extracción mediante esta técnica es el contenido de compuestos grasos (lípidos) presentes en la planta; ya que estos son poco volátiles y en cierto modo llegarían a retener por solubilidad a la fracción de hidrocarburos volátiles que muestran más afinidad por ellos.²⁰

Las condiciones agroecológicas del cultivo y los parámetros operacionales del proceso de extracción son las variables que inciden sobre la composición y el rendimiento de los aceites esenciales. Según indican Tafurt *et al.*,²¹ estas variaciones inducen cambios morfológicos, histológicos y fisiológicos en la planta, mientras que la eficiencia de la HD está relacionada con los parámetros operacionales tales como tiempo, temperatura de la extracción y cantidad de agua empleada, entre otros.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la sensibilidad bacteriana (tabla 3), demostraron que el AE de *O. vulgare ssp* presentó los mejores resultados. Posiblemente, la mayor sensibilidad de los microorganismos al AE de esta planta se deba a que estos AE presentaron la más alta concentración de monoterpenos oxigenados del tipo fenol como el timol y carvacrol. La bacteria *P. acnes* presentó la menor sensibilidad a los AE; posiblemente, la baja cantidad de timol, compuesto que es activo contra esta bacteria,²² es insuficiente para afectar el desarrollo de este microorganismo. Específicamente, el AE de *O. vulgare* fue más activo con las bacterias del género *Staphylococcus*, lo cual puede estar relacionado con los resultados obtenidos por Carneiro de Barros *et al.*²³ quienes encontraron que el AE de *O. vulgare* suprime algunos atributos fisiológicos de *S. aureus* tales como coagulasas, lipasas y la tolerancia a la sal, y esta interferencia metabólica fue dependiente de la dosis del AE.

Con las evaluaciones de CMI se determinó que el AE de *O. vulgare ssp* obtenido por los ambos métodos HD-MWHD mostró inhibición total del crecimiento bacteriano a concentraciones inferiores que las obtenidas para los AE de *O. vulgare* y *L. alba* (tabla 4). Adicionalmente, los AE de ambas especies no presentaron inhibición de la bacteria *P. acnes*, implicada en el desarrollo del acné.

Las menores CMI (700 a 900 µg/mL) fueron obtenidas para el AE de *P. amboinicus*. En particular, este AE presentó la mayor concentración relativa del compuesto carvacrol, el cual puede penetrar la membrana del citoplasma, causando una desestabilización de esta; igualmente podría actuar como intercambiador de protones, reduciendo el gradiente de pH a lo largo de la membrana.²² Resultados similares fueron encontrados por Stefanakis *et al.*⁶ quienes evaluaron la actividad antibacteriana de AE obtenidos de plantas del género *Origanum*, y además, encontraron que el carvacrol exhibe alta actividad antibacteriana. Similarmente, el AE de *L. alba* presentó la más alta CMI contra las tres bacterias, hecho que puede estar relacionado con el bajo contenido de fenoles detectado en la muestra (tabla 2).

De esta manera se sigue sumando evidencia sosteniendo que los AE, son una buena fuente natural y disponible que posibilitará desarrollar diferentes formas farmacéuticas con actividad farmacológica definida. Por otro lado, estos resultados pueden servir para comenzar a entender las razones del extenso uso de los aceites esenciales, ya sean en la medicina tradicional o en la aromaterapia, al mismo tiempo podemos acercarnos cada vez más a la utilización de las plantas aromáticas, que contienen AE, como terapia complementaria de las convencionales.

Las cepas bacterianas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. acnes*, resultaron susceptibles a la acción antibacteriana del AE de *O. vulgare ssp* extraído por los métodos de hidrodestilación e hidrodestilación asistida por la radiación con microondas; lo cual, convierte a este AE, cuyo principal constituyente es el agente antimicrobiano carvacrol, como promisorio para el control del componente bacteriano del acné vulgar. No obstante, se recomienda realizar estudios biodirigidos de actividad antibacteriana frente a las cepas implicadas en el desarrollo del acné.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Cartagena y a la Universidad Nacional por facilitar espacio, recursos y tiempo de los investigadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pascual ME, Slowing K, Carretero ME, Villar A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*). *Fármaco*. 2001; 56(5-7): 501-504.
2. Gilaberte Y. Dermatología pediátrica: ¿qué hay de nuevo en el acné? *Revista Pediatría de Atención Primaria*. 2009; 11: 303-316.
3. Leyden J, Preston N, Osborn C, Gottschalk R. *In vivo* Effectiveness of Adapalene 0.1% / Benzoyl Peroxide 2.5% Gel on Antibiotic-sensitive and Resistant *Propionibacterium acnes*. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2011; 4: 22-26.
4. 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):125-133.
5. Enshaieh S, Jooya A, Siadat AH, Iraj F. The efficacy of 5% topical tea tree oil gel in mild to moderate acne vulgaris: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Indian Journal Dermatology, Venereology and Leprology*. 2007; 73(1): 22-25.
6. Stefanakis M, Touloupakis E, Anastasopoulos E, Ghanotakis D, Katerinopoulos E, Makridis P. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food control*. 2013; 34: 539-546.
7. Bastos M., Damé L, de Souza L, Almeida D, Alves R, Braga J. Antimicrobial action of *Origanum vulgare* L. essential oil against bacteria isolated from bovine milk. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2011; 16(3): 260-266.
8. Borboa FJ, Rueda PE, Acedo FE, Ponce MJ, Cruz M, Grimaldo JO, García OA. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2009; 2: 319-326.
9. Yano Y, Satomi M, Oikawa H. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. Journal. of Food Microbiology*. 2006; 111: 6-11.
10. Chemat F., Lucchesi ME, Smadja J, Favretto L, Colnaghi G, Visinoni F. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*. 2006; 555(1): 157-160.
11. 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.
12. 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.

13. CLSI. Performance standards for Antimicrobial susceptibility testing, 21st international supplements. CLSI Document M100-S21. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
14. Pérez JE, Isaza G, Acosta S. Actividad antibacteriana de extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*. *Biosalud*. 2007;6:59-68.
15. 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.
16. 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.
17. Gibbons S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochem Rev*. 2005;4(1):63-78.
18. Golmakani M, Rezaei K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*. 2008; 109 (4): 925-930.
19. Stashenko E., Ruíz CA, Arias G, Durán DC, Salgar W, Cala M, Martínez MR. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis and PCA. *J. Sep. Sci*. 2010; 33: 93-103.
20. Granados C., Yáñez Y, Santafé G. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 2012; 10(1) ,12-23.
21. Tafurt G., Martinez J, Stashenko E. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Revista Colombiana de Química*. 2005; 34(1): 43-55.
22. Xu J, Zhou F, Ji B, Pei R, Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol*. 2008;47(3):174-9.
23. De Barros J., da Conceição, M, Gomes N, Vieira A, de Souza E. Combination of *Origanum vulgare* L. essential oil and lactic acid to inhibit *Staphylococcus aureus* in meat broth and meat model. *Braz J Microbiol*. 2012; 43(3): 1120-1127.

Recibido: 3 de agosto de 2015.

Aprobado: 29 de enero de 2015.

Miladys Esther Torrenegra Alarcón. Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Campus de Ciencias de la Salud Barrio Zaragocilla, Cartagena, Colombia- Teléfono: (575)6699771. Celular: (57)3113565598. Correo electrónico: mtorrenegraa@hotmail.com