

Artículo Original

Actividad antimicrobiana de un sistema a base de un extracto vegetal y tres aceites esenciales

Antimicrobial activity of a system based on a vegetable extract and three essential oils

Carlos E. Cabrera

Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de un sistema obtenido, mezclando en partes iguales, el extracto alcohólico de semillas de *Citrus paradisi*, y los aceites esenciales de *Luma chequen*, *Melaleuca alternifolia* y *Cymbopogon citratus*; frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Se utilizó el método de difusión en pozo, la actividad antimicrobiana se evaluó por medición de los halos de inhibición. Los componentes individuales presentaron la siguiente actividad (halo de inhibición "mm"): extracto de *C. paradisi* (*E. coli*: "9,67 ± 0,47"; *S. aureus*: "11,67 ± 1,25"; *P. aeruginosa*: "9,67 ± 0,47"; *C. albicans*: "7,67 ± 0,47" y *A. niger*: "sin actividad"); aceite esencial de *L. chequen* (*E. coli*: "12,00 ± 0,00"; *S. aureus*: "inhibición total"; *P. aeruginosa*: "sin actividad"; *C. albicans*: "13,33 ± 0,47" y *A. niger*: "15,33 ± 0,47"); aceite esencial de *M. alternifolia* (*E. coli*: "18,33 ± 0,47"; *S. aureus*: "inhibición total"; *P. aeruginosa*: "sin actividad"; *C. albicans*: "24,33 ± 1,25" y *A. niger*: "inhibición total") y aceite esencial de *C. citratus* (*E. coli*: "sin actividad"; *S. aureus*: "sin actividad"; *P. aeruginosa*: "sin actividad"; *C. albicans*: "sin actividad" y *A. niger*: "19,67 ± 0,47"). Por otro lado, el sistema propuesto presentó la siguiente actividad (halo de inhibición "mm"): *E. coli*: "13,00 ± 0,00"; *S. aureus*: "inhibición total"; *P. aeruginosa*: "12,33 ± 0,47"; *C. albicans*: "10,33 ± 0,47" y *A. niger*: "26,67 ± 0,47". Se concluye que el sistema propuesto presenta actividad antimicrobiana frente a todos los microorganismos evaluados.

Palabras clave: *Citrus paradisi*; *Luma chequen*; *Melaleuca alternifolia*; *Cymbopogon citratus*; actividad antimicrobiana.

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial activity of a system obtained, mixing in equal parts, the alcoholic extract of *Citrus paradisi* seeds, and the essential oils of *Luma chequen*, *Melaleuca alternifolia* and *Cymbopogon citratus*; in front of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Agar well diffusion method was used, considering an inhibition halo of 8 mm, as a minimum valid measure. Individual components showed the following activity (inhibition halo "mm"): *C. paradisi* extract (*E. coli*: "9.67 ± 0.47"; *S. aureus*: "11.67 ± 1.25"; *P. aeruginosa*: "9.67 ± 0.47"; *C. albicans*: "7.67 ± 0.47" and *A. niger*: "no activity"); essential oil of *L. chequen* (*E. coli*: "12.00 ± 0.00"; *S. aureus*: "total inhibition"; *P. aeruginosa*: "no activity"; *C. albicans*: "13.33 ± 0,47" and *A. niger*: "15.33 ± 0,47"); essential oil of *M. alternifolia* (*E. coli*: "18.33 ± 0,47"; *S. aureus*: "total inhibition"; *P. aeruginosa*: "no activity"; *C. albicans*: "24.33 ± 1,25" and *A. niger*: "total inhibition") and essential oil of *C. citratus* (*E. coli*: "no activity"; *S. aureus*: "no activity"; *P. aeruginosa*: "no activity"; *C. albicans*: "No activity" and *A. niger*: "19.67 ± 0.47"). On the other hand, the

Correspondencia:

Nombre: Carlos Enrique Cabrera García

Correo: carlos.cabrerag@gmail.com

Recibido: 06/07/2019

Aceptado: 06/08/2019

Citar como:

Cabrera, C. E. (2019). Actividad antimicrobiana de un sistema a base de un extracto vegetal y tres aceites esenciales. Ciencia e Investigación 2019 22(1):21-25

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución - No Comercia. Compartir Igual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

proposed system presented the following activity (inhibition halo "mm"): *E. coli*: "13.00 ± 0.00"; *S. aureus*: "total inhibition"; *P. aeruginosa*: "12.33 ± 0.47"; *C. albicans*: "10.33 ± 0.47" and *A. niger*: "26.67 ± 0.47". It is concluded that the proposed system has antimicrobial activity against all the microorganisms evaluated.

Keywords: *Citrus paradisi*; *Luma chequen*; *Melaleuca alternifolia*; *Cymbopogon citratus*; antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

Las tendencias actuales en la industria cosmética, buscan la reducción del uso de conservantes sintéticos, para lo cual, una de las estrategias es buscar excipientes multifuncionales derivados de plantas^(1,2). Entre los candidatos se encuentran los extractos vegetales y los aceites esenciales que, a razón de sus propiedades antimicrobianas, han sido utilizados alrededor del mundo para el tratamiento de muchas afecciones y tienen menos efectos adversos que las drogas sintéticas⁽³⁾; por lo que están siendo evaluados a nivel global como fuente de compuestos antimicrobianos⁽⁴⁾. El número de constituyentes de los aceites esenciales puede llegar a cien; pero, a menudo se encuentra que dos o tres componentes son los principales, que se encuentran en alta concentración (20 a 70%) y determinan sus propiedades biológicas. Los monoterpenos son las moléculas más frecuentemente encontradas constituyendo aproximadamente 90% de los aceites esenciales^(5,6).

Se puede formular un sistema resultante de la asociación de más de un extracto o aceite esencial⁽⁴⁾, que puede tener un efecto sinérgico, a partir de la interacción química de sus componentes^(7,8), con lo cual se puede obtener los siguientes beneficios: ampliar el espectro de actividad antimicrobiana, reducir la cantidad necesaria de cada extracto o aceite esencial, minimizar la posibilidad de generación de alergia y de generación de resistencia bacteriana debido a presencia de varios compuestos activos en un mismo sistema⁽⁸⁾.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de un sistema propuesto, preparado a base de un extracto vegetal y tres aceites esenciales, frente a los microorganismos *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. El extracto vegetal utilizado fue un extracto alcohólico de semillas de *Citrus paradisi*, con el cual, se buscó mejorar el desempeño del sistema natural, bajo los siguientes principios: generar un efecto sinérgico incrementando la hidrofilia del sistema propuesto⁽⁴⁾ e incrementar la estabilidad de los aceites esenciales por su actividad antioxidante⁽⁹⁾.

La evaluación de la actividad antimicrobiana del sistema propuesto es un paso necesario para una posterior evaluación su eficacia antimicrobiana como sistema conservante en la formulación de productos cosméticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Adquisición de extractos naturales y aceites esenciales

Para el desarrollo del sistema propuesto se utilizaron componentes comerciales, estos fueron: extracto de semillas de *Citrus paradisi* (Nutribiotic Lab. USA), aceite

esencial de *Luma chequen* (Aromática y Culinaria S.A.C. Perú), aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (Aromática y Culinaria S.A.C. Perú), aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Aromática y Culinaria S.A.C. Perú). Los criterios para de para su uso fueron: la presencia de antecedentes de su actividad conservante o antimicrobiana^(1,4-5,8-16) y su disponibilidad comercial.

Obtención del sistema propuesto

Con el fin de obtener un sistema de amplio espectro y reducir la concentración individual requerida de cada componente, el sistema se obtuvo mezclando el extracto con los tres aceites esenciales en partes iguales, tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes del sistema natural propuesto

Componentes del sistema	Proporción (%p/p)
Extracto de semillas de <i>Citrus paradisi</i> (Toronja).	25.00
Aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (Arrayán).	25.00
Aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (Hierba luisa)	25.00
Aceite esencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> (Árbol del té)	25.00
TOTAL	100.00

Los cuatro componentes fueron pesados y mezclados en un beaker de 500 mL; la mezcla fue agitada manualmente con una varilla de vidrio, por tres minutos, formando una mezcla homogénea. El producto obtenido fue envasado en frascos goteros de vidrio ámbar tipo III.

Evaluación física del sistema propuesto

En el sistema elaborado se realizaron las siguientes evaluaciones físicas:

Aspecto físico: se colocó 5 mL de muestra en un tubo de ensayo y se determinó visualmente las características externas bajo luz blanca y sobre fondo oscuro. Se verificó además la ausencia de partículas extrañas.

Miscibilidad: se dispersó 100 mg de muestra en 200 mL de agua purificada, se agitó manualmente por tres minutos. Se verificó si la muestra es miscible en agua.

Índice de refracción: se tomó 5 mL de muestra y se llevó a 20°C, luego se leyó directamente en el refractómetro (Bausch & Lomb). Se leyó por quintuplicado y el resultado reportado fue el promedio.

Densidad: se seleccionó un picnómetro que previamente fue calibrado mediante la determinación de su peso y el peso de agua contenida en él a 20° C. Se ajustó la temperatura de la muestra aproximadamente a 18° C y se llenó el picnómetro. Se ajustó la temperatura del picnómetro a 20° C, se retiró todo exceso de muestra, y se pesó.

Cálculo:

$$(g/mL)Densidad_{20^{\circ}C} = 0,9982 \times \frac{(\text{Peso pic. muestra} - \text{Peso pic. vacío})}{(\text{Peso pic. agua} - \text{Peso pic. vacío})}$$

Determinación de la actividad antimicrobiana

En la primera parte del estudio se determinó la actividad antimicrobiana de cada componente del sistema de manera individual y en la segunda parte se realizó en el sistema propuesto. El método utilizado fue difusión en pozos, las muestras se enfrentaron con tres cepas bacterianas: *Escherichia coli* (ATCC N°. 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC N°. 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC N°. 6538) y dos cepas de hongos: *Candida albicans* (ATCC N°. 10231), *Aspergillus niger* (ATCC N°. 16404). Los microorganismos señalados fueron incubados en TSA (bacterias) a 37°C y agar sabouraud dextrosa a 35 (± 2°C) (hongos y levaduras) durante 24 horas, luego de lo cual se suspendieron en solución salina estéril al 0,85%. La turbidez se ajustó a un valor de 0,5 de acuerdo a la escala de McFarland para obtener una concentración de aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/mL. El medio de cultivo utilizado fue MHA (Mueller Hinton Agar). Los pozos de 6 mm de diámetro, se prepararon con un sacabocado estéril. A los pozos se depositaron 50µL de cada componente y la mezcla al 100% de concentración; se dejó en reposo por un tiempo y se incubaron a 35 ± 2°C por un tiempo de 16-18 h (bacterias) y 20 – 24 h (hongos y levaduras). Después del tiempo de incubación, se evaluaron la formación de los halos de inhibición en cada pozo; en los pozos que presentaron halos se midió el diámetro (mm). Los casos en los que no se evidenció crecimiento, fueron considerados como “inhibición total”. Como control negativo se utilizó agua purificada estéril.

Con el fin de realizar una interpretación de los resultados, se consideró para todos los microorganismos, como mínima medida válida del halo de inhibición, un

diámetro de 8 mm. Valores menores son considerados como ausencia de actividad antimicrobiana. Esto es en base a otros estudios donde se evalúa actividad antimicrobiana de aceites esenciales^(2,17-19).

RESULTADOS

Evaluación física del sistema propuesto

Los resultados de la evaluación física del sistema propuesto fueron:

- Aspecto: líquido amarillo traslúcido de olor característico.
- Densidad: 1,030 g/mL
- Índice de refracción: 1,425
- Miscibilidad: Miscible en medio acuoso

Actividad antimicrobiana individual de los componentes

El resultado de la actividad de cada componente del sistema fue tal como se presenta en la tabla 2.

Se observa que las muestras individuales presentan actividad antimicrobiana frente a algunos de los microorganismos evaluados; sin embargo, ninguna de las muestras presenta actividad frente a todos, lo cual nos indica que individualmente, el extracto y los aceites esenciales presentan espectro limitado. La mayor parte de las muestras no presentan actividad frente a *P. aeruginosa*.

Actividad antimicrobiana del sistema propuesto

Se determinó la actividad antimicrobiana del sistema propuesto (Ver tabla 3)

El sistema propuesto presenta actividad antimicrobiana frente a todos los microorganismos evaluados, lo cual nos indica que el espectro de esta muestra es más amplio que cualquiera de los componentes individuales. La mayor actividad, presenta frente a *S. aureus*.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana individual de los componentes

Extracto o aceite esencial	Halo de inhibición (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Control Negativo	SA	SA	SA	SA	SA
<i>Citrus paradisi</i>	9,67 ± 0,47	11,67 ± 1,25	9,67 ± 0,47	7,67 ± 0,47	SA
<i>Luma chequen</i>	12,00 ± 0,00	Inhibición total	SA	13,33 ± 0,47	15,33 ± 0,47
<i>Cymbopogon citratus</i>	SA	SA	SA	SA	19,67 ± 0,47
<i>Melaleuca alternifolia</i>	18,33 ± 0,47	Inhibición total	SA	24,33 ± 1,25	Inhibición total

Control negativo: agua purificada.

SA: sin actividad

Tabla 3. Actividad antimicrobiana del sistema natural propuesto

Producto	Halo de inhibición (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Control Negativo	SA	SA	SA	SA	SA
Sistema natural	13,00 ± 0,00	Inhibición total	12,33 ± 0,47	10,33 ± 0,47	26,67 ± 0,47

Control negativo: Agua purificada.

SA: Sin actividad

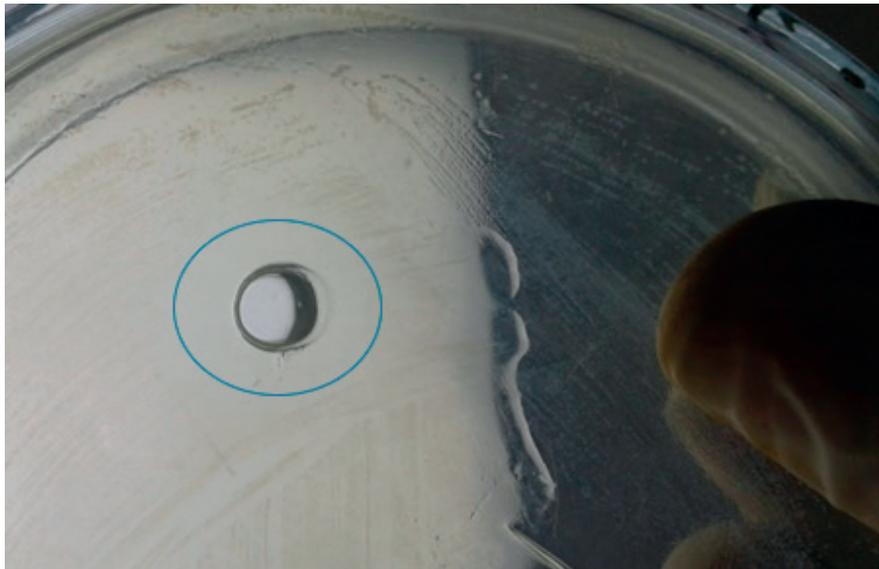


Figura 1. Halo de inhibición: *Escherichia coli*



Figura 2. Halo de inhibición: *Candida albicans*

DISCUSIÓN

La menor sensibilidad *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* frente a algunos de los aceites esenciales, se explica porque es un microorganismo resistente a un gran número de antibióticos gracias a diversos mecanismos de resistencia, entre ellos: las bombas de expulsión y su excepcional impermeabilidad de su membrana celular. La membrana externa en las bacterias gramnegativas contiene lipopolisacáridos hidrofílicos, que proveen mayor tolerancia a compuestos antimicrobianos hidrofóbicos⁽¹⁶⁾.

La incorporación del extracto etanólico de *Citrus paradisi*, como componente, mejora el desempeño del sistema conservante; inclusive, la actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, se ve incrementada, con referencia a la actividad que presenta el extracto de *Citrus paradisi*, de forma individual.

CONCLUSIONES

El extracto vegetal y los tres aceites esenciales evaluados individualmente, al no presentan actividad frente a todos los microorganismos utilizados. Por otro lado, el sistema propuesto, elaborado a base de la mezcla del extracto vegetal y los tres aceites esenciales, sí presenta actividad antimicrobiana frente a todos los microorganismos evaluados, por lo que puede ser incorporado en la formulación de productos cosméticos y ser evaluado como una alternativa a los conservantes sintéticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E et al. Self-preserving Cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science* [Internet]. 2009 [citado 25 abr 2016]; 31(3):163-175. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-2494.2009.00492.x>

2. Sokovic M, Glamoclija J, Marin PD et al. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*. 2010; 15(11):7532-46.
3. Tabassum N, Vidyasagar G. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2013 [citado 26 abr 2016]; 5(2):19-28. Disponible en: http://www.jonnaromatherapy.com/pdf/Tabassum_Antifungal_Plant_Essential_Oils_2013.pdf
4. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils present status and future perspectives. *Medicines*. 2017; 4(3):58.
5. Dreger M, Wielgus K. Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. *Kerva Polonica* [Internet]. 2013 [citado 28 abr 2016]; 59(4):142-56. Disponible en: <http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/7762075-Dreger%20and%20Wielgus.pdf>
6. Gonzales P, Mansilla A, Rengifo L. Extracción de Aceite Esencial de *Myrtus communis* L. Estudio de su Actividad Antimicrobiana. Universidad Agraria de La Molina. Departamento de Química. *Peruvian Green Chemistry* [Internet]. 2014 [citado 25 abr 2016]; 1:1-34. Disponible en: http://www.lamolina.edu.pe/facultad/ciencias/dquimica/pergreenchemistry/?page_id=49
7. Lalitha Ch, Rao P. Antimicrobial Efficacy of Low Level Cosmetic Preservatives. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2014 [citado 25 abr 2016]; 3(2):1685-96. Disponible en: <https://www.wjpps.com/download/article/1391271639.pdf>
8. Vasek O, Cáceres L, Chamorro E. Antibacterial activity of *Citrus paradisi* essential oil. *Journal of Natural Products* [Internet]. 2015 [citado 29 abr 2016]; 8:16-26. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/277670234_Antibacterial_Activity_of_Citrus_Paradisi_Essential_Oil
9. Faleye F, Ogundaini A, Olugbade A. Antibacterial and antioxidant activities of *Citrus paradisi*. *Research Journal of Pharmaceutical and scientific innovation* [Internet]. 2012 [citado 09 may 2016]; 1(3):63-66. Disponible en: http://jpsionline.com/admin/php/uploads/68_pdf.pdf
10. Von Woedtke, Schlüter B, Pfliegel P. Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie*. 1999; 54(6):452-6.
11. Cvetnic Z, Vladimir-Knezevic S. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm*. 2004; 54(3):243-50.
12. Caldecott T. Grapefruit Seed Extract. *Medical Herbalism* [Internet]. 2005 [citado 04 may 2016]; 14(3):1-2. Disponible en: <http://medherb.com/eletter/GSE-Caldecott.pdf>
13. Takeoka G, Dao L, Wong RY et al. Identification of Benzetonium Chloride in Commercial Grape fruit Seed Extract. *J. Agric. Food Chem*. 2001; 49(7):3316-20.
14. Waidulla N Al et al. Antimicrobial Activity of Grapefruit Seeds Extracts (In vitro Study). *Al-Rafidain Dental Journal* [Internet]. 2011 [citado 05 may 2016]; 11(2):341-5. Disponible en: https://www.iraqjournals.com/article_9091_0.html
15. Alzamora L, Morales L, Armas L. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 2001; 62(2):156-61.
16. Pandey A, Kumar P, Sing P et al. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7:2161.
17. Vukovic N, Milosevic T, Sukdolak S. Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2007; 4(1):17-20.
18. Serban E, Ionescu M, Matinca D. Screening of the antibacterial and antifungal activity of eight volatile essential oils. *Farmacia* [Internet]. 2011 [citado 11 may 2016]; 59(3):440-6. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/7542/287a652b10aba7420604c2903c44c97dfbd9.pdf>
19. Mith H, Duré R, Delcenserie V et al. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition* [Internet]. 2014 [citado 12 may 2016]; 2(4):403-16. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.116>

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: Autofinanciado

