

Aceite esencial de clavo de olor, *Syzygium aromaticum*: Análisis de la actividad microbiológica y farmacológica para el posible tratamiento contra la faringoamigdalitis estreptocócica y lesiones causadas por el acné

Recepción: 15-11-2015

Aceptado: 15-12-2015

LICDA. MELISSA MARTÍNEZ DOMÍNGUEZ

LICDA. HAZEL MORALES MATAMOROS

LIC. CRISTHIAN XATRUCH GARCÍA

LIC. ADAM AMEY WILLIAMS

Universidad Internacional de las Américas

Resumen

En distintos campos, incluido el de salud, existe un número importante de usos reportados para aceites esenciales de plantas y especias. El aceite esencial del fruto seco del clavo de olor, *Syzygium aromaticum*, ha sido ampliamente estudiado y se le ha atribuido un importante efecto sobre una amplia variedad de microorganismos que afectan a seres humanos. Este estudio pretendió analizar la acción del aceite esencial extraído del fruto seco del clavo de olor sobre las bacterias presentes en una lesión de acné como el *Propionibacterium acnes* y el *Staphylococcus sub Hominis* y sobre el *Streptococcus pyogenes* presente en problemas como la faringoamigdalitis. Para esto se extrajo el aceite esencial de los frutos secos del clavo de olor mediante una destilación por arrastre en corriente de vapor, luego de determinar que es la técnica que brinda el mayor rendimiento en la extracción. El aceite esencial extraído se caracterizó mediante pruebas de química líquida y análisis instrumental mostrando al eugenol como principal componente. Se realizaron estudios de



sensibilidad *in vitro*, de bacterias aisladas de una lesión activa de acné y del *Streptococcus pyogenes* frente al aceite esencial extraído, observándose en ambos casos que los microorganismos fueron sensibles. Es importante señalar que el *Propionibacterium acnes* no se pudo aislar, pero el aceite esencial pudo ser evaluados en otras bacterias presentes en el acné. Se incorporó el aceite esencial extraído a una formulación farmacéutica de uso tópico y se analizaron cualitativamente sus efectos analgésico y antiinflamatorio en voluntarios con algún tipo de lesión en piel, lo que mostró un resultado positivo importante.

Palabras claves: *Syzygium aromaticum*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnes*, analgésico, antiinflamatorio

Abstract

In several fields, including health, there is a significant number of reported uses for essential oils of plants and spices. The essential oil of clove, *Syzygium aromaticum*, has been extensively studied and has been credited with a major effect on a wide variety of organisms that affect humans. This study aimed to analyze the action of the essential oil extracted from clove dried nut on the bacteria in an acne lesion as *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus sub hominis* and *Streptococcus pyogenes* which is present in problems such as pharyngitis. For this purpose, nuts clove essential oil was extracted by steam distillation, after determining that this technique provided the highest yield in the extraction. The extracted essential oil was characterized by liquid chemical tests and instrumental analysis showing the eugenol as the major component. *In vitro* sensitivity studies against the essential oil extracted were performed in bacteria isolated from an active acne lesion and in *Streptococcus pyogenes*, in both cases it was observed that microorganisms were sensitive. Importantly, the *Propionibacterium acnes* could not be isolated, but the essential oil could be evaluated in other bacteria present in acne. The essential oil extracted was incorporated to a pharmaceutical formulation for topical use and anti-inflammatory and analgesic effects were qualitatively analyzed in volunteers with some type of skin lesion, which showed a significant positive result.

Keywords: *Syzygium aromaticum*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnés*, analgesic, anti-inflammatory

Introducción

Las lesiones cutáneas son muy frecuentes en las personas, estas pueden tener manifestaciones simples como laceraciones o mostrarse más complicadas como ulceraciones tipo celulitis.

El acné es una patología muy común en adolescentes o en aquellas personas con algún grado de alteración hormonal. Esta patología además de ser molesta, por el grado de inflamación que se puede presentar en cada lesión, tiene una connotación anti-estética, que tiende a generar en las personas la necesidad de ocultar las lesiones, tratarlas mediante procedimientos invasivos mecánicos, o de consumir medicamentos muy costosos, sin tener el conocimiento muchas veces, que dicha patología es debida a la presencia de un microorganismo en particular, como es el *Propionibacterium acnes*.

Cuando se presenta alguna lesión cutánea el paciente necesita percibir analgesia y efecto antiinflamatorio de una manera rápida y eficaz. En ocasiones el uso de

algunos medicamentos disponibles actualmente en el mercado está imposibilitado, debido a la aparición de reacciones adversas o al alto costo de los medicamentos usados para este fin.

Chaverri C, Gätjens, Zavaleta, Chaverri F., (2008) mencionan que la faringoamigdalitis estreptocócica es una enfermedad frecuente en la población costarricense durante todo el año donde del 15% al 30% de los casos son en niños y de un 5% a un 10% de los casos son en adultos, esto se manifiesta principalmente por la entrada de la época lluviosa. Con la llegada de los resfríos y la gripe se inician las infecciones de las vías aéreas y con esto las sobreinfecciones bacterianas de las amígdalas y la faringe.

El uso de tratamientos populares, a partir de plantas medicinales, siempre ha sido una fuente importante en el mantenimiento de la salud humana durante toda su historia, de tal forma que en la actualidad muchas personas tienden a adquirir productos (que no son reconocidos o que los distribuyen empresas que no tienen en orden sus controles) , con el propósito de mejorar su

calidad de vida, por lo que el desarrollo y diseño de productos basados en plantas que muestran beneficios medicinales y que son formulados con conocimientos técnicos y científicos puede resultar positivo como alternativa a la medicina tradicional.

Ante la situación recién expuesta, se planteó analizar las propiedades terapéuticas que pueda tener el aceite esencial extraído del fruto seco del *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) al utilizarlo vía tópica como posible alternativa en el tratamiento de lesiones cutáneas mediante la formulación de una crema y la elaboración de un antiséptico bucal para tratar la faringoamigdalitis que tantas incapacidades laborales y escolares produce en las personas.

Actualmente puede encontrarse un número importante de trabajos que resaltan las propiedades tanto aromáticas como farmacológicas del aceite esencial extraído de los frutos secos del *Syzygium aromaticum*, por ejemplo Debjit, Sampath, Akhilesh, Shweta, Shravan y Amit (2012) mencionan el uso en la India del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* en los frutos secos de clavos de olor como especia, indican la capacidad que posee el aceite esencial de aumentar el flujo sanguíneo, aliviar síntomas

de reumatismo, lumbalgia y dolor dental. Además, en este mismo artículo se menciona el efecto antimicrobiano y el aumento de secreción de ácido gástrico al ser ingerido.

En la India, Amin, Jassal y Tygi (2013) destacan el efecto antioxidante que posee el clavo de olor, debido a la presencia de dieciséis compuestos volátiles, así como también su actividad sobre la enzima MAO (enzima monoamino oxidasa) con beneficios ante patologías como el cáncer y el Alzheimer tras su ingestión. De manera similar en este estudio se mencionan los beneficios farmacéuticos como agente carminativo y analgésico.

Hakki, Murat, Nitz y Kollmannsberger (2007) realizaron en Turquía un análisis sobre la composición de los frutos de la planta *Syzygium aromaticum* analizada por cromatografía de gases con detector de masas, donde se encontró que posee como componente principal al eugenol en alrededor de un 87%, seguido de 8% de isoeugenol y 3,56% de β -cariofileno, además destacan que la composición del aceite esencial no presenta mucha variación de sus componentes principales según su procedencia geográfica, también se menciona el uso del aceite esencial de *S. aromaticum* en especialidades

odontológicas, al mezclarlo con óxido de zinc y utilizarlo como cemento o restauración dental de uso temporal, así como su uso en perfumería.

Apparecido, Sartoretto, Schmidt, Caparroz, Bersani-Amado y Kenji (2009) desarrollaron un estudio en ratas al inducir edema en sus patas para analizar la capacidad antiinflamatoria del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* tras su administración parenteral y compararlo respecto de la indometacina y celecoxib.

En el análisis se evaluó la capacidad analgésica del eugenol contenido en el aceite esencial, al compararlo respecto a la meperidina como muestra control positiva y agua como muestra control negativa donde se obtuvo una respuesta muy similar respecto al fármaco, sin embargo, el efecto analgésico predominante se dio a nivel periférico, no mostrando actividad analgésica ante dolor por estimulación térmica.

En Iowa, Estados Unidos; Cai & Wu (1996) procedieron a analizar la capacidad antimicrobiana de distintos compuestos aislados y extraídos de los clavos de olor de la planta *Syzygium aromaticum*, donde se logró determinar la concentración mínima

inhibitoria ante patógenos orales como el *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, y *Actinomyces viscosus*.

En Madrid, Rojo, L., Barcenilla, J., Vázquez, B., González, R., & Román, J. (2008), determinaron el efecto de producir copolímeros de eugenol y su derivado de etoxieugenol con 2-hidroxietilmetacrilato, para determinar su efectividad antimicrobiana ante dos patógenos orales comunes, como lo son la *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans*, al variar las proporciones de cada componente, mediante pruebas de sensibilidad.

Según Janero & Makriyannis (2014), en Boston se analizó la capacidad de unión de varios terpenos y lípidos, a receptores de tipo TRPA1, TRPV1, TRPV2 y TRPV3, para lo cual el eugenol mostró que puede unirse y desensibilizar el receptor transmembrana al reducir la transmisión del dolor e inflamación neurogénica donde también al igual que otras sustancias fitoquímicas nombradas en el estudio podrían ser utilizadas como potenciales fármacos para indicaciones como el dolor y el cáncer.

En Alicante, España; Vianna (2011), también indicó la actividad del eugenol sobre los receptores TRP de tipo V1, V2 y A1, presentes en el sistema trigeminal, al destacar el beneficio de esta sustancia de origen natural, sobre síntomas como el dolor, inflamación, prurito; donde es comúnmente utilizado en odontología en procesos bucales.

También en Costa Rica se han reportado usos importantes para el aceite esencial del clavo de olor. Por ejemplo, Arévalo (2006), destaca el uso en agricultura del eugenol, principal componente del aceite, como eficiente insecticida para el control de plagas.

Además, Arguedas (2014), menciona como en Costa Rica se le da uso amplio al eugenol en odontología como potente analgésico dental, antiinflamatorio y antibacteriano, donde generalmente se mezcla con óxido de zinc para formar un cemento temporal.

Tomando en cuenta todo lo anterior se plantearon los siguientes objetivos para la realización del estudio:

Determinar la técnica de extracción, entre destilación por arrastre en corriente de

vapor o extracción continua empleando el equipo soxhlet, que brinde el mejor rendimiento experimental.

Verificar mediante análisis espectroscópico y cromatografía de gases que el componente principal del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* corresponde al eugenol.

Determinar la posible actividad del aceite esencial de clavo de olor frente a las bacterias presentes en el acné como *Propionibacterium acnes* y frente al *Streptococcus pyogenes* que se encuentra en las faringoamigdalitis, mediante una prueba de sensibilidad de antibióticos.

Formular un preparado de uso tópico y un enjuague bucal a partir del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* obtenido.

Analizar cualitativamente en voluntarios, las propiedades terapéuticas, antiinflamatorias y analgésicas, de un preparado farmacéutico de uso tópico a partir del aceite esencial extraído de los frutos secos de la planta *Syzygium romaticum*.

De estos objetivos surge la pregunta ¿Es posible que el aceite esencial de *Syzygium*

aromaticum presente actividad terapéutica contra el *Propionibacterium acnes*, el *Streptococcus pyogenes* y contra otros patógenos presentes en el acné o la faringoamigdalitis al evaluarlo en voluntarios y según las pruebas microbiológicas?

En los últimos años, ha aumentado el interés de las personas, por el cuidado de la piel, lo que ha aumentado el uso de productos dérmicos que reparen los daños que se presenten o que favorezcan que la curación y sanación sean lo más pronto posible.

Sin embargo, las lesiones cutáneas son muy comunes en las personas, las cuales tienden a ser muy molestas, principalmente porque sin importar el tamaño que posea la lesión, producen dolor con mucho prurito, inflamación y algunas veces pueden infectarse con algún microorganismo. Para este tipo de afecciones se utilizan medicamentos antiinflamatorios derivados frecuentemente de la familia de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos y los analgésicos antiinflamatorios esteroideos, donde algunas veces se asocian a antibióticos de uso tópico.

Actualmente en la sociedad existe preferencia por remedios caseros que

implican el uso de plantas medicinales, muchas veces por motivos económicos o por la simple preferencia de usar solo productos “naturales”.

Por dicha razón, los autores de esta investigación diseñaron un producto de uso tópico, desarrollado a partir de un extracto de los frutos secos de los clavos de olor de la planta *Syzygium aromaticum*, el cual permitiría tratar síntomas comunes en las afecciones tópicas, como el dolor y la inflamación, además de prevenir o tratar posibles infecciones de la zona dañada y servir como posible componente innovador en el tratamiento del acné, debido a las diversas propiedades terapéuticas del componente mayoritario del aceite esencial de la planta.

Además, la investigación busca dar una ayuda al tratamiento de las afecciones faríngeas como la faringoamigdalitis, mediante la elaboración de un enjuague bucofaríngeo o colutorio a partir de los frutos secos del *Syzygium aromaticum* con actividad antibacteriana.

Con esto se generaría un beneficio a los pacientes, médicos y farmacéuticos, ante situaciones que ocurren a diario, además de

proporcionar una alternativa que puede resultar atractiva para las personas, por su procedencia directa de una planta, que aporta un efecto terapéutico importante para el paciente.

Metodología

El material vegetal utilizado fue obtenido por compra directa en el mercado de Heredia. El clavo de olor es desde Indonesia, uno de los principales lugares del mundo donde la planta *Syzygium aromaticum* crece como en su hábitat natural.

Obtención del aceite esencial del *Syzygium aromaticum*

Destilación del aceite.

100 g del fruto seco del clavo de olor, pesados en balanza granataria, se colocaron en un balón de destilación de 500 mL y se cubrieron completamente con agua destilada (unos 500 mL). La boca del balón se cubrió con papel parafina y el material vegetal se dejó macerar por 24 horas, al cabo de las cuales el balón se adaptó a un sistema para destilación de arrastre en corriente de vapor y se obtuvieron aproximadamente 500 mL de destilado. El destilado se mostró como una

mezcla heterogénea de aspecto lechoso y con un fuerte aroma a clavo de olor.

Separación del aceite del destilado y secado.

Se trasvasaron 100 mL del destilado obtenido a un embudo de decantación y se le adicionaron 25 mL de diclorometano, momento en que se observó la separación de dos fases, estas se mezclaron y se separaron. La fase inorgánica superior correspondió al agua mientras que la inferior correspondió a la orgánica en la cual se encontraba el aceite esencial requerido. La fase orgánica se recogió en un erlenmeyer para su secado posterior. Este procedimiento se repitió para cada 100mL de destilado restante.

Todas las extracciones realizadas con el diclorometano se reunieron para obtener una fase orgánica que se secó con sulfato de sodio anhidro. Para esto se adicionaron pequeñas cantidades de este desecante seguido de agitación y reposo hasta que no se observara aglutinación del nuevo sólido adicionado, lo que indicó el secado de la fase. El sólido sedimentado se separó mediante filtración por gravedad a través de papel de filtro empleando un embudo de espiga. El diclorometano se separó del aceite por

destilación en un evaporador giratorio (rotavapor) a una temperatura de 40°C.

Caracterización de los componentes del aceite

Prueba de insaturaciones con bromo disuelto en tetracloruro de carbono (Br₂/CCl₄).

Dentro de un tubo de ensayo se disolvieron 2 gotas del aceite esencial obtenido en 2 mL de diclorometano, a la disolución resultante se le adicionaron 3 gotas de la disolución de Br₂ observándose la decoloración inmediata de este reactivo, lo que representó un resultado positivo para la presencia de insaturaciones.

Prueba para fenoles con cloruro de hierro (III).

Dentro de un tubo de ensayo se disolvieron 2 gotas del aceite esencial en 2 mL de etanol, a la disolución resultante se le adicionaron 3 gotas del cloruro de hierro (III) observándose la rápida aparición de un color verde-azulado, indicando la presencia de grupos fenólicos en el aceite.

Espectro de infrarrojo del aceite.

Para el análisis por espectroscopía de infrarrojo se empleó el espectrofotómetro de infrarrojo Agilent Technologies Cary 630 FTIR Modelo G8044AA, para la obtención de los espectros de infrarrojo tanto del aceite esencial extraído como el de una muestra de referencia de eugenol de marca Merck ® con una pureza del 99,0 %, lo que mostró la presencia de grupos funcionales presentes en el eugenol.

Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

Para el análisis por resonancia magnética nuclear los espectros fueron realizados y facilitados por el Laboratorio Aduanero del Ministerio de Hacienda, en los que se evidenció la presencia del eugenol.

Método para la siembra e identificación de microorganismos presentes en una pústula de acné

De un voluntario, que padecía activamente de acné y tomando todas las medidas estériles, se extrajo una muestra del componente de una de las pústulas de acné. Con esta muestra se realizó una inoculación en el medio de cultivo TSA (Trypticase-soya) y las 3 placas correspondientes se

almacenaron por 7 días en condiciones de almacenamiento, observando el crecimiento microbiano trascurrido este tiempo.

La identificación de las bacterias presentes en la pústula de acné del voluntario se realizó en los laboratorios LABIN S.A. mediante el equipo analizador automatizado de BioMérieux-Francia, modelo Vitek 2 Compact. Para esta prueba, se proporcionó a la empresa, el cultivo realizado en la placa de TSA.

Método para la evaluación de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de clavo de olor frente a los microorganismos presentes en la pústula de acné mediante un antibiograma

Con los cultivos de microorganismos de la lesión de acné se realizó el antibiograma y se evaluó la acción del aceite esencial.

De las colonias obtenidas en los medios de TSA, se seleccionó una colonia de bacterias, pequeña y se inoculó en un medio Mueller-Hinton y se colocaron varios discos de papel filtro preparados con dos gotas de aceite esencial de clavo de olor a cada uno, los que se identificaron y almacenaron por 5 días, al término de los cuales, se midieron los halos de inhibición mostrando resultados importantes.

Formulación de una crema a partir del aceite esencial de clavo de olor obtén

A partir del aceite esencial obtenido por destilación de arrastre por vapor de los clavos de olor, se formuló una crema al 2% de aceite esencial.

Tabla 1. Fórmula para 100 gramos de crema de aceite esencial de clavo de olor

Fase	Ingrediente	Cantidad para cada 100g
I	Lanette N	22,0
	Aceite mineral	6,0
	Propilenglicol	4,0

II	Agua para el 100%	Csp
	Metilparabeno	0,15
	Propilparabeno	0,05
	Glicerina	5,8
III	Aceite esencial de clavo de olor	2,0

Nota: Elaboración propia

Se mezclaron los componentes de la fase I, y se calentaron a 70°C con agitación moderada y constante, de manera semejante se mezclaron los componentes de la fase II. Una vez alcanzada la temperatura de 70°C en ambas mezclas, se vertió la fase II sobre la fase I lentamente y con agitación constante, una vez concluida la mezcla de las fases I y II y manteniendo la agitación se añadió la fase III hasta que se logró la homogeneidad y consistencia deseada.

Prueba sobre lesiones de acné *in vivo* al utilizar la crema formulada a base de aceite esencial al 2%

Sobre una pústula de acné, en un voluntario, se colocó la crema formulada con el aceite esencial extraído de los frutos secos de *Syzygium aromaticum* una vez al día durante al menos 3 días, lo que mostró resultados satisfactorios para el paciente.

Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de una crema de aceite esencial de clavo de olor al 2%

A un voluntario que presentaba un tipo de lesión con inflamación en piel producto de una caída, se le aplicó la crema durante al menos 3 días y se evaluó la actividad terapéutica antiinflamatoria. Se observó una disminución gradual de la inflamación a medida que pasaron los días.

Evaluación de la capacidad analgésica de una crema de aceite esencial de clavo de olor al 2%

La capacidad analgésica del preparado tópico de aceite esencial de los frutos secos de clavo de olor al 2% se estudió en tres voluntarios con algún tipo de lesión en piel, a estos se les aplicó la crema y mediante consulta directa, se determinó la cantidad de

dolor que presentaba el paciente después de 15 minutos de la aplicación. Se usó una escala de 0 a 10, donde 10 es mucho dolor y 0 sin dolor. Los pacientes manifestaron una disminución significativa del dolor.

Formulación de un enjuague bucal con base de aceite esencial de clavo de olor obtenido previamente

En un beaker se adicionaron 4,5 g de laurilsulfato de sodio, 22,05 g de glicerina, 6,75 g de sorbitol y 4,8 g de sabor a menta, la mezcla resultante se agitó magnéticamente hasta lograr la disolución completa de todos los componentes lo que se tardó unos 30 min. Luego se adicionaron 15 mL de alcohol y 1,9 mL del aceite esencial del fruto seco de clavo de olor. Se agregaron poco a poco 3/4 partes del agua total de la formulación, aproximadamente 90 mL. Por último, se incorporó 0,048 g de sacarina sódica y una gota de colorante azul y se agitó por 10 minutos, se completó la formulación con el resto del agua hasta obtener un volumen de 120 mL.

Se prepararon 3 enjuagues bucales, uno con el aceite esencial, uno con el principio activo de eugenol y otro sin el aceite esencial o el principio activo para realizar las pruebas

microbiológicas con las formas farmacéuticas preparadas.

Método para la evaluación de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de clavo de olor, eugenol y colutorio sin principio activo frente a una cepa de *Streptococcus pyogenes* mediante un antibiograma

Con los cultivos de *Streptococcus pyogenes* se realizó el antibiograma y se evaluó la acción del aceite esencial, eugenol y del colutorio sin el principio activo observando resultados de sensibilidad para los dos primeros.

De las colonias obtenidas en los medios, se inoculó una placa de agar BHIA con un hisopo y se colocaron varios discos de papel filtro impregnados con 25 mL de las tres muestras de enjuagues bucales. Se incubaron las placas por 24 horas y pasado este tiempo se midieron los halos formados.

Resultados y Discusión

Obtención del aceite esencial del clavo (*Syzygium aromaticum*)

Con el fin de determinar el mejor proceso para la extracción del aceite esencial,

se evaluaron las técnicas de arrastre en corriente de vapor y extracción continúa empleando el método soxhlet_con etanol como disolvente. En ambos casos se emplearon cantidades iguales del material

vegetal de partida, observándose un mayor porcentaje de extracción para el arrastre en corriente de vapor por lo que fue la técnica seleccionada. Los resultados de esta evaluación se mostraron en la tabla 1.

Tablas 2. Porcentajes de extracción resultantes de las dos técnicas evaluadas en la obtención del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

Técnica	Masa de partida del material vegetal / g	Masa de aceite esencial extraído / g	Porcentaje de extracción / %
Arrastre en corriente de vapor	50,0	3,5	7,0
Soxhlet	50.0	2,7	5,4

Nota: Elaboración propia

Los resultados de esta evaluación son consistentes con lo indicado por Jiang *et al* (2010) citado por Aguilar y López (2013), los que afirman que los rendimientos a través del arrastre en corriente de vapor, para la obtención del aceite esencial de los frutos secos de *Syzygium aromaticum*, son superiores a los observados empleando extracciones con un sistema de destilación soxhlet.

Adicionalmente el método seleccionado presenta la ventaja de extraer principalmente los componentes volátiles, dentro de los que se encuentra de forma mayoritaria el eugenol (Apparecido, 2009).

Cabe destacar que las dos técnicas evaluadas produjeron un líquido oleoso de tonalidad amarillenta y con un fuerte aroma característico del clavo de olor.

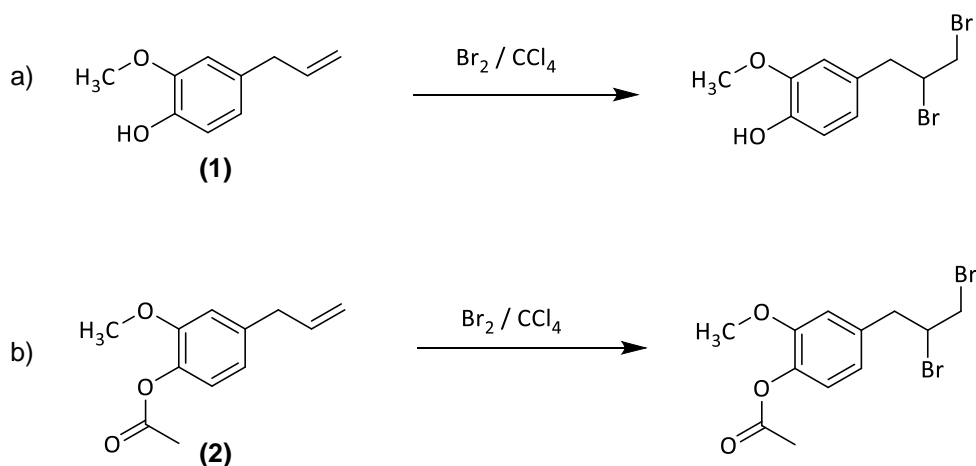
Caracterización de los componentes del aceite esencial de clavo de olor extraído

Debido a que los principales componentes del aceite corresponden a los fenilpropanos eugenol y acetato de eugenilo, se realizaron pruebas químicas para la identificación de grupos funcionales específicos presentes en sus estructuras. La primera prueba fue para evidenciar el doble enlace (C=C) de la cadena lateral presente en

ambos compuestos. Para esto se empleó una disolución de bromo disuelto en tetracloruro de carbono ($\text{Br}_2 / \text{CCl}_4$), comúnmente utilizado para identificar insaturaciones. Esta prueba mostró una decoloración inmediata

del reactivo de bromo, lo que corresponde a un resultado positivo de acuerdo a lo esperado de la adición de este reactivo al doble enlace, obsérvese la Figura 1.

Figura 1. a) Bromación del eugenol (1) y b) bromación del acetato de eugenilo (2)



Nota: Elaboración propia

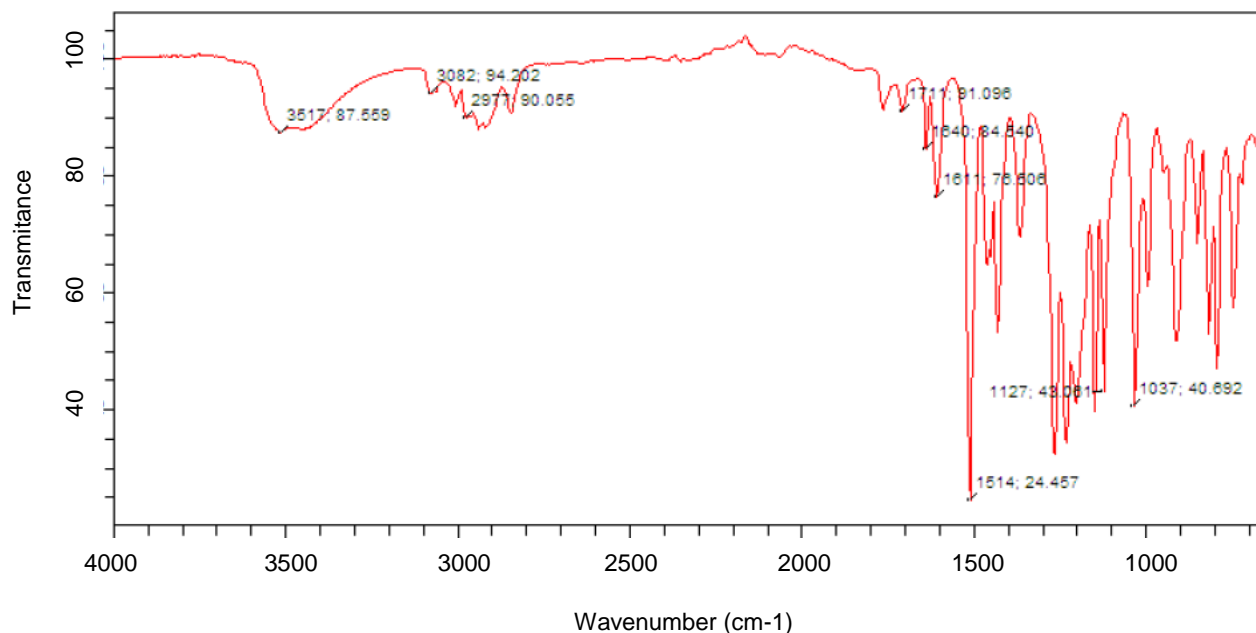
El grupo fenol del eugenol se evidenció por reacción del aceite con una solución de cloruro de hierro (III), observándose una coloración azul-verdosa lo que es un resultado positivo para este grupo funcional. En esta prueba el ion férrico forma quelatos con los compuestos fenólicos que actúan como ligandos.

Adicionalmente, se verificó la presencia de los principales grupos funcionales del eugenol y acetato de eugenilo mediante análisis espectroscópico. El

espectro de infrarrojo (Figura 2) evidenció señales para grupos funcionales presentes en ambos compuestos como una señal a 3082 cm^{-1} asignada a la vibración de tensión C-H aromático y señales a 1612 cm^{-1} y 1514 cm^{-1} para la tensión C=C del mismo grupo, además de una señal a 1641 cm^{-1} para la tensión C=C del alqueno. El análisis de infrarrojo también mostró señales que diferencian a estos compuestos, por ejemplo, se observó a 3518 cm^{-1} la señal de tensión O-H para el eugenol, y una señal débil a 1712 cm^{-1} asignada a la

vibración del grupo C=O del acetato de eugenilo.

Figura 2. Espectro de infrarrojo del aceite extraído



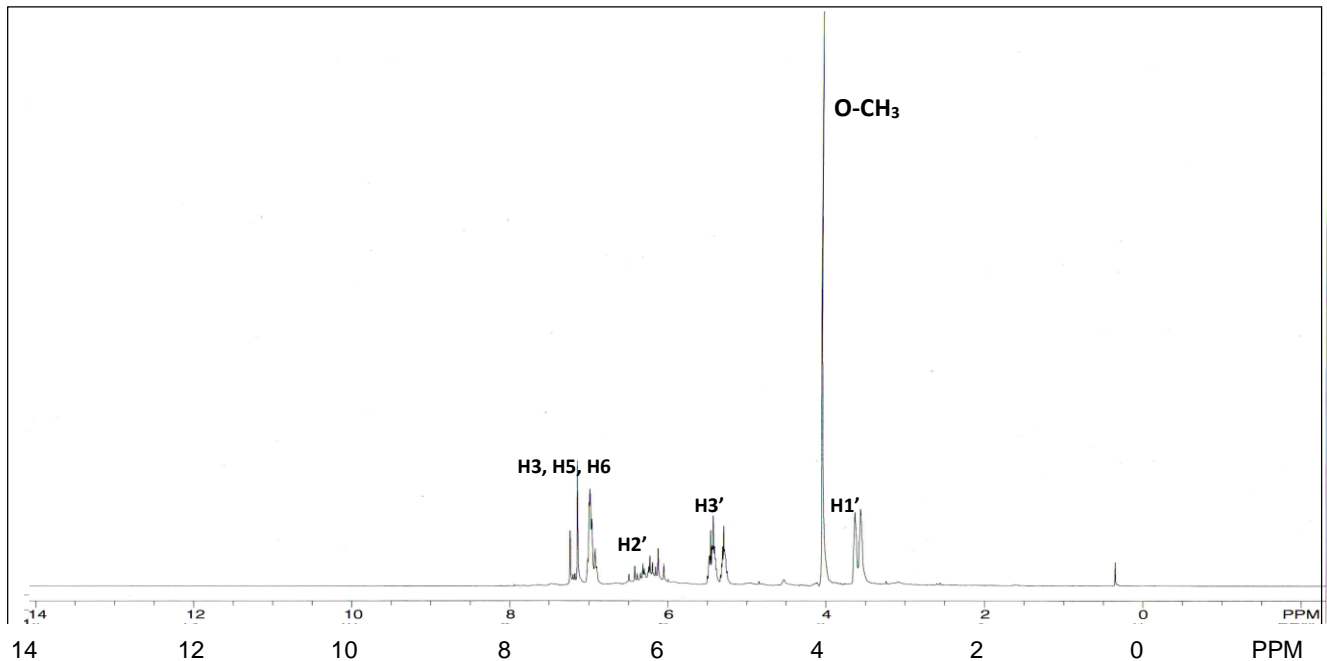
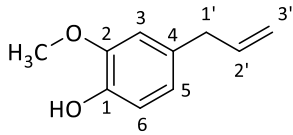
Nota: Elaboración propia

Por su parte el análisis por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN), mostrado en la Figura 2, del aceite esencial extraído de los frutos secos indicó señales de un doblete a 3,6 ppm asignada al metileno ($-\text{CH}_2$) de la cadena lateral del benceno, un singlete a 4,2 ppm para los protones del grupo metoxi ($-\text{O}-\text{CH}_3$), señales de 5,0 ppm a 5,5 ppm para los protones sobre el alqueno de la cadena lateral ($\text{H}-\text{C}=\text{CH}_2$) y señales típicas para los protones aromáticos en la región de 7,0 ppm a 7,4 ppm. Todas

estas señales son consistentes con la estructura del eugenol.

No se evidenció el acetato de eugenilo en el espectro de ^1H -RMN puesto que estuvo ausente la señal de singlete alrededor de 2,4 ppm típica para los protones alfa al carbonilo. Esto puede deberse a la baja proporción de este componente en el extracto, lo que se comprobó mediante análisis de cromatografía de gases que lo mostró en un 8,3 % frente a un 88,1 % del eugenol.

Figura 3. Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN) del aceite extraído



Nota: Elaboración propia

Análisis de sensibilidad de las bacterias presentes en una lesión activa de acné y de *Streptococcus pyogenes* frente al aceite esencial del clavo de olor

Análisis microbiológico para bacterias presentes en una lesión de acné.

Para evaluar la actividad del aceite esencial, mediante una prueba de sensibilidad de las bacterias frente a él, se requirió primero

de la obtención de microorganismos presentes en la lesión activa de acné de un voluntario. Para esto se realizó la siembra respectiva sobre placas con medio de cultivo Tripticasa-soya o placas TSA, lo que permitió observar luego de 7 días el crecimiento microbiano.

Una vez que se contó con los microorganismos sobre las placas el siguiente paso fue el análisis para su identificación. El

resultado del análisis por parte de la empresa contratada, laboratorio LABIN S.A. en el analizador automatizado de bioMérieux-Francia Vitek 2 Compact, mostró que se lograron aislar 4 bacterias distintas. Dos cocos Gram positivos, que debido a un nivel bajo de reactividad no se pudieron identificar; otro coco Gram positivo (*Staphylococcus sub. Hominis*) y un bacilo Gram positivo que no fue identificable mediante el sistema Vitek 2 Compact. Estas bacterias se obtuvieron de la pústula de acné del voluntario, cabe destacar que el *S. hominis* es un microorganismo que se puede encontrar como flora natural de la piel y que probablemente esté contribuyendo a complicar el acné en el voluntario. De forma adicional, un resultado sobresaliente del análisis es que se no evidenció la presencia del *Propionibacterium acnes*, que correspondió a uno de los microorganismos de interés para la investigación.

Es importante resaltar que el cultivo se realizó en presencia de oxígeno lo que pudo ser un factor determinante en el hecho que no se detectara el *Propionibacterium acnes*, ya que esta bacteria además de ser de crecimiento lento es anaerobia. Este aspecto

se consideró durante el estudio; sin embargo, la ausencia del equipo necesario para el cultivo anaerobio fue una limitación para verificar el crecimiento de la *Propionibacterium acnes*.

En el análisis de sensibilidad de los microorganismos presentes en la muestra de la lesión activa del acné tomada del voluntario, se observó, luego de 5 días, el desarrollo de halos de inhibición microbiana en los medios de cultivo Mueller-Hinton, al colocar discos impregnados con el aceite esencial extraído.

Con estos resultados se logró demostrar la potente actividad del aceite esencial de clavo de olor ante microorganismos presentes en la lesión de acné, donde, aunque no se logró aislar al *P. acnes*, si se encontró la inhibición contra el resto de microorganismos presentes, como el ya identificado *Staphylococcus hominis*, comúnmente presente en la flora bacteriana natural de la piel. Dicha bacteria puede contribuir a la producción de sustancias irritantes como los ácidos grasos, los cuales se manifiestan en el acné.

Tabla 3. Medida obtenida de los halos de inhibición formados en los medios de cultivo Mueller-Hinton con los discos impregnados con el aceite esencial de *Syzygium aromaticum*

Disco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Promedio
Medida del halo de inhibición ($\pm 0,5$ mm)	16	15	15	15	15	18	16	18	15	16

Nota: Elaboración propia

A partir de la tabla 3, se obtuvo una medida promedio de 16,0 mm del halo de inhibición alrededor de los discos impregnados con el aceite esencial extraído del fruto seco de clavo de olor. Por lo que se puede afirmar que las bacterias obtenidas de las lesiones de acné, presentan sensibilidad ante el aceite esencial extraído de los frutos secos de la planta *Syzygium aromaticum*.

Análisis microbiológico para el *Streptococcus pyogenes*

El estudio microbiológico se basó en el método de difusión conocido como el método de Bauer Kirby, donde se categorizó los microorganismos como resistentes cuando su halo de inhibición es de 6 mm, intermedio para un halo de 6 mm a 9 mm y susceptible para un halo de inhibición mayor a 9 mm para cada antibiograma. Se evaluaron las tres preparaciones de enjuague bucal obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 4. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial del fruto seco de clavo de olor y eugenol

Muestra	Halo de inhibición / mm	Resultado
Aceite esencial de clavo de olor	15 mm	Positivo

Eugenol	16 mm	Positivo
Enjuague con aceite esencial de clavo de olor	11 mm	Positivo
Enjuague con eugenol	12 mm	Positivo
Enjuague sin principio activo	6 mm	Negativo

Nota: Elaboración propia

Con estos resultados se puede apreciar que todas las muestras que contienen eugenol o el aceite esencial producen un halo de inhibición para el *Streptococcus pyogenes*.

Los resultados obtenidos son congruentes con lo que se indica en la literatura, ya que se observó el efecto antibacteriano del aceite esencial de los frutos secos de clavo de olor *Syzygium aromaticum* frente a las bacterias *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus hominis*, entre otros, donde se determinó que tanto el aceite esencial como el eugenol extraído de él, así como las formulaciones a base de estos inhiben el crecimiento *in vitro* de la bacteria.

Análisis farmacológicos

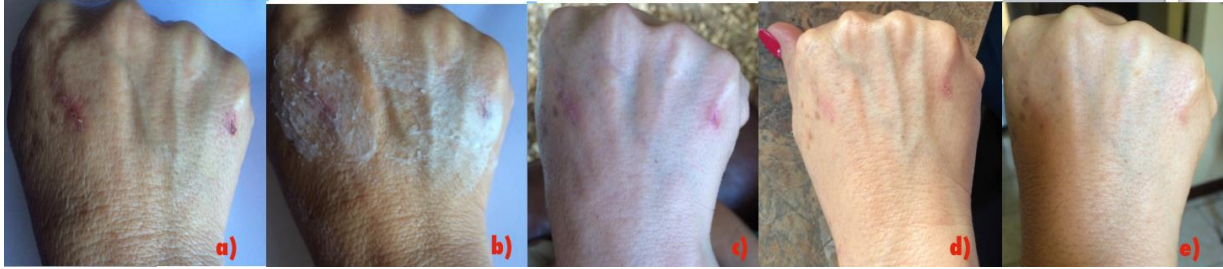
Una vez evaluado el análisis microbiológico y viendo que el aceite esencial de los frutos secos de clavo de olor actúa sobre *Staphylococcus hominis* y *Streptococcus pyogenes* entre otros, se

consideró realizar una formulación de uso tópico, específicamente una crema, y evaluar su efecto sobre una lesión de acné.

Formulada la crema se aplicó sobre la lesión de acné en un voluntario, con lo que se comprobó mejora, pues la lesión desapareció en un periodo de 3 días de aplicación, ya que disminuyó la inflamación y la presencia de pus fue desapareciendo gradualmente. Además, pudo observarse que la forma farmacéutica formulada al 2 % de aceite esencial de clavo de olor, resulta beneficiosa para tratar la patología del acné en las personas, donde el uso diario de la crema provocó la eliminación del nódulo.

Se debe destacar que sabiendo de las propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y analgésicas se procedió a evaluar la eficacia de la forma farmacéutica tópica en otras manifestaciones de la piel que se encontraron en los voluntarios.

Figura 4: Efecto antiinflamatorio de la crema formulada con el aceite esencia extraído del fruto seco del clavo de olor sobre la lesión de un voluntario



Nota: Elaboración propia

La figura 4 muestra el efecto del uso de la crema formulada con base de aceite esencial de clavo de olor al 2% sobre lesiones tópicas en la cara posterior de la mano derecha de una voluntaria por cortes ocasionados debido a una caída. a) Lesión inicial presente en la voluntaria. b) Ejemplo de la aplicación diaria de la crema sobre las lesiones de la cara posterior de la mano derecha de la voluntaria. c) Estado de la piel de la cara posterior de la mano de la voluntaria tras un día de uso de la crema. d) Estado de la piel de la cara posterior de la mano derecha de la voluntaria tras dos días de aplicación de la crema. e) Estado de la piel de

la cara posterior de la mano derecha de la voluntaria tras tres días de uso de la crema.

También se observó una gran disminución del enrojecimiento de la zona, así como sanación. La voluntaria además refirió una sensación de frescura sobre la zona, con disminución del dolor tras el uso diario de la crema, al menos dos veces al día, por tres días de aplicación del producto.

Luego de aplicar la crema en zonas sobre piel, donde voluntarios presentaron dolor debido a diferentes lesiones, tipo raspones, como se muestra en la figura 5 se analizó el efecto de la formulación

Figura 5. Lesiones tipo raspones en diferentes voluntarios donde se usó la crema tópica formulada a base de aceite esencial extraído de los frutos secos del clavo de olor



Nota: Elaboración propia

De la prueba realizada, en los tres voluntarios, todos los participantes refirieron haber percibido una sensación refrescante en la zona donde se encontraban las lesiones, con la eliminación del dolor que percibían aproximadamente a los 15 minutos de aplicada la crema sobre la piel afectada. Los pacientes refirieron haber tenido 0 en la escala de dolor. La cantidad de crema que se utilizó fue la necesaria para cubrir la zona de piel señalada por el voluntario.

Todos estos resultados sugieren que el uso de plantas medicinales para tratar

lesiones como las expuestas se pueden convertir en una alternativa más económica y de fácil acceso para tratamiento contra ciertas patologías.

Es importante señalar que es muy valioso seguir realizando estudios como estos pues nuestro país cuenta con una amplia variedad de plantas medicinales de las cuales se pueden extraer principios activos que pueden ser utilizados en diferentes patologías.

Referencias

Chaverri Calvo, Carlo; Gätjens Torres, Karol; Zavaleta Monestel, Esteban y Chaverri Fernández José Miguel (2008) Revista médica de la Universidad de Costa Rica Valoración de la prescripción de antibióticos en adultos diagnosticados con faringoamigdalitis, período 2004-2007.

- Aguilar, E., López, A. (2013). Temas Selectos de Alimentos 7-2: 35-41. Recuperado de <http://web.udlap.mx/>
- Debjit, B., Sampath, K., Akhilesh, Y., Shweta, S., Shravan, P., & Amit, S. (2012). Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* , 13-22.
- Amin, M., Jassal, M., & Tygi, S. (2013). Phytochemical screening and isolation of Eugenol from *Syzygium aromaticum* by gas chromatography. *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology* , 74-77.
- Hakki, A., Murat, E., Nitz, S., & Kollmannsberger, H. (2007). Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated turkish clove. *Bioresources* , 265-269.
- Apparecido, N., Sartoretto, S., Schmidt, G., Caparroz, S., Bersani-Amado, C., & Kenji, R. (2009). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* , 212-217.
- Kumar, S., & Eko, S. (2012). Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells. *Molecules* , 6290-6304.
- Huss, U., Ringbom, T., Perera, P., Bohlin, L., & Vasange, M. (2002). Screening of Ubiquitous Plant Constituents for COX-2 Inhibition with a Scintillation Proximity Based Assay. *Journal of Natural Products* , 1517-1521.
- Cai, L., & Wu, C. (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products* , 987-990.
- Srivastava, K. (1993). Antiplatelet Principles from a food spice clove (*Syzygium aromaticum*). *Prostaglandins Leukotrienes and essential fatty acids* , 363-372.
- Rojo, L., Barcenilla, J., Vázquez, B., González, R., & Román, J. (2008). Intrinsically Antibacterial Materials Based on polymeric derivates of eugenol for biomedical applications. *Biomacromolecules* , 2530-2535.
- Janero, D., & makriyannis, A. (2014). Terpenes and Lipids of the Endocannabinoid and Transient-Receptor-Potential-Channel biosignaling systems. *ACS Chemical Neuroscience* , 1060-1097.
- Baraldi, G., Preti, D., Materazzi, S., & Geppetti, P. (15 de Enero de 2010). Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as Emerging Target for Novel Analgesic and Anti-inflammatory Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* , 5085-5107.

- Viana, F. (Enero de 2011). Chemosensory Properties of the Trigeminal System. *ACS Neuroscience* , 38-50.
- Arévalo, D. (2006). Insecticidas naturales y sintéticos impregnados en fundas de polipropileno para proteger racimos de banano. Guácimo, Alajuela, Costa Rica: Universidad Earth.
- Arguedas, A. (16 de Noviembre de 2014). Usos del eugenol. (C. Xatruch, Interviewer)
- Skoog, W. H. (2001). *Química Analítica (Séptima Edición ed.)*. DF: McGraw Hill.
- Skoog, H. C. (2008). *Principios de análisis instrumental (Sexta edición ed.)*. México DF: Cengage Learning.
- CIMED. (2002). *Plantas Medicinales Volumen II*. San José: UCR.
- European Medicines Agency. (2011). *Assesment report on Syzygium aromaticum* . Reino Unido: European Medicines Agency.
- Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Guyton, A. (2006). *Tratado de fisiología Médica*. Mississippi: Elsevier.
- Apparecido, D., Sartoretto, S., Schmidt, G., Caparroz-Assef, S., Bersani, C., & Kenji, R. (2009). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia* , 212-217.
- Alma, E. N. (2007). Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). *Bioresources* , 265-269.
- Nicolás, J.-P. (2013). *Manual de Plantas Medicinales del altiplano de guatemala para el uso familia*. Guatemala: Cholsamaj.
- Celis, L. (2010). *Usos medicinales del clavo de olor*. Cuernavaca: Tlahui.
- Medicines, N. (2010). Clove. Retrieved 5 de Febrero de 2015 from <https://naturalmedicines.therapeuticresearch.com/databases/food,-herbs-supplements/professional.aspx?productid=251>
- Pavia, D. (2013). *Introduction to spectroscopy*. United States: Cengage Learning.
- Gómez, C. (2003). *El Acné y su tratamiento*. CIMED. San José: Universidad de Costa Rica.

Grimalt, R. (2007). Protocolo de Dermatología. Madrid: Asociación Española de Pediatría.

CADIME. (2010). Acné: tratamiento. Boletín Terapéutico Andaluz , 26 (1), 1-3.

Malbrán, C. (2001). Manual de Procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.

Schramm. (2005). Emulsions, Foams, and Suspensions. Weinheim: WILEY-VCH.

Swarbrick, J. (2007). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. North Carolina: Pharmaceutech .

Adil el Hadri, M. G. (2010). Cytotoxic activity of alpha-humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia , 343-356.

Katherine Hammer, C. C. (2011). Effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. Antimicrobial Agents and Chemotherapy , 900-915.