ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL D ELA Conobea scoparioides FRENTE A CINCO CEPAS BACTERIANAS DE INTERS CLINICO EN COLOMBIA

PRESENTADO POR : ZULY MILENA ZARAZA MONCAYO

Trabajo de Investigación para Optar por el Título de Especialista en Epidemiología

RESUMEN

- Se sabe que los aceites esenciales de plantas aromáticas presentan actividad biológica, pero por otro lado es innegable la ventaja que han obtenido dichos microorganismos frente a sus tratamientos por el uso indiscriminado de los antibióticos. En el presente estudio se analizó el aceite esencial de la *Conobea scoparioides* para evaluar su actividad frente a cinco cepas bacterianas que han afectado al hombre.

- Se obtuvo el AE y se preparó la bacteria aplicándose pruebas de sensibilidad, para determinar el porcentaje de inhibición y la evaluación de la MIC en las cinco cepas bacterianas que permitió comparar la efectividad del aceite vs la estreptomicina. En análisis estadístico se aplicó estadística no paramétrica.

- El aceite esencial presentó actividad del tipo bactericida principalmente contra el *B. cereus* con el mayor % de inhibición y una MIC de 3.2 ug/uL, caso diferente presentó *P. aeruginosa* con un % de crecimiento por encima del 50% presentando una MIC de 16.7 ug/uL. Finalmente podemos concluir que se presento mayor actividad frente a bacterias gram positivas como el caso del *B. cereus* que en gram negativas con MIC bastante bajas.

INTRODUCCION

- En Colombia en la región pacifica la flora silvestre es usada en la medicina tradicional por sus bondades puesto que al ser usada como la primera opción en la atención en salud se le otorgan grandes resultados frente a las enfermedades que aquejan la región y a sus pobladores.

- La Conobea es una de los ejemplos de planta medicinal conocida en el Pacifico por sus bondades en la medicina natural; pertenece a la familia Scrophulariaceae nativa de la costa pacífica encontrada en el departamento del Chocó/Colombia. Sus partes han sido objeto de estudio y en la región es usada en la desinfección de heridas, infección de garganta, ojos, uñas, como anticonceptivo y también en el manejo de las diarreas

- La pregunta nace a partir de hallar la posibilidad de encontrar habilidades anti-bacterianas en el aceite esencial de esta planta que ha tenido éxito en algunas investigaciones frente a otro tipo de microorganismos, según Weniger et al. (2001) observo que las flores de la planta presentaron actividad frente a *L. amazonensis*. [7] E investigadores brasileros encontraron que no solo poseía actividad biológica sino también le atribuyen actividad antioxidante

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿El aceite esencial de la *Conobea scoparioides* tiene actividad antibacteriana?
- ¿La actividad antimicrobiana es similar en las cepas estudiadas?
- ¿Es similar la actividad antimicrobiana del aceite esencial a la de la estreptomicina?

JUSTIFICACIÓN

- Cada día se hace más difícil el tratamiento antimicrobiano por la capacidad de dichos microorganismos de crear resistencia, dicho fenómeno ha sido considerado emergente en todo el mundo, especialmente en los hospitales mostrando cifras anuales en aumento del 25% en el manejo de pacientes

- Según la OPS, durante los últimos 14 años se reportaron 6511 casos de brotes por ETAS en 22 países el cual el 57% se le atribuyó a bacterias especialmente Salmonella con un 20%, donde Cuba contribuyó con más del 50% y 317 muertes. En Uruguay en el 99 se registraron 41 brotes de los cuales *Salmonella* y *S. aureus* estuvieron implicados con 57 muertes lo que corresponde al 12.5% respectivamente. Colombia no tuvo un resultado ajeno a los anteriores reportes, con registros de 729 personas afectadas durante el mismo período

- Lo que ha venido complicando la situación frente a estos microorganismos es que se encuentran relacionados en diversas patologías, *S. aureus, E.coli, P.aeruginosa* son causantes de infecciones tales como en vías urinarias, tejidos blandos, ETAS y ocasionando infecciones nososcomiales las cuales hacen parte de las enfermedades más comunes que constituyen del 2 al 5% de las consultas de atención primaria.

- Y este ha sido el mismo panorama en los últimos 14 años en todo el mundo, por tanto la OMS en la búsqueda de la recuperación de los conocimientos populares y aplicación de los mismos como medida de atención primaria en la salud principalmente en los países más pobres, hace necesario desarrollar estrategias de investigación que permitan rescatar y conservar los conocimientos populares, donde se fundamente la aplicabilidad de dichas plantas, la parte de la planta que contiene el principio activo, y la investigación según las enfermedades que afectan los países pobres y las regiones de difícil acceso

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a la nueva tendencia en la investigación en Colombia de explorar las propiedades proporcionadas por la flora de nuestro país, se ha venido buscando opciones que permitan encontrar nuevas alternativas que favorezcan la acción frente a los diversos microorganismos que han venido desarrollando resistencia a los antibióticos y que por lo tanto hace que crezca la dificultad para su tratamiento.

Las bacterias incluidas en el estudio a lo largo de la historia se han adaptado y son resistentes frente a los medicamentos de uso para su control, de igual manera se han convertido actualmente en un problema de salud pública ya que muchas de ellas ocasionan enfermedades transmitidas por alimentos, infecciones nosocomiales o sencillamente son oportunistas, y por lo tanto constituyen un riesgo significativo para la salud de la población tanto en los países en vía de desarrollo como en los desarrollados.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de la *Conobea scoparioides* frente a cinco cepas bacterianas que por su frecuencia en enfermedades comunes para nuestra población se han convertido de interés clínico.

OBJETIVOS ESECIFICOS

- Identificar la concentración inhibitoria del aceite esencial de la *Conobea scoparioides* frente a tres cepas gram negativas y dos cepas gram positivas.
- Calcular la proporción de inhibición del crecimiento bacteriano de las 5 cepas estudiada por el aceite de la Conobea scoparioides.
- Comparar la inhibición de las 5 cepas por la Conobea, como reflejo de la actividad antimicrobiana específica.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de la Conobea scoparioides en 15 diluciones y compararla con de la estreptomicina.
- Determinar por medio del análisis estadístico la diferencia entre el aceite esencial y la estreptomicina

METODOLOGIA

- La investigación se clasificó de tipo descriptiva, de laboratorio con un componente exploratorio para comparar la actividad del AE con la Estreptomicina. De igual manera, se trata de un estudio de tipo experimental por su metodología

- La población y muestra en este estudio estuvo conformada por cinco cepas bacterianas dos gram positivas y tres gram negativas que por su interés clínico y facilidad de alcance fueron escogidas

- Para recabar la información se aplicó una serie de pasos microbiológicos con el ánimo inicialmente de mantener las cepas puras y vivas para luego poder aplicar los ensayos con las diferentes concentraciones del aceite y evaluar si existe o no inhibición del crecimiento comprobándolo en el laboratorio mediante cultivos y análisis estadístico.

VARIABLES

CUADRO OPERACIONAL DE VARIABLES		
Variable independiente	unidad	Escala
• Aceite esencial	ug /ml	Razón
• *S.aureus*	Gran positiva	Nominal
• *B.cereus*	Gran positiva	Nominal
• *E.coli*	Gran negativa	Nominal
• *P.aeruginosa*	Gran negativa	Nominal
• *S.tiphy*	Gran negativa	Nominal
• Dilución 100,50,25	ug/ ml	Razón
• estreptomicina	ug/ ml	Razón
Variable dependiente		
Concentración Mínima Inhibitoria	ug / ml	Razón

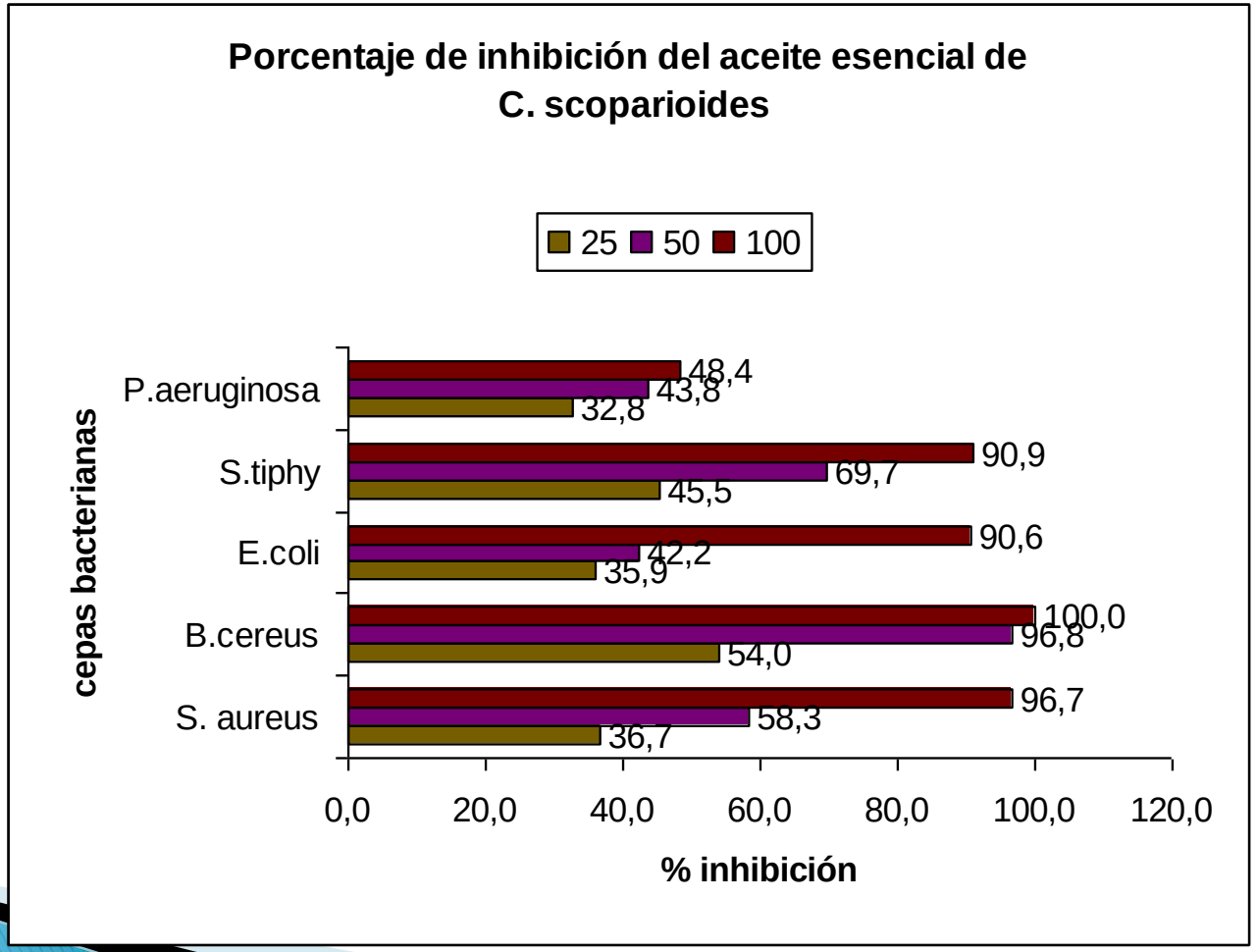
CONTROL DE SESGOS

TIPO DE SESGO	CONTROL DEL SESGO
S. información	Ajuste de la concentración bacteriana en el spectronic para asegurar igualdad en la cantidad bacteria utilizada en el ensayo.
S. información	Reactivación de las bacterias en refrigeración en agar TSA a caldo TSA y nuevamente cultivo en agar TSA y tomar una colonia aislada, para asegurar que las bacterias utilizadas en el ensayo están vivas y la turbidez observada son solo bacterias vivas.
S. información	Se realizó un Gram a la colonia que será utilizada para el juste de la concentración del ensayo y confirmar el morfológicamente que es la bacteria y no contaminación.
S. información	Medición del halo de inhibición por 2 personas ciego, la una sin conocer el resultado de la otra y se promedió el resultado.
S. información	Prueba física y química de la planta recolectada para verificar una adecuada recolección.
S. información	Calibración de la balanza analítica para evitar sesgos en el peso del aceite y asi mismo evitar errores en la preparación de las concentraciones del aceite.

Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la *Conobea scoparioides* a tres concentraciones					
Cepa/ concentración en ug/ml	***S. aureus***	***E. coli***	***B.cereus***	***P.aeruginosa***	***S. tiphy***
100	**++**	**++**	**+++**	**+**	**++**
50	**++**	**+**	**++**	**+**	**++**
25	**+**	**+**	**++**	**+**	**+**

- +: Inhibición < 50%
- ++: Inhibición > 50%
- +++: Inhibición al 100%

- Porcentaje de inhibición del aceite esencial frente a las cinco cepas evaluadas con 100, 50 y 25ug/ml al cabo de 24 horas de incubación



ANALISIS ESTADISTICO

- Se aplicó la prueba de Q de cochran para muestras k relacionadas para determinar si existe diferencia significativa entre los resultados observados entre las bacterias estudiadas.
- H_O = No existe diferencia significativa en la evaluación antibacteriana entre las concentraciones a las que se sometieron las bacterias.
- H_a = Existe diferencia significativa en la evaluación antibacteriana entre las concentraciones a las que se sometieron las bacterias.

Inhibición si=1 no =0 de los ensayos por triplicado para las concentraciones de 100, 50 y 25 ug/ml					
Bacteria	**Ensayo 1**	**Ensayo 2**	**Ensayo 3**	L_i	L_l^2
E.coli	**1**	**1**	**1**	**3**	**9**
S.tiphy	**1**	**1**	**1**	**3**	**9**
P.aeruginosa	**1**	**1**	**1**	**3**	**9**
B.cereus	**1**	**1**	**1**	**3**	**9**
S.aureus	**1**	**1**	**1**	**3**	**9**
	$G_1 = 5$	$G_2 = 5$	$G_3 = 5$	$\Sigma L_l = 15$	$\Sigma L_l^2 = 45$

Total si= 1, $G_j = 15$, $L_i^2 = 45$

$Q = (3-1)\ \int 3\ (5^2 + 5^2 + 5^{2)} - (15)^2\ /\ /4X15) - 45$

$= (2)\ (225) = 450-225\ /60 - 45 = 225/15$

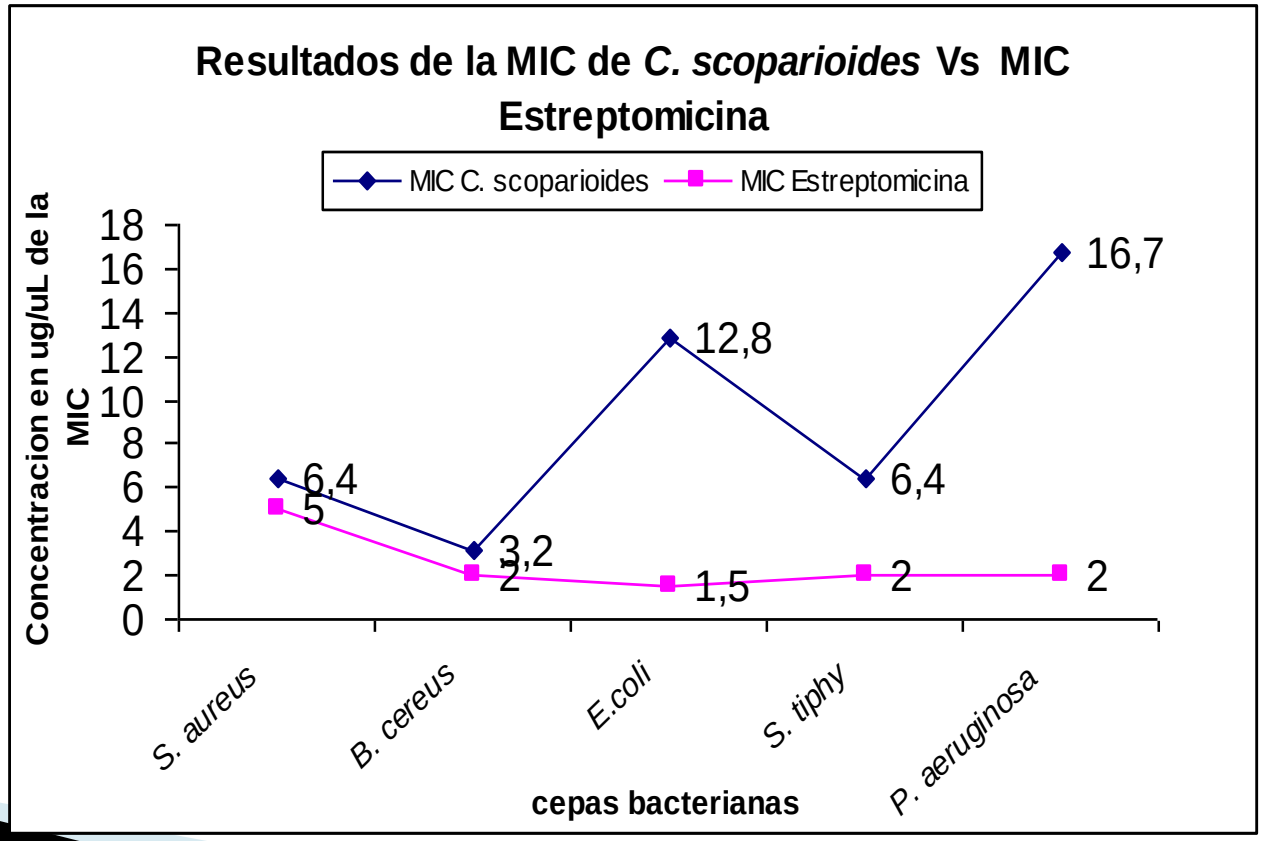
$= 15$

$Q \geq 15$ se tiene una probabilidad de ocurrencia cuando la H_0 es verdadera de $p < 0.001$ con gl = k -1= 4 -1= 3, esta probabilidad es menor que el nivel de significancia $\alpha = 0.01$. Por lo tanto el valor cae en la zona de rechazo, lo que significa que se rechaza la H_o a favor de la H_a

DETERMINACION Y COMPARACION DE LA MIC

Evaluación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de la *C. scoparioides*					
Cepa/ dilución MIC	***S. aureus***	***E.coli***	***B.cereus***	***P.aeruginosa***	***S. tiphy***
16.7	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**
12.8	**+**	**+**	**+**	**-**	**+**
6.4	**+**	**-**	**+**	**-**	**-**
3.2	**-**	**-**	**+**	**-**	**-**
1.6	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
0.8	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
0.4	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
0.2	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
0.1	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
0.05	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
0.025	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
0.0125	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**

- Comparación entre la MIC del AE y la MIC de la estreptomicina con las diferentes concentraciones evaluándola con las 5 cepas bacterianas.



ANALISIS NO- PARAMETRICO
TEST DE FRIEDMAN PARA k MUESTRAS RELACIONADAS

Nombre bacteria	MIC AE	MIC Estreptomicina
S. aureus	6,4	5
B. cereus	3,2	2
E.coli	12,8	1,5
S. tiphy	6,4	2
P. aeruginosa	16,7	2

H_o = Las bacterias en el estudio expuestas al aceite esencia de la C. scoparioides muestran igual inhibición que con la estreptomicina.

H_a = Las bacterias en el estudio expuestas al aceite esencia de la C. scoparioides muestran diferente comportamiento que con la estreptomicina.

Se aplicó el test de friedman para k muestras relacionadas con n=5 se obtuvo

DISCUSION

- Existen diversas investigaciones que han sido encaminadas a favorecer y poder crear opciones que faciliten o mejoren la calidad de vida de las personas y más aún se aprovechen la riqueza natural y en algunos países autóctonos para la creación de nuevas alternativas de tratamientos.

- *Conobea scoparioides* es conocida popularmente en la región pacifica como hierba de sapo y usada para diversos fines de forma empírica, aseguran que tiene poderes curativos para cólicos menstruales, diarrea, infecciones de piel y calmar el vómito.

- Se ha encontrado que la *Conobea scoparioides* específicamente posee un inhibidor celular en le adhesión que los investigadores aislaron como curcubitacina la cual podría estar asociada con diferentes actividades biológicas que se le atribuyen

- En esta investigación la *Conobea scoparioides* demostró poseer actividad antibacteriana del tipo bactericida frente a cinco cepas bacterianas *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, E.coli, Salmonella tiphymurium Pseudomona aeruginosa*, presentando CMI: para *Bacillus cereus* de 3.2ug/ml y para S .aureus de 12.8 ug/ml casi igualando la MIC de la estreptomicina; para *E. coli, S. tiphy* y *P. aeruginosa* fue de12.8, 6.4 y 16.7 ug/ml respectivamente

- Estos resultados permite comparar la actividad de la conobea con estudios recientes bajo la misma modalidad que permiten identificar nuevas plantas con actividad biológica y percibir que la conobe presenta mayor actividad frente a *S.aureus* y *E.coli*, ya que In vitro realizaron pruebas a Peperomia vulcanica, Peperomia fernandopoioana and Scleria striatinux con MIC de 48 ug/ml frente a *S. aureu y E.coli*

BIBLIOGRAFIA

SE PRESENTA ALGUNA DE LA BIBLIOGRAFIA USADA EN EL ESTUDIO.

- Red Colombiana para la prevención, vigilancia y control de las infecciones asociados a la atención en salud y la resistencia a los antimicrobianos by OPS Colombia on Apr 08, 2011.Presentación. realizada por el Instituto Nacional de Salud, en la celebración del Día Mundial de la Salud 2011 (Abril 7, 2011).
- Gomez G. Analisis de la composición química y de la Actividad Biologica de los Aceites Esenciales de dos Quimiotipos Lippi alba (Mill) N.E.Br., en función de las condiciones de extracción y secado de la planta. Tesis de grado.
- Almeida F .El hombre aborigen y el manejo de los recursos naturales.1976
- Historia de las plantas medicinales. Revista Mundo Natural. Salud. Fitoterapia.
- Rochaa, L.G, Almeidab. R.G.S ,Mace R.O, Barbosa-Filhob J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine 12 (2005) 514–535
- Weniger B, Robledo S, Arango G, Deharo E, Aragon R, Muñoz V, Callapa J, Lobstein A, Anton R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. Journal of Ethnopharmacology 78 (2001) 193–200.
- *Rebelo M, Da Silva J., Andrade E, Maia J.*Antioxidant Capacity and Biological Activity of Essential Oil and Methanol Extract of *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth.*J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 6, 1031-1035, 2009