

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA *Conoclea
scoparioides* FRENTE A CINCO CEPAS BACTERIANAS DE INTERES
CLINICO EN COLOMBIA.

Autores: Milena Zaraza Moncayo
Bacterióloga

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

Dr. CARLOS ENRIQUE TRILLLOS

Coordinador Epidemiología Universidad del Rosario

Dra. YOLANDA TORRES de GALVIS

Coordinador Epidemiología Universidad CES

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO- UNIVERSIDAD CES

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE MEDICINA

Bogotá, Mayo de 2012

ENTIDADES PARTICIPANTES

- UTCH: Universidad Tecnológica del Chocó
- UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
- UNIVERSIDAD CES

AUTORES

- MILENA ZARAZA MONCAYO
Bacterióloga. Universidad Industrial de Santander
Estudiante en Especialización en Epidemiología. Universidad del Rosario
milimonca@hotmail.com
zaraza.zuly@ur.edu.co

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a la intervención de valiosas personas que bajo su supervisión y apoyo lo hicieron posible.

Al Dr. Carlos Trillos, Dra. Yolanda Torres y demás profesores del programa de Epidemiología por regalarnos sus conocimientos, por corregirnos con paciencia y exigencia, gracias a su apoyo, sugerencias y dedicación sin duda alguna por su amplia trayectoria en el campo y además porque son seres maravillosos a quienes les ofrezco mi respeto, cariño y sinceridad en todo momento.

Agradezco a Dios padre por darme la perseverancia y fuerza para no desfallecer en el camino.

A mi querida familia que siempre me alentaron y apoyaron en todo momento, a mi maravillosa nonita a quien amo con todo mi corazón y que gracias a ella y a sus esfuerzos nos permitió cumplir muchos sueños y no enseñó a luchar por lo que queríamos, a pesar que ya no estés con nosotros seguirás siendo el pilar de nuestra familia.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	8
2. Pregunta de Investigación	10
3. Justificación	11
4. Planteamiento del problema	13
5. Marco Teórico	14
6. Objetivos	39
6.1 Objetivo General	
6.2Objetivos Específicos	
7. Metodología	40
7.1. Diseño	
7.2. Población y Muestra	
7.3 Fuentes de Información y	
8. Control de Sesgos y Errores	45
9. Aspectos Éticos	46
10. Plan de Análisis	47
11. Resultados	48
12. Discusión	54
13. Bibliografía	57
14. Anexos.	62
• Cronograma	
• Presupuesto.	
• Aspectos administrativos	

RESUMEN

TITULO: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA *Conobea scoparioides* FRENTE A CINCO CEPAS BACTERIANAS DE INTERES CLÍNICO EN COLOMBIA.

Autores: Milena Zaraza Moncayo

En Colombia el manejo de pacientes en los diferentes servicios hospitalarios han presentado inconvenientes en el combate de infecciones por bacterias y la resistencia de las mismas; el *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, han demostrado evolución en la creación de generaciones resistentes y también han participado junto con la *Salmonella* y el *B.cereus* en brotes por ETAS como principales microorganismos causales.

En el presente estudio se analizó el aceite esencial de la *Conobea scoparioides* para evaluar su actividad frente a cinco cepas bacterianas.

Se obtuvo el AE y se prepararon las bacterias aplicándose pruebas de sensibilidad y no paramétricas para determinar el porcentaje de inhibición, la evaluación de la MIC y comparar la efectividad del aceite vs la estreptomycinina.

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

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 conobea es efectiva en mayor proporción frente a bacterias gram positivas.

Palabras Claves: Aceite esencial, *Conobea scoparioides*, *staphylococcus aureus*, *bacillus cereus*, *pseudomona aeruginosa*, *salmonella tiphy*, *E. coli*, actividad antibacteriana, MIC.

SUMMARY

TITLE: ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF THE *Conobea scopariodes* COMPARED WITH FIVE bacterial strains from CLINICAL INTEREST IN COLOMBIA

In Colombia the management of patients in different hospital services have presented difficulties in fighting bacterial infections and resistance of the same, the *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, have shown progress in creating generations resistant and have participated with *Salmonella* and *B.cereus* ETAS in outbreaks as major causative organisms.

In the present study we analyzed the essential oil *Conobea scopariodes* to evaluate their activity against five strains of bacteria. AE was obtained and prepared to apply test bacteria and non-parametric sensitivity to determine the percentage of inhibition, evaluation of MIC and compare the effectiveness of the oil vs. streptomycin

The essential oil presented activity mainly against *B. cereus* with the highest% inhibition and an MIC of 3.2 ug / ml, the case presented different *P. aeruginosa* with a% of growth above 50%, with a MIC of 16.7 ug / ml. Finally we can conclude that there was greater activity against gram positive and the case of *B. cereus* in gram-negative with MIC.

These results allow to compare the activity *conobea* recent studies under the same method to help identify new plants with biological activity and *conobea* perceive that the greater proportion is effective against gram positive.

Keywords: Essential oil, *Conobea scoparioides*, *staphylococcus aureus*, *bacillus cereus*, *pseudomona aeruginosa*, *salmonella tiphy*, *E. coli*, antibacterial activity, MIC

INTRODUCCION

La paleo patología aporta cada día más datos que confirman el hecho de que las enfermedades infecciosas y su tratamiento han sido siempre fenómenos inseparables de la vida del hombre, por ello en la historia de la humanidad y sus civilizaciones es conocida la manera como se buscaba e indagaban la posibilidad de encontrar nuevas formas de cura: ⁽¹⁾

El hombre mediante el método de “ensayo y error” fue encontrando plantas y sustancias minerales que resultaban eficaces frente a las infecciones y construyó poco a poco una auténtica farmacopea para el tratamiento de los procesos infecciosos basada en conocimientos rudimentarios. ⁽²⁾

Es por esto que siempre fue vista la naturaleza como amiga en este camino por encontrar soluciones. La era mesopotámica, china, india, Israel, Egipto, la cultura maya, azteca e inca fueron algunos testigos de las bondades proporcionadas por las plantas. ⁽⁴⁾

En Colombia en la región pacífica 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 Pacífico 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. ⁽⁵⁾

La pregunta nace a partir de hallar la posibilidad de encontrar habilidades antibacterianas 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) observó que las flores de la planta presentaron actividad frente a *L. amazonensis*. ⁽⁶⁾ E investigadores brasileiros encontraron que no solo poseía actividad biológica sino también le atribuyen actividad antioxidante. ⁽⁷⁾

Otros estudios realizados en diversas partes del mundo muestran que las plantas de origen Indio, Colombiano, Boliviano poseen una riqueza botánica con propiedades curativas, antibióticas y con actividad frente a diversos microorganismos. La familia Gesneriaceae, Melastomataceae Piperaceae y Rubiaceae son ejemplo de plantas medicinales con actividad antibacteriana y anti leishmania, aunque no sobre el mismo microorganismo, por ejemplo la familia piperaceae, rubiaceae presentaron actividad sobre *L. amazonensis* y *S. aureus*, por otro lado la familia la familia Gesneriaceae Kayser et al. (2001a) y Melastomataceae Singha et al. (1992) frente a *L. donovani* y *S. aureus*. ^(7.8)

El aceite esencial de *Lippia alba* fue estudiado en una investigación realizada en la Universidad Industrial de Santander con el ánimo de conocer la composición química, bio-actividad y toxicidad de los quimiotipos de la planta, presentando actividad sobre *S.aureu* y *B.cereus*, de igual forma se evaluó actividad anti-leishmania y anti.-tripanosoma con actividad sobre epimastigotes de *T.cruzzi* y promastigotes de *L. chagasi*⁽⁹⁾

PREGUNTA DE INVESTIGACION

- ¿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?

JUSTIFICACION

Cada día se hace más difícil el tratamiento antimicrobiano por la capacidad de dichos microorganismos de crear resistencia, tal 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.⁽¹⁰⁾

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⁽¹¹⁾

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 nosocomiales las cuales hacen parte de las enfermedades más comunes que constituyen del 2 al 5% de las consultas de atención primaria.^(11,12)

El seguimiento epidemiológico de las enfermedades transmitidas por alimentos en el 2008 en Colombia resultó en la notificación al sistema nacional de vigilancia por archivos planos de 9.634 casos implicados en 693 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. En el 2007 se notificaron 4.929 casos, lo que significa que en el 2008 hubo un aumento en la notificación al sistema, donde aislaron como principales microorganismos *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.aureus*, *B.cereus*, *Salmonella*.⁽¹³⁾

El grupo de edad que presentó la mayor incidencia de ETA fue el de 15 a 44 años (53,36 %), lo cual corresponde a 5.191 casos, seguido por el grupo de 5 a 14 años (27,64 %) con 2.679 casos.⁽¹³⁾

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.^(14,15)

Ya que en investigaciones reportan el uso de aceites esenciales y extractos vegetales in vitro frente a microorganismos con resultados positivos y el uso de plantas medicinales como nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas, stress, depresión, cuadros hemorrágicos, diarreicos entre otros, según el uso en la medicina tradicional.⁽¹⁶⁾ ya que lamentablemente, en todo el mundo son cada vez más frecuentes los informes de infecciones por organismos resistentes a múltiples fármacos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter Baumannii* y Enterobacteriaceae productoras de β lactamasa de espectro extendido (EBLEE) o productoras de carbapenemasa.

Entre 1.986 y 2.003, la especie *Acinetobacter* fue el único organismo gram-negativo que aumentó significativamente como causa de neumonía en las UTI de Estados Unidos. Lamentablemente, la resistencia de este organismo a los antibióticos, en particular a los carbapenems, ha generado un importante problema terapéutico. En una encuesta reciente, el 26,4% de 679 aislados de *P. aeruginosa* y 36,8% de 427 aislados de *A. baumannii* que causaron NAVM eran resistentes a los carbapenems (imipenem o meropenem). Datos similares fueron hallados en otras partes del mundo, en países como Grecia, con tasas de resistencia a carbapenems de los aislados en las UTI superiores al 85%.⁽¹⁷⁾

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.⁽¹⁸⁾

Datos obtenidos por la OMS que estiman un alto porcentaje de casos de diarrea en los cuales 1500 son por alimentos contaminados y 3 millones resultan en muertes a menores de 5 años ⁽¹⁸⁾ en otros estudios se demuestra también que aún existe un alto porcentaje infecciones nosocomiales ocurridas en unidades de cuidados intensivos y en pabellones quirúrgicos y ortopédicos.⁽¹³⁾

Pero esto no queda aquí, se ha demostrado que todas estas infecciones son sumamente costosas y prevenibles y que por su cotidianidad, buscar la manera efectiva de controlarlas sería un avance en la medicina y se mejoraría la atención de los eventos.⁽¹⁴⁾

MARCO TEORICO

Se realizó una amplia revisión de la literatura en las diferentes bases de datos proporcionadas por la Universidad del Rosario con el fin de ampliar los conocimientos y tener un material teórico que permita relacionar, comparar y discutir los resultados esperados. MEDLINE, PUBMED, OVID, EBSCO, PROQUEST, SCIENCE DIRECT, BVS, y BIOMEDCENTRAL con los términos MeSH (((("plants, medicinal"[MeSH Terms] OR ("plants"[All Fields] AND "medicinal"[All Fields]) OR "medicinal plants"[All Fields] OR ("medicinal"[All Fields] AND "plants"[All Fields]))) AND ("anti-bacterial agents"[MeSH Terms] OR ("anti-bacterial"[All Fields] AND "agents"[All Fields]) OR "anti-bacterial agents"[All Fields] OR "antibiotics"[All Fields] OR "anti-bacterial agents"[Pharmacological Action]) AND ("oils, volatile"[MeSH Terms] OR ("oils"[All Fields] AND "volatile"[All Fields]) OR "volatile oils"[All Fields] OR ("essential"[All Fields] AND "oil"[All Fields]) OR "essential oil"[All Fields])) OR conobea [All Fields],.

Plantas Medicinales

Generalidades

Las plantas medicinales son aquellas que en sus órganos tienen principios activos, los cuales administrados en dosis suficientes producen efectos curativos en las enfermedades de los seres vivos. Se calcula que de las 260.000 especies de plantas que se han encontrado en el mundo y con buenos resultados en la medicina empírica solo un 10% pueden ser consideradas medicinales.⁽¹⁹⁾

En la actualidad, lo más importante como contribución innegable de las plantas usadas como elementos curativos en el escenario mundial de la ciencia occidental, es el haber llamado de nuevo la atención sobre el “Conocimiento Ancestral Asociado a Los Recursos Filogenéticos”, que poseen las comunidades rurales (llámense campesinas, afro-colombianas o indígenas) sobre el manejo, el uso y la conservación de la naturaleza.^(20,21)

Esto se vino generando a comienzos del siglo XX, donde el campo de la etnobotánica experimentó un giro radical, de la cruda compilación de datos a una reorientación metodológica y conceptual.⁽¹⁹⁾ En nuestros tiempos la etnobotánica requiere una gran variedad de conocimientos: entrenamiento botánico para la identificación y preservación de especímenes vegetales, entrenamiento antropológico para comprender los conceptos culturales en

cuanto a la percepción de las plantas, entrenamiento lingüístico, al menos suficiente como para transcribir términos nativos y entender la morfología nativa, sintaxis y semántica.⁽²⁰⁾

Se podría afirmar que todo el mundo está a la vanguardia del estudio de esa riqueza natural. En los Estados Unidos entre 1959 y 1980, el 25% de las drogas farmacéuticas tenían principios activos derivados de extractos de plantas superiores.⁽¹⁹⁾ En Europa el porcentaje es mayor, y en Latinoamérica se aproxima casi al 80% debido al difícil acceso a las medicinas alopáticas por parte de la población económicamente menos favorecida que en su mayoría es rural.⁽²⁰⁾

Por esto se ha venido indagando en toda Colombia para lograr hacer público lo que todos ya conocemos pero que por falta de recursos e interés no se había podido presentar al mundo y son los resultados arrojados por las plantas que nuestros antepasados utilizaron como primera opción en la cura de enfermedades. Dentro de los aportes más significativos de la Etnobotánica Colombiana se encuentra el descubrimiento y desarrollo de fármacos nuevos para la ciencia, este estudio busca la manera clara de contribuir con el avance en la búsqueda de nuevas opciones para afrontar el medio en el que se vive actualmente del uso indiscriminado de los antibióticos y la presencia de cepas resistentes.

Al haberse obtenido actividad del tipo bactericida con el aceite de la *Conocea*, se busca poder aislar el principio activo y de allí continuar con otros estudios pero frente a microorganismos resistentes como el *staphylococcus aureus* meticilino resistente, ya que en la actualidad la industria farmacéutica se ha basado en los conocimientos tradicionales para la síntesis y elaboración de fármacos, las industrias de farmacia y fitoterapia, utilizan la planta seca, sus extractos o los principios activos aislados, para la fabricación de los medicamentos. A menudo, esta industria imita las estructuras químicas presentes en la naturaleza y el proceso de verificación científica de estas tradiciones que continúa hasta hoy descubriéndose constantemente nuevas aplicaciones⁽²⁰⁾ y nuevas alternativas.

Muchos de los fármacos empleados hoy en día como el opio, la quinina, la aspirina replican sintéticamente o aíslan los principios activos de remedios vegetales tradicionales. Los mercados mundiales más importantes son, entre otros, China, Francia, Alemania, Italia, Japón, España, Reino Unido y USA. Es en USA y en Europa donde el consumo de este tipo de productos ha experimentado un incremento, por un lado por el aumento en la creencia en la medicina alternativa, y por otra parte, por la aceptación de este tipo de tratamientos a nivel oficial⁽²¹⁾

Es bien sabido que en la industria la investigación sobre plantas medicinales no es solo a nivel farmacéutico ya que se les ha dado nombre a ciencias utilizadas con diversos fines a continuación se nombran los usos más comunes con sus principales características.

La aromaterapia: es una rama de la medicina alternativa que utiliza los aceites esenciales de ciertas plantas como método terapéutico para promover la salud en procesos físicos y anímicos, ha generado un mercado con una demanda en aceites esenciales muy superior a lo que venía siendo tradicionalmente, su característica principal es que no se ingieren sino que se inhalan o aplican en la piel. Su eficacia es discutida y es considerada una pseudociencia.

La Fitoterapia veterinaria: Cada vez es más extendido el uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades del ganado, ya sea como tratamientos fitoterápicos o como complementos alimenticios. Se utilizan en la fabricación de compuestos ya que cada vez está más restringido el uso de aditivos artificiales que pueden tener efectos colaterales tanto en la salud de los animales como repercusiones en los consumidores finales, por ejemplo, en el tema de las hormonas. Estas sustancias presentes en las plantas medicinales protegen a los animales frente a diversos tipos de bacterias, hongos, virus, sin presentar en general unos efectos adversos.^(22,23)

Algunos ejemplos de plantas utilizadas para tratar enfermedades en animales son:

- Plantas antiinflamatorias: Regaliz, Harpagofito
- Plantas antimicrobianas: Equinácea, Salvia
- Tónicos cardiovasculares: Espino blanco, *Ginkgo biloba*
- Plantas para cólicos y dispepsias: Hinojo, Eneldo, Menta, Manzanilla
- Plantas diuréticas: Diente de león, Bolsa de pastor
- Inmunotónicos: Equinácea, Astrágalo
- Plantas sedativas: Valeriana, Pasiflora, Hipérico, *Avena sativa*
- Plantas nutritivas: Ortiga, Alfalfa, Lino, Diente de león^(24, 25)

La Cosmética y Para- farmacia: La cosmética natural y ecológica es el segmento de mayor crecimiento de la industria de la belleza. Los altos índices de crecimiento de este mercado resultan muy atractivos para distintos sectores, pero ahora cabe cuestionarse la pureza de los ingredientes naturales y los productos ecológicos utilizados.

Aplicación de las plantas medicinales como materias primas de uso industrial

En este grupo quedan incluidas todas aquellas aplicaciones en las que no participa la actividad farmacológica, como son por ejemplo las aplicaciones basadas en las propiedades organolépticas (aromatizantes, correctores del sabor), o las propiedades fisicoquímicas que dan una presentación adecuada a medicamentos, alimentos y productos de perfumería y cosmética (disolventes, gelificantes, estabilizantes).

Productos destinados directamente al consumidor.

Por ejemplo, hojas de laurel, raíces de regaliz, tallo y hojas de menta, flores y hojas de tila, orégano, salvia y otras (frescas, secas, congeladas), con propiedades antioxidantes y bactericidas.

Productos destinados a la industria.

En este sector destaca la comida precocinada que cada vez más sustituye progresivamente a la comida casera. En ella se emplean antioxidantes, conservantes, saborizantes y colorantes de origen natural, así como condimentos que hacen su olor y sabor más apetecible. También se emplean mucho este tipo de plantas en las industrias cárnicas y charcuteras, como condimento, aromatizantes y conservantes. Un ejemplo de ello sería el pimentón. España es el principal productor de pimentón a nivel mundial, con un total de tierras cultivadas que ascienden a 6.700 hc, equivalente a una producción en seco de 16.800 toneladas. El rendimiento actual mundial es de 9.000 kg/ha⁽²³⁾

Sector perfumería y cosmética

En este sector los productos se elaboran a partir de formulaciones que utilizan fundamentalmente extractos de base, aceites esenciales, otros aceites (germen de trigo, almendra, pepita de uva, soja, jojoba,), alcoholes y pastas y cremas que serán preparadas en la misma empresa o adquiridas a terceros. En Europa han aparecido pequeñas empresas que parten de la explotación agrícola muy especializada o de un grupo de cultivos y plantaciones que se contratan con terceros, para llegar a la integración de un laboratorio analítico y una planta de envasado de productos de Cosmética y Perfumería naturales. ⁽²²⁾

Perfumería industrial.

El sector de la perfumería industrial demanda grandes cantidades de aceites esenciales que serán empleados en productos que contienen composiciones aromáticas ó aceites esenciales puros, como geles de baño, jabones, lociones, cremas. Los perfumes de alta gama contienen una parte importante de aceites esenciales y otros extractos de origen vegetal.⁽²⁶⁾

Técnicas de extracción de aceites esenciales

Hay muchas maneras para extraer los aceites esenciales que se mencionaran a continuación:

Enfleurage:

Éste es el método por el cual las esencias de la flor tales como jazmín, Rosa, que son más delicadas y difíciles de obtener son extraídas. Las flores o los pétalos se machacan entre las bandejas enmarcadas, de cristal de madera manchadas con una grasa animal grasienta hasta que la grasa se satura con su perfume.⁽²⁷⁾

Para esto se utilizan grasas naturales con puntos de ablandamiento alrededor de 40 °C, normalmente manteca de cerdo RBD (Refinada, Blanqueada, Desodorizada). Se extiende en bandejas ó “chasis” en profundidad no mayor a 0.5 cm y sobre ella se colocan los pétalos de flores ó el material vegetal, desde donde se van a extraer los principios odoríficos, el contacto puede durar de 3 a 5 días. Luego el material vegetal es removido y reemplazado por material fresco, esta operación se repite buscando la saturación de la grasa. Posteriormente la grasa impregnada del principio activo, “le pomade”, se lava con alcohol libre de congéneres (alcohol de perfumería), relación 1/1 dos veces consecutivas. El alcohol se filtra y se destila a vacío (21 in Hg, T 30 °C) hasta recuperar un 80 % del volumen de alcohol, como mínimo, en el fondo queda un residuo llamado “absolute”.⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾

Extracción con solventes:

El material previamente debe de ser molido, macerado ó picado, para permitir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente. El proceso ha de buscar que el sólido, ó el líquido, ó ambos, estén en movimiento continuo (agitación), para lograr mejor eficiencia en la operación. Se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambientes. El proceso puede ejecutarse por batch (por lotes ó cochadas) ó en forma continua (percolación, lixiviación, extracción tipo soxhlet). Los solventes más empleados son: Etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan clorados ni benceno por su

peligrosidad a la salud. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados.⁽²⁰⁾

El solvente adicionalmente extrae otros componentes como colorantes, gomas, mucílagos, ceras, grasas, proteínas, ha de disponerse de una unidad de enfriamiento, para la menor pérdida del solvente. El material residual en la marmita de destilación, contiene concentrados las materias odoríficas y se le conoce como “concrete”. En caso de emplear glicoles, aceites vegetales, aceites minerales, como solventes extractores, los componentes odoríficos son imposibles de recuperar desde allí y el producto se comercializa como un todo, conocido como “extractos”⁽²⁹⁾

Extracción por prensado:

Éste es un método simple de exprimir hacia fuera literalmente, de aceites esenciales de las cortezas y pela de la fruta madura tal como naranja y limón en una esponja.^(28,30)

También se le conoce como “expresión”. El material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas tipo batch ó en forma continua, dentro de éstos se tienen los equipos: Tornillo sin fin de alta ó de baja presión, extractor expeller, extractor centrífugo, extractor decanter y rodillos de prensa. Para los cítricos antiguamente se empleó el método manual de la esponja, especialmente en Italia, que consiste en exprimir manualmente las cáscaras con una esponja hasta que se empapa de aceite, se exprime entonces la esponja y se libera el aceite esencial.

Otros métodos corresponden a raspado, como el del estilete ó “ ecuelle”, donde la fruta se pone a girar en un torno y con un estilete se raspa la corteza únicamente; permanentemente cae un rocío de agua que arrastra los detritos y el aceite liberado. Otro proceso emplea una máquina de abrasión similar a una peladora de papas, la “pellatrice” y también hace uso del rocío de agua.

En estos procesos la mezcla detritos-agua-aceite se centrifuga a 5000 rpm durante 40 minutos y el aceite esencial recuperado se coloca en una nevera a 3°C durante 4 horas, para solidificar gomas y ceras que se localizan en la superficie. El aceite esencial se guarda en recipientes oscuros a 12 °C. Los aceites obtenidos por prensado y/o raspado, se les comercializa como “expresión en frío” y cumplen la funciones de odorizantes (smell oils) y saborizantes (taste oils).⁽²⁹⁾

Extracción con fluidos super- críticos:

Punto crítico corresponde a las condiciones de temperatura y presión, para un gas o un vapor, por encima de las cuales la sustancia ya no puede ser “licuada” por incremento de presión. Adicionalmente las propiedades de la fase líquida y/o vapor son las mismas, es decir no hay diferenciación visible ni medible entre gas y líquido. Se habla así de P_c , T_c , V_c , D_c .

La sustancia más empleada es el CO_2 , que en estas condiciones presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), que conlleva a un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar a pequeños poros y rendijas del mismo lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo.

En la parte final del proceso hay una remoción total del solvente y se realiza a una temperatura baja, se disminuye la pérdida de sustancias volátiles y se evita la formación de sabores y olores extraños “a cocido”; también presenta un H_{ev} y un C_p bajos, lo que disminuye notoriamente el consumo de energía del proceso, en intensidad y en tiempo.

El CO_2 no es tóxico, ni explosivo, ni incendiario, es bacteriostático y es clasificado por la FDA como GRAS (Generally Recognized As Safe). La temperatura y presión críticas para el CO_2 son P_c 73 bar y T_c 31°C. ⁽²⁸⁾⁽³⁰⁾

Extracción por arrastre con vapor:

Por efecto de la temperatura del vapor (100 °C) en un cierto tiempo, el tejido vegetal se rompe liberando el aceite esencial, el cual presenta a estas condiciones una presión de vapor. Adicionalmente el aceite esencial debe de ser insoluble en agua, ya que después del condensador, en el separador (Florentino) debe de formarse dos fases: una de aceite esencial y otra de agua. Si el aceite esencial presenta componentes solubles en agua estos quedarán en la fase acuosa que puede comercializarse como tal: agua de rosas, agua de jazmín, agua de ylang-ylang. ⁽³¹⁾

Hidrodestilación:

La hidrodestilación es un proceso conocido y difundido mundialmente para obtener el aceite esencial de una planta aromática. Sin embargo, existen escasos estudios sistemáticos para conocer los fenómenos controlantes del proceso y permitan entenderlo física o químicamente, con los propósitos de: controlarlo, simularlo y optimizarlo eficientemente. ⁽³²⁾

Estos sistemas son muy utilizados en el campo, son fáciles de instalar, se pueden llevar de un sitio a otro, “trashumantes”, son baratos, seguros, fáciles de operar y presentan un consumo energético bajo. Los aceites producidos son más coloreados, que los obtenidos por arrastre con vapor propiamente dicho, y tienden a presentar un cierto olor a quemado: Eucalipto, citronella, limonaria. Por lo anterior estos aceites siempre van a requerir una etapa posterior de refinación.⁽³¹⁾

Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias orgánicas **volátiles**, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas.

Normalmente son líquidos a temperatura ambiente, y por su volatilidad, son extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua, aunque existen otros métodos. En general son los responsables del olor de las plantas⁽²⁰⁾⁽²³⁾

Se definen, según AFNOR (1998), como:

“Productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, bien por arrastre con vapor, bien por procedimientos mecánicos a partir del epicarpio de los Citrus, o bien por destilación seca. El aceite esencial se separa posteriormente de la fase acuosa por procedimientos físicos en los dos primeros modos de obtención; puede sufrir tratamientos físicos que no originen cambios significativos en su composición”.⁽³³⁾

Esta definición establece claramente las diferencias que existen entre los aceites esenciales officinales (que se usa en medicina) y otras sustancias aromáticas empleadas en farmacia y perfumería conocidas vulgarmente como esencias. Están ampliamente distribuidos en coníferas (pino, abeto), mirtáceas (eucalipto), rutáceas (*Citrus* spp), compuestas (manzanilla), si bien las plantas con aceites esenciales se ubican principalmente en las familias de las Labiadas (menta, lavanda, tomillo, espliego, romero) y las umbelíferas (anís, hinojo).^(20,33)

Pueden estar en diferentes órganos: raíz, rizoma (jengibre), leño (alcanfor), hoja (eucalipto), fruto (anís), sumidades floridas (F. Labiatae). La composición varía con el lugar de origen. También varía con el hábitat en que se desarrolle, (por lo general climas cálidos tienen mayor contenido de aceites esenciales), el momento de la recolección, el método de extracción, etc.⁽³⁴⁾

Entre las principales propiedades terapéuticas debidas a la presencia de aceites esenciales, cabe destacar la antiséptica (durante muchísimos años estas especies vegetales se han empleado como especias, no solo para dar sabor sino también para conservar los alimentos); antiespasmódica; expectorante; carminativa y eupéptica; etc.

Se debe tener en cuenta que algunos aceites esenciales, sobre todo a dosis elevadas, son tóxicos, principalmente a nivel del sistema nervioso central. Otros, como el de ruda o enebro, se considera que poseen propiedades abortivas. Algunos también pueden ocasionar problemas tópicos, irritación o alergias. Además de sus propiedades terapéuticas, los aceites esenciales tienen un gran interés industrial en la industria farmacéutica, en alimentación y sobre todo en perfumería.⁽²⁰⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾

Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

a. Consistencia

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- Esencias
- Bálsamos
- Resinas

Las esencias son líquidos volátiles a temperatura ambiente.

Los bálsamos son extractos naturales obtenidos de un arbusto o un árbol. Se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzoico y cinámico, así como sus correspondientes ésteres.

Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc.

Las resinas, son productos amorfos sólidos o semisólidos de naturaleza química compleja. Pueden ser de origen fisiológico o fisiopatológico. Dentro del grupo de las resinas podemos encontrar a su vez una serie de posibles combinaciones o mezclas:

b. Origen.

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como:

- Naturales
- Artificiales
- Sintéticos

Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín, enriquecidas con linalol, o la esencia de anís enriquecida con anetol ⁽³³⁾

Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.

c. Naturaleza química

El contenido total en aceites esenciales de una planta es en general bajo (inferior al 1%) per mediante extracción se obtiene en una forma muy concentrada que se emplea en los diversos usos industriales. La mayoría de ellos, son mezclas muy complejas de sustancias químicas. La proporción de estas sustancias varía de un aceite a otro, y también durante las estaciones, a lo largo del día, bajo las condiciones de cultivo y genéticamente.

El término quimiotipo alude a la variación en la composición del aceite esencial, incluso dentro de la misma especie. Un quimiotipo es una entidad químicamente distinta, que se diferencia en los metabolitos secundarios. Existen pequeñas variaciones (ambientales, geográficas, genéticas, etc.) que producen poco o ningún efecto a nivel morfológico que sin embargo producen grandes cambios a nivel de fenotipo químico. Un caso típico es el del tomillo, *Thymus vulgaris*, que tiene 6 quimiotipos distintos según cuál sea el componente mayoritario de su esencia (timol, carvacrol, linalol, geraniol, tujanol – 4 o terpineol.

Cuando esto ocurre, se nombra la planta con el nombre de la especie seguido del componente más característico del quimiotipo, por ejemplo, *Thymus vulgaris* linalol ó *Thymus vulgaris* timol⁽²⁴⁾⁽³⁴⁾

Características físicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente. Recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos. Su densidad es inferior a la del agua (la esencia de safrán o de clavo constituyen excepciones). Casi siempre dotados de poder rotatorio, tienen un índice de refracción elevado. Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo, y alcohol de alta gradación. Son liposolubles y muy poco solubles en agua, pero son arrastrables por el vapor de agua. ^(28,33)

Características químicas de los aceites esenciales

Los componentes de los aceites se clasifican en terpenoides y no terpenoides. No terpenoides: En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones.

Terpenoides: Son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente.

Según los grupos funcionales que tengan pueden ser:

- Alcoholes (mentol, bisabolol) y fenoles (timol, carvacrol)
- Aldehídos (geranial, citral) y cetonas (alcanfor, thuyona)
- Ésteres (acetato de bornilo, acetato de linalilo, salicilato de metilo, compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina).
- Éteres (1,8 – cineol) y peróxidos (ascaridol)
- Hidrocarburos (limoneno, α y β pineno)

Tabla 1. Grupos funcionales y las propiedades que ofrecen al compuesto al estar presentes

GRUPOS FUNCIONALES Y LAS PROPIEDADES QUE OFRECEN AL COMPUESTO AL ESTAR PRESENTES.		
Compuesto	Ejemplo	Propiedades
Alcohol	Mentol, Geraniol	Antimicrobiano, antiséptico, tonificante, espasmolítico
Aldehído	Citral, citronelal	Espasmolítico, sedante, antiviral
Cetona	Alcanfor, tuyona	Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico
Éster	Metil salicilato	Espasmolítico, sedativo, antifúngico
Éteres	Cineol, ascaridol	Espectorante, estimulante
Éter fenólico	Safrol, anetol, miristicina	diurético, carminativo, estomacal, expectorante
Fenol	Timol, eugenol, carvacrol	Antimicrobiano Irritante Estimulante inmunológico
Hidrocarburo	Pineno, limoneno	Estimulante descongestionante antivírico, antitumoral

Antibióticoterapia

Breve historia

Aunque la identificación, el conocimiento y la determinación del papel de los microorganismos como responsables de las enfermedades infecciosas son hechos recientes, el interés por conocer las causas de la infección y el modo de combatirla comenzaron, sin embargo, mucho antes.

Desde la antigüedad, el hombre ha luchado en todas las épocas contra el dolor y la enfermedad para preservar la vida y la salud e incrementar su bienestar. Cada civilización ha tenido que asumir sus males y ha tratado de combatirlos aplicando remedios terapéuticos, según sus creencias y los conocimientos adquiridos por la experiencia. Históricamente cuatro han sido los medios de lucha contra la enfermedad: el empírico, el mágico, el religioso y el científico.

La primera actitud del hombre primitivo ante la enfermedad debió ser puramente espontánea. De manera semejante a los animales, el instinto fue quien primero guió al hombre para buscar remedios con los que aliviar sus males lamiendo o limpiando sus heridas, desparasitándose, previniendo ciertos procesos infecciosos y atenuando algunas de sus manifestaciones sintomatológicas, como la fiebre o el dolor, mediante la ingestión de plantas.

Más tardía fue la experiencia empírica: ante la repetida observación de un hecho frecuente, como la contaminación de heridas o la presencia de parásitos, al que habitualmente sigue un cuadro anormal de alteraciones distintas, el hombre primitivo reaccionó sin reflexionar por qué se producía aquel hecho; se limitó a constatar lo que su experiencia le mostraba evidente y actuó de acuerdo con prácticas curativas que en ocasiones semejantes habían resultado eficaces.

Con el paso del tiempo, el hombre se convirtió de nómada en sedentario y comenzó a pensar en el pasado y en el futuro, tratando de explicarse los hechos y el porqué de las enfermedades; entonces surgió el concepto de castigo divino como causa de ellas y la religión y la magia vinieron a unirse al empirismo en el tratamiento de las enfermedades.

A mediados del siglo XIX inició el verdadero conocimiento científico sobre todo a partir del establecimiento por parte de L. Pasteur y R. Koch del origen microbiano de las infecciones y del enorme despliegue de la farmacología, que trajo consigo una nueva forma de curar basada en una terapéutica científica.

Tras los descubrimientos de la penicilina y las sulfamidas sufrió una auténtica transformación del tratamiento de las enfermedades infecciosas, que no sólo

cambio la historia de la farmacología y la propia historia de la medicina, sino que también fue uno de los hechos de mayor repercusión en la vida humana: en la segunda mitad del siglo actual las enfermedades infecciosas dejaron de ser la principal causa global de mortalidad en los países desarrollados concretamente en España, la mortalidad por enfermedades infecciosas se redujo en un 70% a partir de los años 50.

Sin embargo, nada hay más lejos de la realidad. Durante los últimos años han surgido una serie de hechos que no permiten seguir manteniendo el optimismo inicial y la euforia de haber iniciado la ‘batalla definitiva’ contra las bacterias: algunas infecciones extra hospitalarias no sólo no han disminuido, sino que han sufrido una auténtica metamorfosis que las hace más variadas y de diagnóstico más difícil, pero ciertas infecciones nosocomiales, producidas por auténticos ‘acorazados microbianos’, están en aumento y la aparición incesante de cepas resistentes, como consecuencia del uso masivo e indiscriminado de los antibióticos, ha adquirido ya proporciones alarmantes en muchos casos.

La investigación farmacéutica ha permitido en el último cuarto de siglo disponer de un verdadero arsenal terapéutico, pero, paradójicamente, en el momento actual puede resultar insuficiente en algunos casos concretos.

La alarma surgida ante el fenómeno de la resistencia y los microbios emergentes ha traído la imperiosa necesidad de contar con nuevas alternativas terapéuticas en los próximos años. Las estrategias que las empresas farmacéuticas ya han puesto en marcha y pasan por el rastreo de nuevas moléculas, por la búsqueda de más dianas, por el desarrollo de terapias génicas^(1, 17, 18, 23, 34,35)

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Están constituidos por terpenos con actividad y composición variada; después de la extracción generalmente son líquidos y rara vez sólidos o pastosos.^(36, 37) Numerosas son las investigaciones que se realizan encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evaluación y establecer su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida,^(37, 38) por medio de extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas, para ello se han empleado las técnicas *in vitro* dada la sencillez y reproducibilidad de las mismas.⁽⁴⁰⁾

El uso de plantas con fines terapéuticos es de gran utilidad, ya que de ellas son obtenidas innumerables sustancias químicas, vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en diferentes países, de ellas el 74%

fue descubierto a partir de su empleo en medicina tradicional, la investigación en este sentido brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente de materia prima más económica y natural, las plantas medicinales.⁽⁴⁰⁾

Existen diversas investigaciones que han sido encaminadas a favorecer y poder crear opciones que faciliten o mejoren la calidad de vida de las personas, como en el control de plagas y de insectos donde se ha encontrado efecto inhibitorio de adultos y adultos emergentes del *Azadirachta indica*, *Hyptis suaveolens* y *Ocimum gratissimum* sobre la *Callosobruchus maculatus*.⁽⁴¹⁾ Así mismo el Dr Kiendrebeogo halló actividad ovicida y larvicida de la *Striga hermonthica* sobre las larvas y huevos de la *C. maculatus*.⁽⁴¹⁾

Por otro lado la infección causada por protozoarios se ha convertido en un problema de salud pública mundial ya que se encuentra endémica en un alto porcentaje en países tropicales que aunque son enfermedades que tienen tratamiento no se han podido controlar. Se han realizado revisiones de cómo antiguamente las culturas buscaban la manera de sanar dichas enfermedades y se encontró que los chamanes indios usaban sobre las lesiones hojas de las plantas que ellos observaban mejoría en pacientes que presentaban la enfermedad causada por *L. amazonensis*, es tal el caso de la *Bocconia integrifolia*, *B. pearces*, *Ampelocera edentula*, *Galipea longiflora*⁽²⁷⁾. Y más tarde científicos Indios probaron en hamsters infectados con *L. donovani* 5 plantas que mostraron inhibición > 75% la *Alstonia scholaris*, *Swertia chirata*, *Tibouchina semidecandra*, *Tinospora cordifolia* y *Nyctantles arbotristis*⁽⁵⁾

Sudan, España, Nigeria, India y Colombia han sido algunos de los países que han centrado sus investigaciones por encontrar nuevas estrategias y moléculas diana que proporcionen una luz para el control y tratamiento de estas enfermedades.

En Colombia se evaluaron 44 plantas del oeste colombiano donde según su quimo taxonomía y etno- farmacología fueron escogidas con el fin de evaluar su actividad antileishmania y trypanocida sobre amastigotes, promastigotes y epimastigotes respectivamente. Dentro de las 44 plantas, 15 mostraron una alta actividad, se mencionan algunas: *Asidosperma megalocarpon*, *Camptosperma panamense*, *Conobea scoparioides*, *Guarea polymera* y *G. guidonia*.⁽²⁸⁾

El aceite esencial de *Lippia alba* fue estudiado en una investigación realizada en la Universidad Industrial de Santander con el ánimo de conocer la composición química, bioactividad y toxicidad de los quimiotipos de la planta, presentó actividad sobre *S.aureu* y *B.cereus*, de igual forma se evaluó actividad

anti-leishmania y anti-tripanosoma presentando actividad sobre epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. chagasi* ⁽⁸⁾

La actividad antimicótica de numerosos compuestos ha sido la elección de algunos investigadores ya que las infecciones por hongos superficiales han aumentado en los últimos 20 años principalmente en individuos inmunodeficientes, convirtiéndose en unas de las infecciones más comunes en todo el mundo y constituyen un problema de salud pública especialmente en países tropicales.⁽⁴²⁾ El clima húmedo, la sobrepoblación y las malas condiciones higiénicas han conducido a un aumento de la prevalencia de estos patógenos, estas micosis han adquirido renovada importancia además por ser una causa de consulta médica frecuente.⁽⁴³⁾

Dentro de este contexto, los aceites esenciales son productos naturales de gran valor e importancia económica. La bio actividad se investiga a partir de los efectos farmacológicos que son producidos por sus metabolitos, los cuales son obtenidos por diferentes técnicas fisicoquímicas a partir de las hojas. ⁽⁴²⁾

Dentro de los hongos la *Candida* es uno de los patógenos más comunes y en especial por la presentación de cuadros invasivos en pacientes inmunocomprometidos. De las infecciones nosocomiales la infección por *Candida* corresponde a la cuarta causa de diseminación por vía hematogena de los microorganismos, en especial en aquellos pacientes con factores de riesgo como el uso de catéteres centrales o con antibióticos de amplio espectro, uso de nutrición parenteral total, procedimientos quirúrgicos o uso de medicamentos inmunosupresores⁽⁴²⁾

Existen estudios que revelan la actividad antimicótica de algunas plantas como la *Phenax rugosa* y la *Baccharis trinervis* sobre *Trichopyton rubrum*, *Trichopyton mentagrophytes* y *Candida albicans*. ⁽⁴²⁾ Por otro lado se evaluaron 15 aceites esenciales de los cuales todos mostraron actividad algunas de las plantas son *T. zipaquirensis*, *M. ovalifolia*, *Stevialucida* sobre *Asperillus flavus*, *a. fumigatus* y *C. albicans*. ⁽⁴³⁾ También se encontró actividad sobre *T. mentagrophytes*, *M. canis* y *C. albicans* de *Minthos trachysmollis* ⁽⁴⁴⁾

Se han evaluado la composición química de diez plantas aromáticas y la actividad biológica de sus aceites y compuestos químicos de los cuales 21 compuestos mostraron actividad frente *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Candida krusei* y *C. parapsilosis* ⁽⁴⁴⁾

En la actividad antibacteriana el *S. aureus* ha sido en gran medida una bacteria estudiada con predilección por la necesidad que habita en los investigadores y la parte medica de hallar nuevas formas terapéuticas frente a este microorganismo que ha venido modificando su comportamiento frente a los

antibióticos usados para su control y eliminación, por otro lado el *B.cereus* es una bacteria que frente a diversas plantas ha mostrado mayor sensibilidad en diferentes estudios, es el caso de los extractos de la Goiaba⁽⁴⁵⁾ el aceite de la *Eremophila*⁽⁴⁶⁾ mostraron en un estudio realizado para evaluar la actividad inhibitoria de sus compuestos y presentaron actividad antibacteriana sobre ambas bacterias con un alto porcentaje de inhibición.

En varias ocasiones al ser evaluado el aceite esencial de las plantas aromáticas algunas presentan actividad frente a gram positivas pero no sobre gram negativas o viceversa, son muy escasos los estudios de actividad antibacteriana sobre aceites esenciales que revelan un porcentaje alto de inhibición tanto para gram positivas y gram negativas, la *Cinnamomun osmophloeum*⁽⁴⁶⁾, la *Thymus pubescans*, *Thymus sepyltum*⁽³⁷⁾, *Picea excelsa*⁽⁴⁶⁾ son unas de ellas.

Bacterias del estudio

Escherichia coli

E. coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole⁽⁴⁷⁾ Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*⁽⁴⁸⁾, ella está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, son catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA.

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados.⁽⁴⁷⁾

E. coli coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio.⁽⁴⁸⁾ Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes".

E. coli puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización, que se transmiten por vía fecal oral de persona a persona o a través del agua y alimentos⁽⁴⁸⁾

Salmonella typhi.

La *Salmonella Typhi* es un bacilo Gram negativo, aerobio y anaerobio, flagelado, no encapsulado, muere por ebullición y pasteurización, produce una endotoxina y posee los antígenos somáticos (O), flagelar (H) y (Vi).

Es de distribución mundial, en México ha ocasionado tantos casos que se considera endémico, presentándose en un porcentaje más alto y con mayor frecuencia en escolares y adolescentes aumentando la incidencia es en los meses de verano. El contagio se adquiere por el contacto con pacientes o por ingerir agua y alimentos contaminados por heces humanas o a través de portadores que manejen alimentos.

El hábitat es el tubo digestivo del hombre, el contagio es directo o por fómites, por heces fecales se eliminan hasta dos meses, se destruyen con la pasteurización y cloración del agua, la refrigeración sólo detiene el crecimiento. La fuente más común de infección por salmonellas son los siguientes alimentos: Pollos, huevos, sobre todo el cascarón, patos, pavos, carnes embutidas, leche, vísceras de cerdo, vísceras de res y mariscos. El periodo de incubación es de 1 a 3 semanas y el periodo de transmisibilidad es desde la primera semana y cerca del 10% de los pacientes no tratados diseminan bacilos durante 3 meses y 5% se tornarán portadores.

La fiebre tifoidea es una enfermedad bacteriana, sistémica, febril, que se caracteriza por tener un inicio insidioso de cefalalgia, anorexia, bradicardia y esplenomegalia, es producida por *S. Typhi*, la cual se adquiere al ingerir agua o alimentos contaminados con heces fecales, puede tener complicaciones graves como la perforación intestinal y es de distribución mundial convirtiendo al hombre en reservorio natural.⁽⁴⁵⁾

Pseudomona aeruginosa

Pseudomona aeruginosa pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es un bacilo gran negativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina. *Pseudomonas aeruginosa*, al igual que otras pseudomonas fluorescentes,

produce catalasa y oxidasa, así como amoniaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono.

Pseudomonas aeruginosa puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos.

Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis. Las personas con fibrosis quística o inmunodeprimidas son propensas a la colonización por *P. aeruginosa*, que puede conducir a infecciones pulmonares progresivas graves. Las foliculitis y las otitis relacionadas con el agua se asocian con ambientes húmedos y cálidos como las piscinas y bañeras de hidromasaje. Muchas cepas son resistentes a diversos antibióticos, lo que puede aumentar su relevancia en el ámbito hospitalario.

Es un microorganismo común en el medio ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo, el agua y las aguas residuales. Puede proliferar en ambientes acuáticos, así como en la superficie de materias orgánicas propicias en contacto con el agua. Es una fuente conocida de infecciones intrahospitalarias y puede producir complicaciones graves. Se han aislado en gran variedad de ambientes húmedos, como fregaderos, baños de agua, sistemas de distribución de agua caliente, duchas y bañeras de hidromasaje.

La vía de infección principal es la exposición de tejidos vulnerables, en particular herida y mucosa, a agua contaminada, así como la contaminación de instrumentos quirúrgicos. La limpieza de lentes de contacto con agua contaminada puede causar un tipo de queratitis. La ingestión de agua de consumo no es una fuente de infección importante. ^(46,47,48)

Bacillus cereus

Es un bacilo formador de esporas responsable de intoxicaciones alimentarias, siendo su hábitat natural el suelo, contamina con frecuencia cereales, leche, budines, cremas pasteurizadas y especias, entre otros alimentos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las enfermedades causadas por alimentos contaminados constituyen uno de los problemas sanitarios más difundidos en la actualidad. ⁽⁴⁹⁾

Los casos de intoxicaciones o enfermedades por alimentos mal preparados o contaminados por este microorganismo suelen ser frecuentes a pesar de que

son perfectamente evitables; la primer descripción de un brote de gastroenteritis data de principios de 1900 ^(50.) En nuestro país casos de brotes de ETA denunciados y confirmados, por este tipo de microorganismos han sido esporádicos, 3 brotes en los últimos 9 años ⁽⁵¹⁾.

B. cereus puede producir dos enterotoxinas: la toxina diarreica y la toxina emética. Los síntomas de la toxiinfección tienen dos formas de presentación con presencia de diarrea, dolores abdominales y vómitos. Su período de incubación varía de 4 a 16 horas luego de la ingesta del alimento contaminado.

Bacillus cereus causa intoxicaciones alimentarias a través de la ingesta de alimentos contaminados. En general se admite que, debido a la levedad del cuadro y a que la detección microbiológica de esta bacteria no se realiza rutinariamente en pacientes diarreicos, la incidencia real puede ser superior a la estimada. Mas si tenemos en cuenta, que el cuadro clínico se confunde a menudo con los producidos por *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*, dependiendo de qué toxina esté involucrada. La intoxicación alimentaria puede ocurrir cuando los alimentos son preparados y mantenidos sin la adecuada refrigeración durante horas antes de ser servidos. ⁽⁵²⁾ Los alimentos vinculados a brotes han sido carne y verduras cocidas, arroz frito o hervido, crema de vainilla, sopas, leche y brotes de vegetales crudos. ⁽⁵³⁾

Bacillus cereus produce dos entero toxinas durante su crecimiento exponencial: la toxina diarreica y la toxina emética que dan lugar a dos formas clínicas distintas de intoxicación alimentaria. El síndrome emético y el síndrome diarreico. ⁽⁵²⁾

Staphylococcus aureus

El *Staphylococcus aureus*, conocido como estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia gram positiva productora de coagulasa y catalasa que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, no infectadas, por ella.

Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.

En la actualidad, este microorganismo se caracteriza por ser el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por

el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado, o incluso, con otro paciente.⁽¹⁷⁾

Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, siendo los antibióticos más eficaces para combatirlos los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina. Además de la administración del tratamiento antimicrobiano correspondiente, puede ser conveniente, en función del caso, la eliminación de puertas de entradas como catéteres venosos permanentes o drenajes quirúrgicos. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo⁽⁵³⁾

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.⁽¹⁷⁾

Datos obtenidos por la OMS que estiman un alto porcentaje de casos de diarrea en los cuales 1500 son por alimentos contaminados y 3 millones resultan en muertes a menores de 5 años⁽¹¹⁾ en otros estudios se demuestra también que aún existe un alto porcentaje infecciones nosocomiales ocurridas en unidades de cuidados intensivos y en pabellones quirúrgicos y ortopédicos.⁽¹²⁾

Pero esto no queda aquí, se ha demostrado que todas estas infecciones son sumamente costosas y prevenibles y que por su cotidianidad, buscar la manera efectiva de controlarlas sería un avance en la medicina y se mejoraría la atención de los eventos.⁽¹³⁾

Cepas bacterianas ATCC: En nuestro medio por situaciones muy especiales y altamente beneficiosas, podemos tener acceso a las cepas control del American Type Culture Collection (ATCC) , la colección más grande e importante del mundo, que se fue formando a medida que se iban descubriendo las bacterias y se iban tipificando. Estas cepas bacterianas se pueden obtener a un bajo costo y pueden ser utilizadas como control en una gran variedad de utilidades, lo cual nos permite conocer el grado de confiabilidad de los productos comerciales o elaborados en el laboratorio,

porque son utilizadas como herramientas en control internos al momento de probar medicamentos, estandarizar pruebas o métodos.

Conobea scoparioides: Pertenece a la familia Scrophulariaceae al género conobea, en el departamento del Chocó es conocida como la hierba de sapo, por los pobladores de la región, ha sido utilizada de diferentes maneras, sus partes ya sea la raíz, las hojas, en infusiones, ungüento y aplicado la hoja sobre las heridas o sobre el vientre para controlar los cólicos.

Flora Brasiliensis, vol. 8(1): Heft 30, Heft 30, t. 51 (1862)

Family Scrophulariaceae

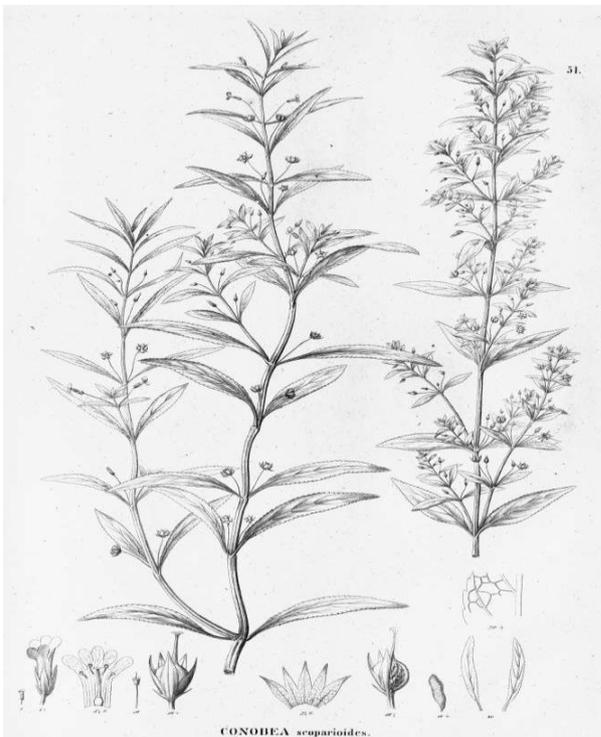
subfamily Gratioloideae

Tribe Stemodieae

Illustration contributed by the Missouri Botanical Garden

Figura 1.

Conobea scoparioides



Conobea scoparioides (Cham. & Schltdl.) Benth. [8209-26893

Medios de cultivo

Agar TSA: Es usado para el aislamiento y cultivo de microorganismos fastidiosos y no-fastidiosos

Agar nutritivo: Es un medio usado para el crecimiento de microorganismos poco exigentes en sus requerimientos nutricionales. No contiene inhibidores del crecimiento bacteriano. Es de color ambar claro medio opalescente.

Agar MH y caldo MH:

De los medios disponibles se considera que tanto el agar como el caldo Mueller Hinton (MH) son los más apropiados para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que muestran buena reproducibilidad entre los diferentes lotes comerciales, son baratos, contienen bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas, son adecuados para la mayoría de las bacterias patógenas en lo que a requerimientos nutricionales se refiere y existen suficientes datos recopilados que avalan su uso en las pruebas de sensibilidad.

Pero se debe tener en cuenta las siguientes recomendaciones en el uso del medio de cultivo:

- Ph = 7.2 a 7.4
- Humedad: no se debe evidenciar gotas de agua en la superficie de la tapa de la caja de petri.
- Efecto de la timina o timidina
- Cantidad de cationes divalentes Mg ++ y Ca ++.
- Finalmente el medio debe ser preparado como lo indica el fabricante
- Esterilizar

Hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHd)

Aspectos generales

El procedimiento llevo a cabo usando un montaje tipo Clevenger, calentado con un horno microondas (LG interlowave, 2450 MHz, 720 W)⁽¹⁾. En la práctica se usan instalaciones sencillas, donde en la parte inferior del tanque extractor, se coloca agua, luego viene encima una parrilla que soporta el material que va a ser extraído. La salida de vapores, puede ser lateral al tanque; pasa a un serpentín ó espiral enfriado por agua y posteriormente el vapor condensado y el aceite esencial se recolectan en un separador de fases, el cual debe tener la suficiente altura y diámetro para evitar la pérdida de aceite y permitir la fácil recolección del mismo. El tanque extractor es calentado con fuego directo en su parte inferior, el vapor producido allí causa el arrastre del aceite esencial.

Cuando se emplea hidrodestilación no se requiere de un calderín generador de vapor, como en las instalaciones industriales.

Una vez extraído el aceite esencial de la planta destilada se procede a la separación del hidrolato (resto del destilado que está compuesto de agua destilada y trazas de aceite esencial). Para ello se utiliza un decantador.

Aplicaciones y utilidad

Los aceites esenciales se utilizan para dar sabor y aroma al café, el té, los vinos y las bebidas alcohólicas. Son los ingredientes básicos en la industria de los perfumes y se utilizan en jabones, desinfectantes y productos similares. También tienen importancia en medicina, tanto por su sabor como por su efecto calmante del dolor y su valor fisiológico.

Sus aplicaciones son diversas en la industria:

- Industria cosmética y farmacéutica: como perfumes, conservantes, saborizantes, principios activos, etc.
- Industria alimenticia y derivada: como saborizantes para todo tipo de bebidas, helados, galletitas, golosinas, productos lácteos, etc.
- Industria de productos de limpieza: como fragancias para jabones, detergentes, desinfectantes, productos de uso hospitalario, etc.

Determinación de la MIC (Concentración Mínima Inhibitoria)

Fundamento

Se define MIC como la mínima concentración de antibiótico en este caso de aceite esencial que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes)

Generalidades:

La determinación de la CIM puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test (marca comercial).

Cultivo bacteriano

Generalidades

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada.

Mantenimiento de cepas y reactivación bacteriana

Para el crecimiento de las cepas bacterianas ATCC, se utiliza el agar TSA, de los cuales se toman 25 mL en cajas de Petri, y se inoculan con la cepa respectivamente y refrigerados a 4°C.

Para su reactivación se toman 2 a 3 colonias aisladas, se realiza un gram para verificar morfología, e inocular en caldo TSA e incubar por 24h a 37°C.

Método de difusión en agar Kiby-Bauer modificado a perforación en placa

Fundamento

El método de difusión en agar consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo y perforarla de manera estéril con pipeta pasteur, las concentraciones del aceite preparadas. Tan pronto el aceite se pone en contacto con el agar este se difunde, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los pozos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.

Generalidades

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Esta metodología se encuentra estandarizada para el estudio de diferentes bacterias dentro de las cuales se encuentran las del estudio.

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 ESPECIFICOS

- 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 estreptomycinina.
- Determinar por medio del análisis estadístico la diferencia entre el aceite esencial y la estreptomycinina

METODOLOGIA

DISEÑO DEL ESTUDIO:

La investigación es 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 realizaron procedimientos de laboratorio de rutina 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.

INSTRUMENTO Y RECOLECCION DE LA INFORMACIÓN

Recolección de material vegetal (salida de campo)

- Se realizó un estudio de campo inicialmente para el reconocimiento de la zona, El material vegetal se recolecto en Salero corregimiento del municipio de Unión panamericana, departamento del Chocó. Se visitó al municipio de elección para la recolección del material vegetal por sus condiciones climáticas el municipio de salero/Choco cuenta con una precipitación promedio entre 6800-7600, temperatura a nivel de mar de 28°C, y humedad relativa de 95% ambiente propicio para el crecimiento de la planta de interés.
- Una vez obtenido el material recolectado se le realizaron pruebas fisicoquímicas estandarizadas de determinación de la planta, realizada por el grupo de biólogos del laboratorio.

Muestra:

En el estudio se utilizaron 5 cepas ATCC dos gram positivas y tres gram negativas. Además son cepas comunes en enfermedades prevalentes en nuestra población y hacen parte del laboratorio de investigación dentro de su stock de cepas bacterianas lo cual facilitó el acceso de las bacterias.

Staphylococcus aureus ATCC 33591

Bacillus cereus ATCC 1177

Salmonella typhi ATCC 13311

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Escherichia coli ATCC 1645

El tamaño de la muestra fue determinado por turbidez según la escala de Macfarland llegando a 0.5 de Abs, medido en el espectrofotómetro lo cual equivale a 1×10^5 ufc/ cm³. La utilidad de la escala es poder realizar suspensiones de las bacterias ajustadas a un patrón, generalmente se suele usar el 0,5 Mc Farland, para esto se toma una muestra de nuestra bacteria y la inoculamos en un tubo con solución salina, en el momento en que se produzca un poco de turbidez ya estamos en el 0,5 (de forma visual).

Se sometieron a dos fases en el ensayo, una para determinar por medio de la difusión en agar a que concentración de 100,50 y 25 eran sensibles las bacterias y la segunda fase consistió en determinar la MIC

Método de difusión en agar Kirby-Bauer modificado a perforación en placa

Procedimiento

1. Se ajustó la concentración bacteriana a 0.5 Abs.
2. Se preparó agar Mueller-Hinton en cajas de petri
3. Más tarde se adicionó 100 μ L de cada cepa bacteriana, y 25 mL de agar a una temperatura de 50 °C.
4. Se homogeniza, agitando la caja en ocho. Hasta solidificar.
5. Se realizó las perforaciones del agar con una pipeta Pasteur estéril (asegurándose que queden equidistantes), rompiendo el fondo del agar.
6. Se adicionó a cada pozo 15 μ L del agar para sellar y garantizar que todos los pozos se encontraran con la misma profundidad.
7. Los pozos se distribuyeron de la siguiente manera: un blanco, un control positivo (streptomycin) y tres diferentes concentraciones 100 ug/ml, 50ug/ml y 25ug/ml.
8. En cada pozo se adicionó 10 μ L de las concentraciones del aceite a evaluar.

Se incubó a 37 °C durante 24 horas. El procedimiento se realizó por triplicado y se realizaron tres tratamientos para asegurarse de la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. A continuación se realizó la lectura del halo de inhibición para cada muestra por 2

personas midiendo en cada caso el diámetro en mm, y se comparó con el halo del control positivo.

Método microdilución en caldo en placa de 96 pozos.

FASE I: Preparación de las concentraciones

Para la preparación de la solución stock de los aceites con actividad antibacteriana de 25ug/ml:

1. Se preparó una solución stock de 64ug/ml, 8 y 0.5 ug/ml en DMSO
2. De la solución stock de 64ug/ml se preparó las diluciones de 12.8, 6.4 y 3.2 ug/ml
3. Se preparó la solución de 8ug/ml y de allí las diluciones de 1.6, 0.8, 0.4 y 0.2 ug/ml
4. Se preparó la solución 0.5ug/ml de donde se preparó las diluciones de 0.1, 0.05, 0.025 y 0.0125 ug/ml.

Para los aceites con actividad antibacteriana entre 50 y 100 ug/ml se preparó una solución stock de 90 ug/ml de donde se prepararon las 8 diluciones de 48, 46,44, 42, 40, 36, 30 y 26 ug/ml con DMSO al 99%.

Para los aceites esenciales con actividad antibacteriana de 100ug/ml se realizó diluciones a partir de una solución stock de 100ug/ml para prepararon diluciones de 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55 ug/ml con DMSO al 99%.

FASE II: Procedimiento.

Determinación de la MIC del aceite esencial con actividad antibacteriana de 25ug/ml:

Las concentraciones para determinar la MIC se prepararon a partir de 12.8ug/ml, 6.4ug/ml, 3.2ug/ml, 1.6ug/ml, 0.8ug/ml, 0.4ug/ml, 0.2ug/ml, 0.1ug/ml, 0.05ug/ml y 0.025 ug/ml, que se ubicaron en cada pozo.

Por otro lado los aceites que presentaron actividad de 50ug/ml a 100ug/ml se determinó la MIC con las siguientes concentraciones:

48ug/ml, 46ug/ml, 44ug/ml, 42ug/ml, 40ug/ml, 36ug/ml, 30ug/ml, 26ug/ml.

La técnica se realizó en placas de 96 pozos independientes para cada ensayo y por triplicado en la placa y el ensayo, con un volumen final de cada pozo de 250 uL.

Las placas de microdilución se sellaron para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incubaron y evitar posible contaminación.

Dentro del pozo hay: 220 uL de medio Mueller-Hinton caldo + 10ul de microorganismo a 0.5 Abs, + 20 uL de cada una de las diluciones previamente preparadas. Se incubaron a 37°C durante 24h.

Lectura de los resultados de la determinación de la MIC:

La lectura inicial de los resultados se hizo a contra luz observando turbidez o transparencia, y se confirmó con la siembra en superficie en caja de petri dividida en 8 con agar nutritivo, adicionando 20 uL del contenido de los pozos escogido uno al azar e incubado por 24horas a 37°C , para posteriormente realizar la lectura. Se observó posterior crecimiento o inhibición del crecimiento.

Medios de cultivo

Agar TSA:

Agar nutritivo:

Agar MH y caldo MH:

Microorganismos

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio fueron:

Staphylococcus aureus ATCC 33591

Bacillus cereus ATCC 1177

Salmonella tiphy ATCC 13311

Pseudomona aeruginosa ATCC 27853

Escherichia coli ATCC 1645.

Otros procedimientos

Limpieza, esterilización e incineración

La limpieza de las superficies del laboratorio se realizó con hipoclorito al 2%.

La esterilización se llevó a cabo de dos formas; húmeda en autoclave para esterilizar los medios de cultivo, y algunos instrumentos de vidrio; cuyo principio es que el vapor generado en la autoclave debe entrar en contacto con lo que se desea esterilizar, la temperatura a la cual debe llegar es de 121-123°C o 250-254°F y una presión de 15 psi durante 20 a 30 min si son líquidos y 10-15 min si son instrumentos.

La otra forma de esterilización es seca en horno cuyo principio es llevar el material de vidrio a 40°C calor generado por el horno.

Los materiales de laboratorio se esterilizaron antes y después de ser usados, en el caso de la cinta autoclave permitió evidenciar que se llegó a la temperatura adecuada para obtener una esterilización precisa.

La incineración del material contaminado (cultivos bacteriano en agar y caldo) fueron incinerados por la empresa contratada manteniendo la documentación al día y evitar contaminación ambiental.

Tabla2. Cuadro de variables

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

Tabla3. Control de sesgos y errores

CONTROL DE SESGOS Y ERROR

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 así mismo evitar errores en la preparación de las concentraciones del aceite.

ASPECTOS ÈTICOS

Este es un estudio descriptivo con componente exploratorio, de laboratorio de microbiología, sin riesgo, dado que no se investigó en personas ni animales. Resolución 8430 de 1993.

Se utilizaron las cepas bacterianas

- *Staphylococcus aureus* ATCC 33591
- *Bacillus cereus* ATCC 1177
- *Salmonella tify* ATCC 13311
- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 1645.

Se cumplió con la norma establecida en la resolución 8430, y **ARTICULO 10**. Donde “El grupo de investigadores o el investigador principal deberán identificar el tipo o tipos de riesgo a que estarán expuestos los sujetos de investigación”. También se clasificó el tipo y riesgo como lo dice el artículo 11.

Se cumplió con lo expuesto en el TITULO IV: con el artículo 63 se dirige a las instituciones investigadoras en las que se realice investigación con microorganismos patógenos o material biológico. Se cumplió con los siguientes requerimientos.

- a. Se contó con las instalaciones y equipo de laboratorio de acuerdo con las normas técnicas, que garantizaron el manejo seguro de tales gérmenes.
- b. Se elaboró un manual de procedimientos para el laboratorio de microbiología y todo el personal profesional, técnico, de servicios y de mantenimiento lo conocieron.
- c. Se entrenó al personal sobre la manipulación, transporte, utilización, descontaminación y eliminación de desechos.
- d. Se determinó la necesidad de vigilancia médica del personal que participó en la investigación.
- e. Se dispuso de bibliografía actualizada y de archivos sobre la seguridad de los equipos, la disponibilidad de sistemas de contención, normas y reglamentos, riesgos.

Sin embargo todo el equipo de investigación involucrado en el proyecto conoce las normas antes mencionadas y las metodologías para procesar y analizar los microorganismos infecciosos.

Tabla4. Plan de análisis estadístico

PLAN DE ANALISIS ESTADISTICO

Objetivo Específico	Análisis
<ul style="list-style-type: none"> Identificar la concentración inhibitoria del aceite esencial de la <i>Conobea scoparioides</i> frente a tres cepas gram negativas y dos cepas gram positivas. 	<p>Análisis cualitativo Observacional</p>
<ul style="list-style-type: none"> Calcular la proporción de inhibición del crecimiento bacteriano de las 5 cepas estudiada por el aceite de la <i>Conobea scoparioides</i>. 	<p>Análisis cuantitativo Porcentaje de inhibición</p>
<ul style="list-style-type: none"> Comparar la inhibición de las 5 cepas por la <i>Conobea</i>, como reflejo de la actividad antimicrobiana específica. 	<p>Análisis no paramétrico para muestras k relacionadas Q de Cochran</p>
<ul style="list-style-type: none"> Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de la <i>Conobea scoparioides</i> en 15 diluciones y compararla con de la estreptomicina. 	<p>Análisis cualitativo Observacional</p>
<ul style="list-style-type: none"> Determinar por medio del análisis estadístico la diferencia entre el aceite esencial y la estreptomicina 	<p>Análisis no paramétrico para muestras k relacionadas test de Friedman.</p>

RESULTADOS

El aceite esencial de la *Conobea* presentó actividad del tipo bactericida contra las cinco cepas bacterianas evaluadas en las tres concentraciones principalmente frente a las gram positivas en las concentraciones más altas de las cuales *B. cereus* presentó mayor proporción con un 100% de inhibición para la concentración de 100ug/ml, y *S. aureus* 96.7%, para la concentración de 50ug/ml *B. cereus* tuvo un 96.8% de inhibición y en el *S. aureus* disminuyó la acción del aceite a 50% de inhibición y en la concentración más baja de 25ug/ml el *B. cereus* superó al *S.aureus*. La MIC registrada por esta bacteria fue de 3.2 ug/ml, la cual difiere de 1.2ug/ml con la de su control positivo estreptomicina. Por otro lado las bacterias gram negativas que participaron de esta investigación mostraron un panorama diferente postulándose la *P. aeruginosa* como la más resistente frente al AE con un % de inhibición por debajo del 50% en las tres concentraciones 10, 50 y 25ug/ml, presentando una MIC de 16.7 ug/ml. *E. coli* fue de las más sensibles en este grupo. Finalmente podemos concluir que se presentó mayor actividad frente a bacterias gram positivas como el caso del *B. cereus* que en gram negativas con MIC bastante bajas.

Tabla 5. resultados de la evaluación antibacteriana del aceite esencial e la *Conobea scoparioides* a tres concentraciones.

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

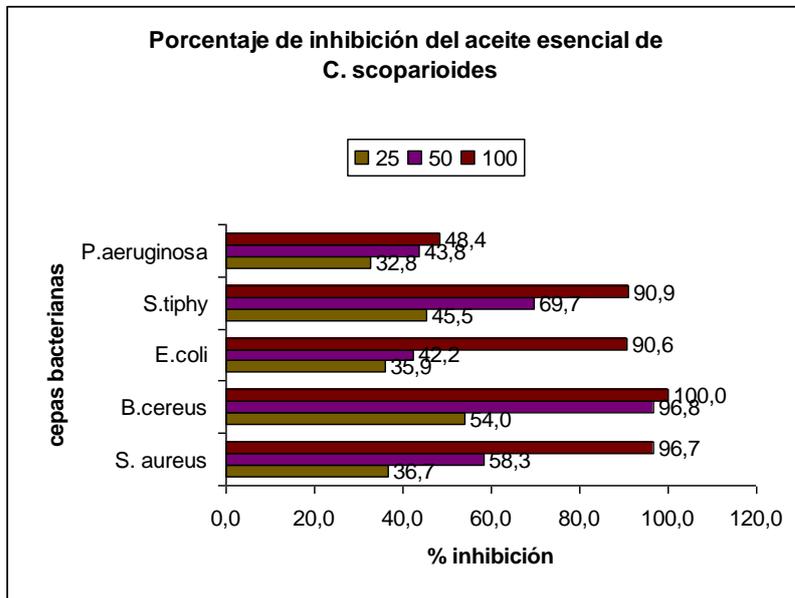
+: Inhibición < 50%

++: Inhibición > 50%

+++ : Inhibición al 100%

Gráfica 1.

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.



Actividad antibacteriana.

Los resultados presentados en la gráfica 1 revelan que el aceite esencial de (e.g, *C. scoparioides*) inhibe el crecimiento de las cinco cepas evaluadas en el estudio, presentándose mayor inhibición en las bacterias gram positivas especialmente en *B. cereus* donde se midió halos de inhibición de 24 mm de diámetro en 100ug/ml y 21 mm en la concentración de 50ug/ml por encima de el halo de la estreptomycinina midiéndose halos de 20 mm. De igual manera sucedió para *S. aureus*.

En cuanto a las cepas bacterianas gram negativas se determinó actividad similar entre los resultados obtenidos tanto para *E. coli* y *S. tiphy* en 100ug/ml caso diferente ocurrió con *P. aeruginosa* la cual presentó mayor resistencia en las tres concentraciones.

Análisis estadístico no paramétrico

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_0 = 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.

Tabla6. Resultados de la inhibición del aceite esencial frente a las cinco cepas bacterianas.

Inhibición $s_i=1$ 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_i^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
	$G_1 = 5$	$G_2 = 5$	$G_3 = 5$	$\Sigma L_i = 15$	$\Sigma L_i^2 = 45$

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

$$Q = (3-1) \left[3(5^2 + 5^2 + 5^2) - (15)^2 / 4 \times 15 \right] - 45$$

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

$$= 15$$

$Q \geq 15$ 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_0 a favor de la H_a

Tabla 7. evaluación de la MIC

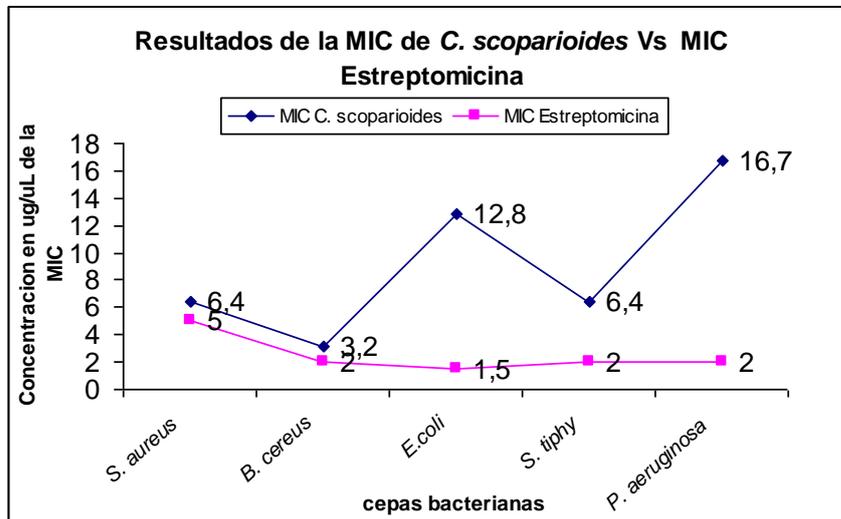
Evaluación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de la <i>C. scoparioides</i>					
Cepa/ dilución MIC	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. tiphy</i>
16.7	+	+	+	+	+
12.8	+	+	+	-	+
6.4	+	-	+	-	-
3.2	-	-	+	-	-
1.6	-	-	-	-	-
0.8	-	-	-	-	-
0.4	-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

+: Inhibición

-: crecimiento

Grafica 2.

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



Concentración Mínima Inhibitoria

Los resultados obtenidos evidencian que *B. cereus* efectivamente fue la bacteria más sensible a la actividad biológica del aceite (e.g., *C. scoparioides*) presentando actividad hasta 3.2 ug/ml siendo la menor concentración a la que el aceite actuó, comparada con la MIC de la estreptomicina para *B. cereus* la diferencia es de 1.2ug/ml siendo bastante baja, se confirmó con el test de Friedman donde se obtuvo un $Fr = 5,00$ lo cual permite considerar que la diferencia entre la inhibición por parte del AE y la estreptomicina es evidente y muy valioso el hallazgo considerando que la estreptomicina es un antibiótico de amplio espectro. En cuanto a *S. aureus* al observarse el comportamiento de la bacteria en presencia del aceite el resultado de la MIC de 6.4ug/ml es acorde a lo expuesto anteriormente relacionando % de inhibición. En cuanto a las bacterias gram negativas con los resultados de la MIC se puede analizar que *E. coli* presentó mayor sensibilidad frente a la estreptomicina con una MIC de 1.5ug/ml colocándola como la bacteria más sensible para la estreptomicina comparada con las 4 cepas restantes.

Según los datos obtenidos con la determinación de la MIC del aceite el *S. aureus* y *S. typhi* presentaron una inhibición similar a pesar de ser morfológicamente diferentes ambas presentaron MIC de 6.4ug/ml pero su comportamiento con la estreptomicina es diferente; el *S. aureus* parece ser más resistente que la salmonella.

P. aeruginosa definitivamente se muestra más resistente aunque la MIC que tiene con la estreptomicina es de las más bajas comparadas con las otras bacterias,

Análisis estadístico para comparar los resultados

Tabla 8. Test de friedman para k muestras relacionadas

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

H_0 = 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

Tabla9. Resultados estadísticos

Rangos		Resultados estadísticos	
	Media de los rangos	N	5
ae	2,00	χ^2	5,000
estrp	1,00	df	1
		Nivel de significancia.	,025

Conclusión: se rechaza la H_0 a favor de la H_a ya que existe diferencia entre los rangos de las medias de los grupos.

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.

La familia Scrophulariaceae es una de las tantas familias a las que se les atribuyen ciertas propiedades curativas por poseer moléculas y sustancias químicas en su composición fitoquímica que le confieren dichas propiedades. El glucósido de iridio y los ácidos fenólicos en el género *Scrophularia* principalmente en la especie *S. deserti* y *S. ningpoensis* han sido evaluados para determinar actividad biológica, utilizando los extractos de la planta los cuales han mostrado una alta actividad antibacteriana, es el caso *S. ningpoensis*, que presentó actividad estafilococia.⁽⁷⁾

A los ácidos fenólicos se les atribuyen propiedades bactericidas y en la *S. frutescens* y *S. sambucifolia* actúa confiriéndoles propiedades antisépticas; de igual manera ocurre con muchas más especies no solo del género *Scrophularia*.

En Colombia se evaluaron 44 plantas del oeste colombiano donde según su quimio-taxonomía y etnofarmacología fueron escogidas con el fin de evaluar su actividad leishmanicida y trypanocida sobre amastigotes, promastigotes y epimastigotes respectivamente. Dentro de las 44 plantas, 15 mostraron una alta actividad, y se mencionan algunas: *Asoidosperma megalocarpon*, *Camptosperma panamense*, *Conobea scoparioides*, *Guarea polymera* y *G. guidonia*.⁽⁵⁴⁾

Conobea scoparioides es conocida popularmente en la región pacífica 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 la adhesión que los investigadores aislaron como curcubitacina la cual podría estar asociada con diferentes actividades biológicas que se le atribuyen.⁽⁵⁵⁾

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 typhimurium*

Pseudomona aeruginosa, presentando MIC: 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 de 12.8, 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 conobea 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*.⁽⁵⁶⁾

Todos estos resultados se obtuvieron bajo diversos procedimientos estandarizados y debidamente controlados como ensayos ciegos para aumentar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados, por otro lado el control de sesgos de información y de selección permitieron obtener resultados validos que se confirman con los análisis y conclusiones de laboratorio y estadísticos. Como dificultad se observó que el manejo de la metodología y los resultados como tal al ser procedimientos de laboratorio, su extensión se vio un poco disminuida.

El ánimo de esta investigación es el inicio de una serie de estudios con la planta para así identificar cual es el principio activo molecular que le permite obtener actividad bactericida, antileishmania y tripanocida como lo mencionan otras investigaciones, para luego poder extrapolarlo a bacterias resistentes que en nuestro medio complican el tratamiento por su resistencia a los antibióticos.

Existen investigaciones encontradas que encaminan su idea a conocer integralmente la planta de interés como el aceite esencial de *Lippia alba* que fue estudiado en una investigación realizada en la Universidad Industrial de Santander con el ánimo de conocer la composición química, bioactividad y toxicidad de los quimiotipos de la planta, que presentó actividad sobre *S.aureu* y *B.cereus*, de igual forma se evaluó actividad anti-leishmania y anti-tripanosoma presentando actividad sobre epimastigotes de *T.cruzzi* y promastigotes de *L. chagasi*⁽³⁰⁾

Todo esto permite identificar la importancia que han recibido las que muchos en las culturas llamaban plantas medicinales, La *Bocconia integrifolia*, *B. pearces*, *Ampelocera edentula*, *Galipea longiflora*⁽²⁷⁾ posee propiedades curativas que en la antigüedad se le atribuyeron en la curación de enfermedades tales como la leishmaniasis causada por *L. amazonensis*, ya que los chamanes la usaban colocando sus hojas sobre las heridas y aseguraban su cura, siendo así se debía confirmar por lo que científicos Indios probaron en hámster infectados con *L. donovani* 5 plantas que mostraron inhibición > 75%

la *Alstonia scholaris*, *Swertia chirata*, *Tibouchina semidecandra*, *Tinospora cordifolia* y *Nyctantles arbotristis* ⁽²⁷⁾

Pero no solo se ha investigado para mejorar la calidad de vida si no también para mejorar la economía agrícola en el control de plagas y de insectos donde se ha encontrado efecto inhibitorio de adultos y adultos emergentes del *Azadirachta indica*, *Hyptis suaveolens* y *Ocimum gratissimum* sobre la *Callosobruchus maculatus*. ⁽⁴³⁾ Así mismo el Dr Kiendrebeogo halló actividad ovicida y larvicida de la *Striga hermonthica* sobre las larvas y huevos de la *C. maculatus*. ⁽⁴³⁾

En Bangladesh evaluaron dos plantas que en su cultura las han utilizado de forma empírica y que se ha obtenido buenos resultados para lo que los médicos o sacerdotes de las culturas le atribuyen propiedades mágico-religiosas, pertenecen a la familia Araceae y Anacardiaceae, se refiere a la *Aglaonema hookerianum* y *Lannea grandis* que mostraron actividad citotóxica y antibacteriana frente a algunas bacterias gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Staphylococcus aureus*, también frente a gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* and *Vibrio cholerae*. La cual mostró un LC50 de 5.25 y LC90 de 10.47 mug/ ml ⁽⁶⁰⁾

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida F .El hombre aborigen y el manejo de los recursos naturales.1976
2. 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.
3. Historia de las plantas medicinales. Revista Mundo Natural. Salud. Fitoterapia.
4. 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
5. 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.
6. *Rebello M, Da Silva J., Andrade E, Maia J.*Antioxidant Capacity and Biological Activity of Essential Oil and Methanol Extract of *Conohea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth.*J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 6, 1031-1035, 2009
7. Pino Benítez N, Stashenko E. Validación antibiótica de plantas medicinales del noroeste de Colombia contra *Staphylococcus aureus*.2009 Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (2), 145 – 150
8. Gómez G. Análisis 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.
9. 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).
10. Estibaliz M. Estimación de la Incidencia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Colombia en la década de 1996-2006. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana.

11. Varela Alonso C. Comparación de la Resistencia al Tratamiento de Infecciones Urinarias no Complicadas a Nivel Internacional con Historias Clínicas del Servicio de Urgencias del Hospital San Ignacio del Año 2007. Monografía. U. Javeriana.
12. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Protocolo de Vigilancia y Control de Enfermedades Transmitidas por Alimentos INT-R02.002.4040-005 Pag 5 de 30 V00.
13. R, Girard, Perraud M, Pruss A, Savey A, Prevención de las Enfermedades Nosocomiales. Guía Práctica. 2ª edición. WHO/CDS/CSR/EPH/2002
14. Guevara D, García S, Díaz A. Análisis Epidemiológico de Cuatro Instituciones de Servicios de Salud II y III Nivel. Valledupar/Colombia. Rev Científica Ciencia y salud
15. Cosme I. El Uso de las Plantas Medicinales. Rev Intercultural. Enero 2008. Universidad Veracruzana Intercultural.
16. Anton Y. Peleg, C. Hooper. Infecciones intra hospitalarias por bacterias gram-negativas. Artículo de revisión con conceptos actuales sobre las infecciones intrahospitalarias por bacterias gram-negativas. 20 SEP 10 | Serie IntraMed "Control de infecciones 2011"
17. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. 29ª sesión, 1y2 de diciembre de 1997
18. Pengelly, A. (1996). *The constituents of Medicinal Plants*. 2nd Ed. Cabi Publishing, U. K.
19. Forero .L.E. Contribuciones de la Etnobotánica al desarrollo de la investigación en plantas medicinales. Universidad Nacional de Colombia Palmira Valle
20. Historia de las plantas medicinales. Revista Mundo Natural. Salud. Fitoterapia.
21. La Rotta, C. 1983. Observaciones etnobotánicas sobre algunas especies utilizadas por la comunidad indígena Andoque (Amazonas, Colombia)
22. Las Plantas de Extractos. Bases para un Plan de Desarrollo del Sector. Fundación Alfonso Martín Escudero. Madrid, 1999.
23. El empleo de las PAM en la industria. Tema 8. Pag 76-79
24. Sánchez F.J. Extracción de aceites esenciales experiencia colombiana. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira Valle. II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas
25. Las Plantas de Extractos. Bases para un Plan de Desarrollo del Sector. Fundación Alfonso Martín Escudero. Madrid, 1999
26. Publicaciones de la Cátedra de Farmacognosia y productos naturales. Facultad de Química, Universidad de la República Oriental del Uruguay.
27. Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales. Tema 7. Aceites Esenciales. pag 66-75.

28. Cases Capdevila, M. A., Hernández – Agero. M. T., 2007. Memorias de las jornadas técnicas dedicadas a PAM. Brihuega, Guadalajara, Enero 2007
29. Morillo O, Fernandez S, Hernandez H, Castillo G, Marquina G. Optimización de los parámetros de extracción de aceite de palam africana utilizando CO₂ supercritico. *Bioagro* 22(2):89-94.2010
30. Sanchez Castillo F. II Congreso Internacional de Plantas Medicinal y Aromaticas. UNAL sede Palmira. Extraccion de Aceites Esenciales, Experiencia Colombiana
31. Cerpa M. Hidrodestilación de Aceites Esenciales: Modelado y Caracterización. Universidad de Valladolid. Departamento de Ingeniería Química. Tecnología del Medio Ambiente. Tesis de Doctorado
32. Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A
33. Martinez A, Aceites Esenciales. Facultad Quimica Farmaceutica. Universidad de Antioquia.2001
34. Van Ginkel, A. (2003). Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción
35. El empleo de las PAM en la industria. Tema 7. Pag 66-75
36. Boatto G, Pintore G, Palomba M, De Simone F, Ramundo E, Todice G. Composition and antibacterial activity of *Inula helenium* and *Rosmarinus officinalis*
37. Kumar A, Sharma V, Singh AK. Antibacterial properties of different Eucaliptus oils. *Fitoterapia* 198; 2: 141-4
38. Alzamora L. Morales L., Armas L., Fernández G. Medicina Tradicional en el Peru: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas.
39. Aricapa D. Actividad Antimicrobiana de Plantas Sobre Microorganismos Cariogenicos. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis para Optar Titulo de Grado
40. Kiendrebeogo M, Patoin A., Germaine O. Activités insecticides de *Striga hermonthica* (Del.) Benth(*Scrophulariaceae*) sur *Callosobruchus maculatus*
41. Iloba B.N, Ekrakene T. Comparative Assessment of Insecticidal Effect of *Azadirachta indica*, *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* on *Sitophilus zeamais* and *Callosobruchus maculatus*.
42. Chang S, Chen P, Chang S, Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology* 77 (2001) 123–127
43. Neidhardt FC. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2nd edition. ASM Press, Washington, 1999.
44. Ewing WH. Edwards and Ewing’s Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th. Edition, Elsevier, 1985

45. Drasar BS, Hill MJ. Human intestinal flora. Academic Press, London, UK., 1974
46. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142-201, 1998
47. Michaine S. *Escherichia coli* O157:H7 La bacteria que disparo el HACCP en la industria de la carne. Enfasis alimentos año IX. N°3. 2003
48. Bartram J *et al.* (eds.), 2003: *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health*. Serie de la OMS *Emerging Issues in Water and Infectious Disease*. Londres (Reino Unido), IWA Publishing
49. Victorica J, Galván M, 2001: *Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption. *Water Science and Technology*, 43:49–52
50. Hardalo C y Edberg SC, 1997: *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking-water. *Critical Reviews in Microbiology*, 23:47–75
51. COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS http://www.fao.org/WAICENT/OIS/PRESS_NE/PRESSS PA/2001/prsp0143.htm
52. Inppaz OPS/OMS vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos <http://intranet.inppaz.org.ar/nhp/ve/ehome>
53. Tauxe R Foodborne disease in Mandell Douglas and Benett's Principles and Practice of Infectious Diseases 2000
54. Pino Benitez N, Stashenko E. Validación antibiótica de plantas medicinales del noroeste de Colombia contra *Staphylococcus aureus*. 2009 Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (2), 145 – 150
55. Musza LL, Speight P, McElhiney S, Barrow CJ, Gillum AM, Cooper R, Killar LM. Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conocarpus scoparioides*. J Nat Prod. 1994 Nov;57(11):1498-502
56. Tauxe R Foodborne disease in Mandell Douglas and Benett's Principles and Practice of Infectious Diseases 2000
57. Martino T, Leyva V, Puig Y, Machin M, Aportela N, Ferrer Y. *Bacillus cereus* y sus implicaciones en la inocuidad de los alimentos. Parte I
58. Blanco W, Arias M, Perez C, Rodriguez C, Chaves C. Deteccion de *Bacillus cereus* toxigenico en productos con especias y leches deshidratadas colectadas en Costa Rica
59. Mba JA, Ngmenya MN, Abawa AL, Babiaka SL, Nubed SL, Nyongbela KD, Lemuh KD. Bioassay-guided discovery of antibacterial agents: in vitro screening of *Peperomia vulcanica*, *Peperomia fernandopoioana* and *Scleria striatinux*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012 May 1; 11(1):10.
60. Roy A, Biswas SK, Chowdhury A, Shill MC, Raihan SZ, Muhit MA. Phytochemical screening, cytotoxicity and antibacterial activities of two Bangladeshi medicinal plants. Pak J Biol Sci. 2011 Oct 1;14(19):905-8

61. Velazquez M, Meza M. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. salud pública de México / vol.47, no.5, septiembre-octubre de 2000
62. Fundación Alfonso Martín Escudero. Las plantas de extractos. Bases para un desarrollo del sector. Madrid, 1999
63. Teixeira M. Actividad Antimicrobiana de Plantas Medicinales y Aromáticas Utilizadas en el Brazil
64. Hernandez L., Rodriguez M. Actividad Antimicrobiana de Plantas que Crecen en Cuba. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Departamento de Investigaciones Microbiológicas. Rev cubana plant med 2001; (2):44-7
65. Alvarez M, Isaza G, Acosta S, Yepes A. Actividad Antimicótica de *Phenax rugosus* y *Baccharis Trinervis*
66. Castañeda M. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. Tesis de grado para optar el título de química
67. S.O. Gnan, M.T. Demello. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous *Goiaba* extracts. Journal of Ethnopharmacology 68 (1999) 103–108
68. Rasooli I, Mirmostafa A, Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. Fitoterapia 73 Ž2002. 244_250
69. Canillac N, Morvey A, Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *S.aureus* and coliform bacteria. Food Microbiology, 2001, 18, 261-268
70. Rivero M, Padola N, Etcheverria A, Parma A. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. Medicina. 2004;64:352-356. ISSN 0025-7680
71. Rodríguez G, Principales características by diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*
72. Avallos L. Enfermedades bacterianas prevenibles con vacunas. Fiebre tifoidea. Capítulo 40.
73. Richardson, AR; Libby SJ, Fang FC (marzo 2008). «A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity.» (en inglés). *Science* **319** (5870):pp. 1672-6. PMID:18356528
74. Bacteriología Medica-Enterobacteriaceae: Características Generales.
75. Food-borne Pathogens. Monograph N°4 *Clostridium perfringens Bacillus cereus*; Oxoid, 1998

ANEXOS

ANEXO 1.

RECURSOS			
Rubros	fuente		total
PERSONAL	suministrado por UTCH,UIS	Descripción ESTUDIANTES BIOLOGIA	\$ 700.000
MATERIAL	UIS,UTCH	ESTUDIANTES BACTERIOLOGIA bacterias, material de laboratorio medios de cultivo, reactivos	\$ 820.000 \$7.000.000
EQUIPOS	UIS,UTCH	espectrofotómetro, balanzas, microscopio, micro pipeta multicanal, cámara de flujo laminar	\$10.000.000
SALIDAS DE CAMPO	UTCH	recolección de material	\$ 50.000
OTROS	UTCH	papelería, cd, teléfono, difusión de los resultados	\$ 300.000
TOTAL			\$ 18.870.000

ANEXO 2

CRONOGRAMA								
Actividad	Meses							
	Marzo-abril	mayo	Junio-julio	Agosto	septiembre	octubre	noviembre	diciembre
Salida de campo y recolección de material vegetal	😊							
Preparación de la cepa bacteriana (pre-cultivo)	😊							
Extracción del aceite esencial		😊						
Determinación de la actividad antibacteriana del aceite en tres tratamientos			😊	😊				
Determinación de la MIC					😊	😊		
Análisis y tabulación de resultados.							😊	

ANEXO 3.

ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

Consideraciones finales

Otros materiales

Laboratorio

Bata

Guantes de latex

Tapabocas

Reactivos

Colorante gram

DMSO al 99%

Hipoclorito de sodio al 1%

10.7.3 Equipos

- Cámara de flujo laminar vertical steriltech serie labculture
- Autoclave
- Balanza analítica debidamente calibrada.
- Spectronic GENESYS 20D
- Incubadora con temperatura de 40°C
- Micropipeta multicanal marca TRANSFERPETTE.
- Microscopio marca OLYMPUS CX 21
- Nevera marca Mabe