



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Maestría en Plantas Medicinales**

**“Estudio de la eficacia *in vitro* de  
combinaciones de antimicrobianos con  
aceite esencial de *Melaleuca armillaris*  
Sm. frente a *Staphylococcus aureus*”**

---

**Tesista: Lic. Daniel Buldain**

**Directora: Prof. Dra. Nora Mestorino**

**Codirectora: Dra. María Laura Marchetti**

**Año 2019**

*Dedico esta tesis a*

*Mis padres porque su fuerza e inteligencia me han guiado siempre en esta vida*

*A Stefi, mi gran amor, por su compañía y su paciencia infinita que me ayudo a iniciar y terminar esta aventura*

*A mis hermanos Maxi, Martin y Gabi por su incondicionalidad y confianza*

## *AGRADECIMIENTOS*

A las Facultades de Ciencias Exactas y Ciencias Veterinarias de la UNLP por permitirme realizar esta Tesis de Maestría en Plantas Medicinales.

A mi Directora, la Dra. Nora Mestorino, por su guía durante estos años, en los que me abrió las puertas de su laboratorio y me brindó sus conocimientos, paciencia y confianza.

A Lau y Andre por acompañarme en el desarrollo de esta tesis, en las necesidades cotidianas y brindándome su amistad desde un principio.

A Li, Cesar y Flor por los momentos compartidos y la ayuda que me han dado durante largas jornadas de trabajo. Así como también a Pedro y a Guille por la buena onda de trabajo en la cátedra.

Al Dr. Bandoni por su ayuda en la caracterización del aceite esencial.

A la Dra. Alicia Consolini por la ambilidad que ha tenido durante todo el desarrollo de la maestría resolviendo las dudas que le he comunicado.

A todos los profesores que forman parte de la Maestría en Plantas Medicinales por su gran predisposición para dar las materias y transmitir sus conocimientos.

A mis compañeros del Magister, gracias por su compañía, apoyo, amistad y todas las experiencias compartidas en estos años.

A mis padres por ser el mejor ejemplo a seguir, bancandome con absoluta confianza en todo lo que emprendo en esta vida.

A mis hermanos por todo lo que son, la incondicionalidad y ayuda de siempre.

A Juan, Cris, Sofi, Pipi y Juan José por ser mi segunda familia y haberme escuchado hablar de este trabajo tantas veces.

A Stefi, mi gran amor por su increíble compañía y aguante por el que todo vale la pena.

## **Títulos y Resúmenes**

**Título:** Estudio de la eficacia in vitro de combinaciones de antimicrobianos con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* Sm. frente a *Staphylococcus aureus*

**Palabras claves:** Aceite esencial, *Melaleuca armillaris*, *Staphylococcus aureus*, Resistencia, Antibióticos, Sinergismo.

### **Resumen**

La resistencia a los antibióticos se ve favorecida por el abuso y el mal uso de los antimicrobianos en medicina humana y animal. Los aceites esenciales son un gran recurso para hacer frente a esta problemática. *Melaleuca armillaris* pertenece a la familia Myrtaceae, rica en especies con aceites esenciales. Los extractos de plantas han demostrado actividad antimicrobiana en muchas investigaciones. Combinamos este aceite esencial (AE) con tres antibióticos diferentes para evaluar la interacción farmacodinámica establecida entre ellos frente a *Staphylococcus aureus*. Los antimicrobianos que utilizamos fueron Cloxacilina (CLOX), Rifaximina (RIF) y Eritromicina (ERI).

El AE se obtuvo mediante destilación de arrastre de vapor de agua y su composición se analizó por GC–FID–MS. Los componentes más abundantes en el AE fueron 1.8 cineol (72.3%), limoneno (7.8%) y  $\alpha$ -pineno (6%).

Trabajamos con aislamientos de *S. aureus* de tipo salvaje (n = 6) de vacas Holstein portadoras de mastitis subclínica, una cepa de *S. aureus* (SARM) resistente a la meticilina proporcionada por el INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" y *S. aureus* ATCC 29213 como cepa de referencia control. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de CLOX, RIF, ERI, AE y de las combinaciones entre los antimicrobianos y el AE se determinaron mediante microdilución en caldo a pH 7.4; 6.5 y 5.0. Se utilizó el método de tablero de damas para evaluar la interacción acontecida entre el AE y los antibióticos. Se estableció el índice de Concentración Fraccionaria Inhibitoria (CFI).

De aquellas combinaciones que produjeron los valores más bajos de CFI, evaluamos el índice de actividad antibacteriana (E), establecido como la diferencia entre los valores

Log<sub>10</sub> del número de bacterias viables al inicio (nt0) y al final de la prueba (nt24). Para ello se construyeron curvas de muerte bacteriana para los antibióticos en forma individual, el AE y sus combinaciones a pH 7.4; 6.5 y 5.0 en concentraciones de 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM. Consideramos efecto bacteriostático (E = 0), efecto bactericida (E = -3) y efecto de erradicación virtual de bacterias (E = -4).

La CIM del AE a pH 7.4 fue de 25 µL/mL para la cepa control ATCC 29213 y 12.5 µL/mL para todas las cepas y aislamientos tipo salvaje analizadas. Estos valores disminuyeron con la acidez del medio en el orden de 2 y 4 veces.

Se demostró una clara actividad sinérgica entre el AE y CLOX, permitiendo reducir la CIM del β-lactámico frente a *S. aureus*. Esta interacción se vio favorecida por la acidificación del medio, donde concentraciones menores de CLOX lograron un efecto bactericida, cercano a la erradicación virtual, en presencia de pequeñas cantidades de AE. La actividad sinérgica entre CLOX y AE fue particularmente importante frente a la cepa SARM.

La RIF presentó una elevada actividad antimicrobiana (0.032 µg/mL) contra *S. aureus* independientemente de las condiciones de pH. Combinando RIF con AE, encontramos un efecto sinérgico en el que el antibiótico se potenciaba, particularmente a pH 5.0 (la CIM disminuyó 8 veces con 1.6 µL/mL de AE). Una mezcla de 0.004 µg/mL de RIF y 12.5 µL / mL de AE permite a pH 7.4 alcanzar un efecto de erradicación virtual (E = -4) frente a aislamientos de tipo salvaje. Algo similar ocurre con la cepa de referencia. La acidificación de los medios mejora la actividad AE/RIF. Así, concluimos que la RIF es un potente antibiótico contra *S. aureus* que no requiere el uso de adyuvantes. Sin embargo, estos resultados se presentan como muy promisorios para el tratamiento de infecciones estafilocócicas de difícil resolución, debido a la resistencia antimicrobiana de *S. aureus* a los antibióticos convencionales, donde las opciones de tratamiento son cada vez más limitadas.

En el caso de ERI, la actividad disminuyó en medio ácido (la CIM se incrementó 16 veces), pero cuando se combinó con el AE, se mantuvo el nivel terapéutico del antibiótico frente a aislamientos de *S. aureus* sensibles. La combinación de AE con ERI redujo la CIM del antibiótico frente a todas las cepas y aislamientos y mostró un efecto sinérgico parcial con

valores de CFI entre 0.5 y 1. Para los aislamientos resistentes, a pH 7.4, 25  $\mu\text{L/mL}$  de AE redujeron la CIM de ERI 16 veces y a pH 5.0, 12.5  $\mu\text{L/mL}$  disminuyeron la CIM más de 8 veces. Se obtuvieron resultados similares con los aislamientos salvajes y la cepa de referencia. Los AE pueden actuar como reguladores del metabolismo intermediario activando o bloqueando las reacciones enzimáticas a nivel ribosomal, o incluso cambiando las estructuras de la membrana. Por lo tanto, estos resultados indican el potencial modulador del AE de *M. armillaris* junto a ERI y pueden ser una alternativa interesante para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *S. aureus* resistente.

**Title:** Study of the *in vitro* efficacy of combinations of antimicrobials with essential oil of *Melaleuca armillaris* Sm. against *Staphylococcus aureus*

**Key words:** Essential oil, *Melaleuca armillaris*, *Staphylococcus aureus*, Resistance, Antibiotics, Synergism.

### **Summary**

Resistance to antibiotics is favored by the abuse and misuse of antimicrobials in human and animal medicine. Essential oils are a great resource to deal with this problem. *Melaleuca armillaris* belongs to the family of Myrtaceae, rich in species with essential oils. Plant extracts has shown antimicrobial activity in many investigations. We combined this essential oil (EO) with three different antibiotics in order to assess the pharmacodynamic interaction established between them against *Staphylococcus aureus*. The antimicrobials we used were Cloxacillin (CLOX), Rifaximin (RIF) and Erythromycin (ERI).

The EO was obtained by steam distillation and its composition was analyzed by a GC–FID–MS. The most abundant components in the EO were 1.8 cineole (72.3 %), limonene (7.8 %) and  $\alpha$ -pinene (6 %).

We worked with wild type *S. aureus* strains ( $n = 6$ ) isolated from Holstein cows, a methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strain provided by the INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" and *S. aureus* ATCC 29213 as a control reference strain. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of CLOX, RIF, ERI, EO and the combinations of antimicrobials-EO was determined by microdilution in broth at pH 7.4; 6.5 and 5.0. The checkerboard method

was applied to evaluate the interaction between antibiotics and EO. The Fractional Inhibitory Concentration index (FIC) was established.

From those combinations that yielded the lowest FIC values, we evaluated the index of antibacterial activity (E), established as the difference between the  $\text{Log}_{10}$  values of the number of viable bacteria at the initial (nt0) and at the end of the test (nt24). So, time-killing curves with antibiotics, EO and combinations of these at 0.5, 1, 2, 4 and 8 fold the MIC in broth at pH 7.4; 6.5 and 5.0 were prepared. We considered Bacteriostatic effect ( $E = 0$ ) Bactericidal effect ( $E = -3$ ) and Effect of virtual eradication of bacteria ( $E = -4$ ).

The MIC of EO at pH 7.4 was 25  $\mu\text{L/mL}$  for the control strain ATCC 29213 and 12.5  $\mu\text{L/mL}$  for all the wild type strains analyzed. These values decreased with the acidity of the medium, in a magnitude between 2 and 4 times.

A clear synergic activity between the EO and the CLOX was demonstrated, which allows reducing the MIC of  $\beta$ -lactam against *S. aureus*. This interaction was favored by acidification of the medium, where lower concentrations of CLOX achieved a bactericidal effect, close to virtual eradication, in the presence of small amounts of EO. The synergic activity of CLOX and the EO was particularly important against de MRSA strain.

RIF presented a high antimicrobial activity (0.032  $\mu\text{g/mL}$ ) against *S. aureus* independently of the pH conditions. Combining RIF with EO, we found a synergic effect where the antibiotic was potentiated, particularly at pH 5 (MIC decreased 8-fold with 1.6  $\mu\text{L/mL}$  of EO). A mix of 0.004  $\mu\text{g/mL}$  of RIF and 12.5  $\mu\text{L/mL}$  of EO allows reaching a virtual eradication effect ( $E = -4.0$ ) against wild types strains at pH 7.4. Something similar occurs for reference strain. The acidification of media improves the EO/RIF activity. We conclude that rifaximin is a potent antibiotic against *S. aureus* and does not require the use of adjuvants. However, these results are very promising for the treatment of staphylococcal infections of difficult resolution, due to the antimicrobial resistance of *S. aureus* to conventional antibiotics, where the treatment options are increasingly limited.

In the case of ERI, the activity decreased in acid medium (MIC is increased 16 times), but when it was combined with the EO maintain the therapeutic level of antibiotic against susceptible *S. aureus* strains. The combination of EO with ERI decreased the MIC of the

antibiotic against all resistant strains and showing partial synergistic effect with FIC's ranging between 0.50 and 1. For resistant strains, at pH 7.4, 25  $\mu\text{L/mL}$  of EO reduced the MIC of ERI 16-fold and at pH 5.0, 12.5  $\mu\text{L/mL}$  decrease the MIC more than 8-fold. Similar results were obtained with wild type and reference strains. The EOs can act as regulators of intermediary metabolism by activating or blocking enzymatic reactions at ribosomal level, or even changing the membrane structures. Thus, these results indicate the ERI and modulator potential of *M. armillaris* EO and can be an interesting another alternative for the therapy of infectious diseases caused by resistant strains of *S. aureus*.



## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	12
I.1. Antimicrobianos.....	16
I.1.1. Resistencia a los antimicrobianos .....	18
I.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
I.3. Aceites esenciales .....	26
I.3.1. Definición y usos comunes .....	26
I.3.2. Métodos de extracción .....	27
I.3.3. Factores que inciden en la producción .....	31
I.3.4. Parámetros de calidad de aceites esenciales.....	32
I.3.5. Propiedades antimicrobianas y mecanismos de acción .....	33
I.3.6. Combinación con antibióticos .....	35
I.4. <i>Melaleuca armillaris</i> .....	36
I.5. Hipótesis.....	40
I.6. Objetivo general.....	40
I.7. Objetivos específicos .....	40
II.MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
II.1. Recolección de <i>M. armillaris</i> .....	42
II.2. Extracción del aceite esencial de <i>M. armillaris</i> .....	42
II.2.1. Caracterización del Aceite esencial .....	44
II.2.1.1. Determinación de la composición del aceite esencial .....	44
II.3. Aislamientos de campo de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	46
II.4. Evaluación de la susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
II.4.1. Prueba cualitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana .....	47
II.4.2. Medio de cultivo.....	47
II.4.3. Inóculo bacteriano .....	48
II.4.4. Discos de antibiograma .....	49
II.4.5. Lectura e interpretación de los halos de inhibición.....	50
II.4.6. Control de calidad.....	50
II.5. Selección de los antimicrobianos a evaluar .....	51
II.6. Prueba cuantitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana a los antibióticos .....	51
II.6.1. Soluciones y diluciones de los antimicrobianos .....	52

II.6.2. Procedimiento .....	53
II.6.3. Preparación de las soluciones de trabajo de los antimicrobianos.....	55
II.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial .....	57
II.7.1. Solución de trabajo de aceite esencial .....	58
II.7.2. Procedimiento .....	58
II.8. Evaluación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los antibióticos y del aceite esencial .....	60
II.9. Determinación de actividad antimicrobiana aceite esencial/antibiótico.....	61
II.9.1. Procedimiento .....	61
II.10. Ensayo de curva de muerte o letalidad bacteriana.....	65
II.10.1. Procedimiento .....	65
III. RESULTADOS .....	70
III.1. Extracción del aceite esencial de <i>M. armillaris</i> .....	70
III.2. Caracterización del aceite esencial de <i>M. armillaris</i> obtenido .....	71
III.3. Selección de cepas y aislamientos.....	73
III.4. Determinación de la CIM y CMB <i>in vitro</i> de cloxacilina, rifaximina, eritromicina y del aceite esencial frente a <i>S. aureus</i> a pH 7.4, 6.5 y 5.....	75
III.4.1. CIM del aceite esencial de <i>M. armillaris</i> .....	76
III.4.2. CIM de cloxacilina .....	77
III.4.3. CIM de rifaximina .....	78
III.4.4. CIM de eritromicina .....	79
III.5. Determinación de la CIM <i>in vitro</i> de la combinación de los diferentes antimicrobianos con el aceite esencial frente a <i>S. aureus</i> a pH 7.4; 6.5 y 5. ....	81
III.5.1. Combinaciones aceite esencial y cloxacilina.....	81
III.5.2. Combinaciones aceite esencial y rifaximina .....	81
III.5.3. Combinaciones aceite esencial y eritromicina .....	82
III.6. Ensayo de curva de muerte bacteriana.....	87
III.6.1. Aceite esencial.....	88
III.6.2. Cloxacilina y combinaciones con aceite esencial .....	97
III.6.3. Rifaximina y combinaciones con aceite esencial.....	108
III.6.4. Eritromicina y combinaciones con aceite esencial .....	117
III.6.5. Evaluación del índice de actividad antibacteriana E.....	132

<b>IV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>152</b>
<b>IV.1. Obtención y caracterización del aceite esencial de M. armillaris .....</b>	<b>152</b>
<b>IV.2. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de M. armillaris frente a S. aureus .....</b>	<b>153</b>
<b>IV.3. Actividad antimicrobiana de cloxacilina y de su combinación con aceite esencial de M. armillaris frente a S. aureus.....</b>	<b>158</b>
<b>IV.3.1. Cloxacilina .....</b>	<b>158</b>
<b>IV.3.2. Combinación aceite esencial/Cloxacilina .....</b>	<b>161</b>
<b>IV.4. Actividad antimicrobiana de rifaximina y su combinación con aceite esencial de M. armillaris frente a S. aureus.....</b>	<b>165</b>
<b>IV.4.1. Rifaximina .....</b>	<b>165</b>
<b>IV.4.2. Combinación aceite esencial/rifaximina .....</b>	<b>167</b>
<b>IV.5. Actividad antimicrobiana de eritromicina y su combinación con aceite esencial de M. armillaris frente a S. aureus.....</b>	<b>169</b>
<b>IV.5.1. Eritromicina.....</b>	<b>169</b>
<b>IV.5.2. Combinación aceite esencial/eritromicina .....</b>	<b>173</b>
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>177</b>
<b>VI. REFERENCIAS.....</b>	<b>179</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**

El tratamiento con antibióticos es una de las terapias más importantes utilizada en la lucha contra las enfermedades infecciosas, la que ha mejorado sustancialmente la calidad de vida y los aspectos sanitarios desde su introducción. Sin embargo, a pesar de los avances científicos, vivimos aún y cada vez más, en una época donde los casos de infecciones resistentes a los antibióticos aumentan en forma alarmante debido al riesgo constante de propagación de microorganismos resistentes (OMS, 2018). El factor más importante que influye en la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos es la excesiva exposición de bacterias a los mismos (Canton y Morosini, 2011). El uso indiscriminado de estos agentes genera una presión selectiva, permitiendo prosperar cepas con el genotipo más apto. A pesar del hecho de que la evolución es inevitable, el uso intensivo de los agentes antimicrobianos en la población, en los hospitales y en la agricultura es sin duda el principal responsable de alimentar esta crisis. Las bacterias no sólo pueden desarrollar resistencia a un solo agente químico, muy por el contrario la resistencia se puede extender a muchos fármacos y propagarse en la comunidad debido al uso inadecuado de antibióticos (Canton y Morosini, 2011; Neu, 1992). La resistencia a los antibióticos puede resultar en el fracaso terapéutico de infecciones, en el aumento de los costos de tratamiento y de la tasa de víctimas mortales, creando mayores problemas en el control de las infecciones y favoreciendo la propagación de bacterias resistentes del hospital a la comunidad.

La persistencia y diseminación de la resistencia a los antibióticos insta a la imperiosa necesidad de encontrar nuevas terapias contra las bacterias resistentes a múltiples fármacos.

El rápido desarrollo de la biología molecular ha arrojado luz sobre un enfoque más eficiente para el descubrimiento de nuevas sustancias con acción antibiótica. Sin embargo, el resultado desalentador es que, en la actualidad, ningún antibiótico encontrado por esta estrategia aún ha alcanzado entornos clínicos. Esto es debido a que se ha colocado

demasiado énfasis en la identificación de objetivos y las moléculas que interactúan, mientras que muy poco se ha puesto en la capacidad real de estas moléculas para permear la pared celular bacteriana, evadir el flujo de salida y evitar la resistencia mutacional (Livermore, 2011). Por lo tanto el descubrimiento de un compuesto que se una a una diana conservada no necesariamente equivale a encontrar un compuesto con actividad antibiótica. Por otra parte, los antibióticos con un solo objetivo diana son especialmente vulnerables a la resistencia mutacional (Yap *et al.*, 2014).

Muchas investigaciones intentan estudiar el potencial de los extractos de plantas y algunos compuestos activos como eficaces combatientes de los problemas de antibiótico resistencia bacteriana. Los extractos de plantas, que constan de mezclas complejas de los principales compuestos y sus metabolitos secundarios, junto con los antibióticos convencionales pueden presentar efectos sinérgicos. Podemos mencionar varias ventajas de la utilización de productos naturales como compuestos antimicrobianos, tales como menos efectos adversos, mejor tolerancia del paciente, relativo bajo costo, amplia aceptación debido a sus aplicaciones tradicionales, renovabilidad y mejor biodegradabilidad (Yap *et al.*, 2014).

Muy pocos trabajos han dado una idea de la prevalencia de la resistencia a la exposición a extractos naturales, en particular con respecto a los aceites esenciales. Estos se componen por una mezcla de múltiples compuestos, la cual ejerce una mayor actividad antibacteriana en comparación con los principales componentes solos. También se ha postulado que la función de los compuestos principales está regulada por otras moléculas menores que ayudan sinérgicamente en la potenciación del efecto. Puede haber varios objetivos diana en una célula que da lugar a la mejora en la actividad antibacteriana (Yap *et al.*, 2014). Por lo tanto, es más significativo y racional estudiar todo el aceite esencial en lugar de algunos de sus componentes de manera aislada, basándose en el posible concepto de sinergia que realmente puede existir entre los componentes de los aceites esenciales. Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión selectiva a la que se someten las bacterias. Como la aplicación de extractos vegetales implica el uso de múltiples compuestos a la vez, las

bacterias presentarían dificultad para desarrollar mecanismos de resistencia contra cada uno de los compuestos de manera simultánea (Begun, 2005; Haddadin, *et al.*, 2002; Lowy, 2003; Sifri *et al.*, 2005), por lo que entonces es posible que los extractos vegetales y aceites esenciales puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes y multirresistentes a agentes antimicrobianos de uso común.

Combinar agentes antimicrobianos convencionales y aceites esenciales es un concepto nuevo. La asociación de aceites esenciales con antibióticos convencionales proporciona un potencial prometedor y significativo para el desarrollo de nuevas terapias a aplicar para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos multi-resistentes. Es necesario profundizar los estudios sobre las bases moleculares de las interacciones sinérgicas, con el fin de comprender mejor el mecanismo por el que actúan en conjunto, punto fundamental para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

Se ha encontrado un efecto sinérgico potenciador de los aceites esenciales, los que a pesar de no producir efectos inhibidores significativos cuando son utilizados solos, utilizados en combinación con fármacos convencionales, producen una actividad antimicrobiana mejorada ya que el efecto combinatorio supera su rendimiento individual (Gibbons *et al.*, 2003). La actividad sinérgica ejercida por el uso de aceites esenciales ha demostrado la posibilidad de reducir la dosis mínima eficaz de los antibióticos en el tratamiento de infecciones bacterianas. Esto, por lo tanto, reduciría los efectos adversos de los antimicrobianos. Lo más importante de la asociación de antibióticos con aceites esenciales dirigidos a bacterias resistentes es que pueden tener diferente mecanismo de acción, lo que puede dar lugar a nuevas opciones para superar los embates de la resistencia microbiana. La explotación de los aceites esenciales en la prevención de la resistencia bacteriana es prometedora porque estos son multicomponentes con diferentes dianas de acción, en comparación con muchos agentes antimicrobianos convencionales que sólo tienen un único sitio de destino. Dependiendo de la composición del aceite esencial se pueden atribuir distintos mecanismos de acción, incluyendo la degradación de la pared celular (Gill y Holley, 2006), daño en la membrana citoplásmica y coagulación del citoplasma (Ultee *et al.*, 2000; Ultee *et al.*, 2002), daño las proteínas de la

membrana y aumento de la permeabilidad que conduce a la fuga del contenido celular (Juven *et al.*, 1994; Lambert *et al.*, 2001), disminución de la fuerza motriz protónica (Ultee y Smid, 2001), y reducción del potencial de membrana mediante el aumento de la misma (Burt, 2004). Estos aceites contienen amplias gamas de polifenoles y terpenoides, que poseen fuerte afinidad de unión a diferentes estructuras moleculares como las membranas, debido a su gran lipofilia, presentando un alto potencial para penetrar a través de las paredes celulares y desorganizarlas, conduciendo así a la fuga del contenido celular (Nazzaro *et al.* 2013).

Respecto a la aparición de resistencia, se ha observado que algunas especies bacterianas no logran adquirir resistencia a ciertos aceites esenciales luego de una larga exposición a los mismos. Hurdle *et al.* (2011) también sugirió un bajo potencial para el desarrollo de resistencia en los agentes de membrana activa debido a los sistemas de modificación de LPS. Además, el cambio de las estructuras de la membrana y su composición detiene instantáneamente la viabilidad de las bacterias (Langeveld *et al.*, 2013). Esto sumado a su posible efecto potenciador sobre los agentes antimicrobianos los convierten en extractos valiosos con potencial para atacar el problema de la resistencia microbiana a los fármacos actualmente utilizados (Yap *et al.* 2014).

Los aceites esenciales resultan ser extractos muy útiles obtenidos a partir de plantas. Su potencial como mejoradores de los fármacos actuales abre nuevas posibilidades para introducir mejoras en la industria farmacéutica que permitan desarrollar nuevos medicamentos con mayor efectividad y posiblemente menores efectos secundarios. Existen aspectos que todavía deben ser abordados, tales como la estabilidad, la selectividad y la biodisponibilidad de estos productos naturales en el organismo.

La explotación de los aceites esenciales como una terapia de reemplazo representa “una nueva era de fitofármacos”. Tal vez, en el futuro, los aceites esenciales puedan progresar desde ser uno de los agentes curativos tradicionales para convertirse en una terapia ampliamente utilizada en el dominio médico moderno.

En este estudio se plantea el uso del aceite esencial de *Melaleuca armillaris* en combinación con distintos antibióticos para lograr el mejor resultado *in vitro* frente a

cepas de *Staphylococcus aureus*. La obtención de buenos resultados permitiría avanzar en un futuro sobre modelos *in vivo* y considerar la combinación aceite esencial/antibiótico como alternativa al tratamiento de infecciones estafilocócicas que afectan a la salud pública.

### I.1. Antimicrobianos

Los antimicrobianos son sustancias naturales (elaboradas por microorganismos) o sintéticas que en bajas concentraciones inhiben o destruyen a otros microorganismos. Aquellos que son semi-sintéticos se obtienen por modificaciones de la estructura química de agentes obtenidos naturalmente. Los distintos antimicrobianos presentan diferentes mecanismos de acción, cuyas dianas se encuentran en diferentes regiones de la célula bacteriana. Estas regiones son la pared celular, la membrana celular, los ribosomas donde se lleva a cabo la síntesis proteica y los ácidos nucleicos (Errecalde 2004; Mestorino y Marchetti, 2019).

Los antibióticos se clasifican según: su espectro de actividad (amplio o reducido), su estructura química, su efecto antimicrobiano (bactericida o bacteriostático), su mecanismo de acción y según su comportamiento farmacocinético/farmacodinámico. Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo. En general, son bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplasmática o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo de los ácidos nucleicos (ADN o ARN), y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos que son bactericidas rápidos (Calvo y Martínez, 2009; Mestorino y Marchetti, 2019).

Los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared necesitan para ejercer su acción que la bacteria se halle en crecimiento activo, y para su acción bactericida requieren que el medio en que se encuentre la bacteria sea isotónico o hipotónico con respecto a su medio interno, lo que favorece el estallido celular cuando la pared celular se pierde o se



desestructura. Suelen ser más activos sobre las bacterias Gram-positivas por su mayor riqueza en peptidoglicano. En general, son poco tóxicos por actuar selectivamente en una estructura que no está presente en las células eucariotas (Murray, 2008). A este grupo pertenecen los:  $\beta$ -lactámicos, glucopéptidos y bacitracina. Los agentes activos en la membrana celular bacteriana son las polimixinas. Estas sustancias son péptidos catiónicos con actividad de tipo detergente que disrumen la porción fosfolipídica de la membrana de las bacterias Gram-negativas (Errecalde 2004; Mestorino y Marchetti, 2019).

La síntesis proteica es uno de los procesos que con mayor frecuencia se ve afectado por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. La mayoría de los antibióticos de este grupo tienen actividad bacteriostática, aunque los aminoglucósidos se comportan como bactericidas rápidos. La acción bactericida o bacteriostática también va a depender de las concentraciones del antimicrobiano, y del microorganismo afectado (Calvo y Martínez, 2009). Las tetraciclinas y los aminoglucósidos se unen al ribosoma en la porción 30S, las primeras impiden la unión codón-anticodón, mientras que los aminoglucósidos ocasionan una lectura incorrecta que da lugar a la síntesis de una proteína anómala ocasionando la muerte bacteriana. Cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol, actúan a nivel de la porción 50S del ribosoma, inhibiendo la transpeptidasa, lo que impide que se formen los péptidos. Lincosamidas y macrólidos, también se unen a la porción 50S, inhibiendo la traslocación. Todos estos mecanismos, de una u otra manera, detienen o desvían la síntesis de proteínas.

Los agentes que actúan a nivel de los ácidos nucleicos son varios y sus sitios de acción diversos. Entre ellos tenemos a las sulfamidas y trimetoprima, cuya acción como antimetabolitos impidiendo la síntesis de purinas, los distingue del resto. Las fluoroquinolonas y novobiocina actúan a nivel de las cadenas de ADN, impidiendo el superenrollamiento, por inhibición de una topoisomerasa, la girasa de ADN. Los nitroimidazoles, como dimetridazol, metronidazol y tinidazol dan lugar a la disrupción de las cadenas de ADN, impidiendo su reparación. Los nitrofuranos, por su parte impiden la lectura codónica ADN-ARN mensajero (Errecalde 2004). Las rifamicinas (rifampicina y

rifaximina) forman parte del grupo de las ansamicinas. Estas se unen a la subunidad beta de la holoenzima ARN polimerasa de las bacterias inhibiendo los procesos de iniciación, elongación, y transcripción de la síntesis nucleica (Hartmann *et al.*, 1967).

### **I.1.1. Resistencia a los antimicrobianos**

La resistencia a los antibióticos se produce cuando un fármaco pierde su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Las bacterias se vuelven "resistentes" y continúan multiplicándose en presencia de niveles terapéuticos de los antibióticos. La exposición de los microorganismos a los agentes antimicrobianos tiende a favorecer naturalmente la selección de resistencia debido a la presión selectiva (Levy, 1993).

La base del desarrollo de la resistencia bacteriana está en la selección de cepas resistentes que producen ciertas concentraciones de antibiótico. El antibiótico no induce resistencia, solamente selecciona. Es una interferencia en el proceso de selección natural. Donde antes se seleccionaban las bacterias más aptas para la supervivencia, en el sitio del organismo de que se trate, en presencia del antibacteriano, sobrevivirán solamente aquellas variantes capaces de resistir a las concentraciones de antibiótico presentes en ese lugar. El antibiótico se convierte en el primer factor de selección (Errecalde, 2004).

Las bacterias pueden manifestar resistencia a los compuestos antibacterianos a través de una gran variedad de mecanismos. Algunas especies bacterianas son innatamente resistentes a una clase de agentes antimicrobianos. En tales casos, todas las cepas de esa especie bacteriana son igualmente resistentes a todos los miembros de esa familia de antibióticos. Por otro lado, pueden generarse casos de resistencia adquirida, donde las poblaciones de bacterias inicialmente susceptibles se vuelven resistentes a un agente antibacteriano, proliferan y se diseminan bajo la presión selectiva de uso de ese agente (Tenover, 2006).

La transmisibilidad de los factores de resistencia puede dar lugar a un problema aún mayor: la multiresistencia. Estos microorganismos no solamente son resistentes a una serie de drogas, sino que esa multi-resistencia sigue siendo transferible, por lo que se transforman en reservorios de resistencia (Errecalde, 2004).

La disminución de la sensibilidad antimicrobiana es un problema continuo y en aumento. Se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo, no sólo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie. Entre estos mecanismos de resistencia tenemos:

- Producción de enzimas hidrolíticas: Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo. Se encuentran las  $\beta$ -lactamasas que son enzimas que hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo  $\beta$ -lactámico. La producción de  $\beta$ -lactamasas es el mecanismo más frecuente de resistencia antibiótica. Se han identificado más de 1000 tipos de  $\beta$ -lactamasas producidas tanto por microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos (Rahman *et al.*, 2018). Existen continuas mutaciones que producen expresión de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), manifestándose como resistencia a cefalosporinas de 3ra generación (ceftriaxona). Para combatir esta resistencia se utiliza un inhibidor enzimático que tiene mayor afinidad por la enzima e impide la destrucción del antimicrobiano, permitiendo de esta manera su acción (clavulanato y sulbactam). Las BLEE se asocian a co-resistencia con aminoglucósidos y cotrimoxazol, dada la frecuencia de transferencia en el mismo plásmido (Moreno *et al.*, 2009).
- Modificación del sitio activo: La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano. Se encuentra la modificación de PBP (penicillin binding protein), el cual es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular de las bacterias, principalmente en Gram-positivas. Si se produce mutación del sitio de unión del antimicrobiano, como los  $\beta$ -lactámicos, éstos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos. También está la modificación ribosomal; los genes *erm A* y *erm B* producen modificación del sitio activo del ribosoma,

mediante metilación. Este mecanismo es importante en la resistencia a macrólidos en *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Moreno *et al.*, 2009).

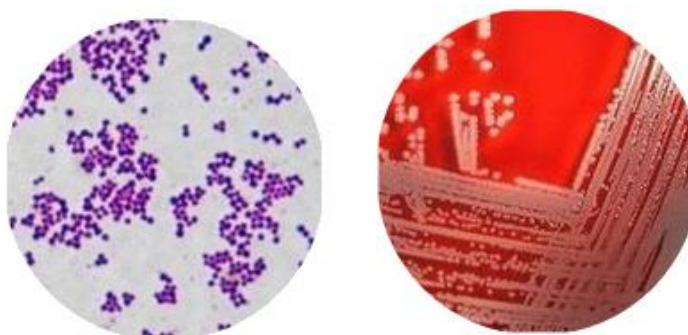
- Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano: Cambios en el diámetro y/o número de porinas donde existe una disminución de la expresión de éstas, lo que disminuye la susceptibilidad a  $\beta$ -lactámicos y fluorquinolonas en *Pseudomonas* y pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria (Moreno *et al.*, 2009).
- Bombas de eflujo: Proteínas que transportan al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Existen bombas de eflujos multidrogas en la pared bacteriana que permiten la expulsión de sustancias como los antimicrobianos. Estos genes explican la resistencia a macrólidos y a fluoroquinolonas. Para combatir este tipo de resistencia se encuentran en estudio la asociación de inhibidores de bombas de eflujo junto con el antimicrobiano (Marchetti *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2009).

La evolución de los microorganismos y el uso indiscriminado de antimicrobianos ha llevado a la aparición de estos diversos mecanismos de resistencia a los mismos. Esto conlleva a la necesidad de encontrar nuevas moléculas alternativas con capacidad de inhibir el desarrollo de cepas bacterianas que afectan a la salud pública. Es aquí donde los extractos vegetales, y particularmente los aceites esenciales por su actividad antimicrobiana, son un promisorio recurso a investigar.

*S. aureus* es un patógeno que ejemplifica correctamente la evolución adaptativa de las bacterias en la era de los antibióticos, ya que ha demostrado una capacidad única para responder rápidamente a cada nuevo antibiótico con el desarrollo de un mecanismo de resistencia.

## 1.2. *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram-positivos (Figura 1), con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas (Cervantes-García *et al.*, 2014). Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos (Kloss *et al.*, 1992; Kuroda *et al.*, 2001).



**Figura 1.** *S. aureus* con tinción de Gram y crecimiento en agar sangre.

La identificación de *S. aureus* se realiza con el empleo de la tinción de Gram y pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, coagulasa, fermentación de manitol, maltosa, trehalosa y producción de Voges-Proskauer. Complementariamente, se evalúa tipo de hemólisis. Con la prueba de la DNAsa termoestable se identifica fácilmente en el medio que contiene DNA y azul de toluidina. *S. aureus* también puede identificarse a través de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR, utilizando genes específicos de especie. Sin embargo, estas técnicas son caras y laboriosas (Cervantes-García *et al.*, 2014).

*S. aureus* es capaz de crecer en el citoplasma celular, formar biopelículas y originar bacteriemia persistente o infección crónica o permanecer quiescente y reactivarse meses o años más tarde. Coloniza determinadas áreas de la piel y las mucosas, desde donde

causa reinfecciones, contamina el entorno y se extiende a otros pacientes. Por otro lado, si la densidad de población bacteriana en el foco infeccioso es elevada, *S. aureus* puede hacerse resistente a la mayoría de los antibióticos empleados en monoterapia (Mensa *et al.*, 2013). *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) ha sido reconocido como la mayor causa de infecciones a nivel mundial. Aunque en un principio fue categorizado como un importante patógeno nosocomial, SARM se ha vuelto endémico en la comunidad, es decir fuera de los hospitales (Grundmann *et al.*, 2006).

*Staphylococcus aureus* representa la principal causa de infecciones del torrente sanguíneo con una elevada incidencia y nivel de mortalidad (de Kraker *et al.*, 2013; Goto y Al-Hasan, 2013). SARM) contribuye significativamente a las infecciones adquiridas en la comunidad, al mismo tiempo que es endémico en muchos hospitales y hogares de ancianos en America (Vazquez Guillamet *et al.*, 2018). Su facilidad para crear reservorios entre los pacientes hospitalizados y sus acompañantes, permiten su propagación a la comunidad, emergiendo como cepas genéticamente diferentes a las que se asocian altos índices de morbilidad en las infecciones neonatales (Jones *et al.*, 2006; Lieberman, 2003). Este agente elabora una amplia variedad de toxinas extracelulares y enzimas responsables de la virulencia dados los múltiples mecanismos de patogenicidad (Lieberman, 2003).

La aparición de SARM por lo general se ha asociado con la exposición en centros de atención de salud, pero ha sido reconocido en personas con factores de riesgo tradicionales. Estas infecciones han sido llamadas adquiridas en la comunidad o SARM asociado a la comunidad (SARM-AC) por contacto entre individuos de la misma (King *et al.* 2006). Infecciones SARM-AC son causadas por cepas muy virulentas de *S. aureus*, que puede afectar a personas saludables (Zetola *et al.*, 2005). Más preocupante aún, es que estas cepas se han reportado como causa importante de infecciones nosocomiales, lo que indica que pueden llegar a ser endémicas en los hospitales (Maree *et al.*, 2007). Otra cuestión relevante relacionada con el tratamiento de las infecciones por SARM es la aparición de resistencia a la vancomicina (Sieradzki *et al.* 1999), comprometiendo la

eficacia de la vancomicina en el tratamiento de infecciones graves (McGuinness *et al.*, 2017).

*S. aureus* resistente a la meticilina asociado con la comunidad ha emergido en diferentes regiones del mundo (King *et al.* 2006), incluyendo a América Latina (Reyes *et al.* 2009), como una de las principales causas de infecciones bacterianas agudas en la piel.

La transferencia de SARM de animales a humanos también presenta gran relevancia. La convivencia con animales portadores de estos microorganismos puede llevar a infecciones causadas por cepas que han incrementado su resistencia a antibióticos. La transferencia de patógenos entre animales de granja y de compañía y seres humanos es creciente y se esta extendiendo en la población (Moreno Anzola *et al.*, 2018). Se ha detectado un incremento en la colonización nasal por *S. aureus* en criadores de cerdos en comparación con individuos que no están expuestos en este tipo de establecimientos (Aubry-Damon *et al.* 2004). Los animales de compañía como perros, gatos y caballos también han sido implicados como potenciales reservorios de SARM (Cefai *et al.*, 1994; Manian, 2003). La transmisión de *S. aureus* susceptible a meticilina ha sido reportada entre propietarios y sus mascotas (Simoons-Smit *et al.*, 2000). Varios estudios indican que la cepa SARM CC398 puede ser transmitida a humanos como colonizador (Huijsdens *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009), y puede causar infecciones clínicas (Declercq *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2008). Por lo expuesto, resulta indispensable encontrar alternativas que permitan tener un mayor control sanitario sobre animales que pueden comprometer la salud humana.

*S. aureus* es un patógeno de importancia en salud animal y humana. Las infecciones e intoxicaciones alimentarias continúan representando graves problemas en salud pública. Como mencionamos, la incidencia de esta bacteria en bovinos es elevada y el mayor peligro que tiene la leche con *Staphylococcus* reside en que algunas cepas de estos microorganismos pueden producir una enterotoxina capaz de causar en el hombre gastroenteritis agudas; además de favorecer la presencia de residuos de antibióticos y la transferencia e intercambio de determinantes genéticos de antibiótico-resistencia entre el sistema animal-hombre-ambiente. Producir leche de buena calidad no solamente importa por su impacto en la salud pública, sino que también es un factor que estabiliza el

desarrollo socio-económico en áreas rurales, particularmente en los países en desarrollo (McDowell, 1981). A lo dicho debemos agregar la capacidad de supervivencia a nivel intracelular que presenta el *S. aureus*.

El tratamiento antibacteriano frente a microorganismos capaces de mantenerse y prosperar en el medio intracelular nos enfrenta a un reto de grandes proporciones, ya que las bacterias en este estado son especialmente refractarias a los mecanismos inmunes. La pobre acción de los antimicrobianos a nivel intracelular posibilita la supervivencia de los microorganismos y predispone el camino para la selección de cepas resistentes. Estas consideraciones nos incitan a desarrollar el conocimiento con miras hacia el control de infecciones intracelulares, para lo cual los aceites esenciales podrían tener importancia por su lipofilia y capacidad de permeabilizar las membranas celulares.

*S. aureus* es un microorganismo patógeno muy versátil capaz de producir enfermedad por liberación de toxinas, invadir cualquier órgano o tejido y dar lugar a procesos de tipo purulento, necrosis tisular, trombosis vascular y septicemia. Más del 90% de aislados de *S. aureus* producen betalactamasas que inactivan a la penicilina. Existen  $\beta$ -lactámicos con actividad frente a cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas: las penicilinas resistentes a penicilinasas (metecilina, nafcilina y penicilinas isoxazólicas), las asociaciones de una penicilina con un inhibidor de betalactamasas, las cefalosporinas (especialmente las de primera generación) y los carbapenems. Si bien al comienzo de la era antibiótica los estafilococos eran 100% sensibles a la penicilina, rápidamente desarrollaron resistencia. Esta se debe a la producción de  $\beta$ -lactamasas (penicilinasas) que desdoblan el anillo  $\beta$ -lactámico, inactivando el antibiótico por transformación en ácido penicilinoico. La nafcilina y las penicilinas isoxazólicas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina y flucloxacilina) son entre 4 y 8 veces más activas que metecilina. La resistencia a metecilina suele ser cruzada con todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos disponibles. La causa de la resistencia a metecilina es la adquisición del gen *mecA*, que codifica una PBP2 adicional denominada PBP2a. La PBP2a tiene escasa afinidad por el  $\beta$ -lactámico y, en su presencia, sustituye a la PBP2 original en la función de transpeptidación para la síntesis de peptidoglucano. La PBP2 sigue participando en la transglicosilación (Mensa *et al.*, 2013).



Los  $\beta$ -lactámicos mantienen su actividad a un pH de 5 (Barcia-Macay, 2006). De hecho, SARM puede recuperar parcialmente la sensibilidad a cloxacilina cuando crece en un medio con pH de 5.5 como el observado en el interior de los fagolisosomas. El pH ácido origina un cambio en la estructura tridimensional de la PBP2a que afecta a su centro catalítico y aumenta la afinidad por el  $\beta$ -lactámico. El resultado es la recuperación parcial de la sensibilidad que se traduce en un efecto bacteriostático de importancia variable según el  $\beta$ -lactámico, la concentración y el tiempo de exposición (Lemaire *et al.*, 2008).

La vancomicina es un antibiótico importante para el tratamiento de infecciones graves por SARM. El uso generalizado ha generado la aparición de resistencia. Esto no solo en el hombre, sino que también se han aislado de cerdos, cabras y ganado vacuno (Bhattacharyya *et al.*, 2016; Kwok *et al.*, 2013). Los elementos genéticos móviles tienen un rol clave en la capacidad de selección de resistencia del *S. aureus* frente a la exposición a antibióticos. Así, la información genética se intercambia entre bacterias a través de la transferencia horizontal de genes. Las cepas de *S. aureus* en general contienen una variedad relativamente grande de elementos móviles que juegan un papel importante en conferir resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y vancomicina (McGuinness *et al.*, 2017). En la resistencia a la vancomicina, está implicada la adquisición de un grupo de genes que remodela la síntesis del peptidoglicano mediante cambios del último D-Ala por D-lactato (resistencia de alto nivel) o D-serina (resistencia de bajo nivel); y destruye los precursores de D-Ala-D-Ala normales evitando la unión de la vancomicina a los precursores de la pared celular (Munita y Arias, 2016).

La búsqueda de nuevas moléculas antibióticas no está prosperando, por ello una de las alternativas en las que se está trabajando arduamente son los aceites esenciales. Hay cientos de especies vegetales con aceites esenciales estudiados, muchos de ellos con propiedades antibacterianas conocidas, particularmente frente a SARM (Edward-Jones *et al.*, 2004).

Los extractos multicomponentes obtenidos de plantas, como los aceites esenciales, podrían ser útiles para controlar infecciones ocasionadas por *S. aureus* y evitar la adquisición de resistencia por la gran cantidad de sustancias a la que es expuesto.

### I.3. Aceites esenciales

#### I.3.1. Definición y usos comunes

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos por organismos vivos y aislados por medios físicos (prensado, extracción con solventes y destilación) de una planta entera o de una parte de la planta de origen taxonómico conocido. Técnicamente, los aceites esenciales no son verdaderos aceites, ya que no tienen un contenido de lípidos, sino que son compuestos volátiles altamente complejos que consisten en alrededor de 20-60 componentes en distintas concentraciones. Los componentes comprenden dos grupos relacionados biosintéticamente, terpenos y compuestos aromáticos. En esta mezcla de componentes múltiples, dos o tres compuestos principales están presentes en relativamente altas concentraciones (20-70%) en comparación con otros componentes que están presentes en cantidades traza (Yap *et al.*, 2014). Los compuestos principales derivan de tres rutas biosintéticas: la vía del mevalonato conduce a los sesquiterpenos; la ruta del metil-eritrol lleva a los monos y diterpenos; y la vía del ácido shikímico a los fenilpropanos. Sin embargo, hay una enorme cantidad de sustancias individuales y una gran variación en la constitución de los aceites esenciales. La composición de los aceites esenciales está representada principalmente por hidrocarburos mono y sesquiterpénicos y sus derivados oxigenados (hidroxilo y carbonilo), junto con aldehídos alifáticos, alcoholes y ésteres. Los terpenos se pueden considerar como la clase más estructuralmente variada de productos naturales de plantas, derivados de la fusión repetitiva de unidades de cinco átomos de carbono ramificados (unidades de isopreno) (Croteau *et al.*, 2000). Muchas de estas sustancias volátiles tienen diversas funciones ecológicas, pueden actuar como mensajeros internos, como sustancias defensivas contra herbívoros, patógenos e insectos enemigos naturales o como volátiles atractivos de insectos polinizadores (Harrewijn *et al.*, 2001). Según la familia de compuestos químicos que prevalezca en la mezcla, los aceites esenciales se pueden clasificar en los siguientes tres grupos principales: tipo monoterpenoide: la mayoría de las

sustancias presentes en el aceite son monoterpenos y sus análogos oxigenados; tipo sesquiterpenoide: cuando en el aceite predominan sesquiterpenos y sus derivados oxigenados; y aceites ricos en compuestos fenólicos y fenilpropanoides y compuestos oxigenados no terpénicos (Stashenko, 2009).

En la vida cotidiana existe una aplicación continua de aceites esenciales. Se utilizan en una gran variedad de formas. Las industrias de alimentos, farmacéutica, de sabores y de fragancias son grandes receptoras de este tipo de extractos (Lawrence, 2008). Un área más especializada se da en los campos de la aromaterapia y la aromacología. En años recientes, la importancia de los aceites esenciales como biocidas y repelentes de insectos ha dado lugar al estudio de su potencial antimicrobiano. Los aceites esenciales son también buenas fuentes naturales de sustancias que sirven como materiales de partida para la síntesis química de compuestos de gran interés comercial. La humanidad ha utilizado los aceites esenciales durante cientos de años, incluso milenios (Halberstein, 2005). Mucho antes de ser usados como fragancias en perfumes, se reconoció la importante acción de estos como medicamentos. Sin la atención médica de la que disfrutamos en nuestro tiempo, la autocuración era la única opción para combatir parásitos, patógenos o dolencia del organismo. Más tarde se utilizaron aceites esenciales en la preparación de cosméticos, polvos y jabones (Pauli y Schilcher, 2010).

### **I.3.2. Métodos de extracción**

Los métodos de obtención de los aceites esenciales varían, entre otras cosas, en base al tipo de material vegetal del cual se va a obtener la esencia. Los principales métodos utilizados para obtener aceites esenciales a partir de plantas aromáticas son: la expresión mecánica (o prensado en frío), probablemente el más antiguo, utilizado casi exclusivamente para la producción de aceites provenientes de cítricos; la extracción con solventes orgánicos; y la destilación por arrastre de vapor de agua.

### **I.3.2.1. Expresión mecánica**

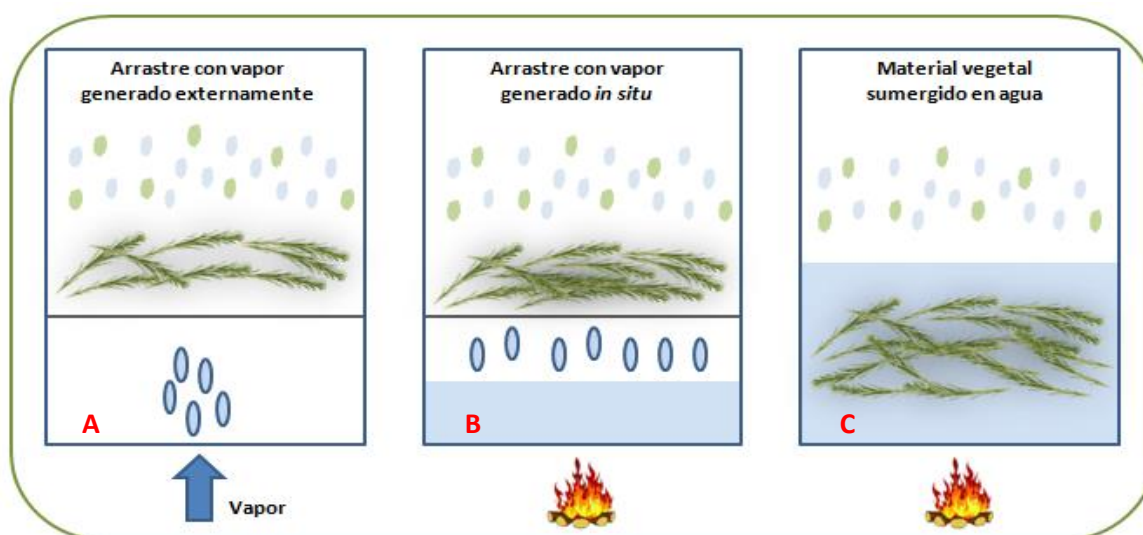
Los métodos directos se aplican principalmente a los cítricos, porque sus aceites están presentes en la corteza de la fruta, y el calor de los métodos de destilación puede alterar su composición. El aceite de los cítricos está contenido en numerosas glándulas secretoras del epicarpio. El proceso se basa en la ruptura de las glándulas secretoras de aceite y en recolectar la esencia. La extracción del aceite se produce en una serie de etapas: i) Corte de la epidermis y de las glándulas que contienen la esencia; ii) Creación de zonas de mayor presión desde donde fluye la esencia hacia el exterior y iii) Abrasión de la cáscara. Al exprimir la corteza tales glándulas se rompen y liberan el aceite, el cual se recoge inmediatamente y se filtra para liberarlo de partículas. La expresión mecánica para aceites esenciales de cítricos se basa en la facilidad de obtención por prensado de la cáscara y la inestabilidad térmica relativa de los aldehídos y algunos hidrocarburos y ésteres terpénicos contenidos en los aceites de cáscara (Shmidt, 2010).

### **I.3.2.2. Extracción mediante solventes**

Este método está basado en la facilidad con la que los disolventes orgánicos penetran en el material vegetal y disuelven los aceites esenciales. La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como éter de petróleo, pentano, éter etílico, alcohol, cloroformo. Estos solventes solubilizan la esencia y extraen otras sustancias tales como ácidos grasos, ceras y pigmentos, que se pueden separar por destilación. Una ventaja que tiene el uso de solventes en la extracción es que puede actuar a bajas temperaturas, por lo cual no se produce termodestrucción ni alteración química de los componentes del aceite. Además ofrece la posibilidad de separar componentes individuales y/o presentes en poca cantidad mediante purificación de fracciones. La técnica de solventes a menudo se utiliza a escala de laboratorio, ya que a escala industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes. Se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, algunas veces tóxicas (Shmidt, 2010).

### I.3.2.3. Destilación por arrastre de vapor

Este método es el que presenta mayor aplicación en los sistemas de producción de aceites esenciales. La destilación puede definirse en forma simple como la evaporación y posterior condensación de un líquido. Durante el proceso se produce la liberación del aceite esencial presente en las glándulas secretoras (células) de la planta debido a la ruptura de las paredes celulares a causa del aumento de presión debido a la expansión generada por el contenido celular debido al calor del proceso. Una vez liberado, el aceite se volatiliza y es transportado por el flujo de vapor de agua, actuando como portador de las moléculas de aceite esencial. Este tipo de extracción puede hacerse de tres maneras distintas, en base a la forma en la que se pone en contacto el material vegetal con el vapor (Figura 2).



**Figura 2.** Formas de destilación de arrastre de vapor de agua: Generación de vapor externa (A), generación de vapor *in situ* (B), calentamiento de material vegetal sumergido (C).

El método más simple es mediante hidrodestilación, en donde se realiza la inmersión de la biomasa en agua hirviendo (Figura 2C). Este método se utiliza para la destilación de material vegetal delicado, como por ejemplo flores. La biomasa absorbe agua durante el proceso de ebullición y el aceite contenido en las células secretoras se difunde a través de las paredes de la célula por medio de la ósmosis. Una vez que el aceite ha difundido fuera de las células secretoras, se vaporiza y es arrastrado por la corriente de vapor para luego

condensarse en el sistema de enfriamiento. La mezcla de vapor de agua y compuestos volátiles llega al condensador donde pasan a estado líquido y el aceite se separa del agua condensada por diferencia de densidad (Shmidt, 2010).

Otro de los métodos consiste en separar físicamente la producción de vapor y el material vegetal (Figura 2A). Con este método se puede evitar el calcinamiento de parte del material vegetal por aplicación de fuego directo para la calefacción. Aquí se genera vapor de agua en una caldera externa y se hace llegar al depósito con biomasa para que circule y genere la liberación del aceite esencial. La llegada de vapor al tanque con biomasa puede realizarse de varias maneras. Comúnmente, el vapor se conduce directamente al alambique a través de su parte inferior. De este modo, se evita el sobrecalentamiento y la biomasa se calienta rápidamente. También permite la regulación de la cantidad y presión de vapor; reduce el tiempo de destilación y mejora la calidad del aceite. En otra variante, el vapor se inyecta en forma de espiral. Este método es más efectivo ya que el vapor entra en contacto con una mayor superficie de biomasa. La velocidad con la que se lleva a cabo el proceso depende de la naturaleza del material vegetal. El vapor sobrecalentado penetra el material vegetal a presión más alta que la atmosférica, rompe las células o canales oleíferos en la planta y arrastra la mezcla volátil, que se condensa luego de atravesar un refrigerante. Generalmente, los aceites son más livianos que el agua y muy poco solubles en ella, por ende, pueden ser separados por decantación. La excepción la presenta el aceite de clavo (*Syzygium aromaticum*), que es más pesado que el agua y se recoge debajo de ella. El método de arrastre con vapor se usa para extraer aceites de rizomas, raíces, semillas (valeriana, jengibre, anís, etc.) y de hojas secas o fermentadas de algunas plantas, como por ejemplo el patchoulí (Stashenko, 2009).

Existe otra variante de la destilación por arrastre de vapor de agua, la cual implica generación de vapor en el mismo contenedor en que está el material vegetal (Figuras 2B). En este sistema de extracción se emplea un vapor húmedo, proveniente del agua en ebullición, que traspasa el material vegetal, que se encuentra suspendido encima y soportado por una malla. Este método es el más utilizado para hacer extracciones de

aceite esencial de plantas herbáceas. El equipo se compone por un recipiente fijo (un tambor de acero inoxidable), una placa de metal cribada fija ubicada por encima del nivel deseado del agua, y una tapa con salida de cuello de cisne. La tapa cuenta con una junta para evitar fugas de vapor. La salida de vapor se encuentra unida a un condensador (generalmente un serpentín colocado en un tanque por el que circula agua fría). Por último, el equipo cuenta con un recipiente colector, que separa el aceite del agua destilada enriquecida en compuestos volátiles (llamada hidrolato). Comúnmente se utiliza un vaso florentino colocado en el extremo del serpentín. Como primera medida para operar el equipo, se agrega un volumen de agua en el fondo que no sobrepase la malla perforada. Luego, la biomasa se coloca sobre la placa con perforaciones hasta llenar el tanque de destilación, en lo posible utilizando la mayor cantidad de material vegetal disponible. Posteriormente se colocan la tapa, conexiones, serpentín y el colector. Por último se inicia el calentamiento del agua, ya sea mediante una resistencia eléctrica o fuego directo, lo cual dependerá del diseño del aparato (Shmidt, 2010).

### **I.3.3. Factores que inciden en la producción**

La producción de aceites esenciales está condicionada por diversos factores propios de la planta y del ambiente en que se cultivan. Muchos de ellos inciden sobre la composición y el rendimiento de aceite esencial en la planta. Entre los factores agronómicos que inciden encontramos el clima, el tipo de suelo, la influencia de la sequía y el estrés hídrico, el estrés causado por insectos y microorganismos, propagación (semilla o clones), prácticas de cultivo y estado de desarrollo de la planta (Rioba *et al.*, 2015). Otros factores importantes incluyen la parte de la planta que se va a utilizar, la ubicación de las células oleíferas dentro de la planta, el momento de la cosecha, el método de recolección, el almacenamiento y la preparación de la biomasa antes de la extracción del aceite esencial. Los factores geo-climáticos y el tipo de suelo pueden dar origen a diferentes quimiotipos de la planta, de los cuales se destilan aceites esenciales con composición química, propiedades sensoriales y actividad biológica diferentes (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017).

#### **I.3.4. Parámetros de calidad de aceites esenciales**

El precio de un aceite esencial, su valor comercial y, sobre todo, su aplicación en diferentes ramas de la industria están relacionados directamente con sus propiedades físico-químicas, olor, actividad biológica y, sobre todo, con la composición química, que comprende no solamente compuestos mayoritarios sino también aquellos presentes a nivel de trazas. Por ello es necesaria la caracterización física, química y sensorial completa del aceite. Los métodos analíticos deben contemplar la gran variabilidad de moléculas que contienen los aceites esenciales.

Los procedimientos que suelen aplicarse para determinar la pureza de los aceites esenciales incluyen: análisis del olor, color y sabor; densidad relativa a 20 °C; solubilidad en agua, aceite mineral, etanol y mezclas etanol-agua; determinación de índices de acidez y esterificación; medición del índice de refracción y rotación óptica; y análisis de la composición por métodos cromatográficos (Stashenko, 2009).

Los índices de acidez, esterificación, refracción y rotación óptica están definidos en la Farmacopea Argentina VII Edición. El índice de acidez se establece por el contenido de ácidos grasos libres, definido como la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos libres presentes en 1.0 g de muestra. El índice de esterificación se define como la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para saponificar los ésteres presentes en 1.0 g de muestra. El índice de refracción se puede determinar mediante un refractómetro de Abbé y se establece como la relación ( $n$ ) entre la velocidad de la luz en el espacio y la velocidad de la luz en un medio determinado (también expresado como los senos de los ángulos de incidencia y de refracción); esta relación tiende a disminuir ligeramente cuando aumenta el peso molecular. Si la radiación incidente pasa de un medio menos denso,  $n$  será menor que 1. Por último, la rotación óptica es la rotación de un plano de polarización de un haz de luz polarizada plana por una sustancia ópticamente activa; viene dada por un ángulo  $\alpha$ , que forman los planos de polarización del haz incidente y el haz emergente en la sustancia, denominado ángulo de rotación óptica. Para expresar los datos de rotación óptica en una forma lógica, para establecer comparaciones, hay que escoger condiciones estándares. La polarimetría mide



el ángulo de rotación del plano de vibración de la luz polarizada, cuando ésta atraviesa un medio que contiene una sustancia ópticamente activa. Para ello se utiliza el polarímetro.

La técnica cromatográfica empleada rutinariamente para determinar la composición de un aceite esencial es la gaseosa (GC), debido a que los constituyentes de los aceites son sustancias volátiles (monoterpenoides, ésteres, etc.) o semi-volátiles, volatilizables (sesquiterpenoides, derivados fenólicos, etc.), cuyas temperaturas de ebullición no exceden los 230 – 250°C. Un sistema cromatográfico comprende cuatro bloques fundamentales, entre los cuales figuran los siguientes: sistema de aplicación de la muestra (inyector); sistema de separación de la mezcla (columna); sistema de detección de analitos eluidos de la columna (detector) y, finalmente el sistema de datos (Grob y Barry, 2004).

### **I.3.5. Propiedades antimicrobianas y mecanismos de acción**

Los aceites esenciales y sus principales componentes químicos poseen una amplia gama de potenciales inhibidores bacterianos. Pueden inhibir el crecimiento de bacterias (bacteriostáticos) o destruir las células bacterianas (bactericidas). Los aceites esenciales contienen numerosos metabolitos secundarios que también pueden inhibir o disminuir el crecimiento bacteriano. Sus componentes tienen una gran variedad de sitios diana de acción, principalmente la membrana plasmática y el citoplasma, y en ciertas situaciones, alteran por completo la morfología de las células. Los efectos de los aceites esenciales generalmente conducen a la desestabilización de la bicapa de fosfolípidos, la destrucción de la función y composición de la membrana plasmática, la pérdida de componentes intracelulares vitales y la inactivación de los mecanismos enzimáticos (Nazzaro *et al.*, 2013).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales difiere de un tipo a otro, así como también el tipo de bacterias sobre las que actúan (bacterias grampositivas y gramnegativas). En general, las bacterias gramnegativas son más resistentes a los aceites esenciales que las bacterias grampositivas (Trombetta *et al.*, 2005). La estructura de la pared celular de bacterias grampositivas permite que las moléculas hidrofóbicas penetren fácilmente en las células y actúen tanto sobre la pared celular como dentro del citoplasma. Los compuestos fenólicos, que también están presentes en los aceites

esenciales, generalmente muestran actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas. Su efecto depende de la cantidad del compuesto presente, en bajas concentraciones pueden interferir con enzimas involucradas en la producción de energía, y en concentraciones más altas pueden desnaturalizar proteínas (Tiwari *et al.*, 2009).

La pared celular de las bacterias gramnegativas es más compleja. Tiene una capa de peptidoglicano más delgada que las grampositivas, posee una membrana externa por fuera de la fina pared celular. La presencia de la membrana externa es una característica que diferencian bacterias gramnegativas de grampositivas. Se compone por una doble capa de fosfolípidos que está ligada a la membrana interna por lipopolisacáridos. La bicapa externa que contiene lipopolisacárido sirve como una barrera eficaz para prevenir la penetración rápida por estos antibióticos lipófilos y agentes quimioterapéuticos, lo que vuelve a las bacterias gramnegativas más resistentes a los aceites esenciales y a otros extractos naturales con actividad antimicrobiana. Los solutos hidrofílicos pequeños pueden atravesar la membrana externa a través de abundantes proteínas, porinas, que actúan como canales hidrofílicos transmembrana. En el caso de los compuestos hidrofóbicos el ingreso a bacterias gramnegativas se dificulta (Nikaido, 1994). La membrana externa es, sin embargo, casi, pero no totalmente impermeable a moléculas hidrofóbicas, algunas de las cuales pueden atravesar lentamente las porinas (Plesiat y Nikaido, 1992).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, al igual que todos los extractos naturales, depende de su composición química y de la concentración de cada componente. Muchos de los compuestos antimicrobianos se expresan constitutivamente por las plantas, y otros se pueden sintetizar como mecanismos de autodefensa en respuesta a los patógenos. Estas moléculas pueden estar presentes de forma natural en su forma activa en la planta o pueden ser activadas por enzimas específicas cuando el organismo vegetal está sometido a un estrés biótico o abiótico particular (Holley y Patel, 2005).

El mecanismo de acción de los aceites esenciales depende de su composición química. Su actividad antimicrobiana no es atribuible a un único mecanismo de acción, sino que es

una cascada de reacciones que involucran a toda la célula bacteriana (Burt, 2004). Se han propuesto varios mecanismos de acción antibacteriana para los aceites esenciales. Estos extractos principalmente desestabilizan la estructura celular, llevando a la ruptura de la integridad de la membrana y al aumento de la permeabilidad. De este modo se interrumpen muchas actividades celulares, incluida la producción de energía (acoplada a membrana), transporte de membrana y otras funciones metabólicas reguladoras. Esto ocasiona problemas en procesos como el procesamiento de nutrientes, la síntesis de macromoléculas estructurales y la secreción de reguladores del crecimiento (Oussalah *et al.*, 2006). Debido a su naturaleza lipófila, los aceites esenciales penetran fácilmente a través de las membranas de las células bacterianas. Existen publicaciones en las que se han reportado que ciertos aceites esenciales causan un aumento de la permeabilidad de la membrana de las células bacterianas, provocando la pérdida de componentes celulares e iones (Oussalah *et al.*, 2006; Raut y Karuppayil, 2014). El efecto antibacteriano de los aceites esenciales también está relacionado con la disminución de los potenciales de membrana, la alteración de las bombas de protones y el agotamiento del ATP. Esta alteración en la organización celular puede causar un efecto de cascada, por lo que otras organelas celulares también se ven afectadas. Los aceites esenciales pasan a través de la pared celular y de la membrana citoplásmica, lo que puede alterar la disposición de diferentes ácidos grasos, bicapas de fosfolípidos y moléculas de polisacáridos (Swamy *et al.*, 2016).

### **I.3.6. Combinación con antibióticos**

En la actualidad existe a nivel mundial un resurgimiento en el uso de hierbas medicinales. La explotación de productos naturales para usos medicinales es una tendencia floreciente hoy en día. Los productos naturales son vistos como un grupo privilegiado de estructuras que ha evolucionado para interactuar con una amplia variedad de dianas. Se han realizado muchos intentos para investigar el posible papel de los extractos de plantas y algunos compuestos activos en su eficacia para combatir los problemas de resistencia bacteriana a los antibióticos. La terapia combinada, que asocia

antibióticos convencionales con productos naturales, representa una estrategia prometedora para superar la resistencia a los antibióticos (Elshafie *et al.*, 2015; Mancini *et al.*, 2014). Cuando se combinan fármacos, ocurre sinergia si el efecto combinado es mayor que la suma de los efectos individuales. En cambio, se da antagonismo cuando el efecto combinado es menor al obtenido por los dos compuestos aplicados individualmente. La indiferencia se observa cuando no hay interacción entre unos y otros. Las combinaciones sinérgicas presentan mayor eficacia y menor toxicidad que sus componentes aislados. Debido a una actividad multidiana, tales combinaciones podrían dificultar la selección de resistencia a los antibióticos y por lo tanto, podrían maximizar la eficacia frente a cepas microbianas resistentes a múltiples fármacos (Van Vuuren y Viljoen, 2011).

En la bibliografía se encuentran múltiples trabajos que dan cuenta de la actividad sinérgica entre aceites esenciales y antibióticos. Si *et al.* (2008) han reportado la presencia de actividad antimicrobiana sinérgica al combinar aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) con doxiciclina y florfenicol frente a cepas de *E. coli* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. También, se puede mencionar al aceite esencial de *Pelargonium graveolens*, que logró reducir la dosis mínima eficaz de norfloxacin frente a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Rosato *et al.*, 2007). Rodríguez *et al.* (2009) informaron que el aceite esencial de hojas de *Croton zehntneri* es capaz de potenciar la actividad de gentamicina en un 42.8% frente a *P. aeruginosa* a través del contacto gaseoso, lo que sugiere que el aceite posee un potencial para ser utilizado como coadyuvante en la terapia antimicrobiana.

#### **1.4. *Melaleuca armillaris***

La *Melaleuca armillaris* Sm. (Figura 3) pertenece a la familia de las Myrtaceae, plantas dicotiledóneas leñosas ubicadas dentro del orden Myrtales, perteneciente a la serie de órdenes corolarios de gineceo ínfero, conteniendo más de 5.650 especies organizadas en 130 a 150 géneros (Govaerts *et al.*, 2008). Conocida como la octava familia más grande de plantas de floración, que comprende varios géneros de excepcional relevancia ecológica y económica en todo el mundo.

La familia se encuentra principalmente en el hemisferio sur. Cuenta con centros de diversidad en los trópicos húmedos, especialmente América del Sur, Australia y Asia tropical, con presencia también en África y Europa. Esta familia se encuentra comúnmente en muchos de los lugares de mayor biodiversidad del mundo, como el suroeste de Australia y la Selva Atlántica de Brasil, donde pueden encontrarse más de 90 especies de Myrtaceae por hectárea, muchas de las cuales no han sido descritas aún (Govaerts *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Planta de *M. armillaris*. (Fuente: Manzaner Molina, 2005).



**Figura 4.** Inflorescencias de *M. armillaris*. (Fuente: Manzaner Molina 2005).

Las plantas de la familia Myrtaceae son árboles, arbustos o subarbustos de hojas simples, enteras, con aceites esenciales en las cavidades secretoras esquizógenas; flores actinomorfas, hermafroditas, con una cantidad de piezas florales múltiplo de 4 o de 5, generalmente con muchos estambres; frutos en forma de cápsulas, drupas o bayas; floema localizado a ambos lados del xilema (no solo por fuera como en la mayoría de las plantas) y punteaduras en los vasos del xilema (Wilson *et al.*, 2001).

Con alrededor de 260 especies, *Melaleuca* es uno de los principales géneros de Myrtaceae y es el segundo con más especies en Australia después del *Eucalyptus*. Las especies de *Melaleuca* pueden ser árboles o arbustos pequeños, los cuales tienden a ocupar el nicho de los humedales y son comúnmente dominantes en el sotobosque de bosques de eucalipto. Están muy extendidas en Australia, el sudeste de Asia, y Nueva Caledonia. El género se caracteriza por largos racimos de flores (Figura 4), las cuales se asemejan a un cepillo (Grattapaglia *et al.*, 2012).

En este trabajo nos centraremos en *Melaleuca armillaris* Sm., una de las plantas del género *Melaleuca* más ampliamente cultivadas. Es comúnmente conocido como *Honey bracelet myrtle* y crece en forma de arbusto grande o como árbol pequeño. Los reportes de la literatura acerca de *M. armillaris* siguen siendo escasos. Investigaciones por GC-MS (Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas) de su aceite esencial revelaron la presencia de 1.8-cineol como componente principal (Chabir *et al.*, 2011; Hayouni *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2007).

Se han determinado varias actividades para este aceite esencial. Rizk *et al.* (2012) obtuvieron buenos resultados *in vivo* utilizando este aceite esencial en el tratamiento contra el parásito *Schistosoma mansoni*, respondiendo frente a la actividad oxidante generada por el patógeno. También se encontró actividad inhibitoria, *in vitro*, frente a diversas especies bacterianas como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Amri *et al.*, 2012). Chabir *et al.* (2011) determinaron actividad anticancerígena por el efecto citotóxico que presenta sobre las células del cáncer de mama MCF7.

Las actividades observadas para el aceite esencial de *M. armillaris* en forma pura permiten suponer que los buenos resultados obtenidos por si solos pueden incrementarse en sistemas sinérgicos para el mismo fin, como el mejoramiento de antibióticos para tratar infecciones ocasionadas por cepas resistentes al tratamiento convencional. No se ha encontrado hasta el momento bibliografía indicando el uso del aceite esencial de *M. armillaris* como potenciador de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones de origen bacteriano, particularmente contra cepas de *S. aureus*. Este patógeno es muy resistente a los antibióticos, y es responsable de un alto porcentaje de infecciones hospitalarias y comunitarias. El uso indiscriminado de antimicrobianos está generando microorganismos resistentes a múltiples fármacos, convirtiéndose en un grave problema para la salud mundial (OMS, 2018).

Resulta interesante la búsqueda de soluciones a estos problemas, partiendo de los tratamientos ya existentes y con la ayuda de nuevas estrategias basadas en extractos de plantas, que están demostrando un gran potencial para abordar el tema.

### I.5. Hipótesis

- Los aceites esenciales al ser combinados con antibióticos convencionales, potencian la acción antibacteriana de los mismos.
- Los aceites esenciales, por ser multicomponentes, disminuyen la capacidad de desarrollar resistencia bacteriana.
- Una combinación de antimicrobianos con aceites esenciales que demuestre efecto sinérgico *in vitro*, tiene alta probabilidad de ser eficaz para el tratamiento de infecciones bacterianas, independientemente del patrón de sensibilidad del microorganismo.
- El aceite esencial extraído de *M. armillaris*, es capaz de potenciar la acción antimicrobiana de aquellos agentes a los cuales el *S. aureus* ha disminuido su sensibilidad, recuperando así la eficacia antimicrobiana.

### I.6. Objetivo general

Establecer una combinación óptima y de máxima eficacia del aceite esencial de *Melaleuca armillaris* con antibióticos ampliamente utilizados para tratar infecciones ocasionadas por *Staphylococcus aureus* sensibles y con sensibilidad disminuida.

### I.7. Objetivos específicos

- 1- Comparar la composición del aceite esencial de *M. armillaris* extraído con la publicada en bibliografía.
- 2- Seleccionar mediante pruebas de sensibilidad bacteriana, agentes antimicrobianos dentro de los siguientes grupos:  **$\beta$ -lactámicos** (penicilina, amoxicilina, oxacilina); **macrólidos** (azitromicina, claritromicina, eritromicina); **glicopéptidos**; **fenicoles** (tiamfenicol); **tetraciclinas** (oxitetraciclina, doxiciclina, minociclina);



**fluoroquinolonas** (enrofloxacin, danofloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin), **aminoglucósidos** (estreptomicina, gentamicina) y **ansamicinas** (rifaximina y rifampicina).

- 3- Determinar la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) *in vitro* de los antimicrobianos seleccionados frente a cepas de referencia y aislamientos de *Staphylococcus aureus*.
- 4- Establecer la CIM y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) *in vitro* del aceite esencial de *M. armillaris* frente a cepas de referencia y aislamientos salvajes de *Staphylococcus aureus*.
- 5- Evaluar, mediante pruebas de sinergismo *in vitro*, la eficacia obtenida por la asociación de los antimicrobianos seleccionados con el aceite esencial de *M. armillaris*.

## **II.MATERIALES Y MÉTODOS**

### **II.1. Recolección de *M. armillaris***

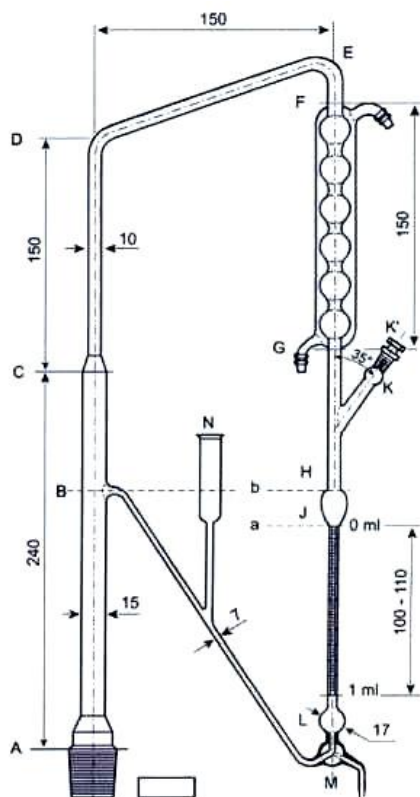
Se llevó a cabo la recolección de 44.85 Kg de hojas y ramas herbáceas de plantas ubicadas en las cercanías de Coronel Brandsen, provincia de Buenos Aires (latitud 35°06'18.9"S y longitud 58°10'57.0"O). La obtención del material vegetal tuvo lugar en el mes de julio de 2015. La cosecha se realizó durante la mañana y se llevó inmediatamente al sitio de extracción del aceite esencial. Una muestra del material vegetal fue reservada para identificación y depósito en el herbario LPAG de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP (Holmgren *et al.*, 1990).

### **II.2. Extracción del aceite esencial de *M. armillaris***

La extracción del aceite esencial a partir del material vegetal recolectado se realizó mediante destilación por arrastre de vapor de agua. En primer lugar, se determinó el rendimiento siguiendo las recomendaciones de la Farmacopea Argentina VII Ed. (2013) utilizando 100 g de hojas recolectadas. De acuerdo con este documento, la determinación de aceites esenciales en vegetales se lleva a cabo mediante extracción por arrastre con vapor de agua en un aparato apropiado, denominado cleveger (Figura 5), que consta de un balón y de un condensador. El aceite esencial es recolectado en un tubo graduado empleando xileno para fijarlo, mientras que el agua retorna al balón de extracción. Las diferentes partes del condensador están construidas en una sola pieza de vidrio de bajo coeficiente de expansión. El tapón K' tiene una abertura y el tubo K posee un orificio de 1 mm de diámetro, el cual coincide con la ubicación de la abertura del tapón. El extremo final del tubo K es esmerilado y tiene un diámetro interno de 10 mm; un tubo en forma de pera J de 3 mL de capacidad; un tubo JL graduado en 0.01 mL; un tubo en forma de bulbo de aproximadamente 2 mL de capacidad y una válvula de tres vías M. La unión B se encuentra a 20 mm de la graduación máxima superior.

Para comenzar el proceso se coloca el material vegetal en el balón, se agregan algunos trozos de plato poroso y se coloca el condensador. Se introduce agua a través del tubo de llenado **N** hasta el nivel **B**. Se retira el tapón **K'** y se transfiere la cantidad indicada de xileno empleando una pipeta con su extremo en la parte inferior del tubo **K**, luego se coloca el tapón **K'** nuevamente, asegurándose que los orificios de **K** y **K'** coincidan entre sí. Se procede a calentar el líquido en el balón hasta ebullición y se ajusta la velocidad de extracción a aproximadamente 2 mL por minuto, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. Para determinar la velocidad de extracción, se debe disminuir el nivel de agua por medio de la válvula de tres vías hasta que el menisco se encuentre en la marca inferior **a**. Cerrar la válvula y medir el tiempo que toma el líquido en alcanzar la marca superior **b**. Abrir la válvula y continuar con la extracción, modificando el calentamiento para regular la velocidad de extracción. La extracción se lleva a cabo durante 30 minutos. Finalmente, se detiene el calentamiento y se lee el volumen de xileno, donde el aceite esencial se ha disuelto, en el tubo graduado después de por lo menos 10 minutos. La diferencia entre el volumen inicial y final del xileno indica la cantidad de esencia extraída. Por último se expresa la cantidad de aceite esencial extraído cada 100 g de muestra. Esta determinación se llevó a cabo en la Cátedra de Farmacognosia y Farmacobotánica de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) a cargo de la Dra. María Adelaida Rosella.

Luego se procedió a la destilación de toda la biomasa cosechada. Se utilizó la técnica de extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor de agua con generador de vapor *in situ*. El equipo de destilación utilizado tiene una capacidad de 385 litros. Se utilizaron 38.5 litros de agua para la destilación por arrastre de vapor de 44.75 Kg de hojas y ramas herbáceas. El proceso completo de destilado duró 5 horas y se extrajeron 550 mL de aceite esencial. La esencia extraída fue secada con cloruro de sodio anhidro, filtrada y guardada en frasco de vidrio color ambar en heladera a 4°C.



**Figura 5.** Equipo de destilación tipo Clevenger para la determinación de aceites esenciales en drogas vegetales. Las dimensiones son mm. (Fuente: FA VII Ed., 2013).

## II.2.1. Caracterización del Aceite esencial

### II.2.1.1. Determinación de la composición del aceite esencial

La composición del aceite esencial fue analizada en el IQUIMEFA-CONICET-UBA a cargo del Prof. Dr. Arnaldo Bandoni. Dicho análisis se llevó a cabo mediante un cromatógrafo GC–FID–MS Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 7890A/5975C equipado con un inyector (split ratio 1:100) conectado por un flow splitter de dos columnas capilares (HPWAX y DB-1-MS, ambas de 60 m × 0.25 mm con 0.25 micrones de fase estacionaria). La columna polar fue conectada a un FID, mientras que la columna no polar se conectó a un detector de masa cuadrupolar (HP 5975C) (70 eV). Se utilizó Helio como gas portador, a un flujo de 1.8 mL/min. La temperatura del inyector se estableció en 250

°C. El volumen de inyección fue de 0.3 µL. La temperatura de la columna se programó de acuerdo con el siguiente gradiente: 100 °C, aumento de 2 °C/min hasta 240 °C y mantenido en forma constante durante 15 min. La temperatura del FID fue 260 °C y las temperaturas para la línea de transferencia y la fuente iónica se establecieron en 280 y 230 °C, respectivamente. El rango de masa ( $m/z$ ) fue 40–500 Da. La adquisición de datos, el procesamiento y el control del instrumento se realizaron utilizando el software Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La identificación de los compuestos se logró mediante el análisis de los índices de retención (relativos a C8–C24 n-alcenos) obtenidos en ambas columnas y comparados con los de compuestos de referencia, compuestos identificados en aceites esenciales químicamente conocidos y de la bibliografía (Joulain y König, 1998; Babushok *et al.*, 2011). Además, cada espectro de masas obtenido se comparó con el existente en las bibliotecas (Joulain y König, 1998; Adams, 2007; Wiley/NIST, 2008) y con los espectros de masas obtenidos a partir de los compuestos de referencia. La contribución relativa porcentual de los compuestos se calculó a partir de las respuestas FID mediante una integración computarizada suponiendo que todos los factores de respuesta fueron 1.

### 2.1.2. Determinación parámetros físicos-químicos

Se establecieron índices y factores correspondientes al control de calidad de aceites esenciales (Plaza y Ricalde, 2015) con el fin de caracterizar al aceite esencial de *M. armillaris*, ya que no se encuentra descrito en la bibliografía. Para ello se observaron factores como: aspecto a 20 °C, olor, sabor, color, densidad (mediante uso de picnómetro) y pH. También, se verificó la solubilidad en distintos solventes: aceite mineral (1:1); agua (1:10) y etanol 70% (1:1).

Por otra parte se determinaron los índices de acidez y esterificación siguiendo las recomendaciones de la FA VII Ed.:

-Índice de acidez (contenido de ácidos grasos libres, definido como la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos libres presentes en 1.0 g de

muestra). Se disolvieron 10.0 g de muestra, exactamente pesados y previamente neutralizados frente a la fenolftaleína con hidróxido de sodio 0.1 N, en 50 mL de alcohol contenidos en un Erlenmeyer. Se agregó 1 mL de fenolftaleína (preparada al 1% en alcohol) y se tituló con hidróxido de potasio 0.1 N hasta coloración rosada persistente durante 30 segundos. El índice de acidez se calculó como los mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres en un gramo de muestra.

- Índice de esterificación (definido como la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para saponificar los ésteres presentes en 1.0 g de muestra). Se transfirieron 2 g de muestra, exactamente pesados, a un erlenmeyer de 250 ml, previamente pesado y se agregaron 25 mL de alcohol neutralizado en agitación y se agregó 1 mL de fenolftaleína (preparada al 1% en alcohol). Se tituló con hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N hasta neutralizar totalmente los ácidos grasos, libres. Luego se agregaron 25.0 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N. Se calentó en un baño de María, con un refrigerante apropiado para mantener el reflujo durante 30 minutos, agitando por rotación frecuentemente y se tituló el hidróxido de potasio en exceso con ácido clorhídrico 0.5 N. Se realizó una determinación con un blanco. La diferencia entre los volúmenes, en mL, de ácido clorhídrico 0.5 N consumido por la muestra y el blanco, multiplicado por 28.05 y dividido por el peso, en g, de la muestra tomada, es el Índice de esterificación.

### II.3. Aislamientos de campo de *Staphylococcus aureus*

El laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT) de la Cátedra de Farmacología Especial y Toxicología de la FCV-UNLP cuenta con una importante cantidad de aislamientos y cepas a lo largo de los últimos 8 años, como así también con las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y ATCC 29213. Se dispuso de 120 cepas de *S. aureus* obtenidas a campo a partir de proyectos de investigación previos. Además se cuenta con cepas SARM provistas por el INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán. Las cepas y aislamientos se encuentran conservados en caldo tripticasa soya con 15% de glicerol a -70°C, en crioviales autoclavables de 2.5 mL de capacidad.

Las cepas y aislamientos de *S. aureus* fueron repicadas en agar nutritivo suplementado con 5% de sangre ovina estéril (agar sangre), y llevadas a incubación durante 24 horas a 35°C. Luego las colonias crecidas, se observaron macroscópicamente evaluando características tales como color, tamaño, aspecto general y presencia o ausencia de hemólisis. El *S. aureus* en agar sangre presenta óptimo crecimiento a temperaturas entre 34-37°C. Tras 18 a 24 horas de incubación, se observan colonias de 1-3 mm de diámetro, de color blanco amarillento, debido a la producción de carotenoides. Posteriormente, fueron repicadas en agar nutritivo y mantenidas en heladera para continuar trabajando.

### **II.4. Evaluación de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus***

#### **II.4.1. Prueba cualitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana**

Se evaluó la susceptibilidad de las cepas de *S. aureus* mediante la técnica de antibiograma por el método Kirby-Bauer (método de difusión en agar). Este método consiste en colocar sobre la superficie de un medio de cultivo sólido inoculado con una concentración estandarizada de la bacteria a analizar, discos de papel impregnados con una cantidad específica de cada antimicrobiano a ensayar. Una vez colocados los discos en contacto con la superficie húmeda del agar y como resultado de la formación de un gradiente de concentración, el antimicrobiano difunde desde el disco (lugar de mayor concentración) hacia el agar (lugar de menor concentración) en forma radial. Transcurridas 18-24 h de incubación, y luego que la concentración del antimicrobiano se diluye al punto de no lograr la inhibición del crecimiento bacteriano, queda en el agar claramente demarcada la zona de inhibición. El diámetro de esta zona, se correlaciona inversamente con la concentración mínima inhibitoria (CIM) de la bacteria testada. La medida de los diámetros de los halos de inhibición permite interpretar los resultados de acuerdo a las siguientes categorías: sensible (S), intermedia (I) o resistente (R).

#### **II.4.2. Medio de cultivo**

El agar Mueller Hinton (AMH) es el medio adecuado para utilizar en las pruebas de susceptibilidad (CLSI, 2008). El medio de cultivo fue preparado siguiendo las

recomendaciones del fabricante. Luego de ser esterilizado por autoclave, se mantuvo en baño termostático hasta alcanzar una temperatura de 48 - 50 °C. Utilizando una pipeta de vidrio estéril, 25 mL del medio de cultivo fueron trasvasados a cada una de las placas de Petri. Las mismas se ubicaron sobre una superficie horizontal correctamente nivelada, con el fin de lograr una capa de agar uniforme de 4 mm de profundidad en toda su superficie.

Las placas preparadas fueron mantenidas a temperatura ambiente y una vez gelificado el agar, se llevaron a 4 °C para su utilización al día siguiente. Para comprobar la esterilidad del medio de cultivo, 2 placas preparadas con el agar proveniente de cada matraz utilizado fueron incubadas durante 24 h a 35 °C. El control del pH del medio de cultivo, gelificado y a temperatura ambiente, se realizó con cintas para control de pH (Merck KGaA, Germany) con el fin de corroborar que el medio de cultivo tuviera siempre el pH adecuado: 7.2 – 7.4.

### II.4.3. Inóculo bacteriano

El método utilizado para la preparación de los inóculos fue el de suspensión directa de colonias (CLSI, 2008). El día anterior a la realización del antibiograma, todos los aislamientos a evaluar y un repique de la cepa de referencia (*S. aureus* ATCC 25923) fueron sembrados en placas con agar nutritivo. Se incubaron durante 20 h a una temperatura de 35 °C. Transcurrido el período de incubación y utilizando un ansa estéril, se tomaron 2 a 4 colonias de cada aislamiento y cada uno de ellos fue inoculado en 5 mL de solución fisiológica estéril. Luego de agitar durante unos minutos se comparó el inóculo con una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de McFarland en solución fisiológica (que equivale aproximadamente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL). Cuando la turbidez fue superior se ajustó con solución fisiológica estéril y cuando fue necesario se agregaron más colonias del aislamiento correspondiente (CLSI, 2008).

Para la preparación del tubo con solución correspondiente al 0.5 de la escala de McFarland se diluyeron 0.5 mL de cloruro de bario 0.048 M (1.173 g de cloruro de bario dihidrato, 1.175% m/v) en 99.5 mL de ácido sulfúrico 0.18 M (0.36 N, 1% v/v) con agitación constante. La solución obtenida se dividió en alícuotas de 5 mL que fueron distribuidas en tubos con tapa a rosca y almacenadas en la oscuridad a temperatura



ambiente (CLSI, 2008). Mensualmente se controló la absorción a 625 nm, la debía estar entre 0.08 y 0.10.

A partir de cada aislamiento inoculado en caldo y en el transcurso de los 15 min posteriores a la preparación, fueron sembradas 2 placas utilizando en cada caso 1 hisopo estéril y atóxico. El hisopo fue introducido dentro de la suspensión y al retirarlo se rotó varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. Para obtener un crecimiento uniforme en la placa de Petri, el hisopo fue deslizado por toda la superficie de la misma en 3 repeticiones rotando la placa 60° cada vez y por último fue deslizado por la periferia del agar. Luego de 3 - 5 min de secado, pero no más de 15 min, se procedió a depositar los discos (CLSI, 2008).

#### **II.4.4. Discos de antibiograma**

Los frascos o contenedores de los discos de papel con antibióticos se mantuvieron almacenados en freezer a -20 °C y libres de humedad. Una hora antes de su utilización, fueron llevados a temperatura ambiente. Una vez atemperados y utilizando pinzas estériles, los discos se colocaron sobre la superficie del agar inoculado ejerciendo una leve presión para asegurar el perfecto contacto con el medio de cultivo. Con el objetivo de evitar la superposición de los halos de inhibición, y siguiendo las recomendaciones del CLSI 2008, no se colocaron más de 5 discos en cada placa de Petri de 90 mm de diámetro.

Los discos incluidos en la prueba fueron: penicilina (10 UI), oxacilina (1 µg), clindamicina (2µg), azitromicina (15 µg), ciprofloxacina (5 µg), cefoxitina (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), rifampicina (5 µg), cefoperazona (30 µg), cefalexina (30 µg), enrofloxacin (5 µg), vancomicina (30 µg).

Una vez colocados los discos de papel con antimicrobiano, y no dejando pasar más de 15 minutos, las placas se colocaron en estufa y se incubaron a 35°C durante 18 hs, en posición invertida y apiladas en grupos de cuatro. Pasado ese tiempo, la lectura se realizó con la ayuda de un calibre de Vernier contra un fondo negro e iluminado con luz reflejada (CLSI, 2008).

#### **II.4.5. Lectura e interpretación de los halos de inhibición**

Todas las placas fueron leídas por la misma persona y utilizando el mismo calibre de Vernier. Como corresponde cuando se utilizan medios traslúcidos, las placas fueron observadas sobre el reverso y con luz transmitida (CLSI 2008). Se consideró como zona de inhibición al área circundante a un disco que mostró ausencia de crecimiento visible a simple vista. La interpretación de los resultados de dicha lectura se basó en los datos establecidos en el documento M31-A3 y en el del VET01-S2, para la discriminación de los microorganismos sensibles, intermedios y resistentes (CLSI 2008 y CLSI 2013, respectivamente).

#### **II.4.6. Control de calidad**

La cepa de referencia utilizada para supervisar la exactitud del método fue *S. aureus* ATCC 25923 (CLSI 2008). Al igual que las cepas y aislamientos problema, esta fue mantenida a una temperatura de -70 °C en crioviales con caldo tripticasa soya y 15% de glicerol.

Cada vez que se realizaron estudios de antibiograma, se incluyó a la cepa de referencia entre los aislamientos evaluados. Dos días antes de realizar los antibiogramas, la cepa fue sembrada en una placa de agar sangre e incubada a 35°C, durante 18 - 20 h. A partir de este cultivo puro se realizó un repique de 24 h de incubación que fue utilizado para preparar la suspensión empleada en la placa para antibiograma. Los halos de inhibición de la cepa de referencia fueron comparados con los intervalos que el CLSI 2008 (Tabla 4, documento M31-A3) determina como aceptables.

Dentro de las novedades más relevantes publicadas en enero de 2013 en el documento M100-S23 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para *Staphylococcus spp.* se eliminaron los criterios de interpretación (puntos de corte) de todos los  $\beta$ -lactámicos a excepción de: penicilina, oxacilina y cefoxitina. Entre los  $\beta$ -lactámicos ahora disponibles,

penicilina representa a todas las penicilinas lábiles a penicilinasas; oxacilina representa a todas las penicilinas estables a penicilinasas; y cefoxitina representa el marcador sustituto de oxacilina.

## **II.5. Selección de los antimicrobianos a evaluar**

De la totalidad de las cepas evaluadas por la prueba de susceptibilidad por antibiograma, se seleccionaron aquellas con las que se realizarán los ensayos encaminados a cumplir los objetivos de esta tesis. La elección de cepas incluyó sensibles a todos los antibióticos (n=3) y con sensibilidad disminuida a  $\beta$ -lactámicos (n=1) y macrólidos (n=3). Esto se debe a que son fenotipos de resistencia frecuentemente observados para *S. aureus* (SARM y MSLB, respectivamente). Los antimicrobianos seleccionados para realizar las pruebas ulteriores fueron: cloxacilina, eritromicina y rifaximina. Los primeros dos antimicrobianos fueron elegidos como representantes de cada uno de los dos grupos de antimicrobianos tiempo dependientes según la clasificación basada en pautas farmacocinéticas/farmacodinámicas:

1. Antibióticos acción Tiempo dependientes con escaso/nulo efecto postantibiótico: cloxacilina ( $\beta$ -lactámico).
2. Antibióticos acción Tiempo dependientes con prolongado efecto postantibiótico: eritromicina (Macrólido).

La rifaximina fue seleccionada por la necesidad de profundizar los conocimientos sobre este antibiótico muy utilizado en el tratamiento de infecciones estafilocócicas. Es una molécula que se encuentra registrada en diversos países de la Comunidad Europea para su uso en infecciones intramamarias de los bovinos, pero carece de información científica de relevancia.

## **II.6. Prueba cuantitativa para evaluar susceptibilidad bacteriana a los antibióticos**

Una vez que las cepas y los antimicrobianos fueron seleccionados, se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) mediante microdilución en caldo, metodología basada en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de

concentraciones crecientes del antimicrobiano (CLSI, 2008). Posteriormente se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos ensayados.

En el desarrollo de la técnica se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2, utilizando como medio de cultivo caldo Mueller Hinton (CMH). Luego, se inocular dicho medio y tras la correspondiente incubación, para permitir el crecimiento del microorganismo, se realiza la lectura determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida. La gran cantidad de variables (dependientes del microorganismo, del medio de cultivo, del inóculo) que influyen en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado finalmente obtenido.

De esta forma se determinaron los valores de CIM para las cepas y aislamientos destinados al estudio. Además de evaluar la sensibilidad de los microorganismos a cada antimicrobiano seleccionado a pH 7.4, que es el habitual del medio reconstituido, se evaluó la modificación o no de la sensibilidad antimicrobiana a pH 6.5 y 5.0, con el fin de emular las condiciones de acidez a nivel subcelular, a las cuales se encuentra enfrentado frecuentemente el *S. aureus*, una vez que ha ingresado al interior celular.

El CMH se preparó siguiendo las especificaciones del fabricante. Este es el medio de cultivo recomendado para las pruebas de susceptibilidad (CLSI, 2008). Para acidificarlo, una vez preparado, se agregaron 3 mL de HCl 1N a un litro de medio de cultivo para llevar a pH 6.5 y 8 mL de HCl 1N a igual volumen de medio de cultivo para obtener un pH 5.0.

### II.6.1. Soluciones y diluciones de los antimicrobianos

En la preparación de la solución madre de cada antibiótico, la droga pura, valorada por el fabricante, fue pesada en una balanza analítica y diluida en el volumen necesario del solvente recomendado por la CLSI (2008). Estos solventes se observan en la Tabla 1. Para el cálculo de la concentración se consideró la pureza de la sustancia, con el fin de ajustar

la masa de activo a pesar. Aplicamos alguna de las siguientes fórmulas propuestas por la CLSI:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{Concentración (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potencia (}\mu\text{g/mg)}}$$

$$\text{Volumen (mL)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Concentración (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potencia (}\mu\text{g/mg)}}$$

Para cada antimicrobiano se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución stock madre, utilizando los diluyentes recomendados hasta obtener una solución stock de trabajo cuatro veces mayor a la concentración que se deseaba evaluar. Esta solución de trabajo fue el punto de partida para las diluciones seriadas que luego fueron confrontadas con el inóculo bacteriano.

**Tabla 1.** Solventes y diluyentes empleados para la preparación de las soluciones stock de Cloxacilina, Eritromicina y Rifaximina.

ANTIMICROBIANO	SOLVENTE	DILUYENTE
CLOXACILINA	METANOL	MEDIO DE CULTIVO/AGUA
ERITROMICINA	ETANOL 95%	MEDIO DE CULTIVO/AGUA
RIFAXIMINA	METANOL	MEDIO DE CULTIVO/AGUA

### II.6.2. Procedimiento

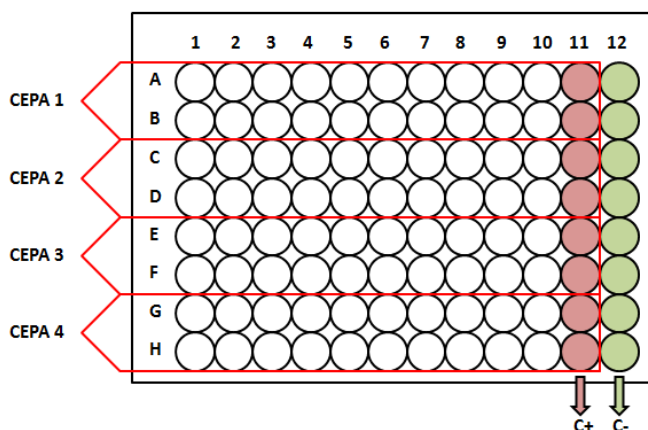
El valor que se obtiene de la CIM por el método de dilución es un valor que orienta (no es un valor real) acerca de cuál es la concentración necesaria en el sitio de infección para que un microorganismo dado pueda inhibirse. La CIM puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo (CLSI, 2008).

Para la prueba de sensibilidad por microdilución para cada antimicrobiano y para cada cepa aislamiento, se emplearon policubetas descartables estériles de 96 pocillos con

fondo en “U”. Cada una de las policubetas contenía el rango completo de diluciones del antimicrobiano, repetido cuatro veces, la serie total de concentraciones evaluadas comprendía dos filas de la policubeta para cada microorganismo, desde la columna 1 a la 10. La columna 11 contenía el inóculo sin antimicrobiano ni inhibidor, permitiendo de esta manera tener un control positivo de crecimiento y la número 12 fue el control negativo, pues solo contenía caldo (Figura 6). Este procedimiento se realizó por duplicado y para los pH 7.4, 6.5 y 5.0.

Las policubetas fueron cargadas con 100  $\mu$ L de CMH utilizando una pipeta multicanal. Luego los primeros pocillos de cada fila, se cargaron individualmente con 100  $\mu$ L del antimicrobiano a una concentración cuatro veces mayor que la deseada para dicho pocillo. Es decir, que al agregar 100  $\mu$ L de la solución stock de trabajo concentrada al caldo, se obtuvo una dilución 1:2 y una vez realizada, las diluciones seriadas desde la columna 1 hasta la 10 con la pipeta multicanal el volumen volvió a quedar en 100  $\mu$ L. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ L de caldo conteniendo el inóculo problema, diluyendo de esta manera, la concentración anterior, nuevamente 1:2. En consecuencia, la concentración final resultó ser cuatro veces menor que la preparada inicialmente. Una vez cargado el inóculo, el volumen final por pocillo fue de 200  $\mu$ L.

En el caso de la cloxacilina, el CMH fue suplementado con 2% de cloruro de sodio por recomendación de la CLSI para penicilinas resistentes a penicilinasas.



**Figura 6.** Esquematización de policubetas para la realización de las CIMs de los antimicrobianos por microdilución. C+: control positivo, C-: control negativo.

### **II.6.3. Preparación de las soluciones de trabajo de los antimicrobianos**

Para cada antimicrobiano se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución stock madre, utilizando los diluyentes recomendados hasta obtener una solución stock de trabajo cuatro veces mayor a la concentración que se deseaba evaluar. Esta solución de trabajo fue el punto de partida para las diluciones seriadas que luego fueron confrontadas con el inóculo bacteriano.

#### Diluciones seriadas de cloxacilina

Se empleó cloxacilina en forma benzatínica, cuya potencia era de 96.4% p/p (Vetpharma Animal Health S.L.) cedida por Biogénesis Bagó. La solución stock madre (5120 µg/mL) se preparó usando como solvente metanol calidad HPLC. A partir de ésta, se prepararon dos diluciones: la mayor (1024 µg/mL), fue la primer concentración de las filas A, C, E y G de la policubeta y la menor (16 µg/mL), la primera de las B, D, F y H, lo cual permitió obtener un rango de diluciones más amplio. Cada una de estas, contenía cuatro veces la concentración más alta a analizar y los diluyentes empleados fueron primero agua y luego CMH en ambos casos.

Para las filas A, C, E y G la primera dilución fue de 1024 µg/mL con el fin de lograr una concentración final de 256 µg/mL en el primer pocillo. El rango de diluciones seriadas fue: 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL y 0.5 µg/mL del antimicrobiano.

La segunda concentración, para las filas B, D, F y H fue de 16 µg/mL y el rango obtenido fue: 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL, 0.062 µg/mL, 0.031 µg/mL, 0.015 µg/mL y 0.007 µg/mL de cloxacilina.

En consecuencia para cloxacilina el rango de diluciones seriadas comprendió concentraciones desde 256 µg/mL hasta 0.007 µg/mL.

#### Diluciones seriadas de eritromicina

Se empleó eritromicina en forma de base con 90.7 % p/p de pureza (Parafarm). El solvente utilizado para la preparación de la solución madre fue etanol 95% y las soluciones

stock de trabajo se diluyeron en CMH. En este caso particular las CIMs de los aislamientos resistentes y sensibles fueron analizadas con rangos de diluciones levemente diferentes debido a que las primeras no fueron inhibidas a la concentración más elevada utilizada para las sensibles.

Para las sensibles a eritromicina el rango fue de 256 µg/mL a 0.007 µg/mL coincidiendo con el caso anterior, mientras que en el caso de las resistentes a eritromicina, las concentraciones evaluadas en la primer fila fueron: 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL y 2 µg/mL del antimicrobiano. La segunda fila fue igual al caso de la cloxacilia. Por lo tanto, el rango cubierto para los aislamientos resistentes fue de 1024-0.007 µg/mL.

### Diluciones seriadas de rifaximina

La solución stock madre se preparó utilizando rifaximina potencia >99% p/p (Santa Cruz Biotechnology). Se empleó metanol como solvente y CMH diluyente. La técnica fue idéntica a la explicada para cloxacilina, obteniendo también un rango de diluciones comprendido entre 256 µg/mL y 0.007 µg/mL.

### Preparación del inóculo

Para la prueba de susceptibilidad bacteriana por microdilución, se preparó el inóculo bacteriano de las cepas y aislamientos problema y de las cepas de referencia por método directo a partir de colonias aisladas (CLSI, 2008).

El inóculo se preparó de forma similar a la descrita en el punto II.4.3, realizando una suspensión de colonias en solución salina estéril, provenientes de un cultivo en medio no selectivo de 24 hs a 35°C. La densidad de dicha suspensión, fue ajustada a la escala 0.5 de McFarland es decir, 1 a  $2 \times 10^8$  UFC/mL para *S. aureus* ATCC 29213.

Para la preparación del inóculo final de cada cepa y aislamiento analizado, se diluyó 1:100 la suspensión inicial obtenida, es decir en 9.9 mL de CMH se colocaron 100 µL del inóculo inicial obteniendo  $10^6$  UFC/mL. Luego se colocaron 100 µL de esta última en cada pocillo de la policubeta previamente cargada con antimicrobiano y caldo (100 µL). De este modo, se obtuvo una dilución 1:2 logrando así un inóculo final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.



La suspensión bacteriana finalmente obtenida, fue colocada con ayuda de una pipeta multicanal a razón de 100 µL/pocillo de cada policubeta dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación (CLSI, 2008).

### Incubación de las placas e interpretación de resultados

Luego de haber colocado el inóculo, se procedió a la incubación de las placas en estufa a 35°C por 20 hs, apiladas en grupos de a cuatro y cubiertas con tapa plástica para evitar su desecación (CLSI, 2008).

La determinación de la CIM fue realizada a simple vista obteniendo como punto final al primer pocillo que presentó falta de turbidez. Cada pocillo con turbidez evidente fue comparado con la columna de control positivo, es decir aquella que contenía caldo e inóculo sin antimicrobiano. De este modo, se consideró válido solo cuando se observó un botón de crecimiento >2mm de diámetro o turbidez neta (CLSI, 2008).

La interpretación de los resultados de dicha lectura se basó en los datos establecidos en el documento M31-A3 (CLSI 2008), VET01-S2 (CLSI 2013) y en el del M100-S23 (CLSI 2013), para la discriminación de los microorganismos sensibles, intermedios y resistentes.

El control de calidad de este método se llevó a cabo, siguiendo las recomendaciones de la CLSI 2013 con la cepa *S. aureus* ATCC 29213, a diferencia del método de antibiograma donde se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

### **II.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial**

Para determinar la CIM del aceite esencial frente a las cepas y aislamientos seleccionados de *S. aureus*, también se utilizó el método de microdilución en caldo, de acuerdo con lo descrito en el documento CLSI 2008 (M31-A3). La técnica empleada fue similar a la detallada anteriormente para los antibióticos (cloxacilina, eritromicina y rifaximina) pero con algunas modificaciones. El medio de cultivo utilizado fue el CMH, al cual se le adicionó 0.5% v/v de Tween 80. Este surfactante favorece la disolución del aceite esencial en el medio de cultivo acuoso. La CIM del aceite esencial fue evaluada también a pH 7.4, 6.5 y 5.0. Este ajuste en la acidez del medio se llevó a cabo con HCl 1N como se explicó en el punto II.6 (adicionando 3 mL de HCl 1N a un litro de medio de

cultivo para llevar a pH 6.5 y 8 mL de HCl 1N a igual volumen de medio de cultivo para obtener un pH 5.0).

### **II.7.1. Solución de trabajo de aceite esencial**

La solución madre de aceite esencial se preparó siempre en el momento en que se iba a utilizar. Esta solución tenía una concentración cuatro veces mayor a la que se deseaba evaluar y fue el punto de partida para las diluciones seriadas que luego fueron confrontadas con el inóculo bacteriano.

Se evaluó un solo rango de concentraciones por placa, siendo diluciones seriadas a la mitad desde el pocillo 1 al 10. La primera dilución fue de 50  $\mu\text{L/mL}$ , por lo tanto la solución madre se preparó a una concentración de 200  $\mu\text{L/mL}$ . Esta se formuló con CMH, 0.5 % de Tween 80 y aceite esencial en forma pura. El rango de diluciones seriadas fue: 50  $\mu\text{L/mL}$ , 25  $\mu\text{L/mL}$ , 12.5  $\mu\text{L/mL}$ , 6.25  $\mu\text{L/mL}$ , 3.12  $\mu\text{L/mL}$ , 1.56  $\mu\text{L/mL}$ , 0.78  $\mu\text{L/mL}$ , 0.39  $\mu\text{L/mL}$ , 0.19  $\mu\text{L/mL}$  y 0.09  $\mu\text{L/mL}$  del aceite esencial.

### **II.7.2. Procedimiento**

Las policubetas se cargaron con 100  $\mu\text{L}$  de CMH con 0.5% v/v de Tween 80 utilizando una pipeta multicanal. Luego los primeros pocillos de cada fila, se cargaron individualmente con 100  $\mu\text{L}$  del aceite esencial a una concentración cuatro veces mayor que la deseada para dicho pocillo. Es decir, que al agregar 100  $\mu\text{L}$  de la solución stock de trabajo concentrada al caldo, se obtuvo una dilución 1:2 y una vez realizada, las diluciones seriadas desde la columna 1 hasta la 10 con la pipeta multicanal el volumen volvió a quedar en 100  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de caldo conteniendo el inóculo problema, diluyendo de esta manera, la concentración anterior, nuevamente 1:2. En consecuencia, la concentración final resultó ser cuatro veces menor que la preparada inicialmente. Una vez cargado el inóculo, el volumen final por pocillo fue de 200  $\mu\text{L}$ .

### Preparación del inóculo

Al igual que fue descripto en el punto II.4.3 el inóculo se preparó realizando una suspensión de colonias, en solución salina estéril, provenientes de un cultivo en medio no selectivo de 24 hs a 35°C. La densidad de dicha suspensión, fue ajustada a la escala 0.5 de McFarland es decir, 1 a  $2 \times 10^8$  UFC/mL para *S. aureus* ATCC 29213.

Para la preparación del inóculo final de cada cepa y asilamiento analizados, se diluyó 1:100 la suspensión inicial obtenida, es decir en 9.9 mL de CMH suplementado con Tween 80 al 0.5% v/v y se colocaron 100 µL del inóculo inicial obteniendo  $10^6$  UFC/mL. Luego se colocaron 100 µL de esta última en cada pocillo de la policubeta previamente cargada con aceite esencial y caldo (100 µL). De este modo, se obtuvo una dilución 1:2 logrando así un inóculo final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

La suspensión bacteriana finalmente obtenida, fue colocada con ayuda de una pipeta multicanal a razón de 100 µL/pocillo de cada policubeta dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación (CLSI, 2008).

### Incubación de las placas e interpretación de resultados

Luego de haber colocado el inóculo, se procedió a la incubación de las placas en estufa a 35°C por 20 hs, apiladas en grupos de a cuatro y cubiertas con tapa plástica para evitar su desecación (CLSI, 2008).

La determinación de la CIM fue realizada a simple vista obteniendo como punto final al primer pocillo que presentó falta de turbidez. Cada pocillo con turbidez evidente fue comparado con la columna de control positivo, es decir aquella que contenía caldo e inóculo sin aceite esencial. De este modo, se consideró válido solo cuando se observó un botón de crecimiento >2mm de diámetro o turbidez neta (CLSI, 2008).

El control de calidad de este método se llevó a cabo, siguiendo las recomendaciones de la CLSI 2008 con la cepa *S. aureus* ATCC 29213, a diferencia del método de antibiograma donde se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

## **II.8. Evaluación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los antibióticos y del aceite esencial**

La concentración bactericida mínima (CBM), se define como la mínima concentración de antibacteriano capaz de producir la muerte de la mayoría de los organismos viables (> 99.9%) después de 24 hs de incubación bajo condiciones estandarizadas (NCCLS, 1999). Esta determinación está sujeta a variables metodológicas por lo cual se utiliza como un complemento de los datos obtenidos por la CIM, pero con una relevancia clínica prácticamente imposible de apreciar, fundamentalmente para ciertos fármacos y en determinadas circunstancias.

### Procedimiento

Para la determinación de la CBM se utilizó el método de microdilución. Es decir, se emplearon policubetas estériles de 96 pocillos, fondo en “U”, conteniendo un volumen final de 200  $\mu$ L de caldo. Según menciona la CLSI en su documento M26-A Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents (NCCLS, 1999) una ventaja de la determinación por microdilución es que no se ha encontrado que la adherencia de los microorganismos a las paredes de los pocillos sea un problema, a diferencia de lo que se observa cuando se usan tubos de plástico en la macrodilución.

El procedimiento básico se realizó, según fue descripto para la CIM en los apartados 6.2 (antibióticos) y 7.2 (aceite esencial), por microdilución en CMH para las cepas de referencia y los aislamientos salvajes.

Partiendo de la policubeta donde fue determinada la CIM, tras 24 hs de incubación, y luego de la lectura del resultado de esta última, se tomaron muestras de los pocillos que no presentaban turbidez apreciable a simple vista ni un botón de precipitado en el fondo. Es decir, que fueron muestreadas las cubetas que contenían concentraciones mayores al valor establecido como CIM.

Se tomaron 50  $\mu$ L de cada pocillo y se sembró uniformemente en una placa con agar MH, luego se incubó 24hs a 35°C a fin de determinar el número de bacterias viables

remanentes, método recomendado por la CLSI (NCCLS, 1999). Este procedimiento se realizó por duplicado.

#### Lectura e interpretación

El punto final letal es determinado por un subcultivo cuantitativo usando una pipeta calibrada. Cada pocillo que mostró inhibición de crecimiento a las 24 hs fue subcultivado en una placa de agar MH. Considerando que el inóculo final en la prueba de la CIM fue de  $5 \times 10^5$  UFC/mL, y teniendo en cuenta que la CBM se define como la muerte del 99.9% de las bacterias presentes en el mismo, las placas que presentaron 500 UFC/mL o menos, fueron las que representaron la concentración bactericida mínima del antimicrobiano evaluado o del aceite esencial de *M. armillaris*. Este valor de 500 UFC/mL se correlaciona con el conteo de 25 colonias en la placa, dado que se siembran 50  $\mu$ L (NCCLS, 1999).

### **II.9. Determinación de actividad antimicrobiana aceite esencial/antibiótico**

Se evaluaron, en placas de microtitulación de 96 pocillos conteniendo CMH suplementado con Tween 80 al 0.5% a pH 7.4; 6.5 y 5.0, combinaciones del antibiótico y del extracto vegetal frente a los aislados de *S. aureus* y a la cepa de referencia mediante la técnica de tablero de damas o checkerboard (Eliolopus y Moellering, 1996). La preparación del medio de cultivo incluyó también la adición de Tween 80 para permitir la disolución del aceite y para la acidificación del medio se utilizó HCL 1N. El procedimiento utilizado fue similar al empleado para evaluar la CIM de los antibióticos y del aceite esencial. En el caso de la combinación del aceite esencial con cloxacilina, el CMH fue suplementado con 2% de cloruro de sodio por recomendación de la CLSI para penicilinas resistentes a penicilinasas.

#### **II.9.1. Procedimiento**

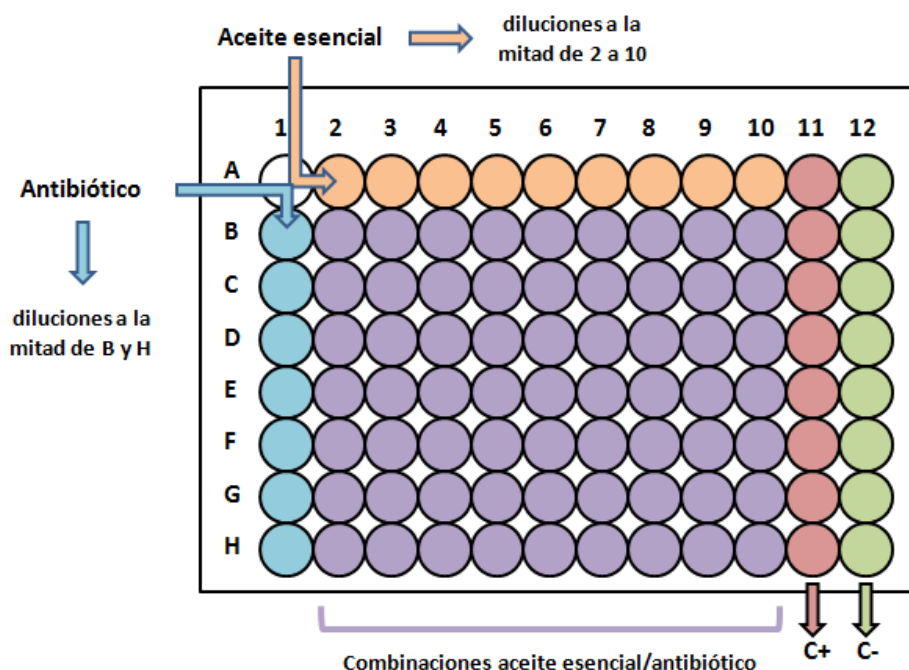
El rango de concentraciones evaluadas fue establecido en base a los valores de CIM obtenidos por antimicrobiano y por pH.

Para el aceite esencial las concentraciones evaluadas fueron de 50-0.19  $\mu$ L/mL. Los rangos de concentración utilizados para los antibióticos se muestran en la tabla 2.

En este ensayo las placas de microtitulación se armaron de modo que la columna 12 representaba el control de esterilidad (negativo) y la columna 11 el control de crecimiento (positivo) al igual que para la determinación de la CIM. Se incluyó el control de CIM para el antibiótico en diluciones seriadas a la mitad en los pocillos (1B a 1H). De la misma manera para el aceite esencial pero en la fila A (2A a 10A). Las combinaciones de estos se ubicaron en el rectángulo comprendido entre 2B-2H y 10B-10H (Figura 7).

**Tabla 2.** Concentraciones de rifaximina, eritromicina y cloxacilina utilizadas para realizar el tablero de damas frente a cepas y asilamientos sensibles y resistentes.

Antibiótico	pH	Rango de concentraciones (µg/mL)
Rifaximina sensibles	7.4	0.064 - 0.001
	6.5	0.064 - 0.001
	5.0	0.064 - 0.001
Eritromicina sensibles	7.4	4 - 0.125
	6.5	4 - 0.125
	5.0	16 - 0.5
Eritromicina resistentes	7.4	1024 - 16
	6.5	1024 - 16
	5.0	1024 - 16
Cloxacilina sensibles	7.4	2 - 0.031
	6.5	1 - 0.015
	5.0	0.125 - 0.002
Cloxacilina resistente	7.4	512 - 8
	6.5	512 - 8
	5.0	8 - 0.125



**Figura 7.** Esquema de armado de tablero de damas.

Se prepararon dos placas (duplicado) por cepa u aislamiento, antibiótico y condición de pH. La preparación de las mismas involucró inicialmente la carga de 100  $\mu\text{L}$  de CMH con 0.5% de Tween 80 en las columnas 1 a 10, 150  $\mu\text{L}$  en la columna 11 y 200  $\mu\text{L}$  en la 12. Luego, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  (en toda la columna 2) de aceite esencial de una solución stock de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , preparada como se explica en 7.1, de modo que la concentración final sea 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  por la dilución 1/4 que se genera en el proceso (ver rangos utilizados en tabla 2). Al igual que en el proceso de determinación de CIM, se distribuyen 100  $\mu\text{L}$  desde la columna 2 a la 10, con descarte de este volumen en la última columna, luego de homogeneizar. En toda la fila A (2A-10A) se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de CMH con 0.5% de Tween 80 para tener un volumen de 150  $\mu\text{L}$ .

Posteriormente se cargó el antibiótico. A todos los pocillos de cada fila (de B a H) se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de solución stock de antimicrobiano (de igual forma que en el punto 6.3), preparada con una concentración 4 veces superior a la deseada por fila, ya que se adicionan 50  $\mu\text{L}$  en 200  $\mu\text{L}$  totales. De este modo todos los pocillos, excepto los de la

columna 12, contenían 150 µL. El volumen restante para llegar a los 200 µL fue de inóculo. La solución bacteriana se estandarizó a una concentración de  $2 \times 10^6$  UFC/mL.

#### Preparación del inóculo

El inóculo se preparó partiendo de una concentración bacteriana comparable con el 0.5 de la escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). La preparación del inóculo se realizó de forma similar a la mencionada en los puntos 6.3 y 7.2, pero con la dilución 1/50 del tubo 0.5 McFarland.

#### Incubación de las placas e interpretación de resultados

Se llevó a cabo la incubación en las mismas condiciones que las mencionadas en los puntos 6.3 y 7.2. El control de calidad de este método se llevó a cabo con la cepa *S. aureus* ATCC 29213 al igual que las determinaciones individuales de CIM. Se corroboró que los valores de concentraciones inhibitorias de los antibióticos y del aceite esencial, individualmente en las placas, se correspondiesen con el resultado obtenido anteriormente en los puntos 6 y 7.

La interpretación de los resultados se realizó a través del cálculo del índice de la concentración fraccionaria inhibitoria (CFI) según la siguiente fórmula:

$$CFI = \frac{(A)}{(CIM)a} + \frac{(B)}{(CIM)b}$$

Los criterios para la interpretación de los resultados se basaron en una combinación de los propuestos por Berenbaum (1978) y Eliopoulos (1989). Se consideró sinergismo (S) si  $CFI \leq 0,5$ ; sinergismo parcial o bajo (SP) si  $0,5 < CFI < 1$ ; indiferencia o adición (I) si  $1 \leq CFI < 2$  y antagonismo (A) cuando  $CFI \geq 2$ .

Cuando el valor de la CIM del fármaco individual y en la combinación, coincidió con el valor extremo del rango de concentración probado, el valor del índice CFI se consideró igual a uno (producto del resultado de dividir el mismo valor en la fórmula). En estos casos, la combinación se declaró indiferente o antagónica, según el valor de la sumatoria total del índice CFI obtenido para la combinación investigada. Como punto final en cada prueba se consideró aquella combinación antibiótico/aceite esencial a la cual se produjo la



máxima interacción sinérgica, es decir, aquella que expresó el menor valor del índice CFI, siempre que ninguna de las restantes fuera antagónica.

## **II.10. Ensayo de curva de muerte o letalidad bacteriana**

Se realizó la curva de letalidad o muerte bacteriana, gráfico resultante del estudio de la actividad letal expresada como el Logaritmo en base 10 de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro  $\text{Log}_{10}$  (UFC/mL) a una concentración fija de antimicrobiano bajo condiciones controladas en el tiempo. Se determina contando el número de células viables a diferentes intervalos de tiempo. Se valora la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano. Este método es particularmente útil para medir la cinética de muerte de un agente antimicrobiano.

La técnica consiste en enfrentar un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo de cultivo, en comparación con un control sin antibiótico (curva de crecimiento control). Nos permite determinar el porcentaje de muerte bacteriana alcanzado por una concentración fija de antimicrobiano bajo condiciones controladas. Este porcentaje de muerte se determina midiendo el número de células viables (unidades formadoras de colonias –UFC-) a diferentes intervalos de tiempo como mencionamos. El poder bactericida se establece cuando se produce una disminución de las UFC en 3 logaritmos decimales en un tiempo determinado.

Las curvas de muerte bacteriana se llevaron a cabo tomando como punto de partida los resultados obtenidos en la determinación de las CIMs de los antimicrobianos (puntos 6 y 7) y se utilizaron las mismas variables de pH, tipo de antibiótico, presencia de aceite esencial y combinación de ambos.

### **II.10.1. Procedimiento**

Para cada combinación microorganismo/antimicrobiano, se empleó una batería de tubos conteniendo un volumen final de 1mL constituido por CMH, inóculo y cada una de las concentraciones del antimicrobiano a evaluar, según se describe a continuación. En las pruebas en que se utilizó aceite esencial solo o en combinación se adicionó 0.5% Tween 80 al caldo.

El procedimiento se realizó para cada cepa y asilamiento en presencia de antibiótico, aceite esencial y la mezcla de ambos. Cada tratamiento anteriormente mencionado se llevó a cabo a pH 7.4, a pH 6.5 y a pH 5. El ajuste del pH se realizó con HCl 1N como se indicó anteriormente.

Cada batería estuvo conformada por 5 tubos de vidrio conteniendo concentraciones del antimicrobiano en cuestión (antibiótico, aceite esencial o la combinación), correspondientes a 0.5 CIM, 1 CIM, 2 CIM, 4 CIM y 8 veces la CIM. Un sexto tubo, sin antimicrobiano, fue usado como control del crecimiento bacteriano.

El inóculo bacteriano se enfrentó a los antimicrobianos o al aceite esencial (por separado y/o combinados) a diferentes concentraciones y a determinados intervalos de tiempo (0, 2, 4, 8, 12 y 24 h). Se tomaron submuestras de cada uno de los tubos de las baterías y se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en placas de Petri con AMH. El inóculo inicial por tubo fue de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Las muestras tomadas a cada tiempo fueron diluidas en forma seriada según el crecimiento observado a modo de poder contabilizar entre 10 y 300 colonias por placa. Para ello, las submuestras se prepararon tomando 10  $\mu$ L de cada tubo y se diluyeron en 90  $\mu$ L de solución fisiológica estéril, a partir de esta primera dilución se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc) para luego sembrar en las placas 10  $\mu$ L de cada dilución a fin de poder realizar el conteo de colonias en la placa.

Cada placa se incubó a 35°C durante 24 hs. Transcurrido ese tiempo se procedió a realizar la lectura con el consiguiente conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) a fin de observar el efecto del antimicrobiano sobre la cepa o aislamiento analizado. El límite de detección para esta prueba fue de 10 UFC/mL de muestra.

### Preparación de tubos con antibióticos, aceite esencial y combinaciones de ambos

Los tubos en los que se evaluó la actividad antimicrobiana de los antibióticos (cloxacilina, rifaximina y eritromicina) se prepararon con un volumen final de 1 mL, conteniendo 800  $\mu$ L de CMH, 100  $\mu$ L de antibiótico a una concentración 10 veces mayor a la deseada en el tubo (se produce una dilución 1/10 en la carga) y 100  $\mu$ L de inóculo  $5 \times 10^6$  UFC/mL (finalmente se obtiene una concentración de  $5 \times 10^5$  UFC/mL). Las

concentraciones de cada antibiótico utilizadas en cada tubo se presentan en la tabla 2 (seleccionadas a partir de la determinación de la CIM en el punto 6). Las soluciones stock de antibiótico fueron preparadas según lo desarrollado en el punto 6.3, donde la cloxacilina y rifaximina fueron disueltas en metanol calidad HPLC y la eritromicina en etanol 95%. Luego fueron diluidas en CMH hasta alcanzar la concentración de carga de cada tubo (10 veces mayor a la final por tubo).

En el caso del aceite esencial, la cantidad de caldo utilizado en cada tubo dependió de la concentración deseada. Esto se debió a que la esencia se encuentra en estado líquido y se facilitó la preparación al no hacer una solución stock, sino adicionándolo directamente al tubo. Luego se agregó CHM al 0.5% en Tween 80 en un volumen necesario para obtener 900  $\mu$ L. Por último, se agregó el inóculo de igual forma que la utilizada para los antibióticos (100  $\mu$ L de inóculo  $5 \times 10^6$  UFC/mL) pero preparado en CHM al 0.5% en Tween 80. Las concentraciones 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM son aquellas obtenidas para en el punto II.7.

Finalmente, para las combinaciones aceite esencial/antibiótico se partió de aquellas combinaciones que arrojaron los menores valores de CFI, tomadas como valor CIM de las mezclas obtenidas en el punto 9. Para ello se prepararon 6 tubos con 1 mL de volumen final conteniendo la mezcla aceite esencial/antibiótico. Estos se corresponden con el control sin antimicrobianos; 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM de la mezcla. La preparación de los tubos se llevó a cabo cargando el volumen de aceite esencial necesario para obtener la concentración deseada en un volumen final de 1 mL. Luego, se agregó CMH al 0.5% en Tween 80 en cantidad necesaria para llegar a 800  $\mu$ L. Se agregaron 100  $\mu$ L correspondientes al antibiótico, nuevamente 10 veces más concentrado que lo que se deseaba en el tubo final. Las diluciones del antibiótico fueron preparadas en CMH al 0.5% en Tween 80 a partir de la solución stock correspondiente. Por último, se agregaron los 100  $\mu$ L de inóculo  $5 \times 10^6$  UFC/mL también preparado en CHM al 0.5% en Tween 80.

### Preparación del inóculo

El inóculo bacteriano de las cepas y aislamientos problema y de las cepas de referencia fue preparado de acuerdo al documento M26-A *Methods for determining bactericidal*

*activity of antimicrobial agents* (CLSI, 1999), incorporando a cada tubo de las baterías una concentración constante de UFC/mL.

Partiendo de una placa de agar de 24 hs, se tomó con ansa un promedio estimado de 2-4 colonias, de cada cepa o aislamiento en estudio, que luego se inocularon en un tubo de vidrio conteniendo 5 mL de solución fisiológica estéril comparando la turbidez con la escala 0.5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Posteriormente, se realizó una dilución 1:20 logrando una suspensión bacteriana de  $5 \times 10^6$  UFC/mL. De esta suspensión se inocularon 100  $\mu$ L en cada tubo a modo de lograr una concentración de  $5 \times 10^5$  UFC/mL en el tubo final, cuyo volumen final era de 1mL (se obtiene la última dilución 1/10 al sembrar el inóculo). El tubo 5 fue el único que contenía inóculo bacteriano sin antibiótico ni aceite esencial.

Los tubos fueron homogenizados por agitación antes de cada siembra con el fin de re-suspender las bacterias que quedasen adheridas a las paredes del mismo.

### Lectura e interpretación

La lectura de las placas se realizó contando las colonias (UFC) a ojo desnudo. Con los datos obtenidos corregidos por los factores de dilución, se graficó el logaritmo de las UFC en función del tiempo. Se consideró efecto bactericida del antimicrobiano (utilizado solo) cuando se logró una disminución de 3  $\text{Log}_{10}$  (99.9 % de muerte bacteriana) de UFC en el tiempo evaluado. Mientras que para evaluar el efecto sinérgico de la combinación aceite esencial/antibiótico, nos basamos en la CLSI que estipula que el efecto bactericida en una combinación sinérgica se manifiesta como una disminución de 2  $\text{Log}_{10}$  de UFC/mL.

### Evaluación del índice de actividad antibacteriana

El índice de actividad antibacteriana (E) se cuantificó como la diferencia entre los valores  $\text{Log}_{10}$  del número de bacterias viables (UFC/mL) al inicio (nt-0) y al final del ensayo (nt-24) según la siguiente ecuación:  $E = \text{nt-24} - \text{nt-0}$ .

Para evaluar E, se aplicaron tres puntos de corte teóricos (Sidhu et al., 2011): a) Efecto bacteriostático:  $E = 0$ ; no hay cambios en el valor de nt-0; b) Efecto bactericida:  $E = -3$ ; hay

reducción de  $\geq 3 \text{ Log}_{10}$  de nt-0 y c) Efecto de erradicación virtual de bacterias:  $E = -4$ ; hay reducción de  $\geq 4 \text{ Log}_{10}$  (99.99%) respecto del Log de nt-0.

Los resultados obtenidos fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism 6 a fin de obtener curvas  $E$  vs.  $\text{Log}_{10}$  (concentración del antibiótico).

### III. RESULTADOS

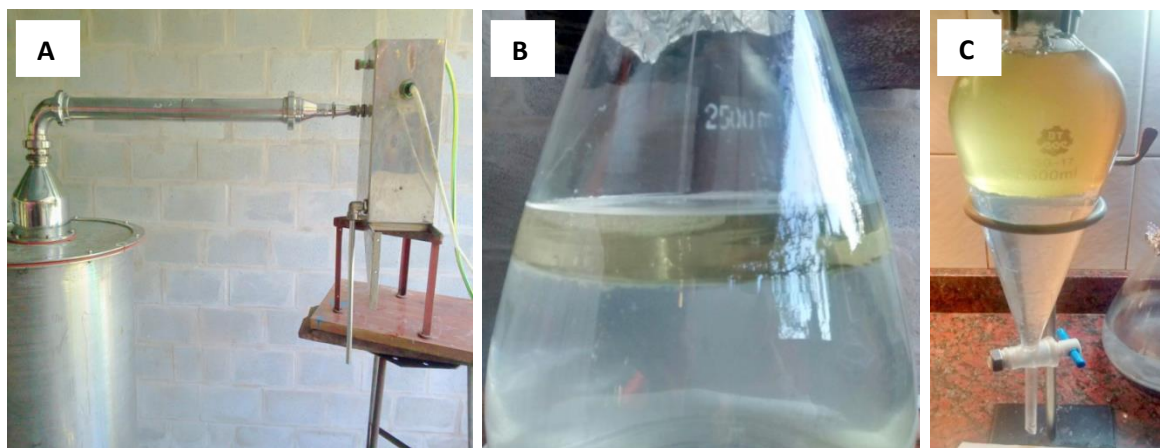
#### III.1. Extracción del aceite esencial de *M. armillaris*

Una pequeña porción del material vegetal (100 g) se reservó para determinar el rendimiento siguiendo las recomendaciones de la FA VII Ed. con un equipo Clevenger (Figura 8). Se obtuvo un rendimiento del 1.55% v/p.



**Figura 8.** Equipo Clevenger para determinar el rendimiento de extracción de *M. armillaris*.

La extracción de los 44.75 Kg de hojas y ramas herbáceas recolectados se llevó a cabo en un equipo especialmente diseñado (Figura 9A). Se utilizaron 38.5 litros de agua para la destilación y el proceso completo de destilado duró 5 horas, extrayéndose 550 mL de aceite esencial (Figura 9B). La esencia extraída fue separada del agua condensada mediante una ampolla de decantación (Figura 9C) y secada con cloruro de sodio anhidro. Luego del secado se filtró y se guardó en un frasco de vidrio color ambar en heladera a 4°C.



**Figura 9.** Equipo de destilación con producción de vapor *in situ* usado en la extracción del aceite esencial de *M. armillaris* (A). Aceite esencial obtenido en el proceso (B) y su separación (C).

### III.2. Caracterización del aceite esencial de *M. armillaris* obtenido

Una vez obtenido el aceite esencial se procedió a caracterizarlo fisicoquímicamente. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Aspecto a 20 °C: Líquido oleoso y límpido.
- Olor: Penetrante, muy fresco.
- Sabor: Amargo, astringente.
- Color: Amarillo pálido.
- Densidad (mediante uso de picnómetro): 0.89197 g/mL
- Solubilidad en aceite mineral (1:1): Soluble
- Solubilidad en agua (1:10): Parcialmente soluble
- Solubilidad en etanol 70% (1:1): Soluble
- Índice de acidez: 0.7824
- Índice de esterificación: 32.8526

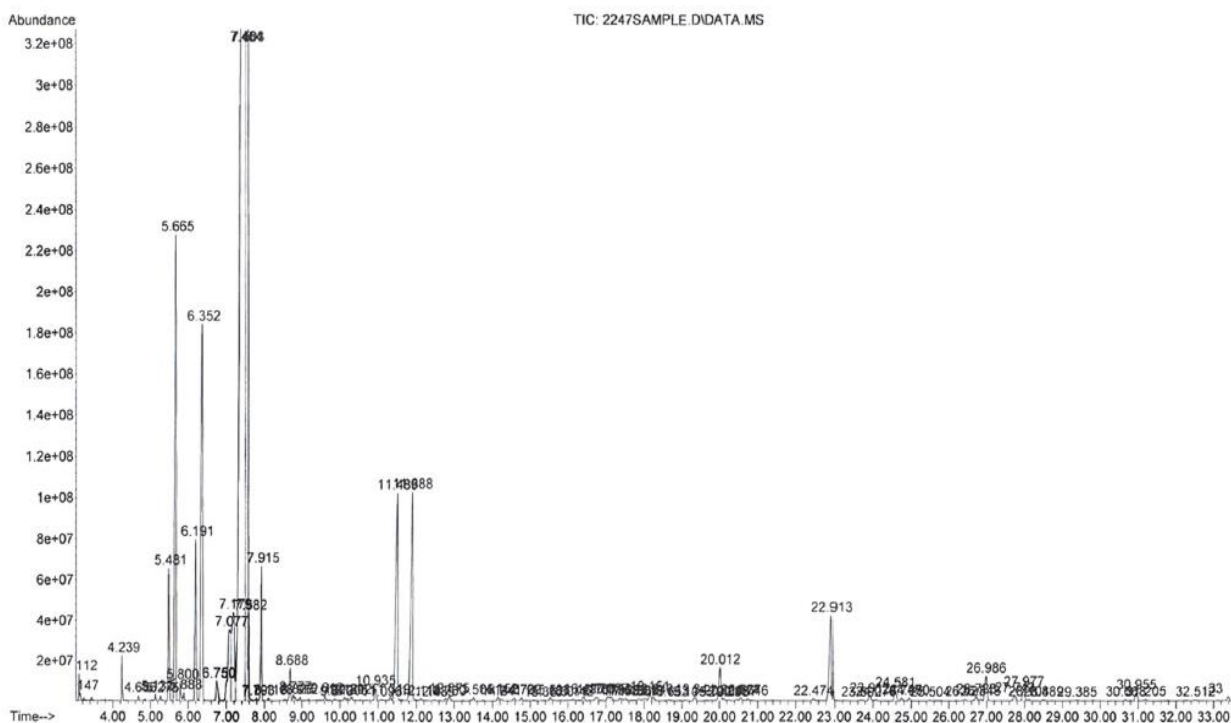
La composición del mismo se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa y con detector de ionización de llama (GC-FID-MS). En la tabla 3 se muestra la composición porcentual del aceite esencial resultante del análisis del

cromatograma obtenido (Figura 10). La suma total de los componentes encontrados da un 99.5%. Los resultados indican que el 1.8 cineol es el componente principal (72.3%), seguido de limoneno (7.8) y  $\alpha$ -pineno (6%).

**Tabla 3.** Composición porcentual del aceite esencial de *M. armillaris*.

COMPONENTE	NO POLAR	POLAR	COMPOSICIÓN PORCENTUAL
$\alpha$ -Tujeno	926	1036	1.5
$\alpha$ -Pineno	935	1043	6.0
Sabineno	968	1138	1.0
Myrceno	974	1170	2.2
$\beta$ -Pineno	979	1133	2.2
$\alpha$ -Phellandreno	1005	1191	0.1
$\alpha$ -Terpineno	1012	1206	0.2
P-Cimeno	1018	1286	1.4
1.8-Cineol	1022	1234	72.3
Limoneno	1024	1221	7.8
Trans- $\beta$ -Ocimeno	1032	1260	0.2
$\gamma$ -Terpineno	1047	1264	0.5
Terpinoleno	1082	1305	0.1
$\delta$ -Terpineol	1150	1674	0.1
Terpinen-4-ol	1164	1614	1.4
$\alpha$ -Terpineol	1172	1705	1.4
Geranyl acetato	1359	1760	0.2
$\beta$ -Caryophylleno	1417	1614	0.5
Aromandendreno	1437	1622	0.1
Geranyl isobutyrate	1496	1794	0.1
Cis-Calameneno	1508	1841	0.1
Oxi-Caryophylleno	1565	1989	0.1
<b>Total</b>			<b>99.5</b>

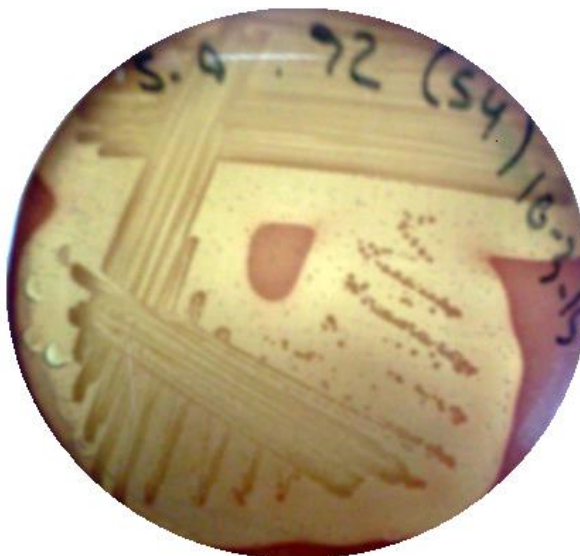




**Figura 10.** Cromatograma obtenido por cromatografía gaseosa con el detector de espectrometría de masas del aceite esencial de *M. armillaris*.

### III.3. Selección de cepas y aislamientos

El total de los 120 aislamientos y cepas de *S. aureus* existentes en el Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT) fueron nuevamente incubados a 35°C en AMH con 5% de sangre bovina por un periodo de 24 horas. También se incluyó la cepa SARM provista por el INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" (caracterizada en Egea *et al.*, 2014). Todas dieron lugar a la formación de colonias circulares de entre 1 y 3 mm de diámetro, de apariencia lisa, cremosa con un perfil convexo, bordes netos y coloración blanca amarillenta (Figura 11). Posteriormente, se repicaron en agar nutritivo para mantenerlas en heladera y luego llevar a cabo las pruebas de sensibilidad por antibiograma (Figura 12).



**Figura 11.** Aislamientos  $\beta$ -hemolíticos obtenidos.



**Figura 12.** Resultados de prueba de antibiograma por difusión en placa.

Los antimicrobianos probados para determinar la presencia de resistencia son los mencionados en el punto II.4.4. Se obtuvieron 8 aislamientos resistentes a penicilina, 1 a oxacilina, 4 a clindamicina, 4 a azitromicina, 1 a cefoxitina, 3 a tetraciclina y 3 a eritromicina. Para el resto de los antibióticos (cefoperazona, cefalexina, enrofloxacin,

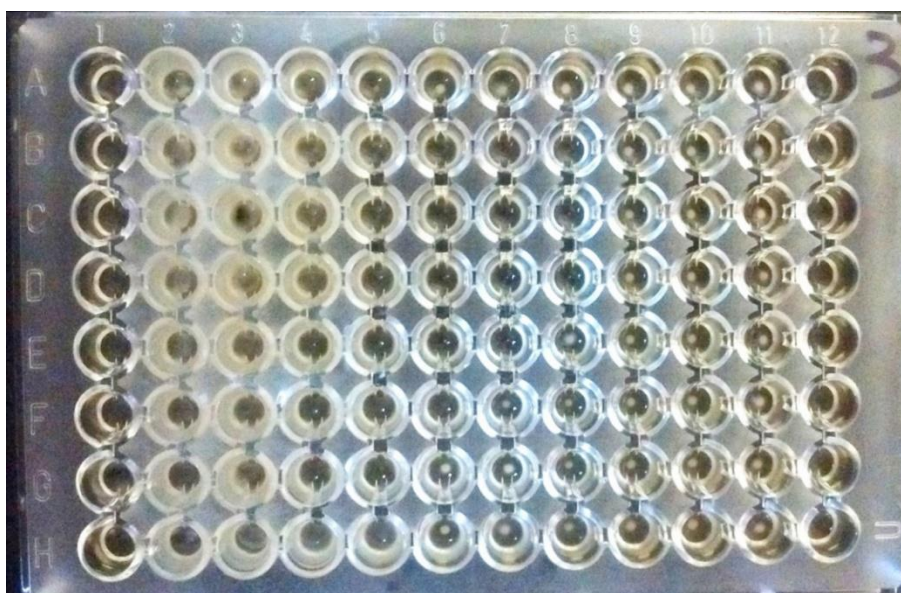
vancomicina, ciprofloxacina, gentamicina y rifampicina) todas las cepas presentaron como sensibles.

Luego de obtener los perfiles de sensibilidad de las cepas estudiadas se seleccionaron las cepas en base a los antibióticos con los que se deseaba trabajar:

- con sensibilidad a oxacilina (como marcador de cloxacilina), eritromicina y rifampicina (como marcador de rifaximina): 3 aislamientos (SA 13, SA 96 y SA 139).
- con sensibilidad disminuída a oxacilina (como marcador de cloxacilina): 1 cepa (SARM 5-I).
- con sensibilidad disminuída a eritromicina: 3 aislamientos (SA 78A, SA 79A y SA 86B).

#### III.4. Determinación de la CIM y CMB *in vitro* de cloxacilina, rifaximina, eritromicina y del aceite esencial frente a *S. aureus* a pH 7.4, 6.5 y 5.

Según mencionamos en el apartado Materiales y Métodos, se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a través de la prueba de microdilución en caldo empleando placas de microtitulación de 96 pocillos (Figura 13). Se evaluó la incidencia del pH en la sensibilidad de los microorganismos a los antibacterianos, determinando la CIM a pH 7.4, 6.5 y pH 5.0.



**Figura 13.** Placa de microtitulación para determinación de CIM.

### III.4.1. CIM del aceite esencial de *M. armillaris*

Los resultados obtenidos para la determinación de la CIM en microplaca se expresaron en  $\mu\text{L/mL}$  y se presentan en la tabla 4. Se puede observar un leve a moderado efecto de la acidez del medio en la potenciación de la esencia frente a las cepas y aislamientos de *S. aureus*. A pH 7.4 las cepas y aislamientos salvajes presentaron una CIM de 12.5  $\mu\text{L/mL}$ , mientras que para la cepa de referencia ATCC 29213 fue el doble.

**Tabla 4.** Resultado de CIM del aceite esencial a pH 7.4; 6.5 Y 5.0.

<b>CIM AE <i>Melaleuca armillaris</i></b>			
<b><i>S. aureus</i></b>	<b>CIM pH 7.4 (<math>\mu\text{L/mL}</math>)</b>	<b>CIM pH 6.5 (<math>\mu\text{L/mL}</math>)</b>	<b>CIM pH 5.0 (<math>\mu\text{L/mL}</math>)</b>
<b>ATCC 29213</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>12.5</b>
<b>SA 13</b>	<b>12.5</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>
<b>SA 96</b>	<b>12.5</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>
<b>SA 139</b>	<b>12.5</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>
<b>SARM 5-I</b>	<b>12.5</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>
<b>SA 78A</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>	<b>3.1</b>
<b>SA 79A</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>	<b>3.1</b>
<b>SA 86B</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>	<b>3.1</b>

La CBM para este aceite fue determinada a partir de los pocillos en los que no se desarrolló crecimiento y fue levemente superior a la CIM obtenida para las cepas y aislamientos tratados (Tabla 5). Del mismo modo, la acidificación del medio no ejerció mucho efecto sobre el parámetro bactericida pero mostró una tendencia a descender.

**Tabla 5.** Resultado de CBM del aceite esencial a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

<b>CBM AE <i>Melaleuca armillaris</i></b>			
<b><i>S. aureus</i></b>	<b>CBM pH 7.4 (μL/mL)</b>	<b>CBM pH 6.5 (μL/mL)</b>	<b>CBM pH 5.0 (μL/mL)</b>
<b>ATCC 29213</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>25</b>
<b>SA 13</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>
<b>SA 96</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>12.5</b>
<b>SA 139</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>12.5</b>
<b>SARM 5-I</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>12.5</b>
<b>SA 78A</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>	<b>3.1</b>
<b>SA 79A</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>	<b>3.1</b>
<b>SA 86B</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>	<b>3.1</b>

#### III.4.2. CIM de cloxacilina

Los resultados de CIM para la cloxacilina se muestran en la Tabla 6. El control de calidad fue realizado con la cepa de referencia ATCC 29213 y se utilizó como rango aceptable el indicado por la CLSI en su documento VET01-S2 (2013), el cual establece como aceptable el rango 0.12-0.5 μg/mL para la oxacilina (única penicilina antiestafilocócica que figuran en dicho documento). Se puede ver claramente como la acidificación del medio disminuye la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano. Esto es particularmente importante para la cepa meticilino resistente (SARM 5-I), para la cual la CIM desciende 128 veces a pH 5.0 respecto de la obtenida pH 7.4. En la Tabla 7 se exponen los resultados de CBM obtenidos para cloxacilina ensayada a los 3 pHs.

**Tabla 6.** Resultado de CIM de cloxacilina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CIM CLOXACILINA			
<i>S. aureus</i>	CIM pH 7.4 (µg/mL)	CIM pH 6.5 (µg/mL)	CIM pH 5.0 (µg/mL)
ATCC 29213	0.125	0.062	0.031
SA 13	0.5	0.125	0.031
SA 96	0.5	0.125	0.031
SA 139	0.5	0.125	0.0625
SARM 5-I	512	512	4

**Tabla 7.** Resultado de CBM de cloxacilina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CBM CLOXACILINA			
<i>S. aureus</i>	CBM pH 7.4 (µg/mL)	CBM pH 6.5 (µg/mL)	CBM pH 5.0 (µg/mL)
ATCC 29213	0.5	0.25	0.062
SA 13	1	0.25	0.062
SA 96	1	0.5	0.062
SA 139	1	0.25	0.125
SARM 5-I	>512	>512	8

#### III.4.3. CIM de rifaximina

En el caso de la rifaximina, al igual que para cloxacilina, tampoco se cuenta con valor de CIM de control de calidad. Se utilizó como referencia el rango indicado por la CLSI en su documento VET01-S2 (2013) para la rifampicina, el cual se establece en 0.004-0.016 µg/mL (única ansamicina que figura en dicho documento). El valor obtenido fue de 0.032 µg/mL, el cual es ligeramente superior al establecido para la rifampicina. La Tabla 8 presenta los resultados de CIM de rifaximina frente a las cepas y aislamientos seleccionados. La acidificación del medio produjo influencia en la concentración inhibitoria, el valor de CIM se mantuvo en los valores de pH estudiados.

**Tabla 8.** Resultado de CIM de rifaximina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CIM RIFAXIMINA			
<i>S. aureus</i>	CIM pH 7.4 (µg/mL)	CIM pH 6.5 (µg/mL)	CIM pH 5.0 (µg/mL)
ATCC 29213	0.032	0.032	0.032
SA 13	0.032	0.032	0.032
SA 96	0.032	0.032	0.032
SA 139	0.032	0.032	0.032

En cuanto a la CBM de rifaximina se observó que los valores fueron superiores a la CIM obtenida para este antibiótico. Si bien el parámetro de inhibición no se modificó con la acidez, si lo hace la concentración bactericida, particularmente a pH 5.0.

**Tabla 9.** Resultado de CBM de rifaximina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CBM RIFAXIMINA			
<i>S. aureus</i>	CBM pH 7.4 (µg/mL)	CBM pH 6.5 (µg/mL)	CBM pH 5.0 (µg/mL)
ATCC 29213	0.512	0.512	0.064
SA 13	0.512	0.512	0.128
SA 96	0.512	0.512	0.128
SA 139	0.512	0.512	0.128

#### III.4.4. CIM de eritromicina

En el caso de la eritromicina se obtuvo para la cepa de referencia ATCC 29213 un valor de acuerdo con el rango establecido por la CLSI (2013) en su documento VET01-S2 (0.25-1 µg/mL) a pH 7.4. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10. Se observa que los valores de CIM aumentan al acidificar el medio.



**Tabla 10.** Resultado de CIM de eritromicina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CIM ERITROMICINA			
<i>S. aureus</i>	CIM pH 7.4 (µg/mL)	CIM pH 6.5 (µg/mL)	CIM pH 5.0 (µg/mL)
ATCC 29213	0.5	1	8
SA 13	0.5	1	8
SA 96	0.5	1	8
SA 139	0.5	1	8
SA 78A	1024	>1024	>1024
SA 79A	1024	>1024	>1024
SA 86B	1024	>1024	>1024

El efecto de la acidez sobre la actividad de eritromicina frente a *S. aureus* también se observa en la CBM (Tabla 11). Las concentraciones bactericidas encontradas fueron muy elevadas, tanto para cepas y aislamientos sensibles (ATCC 29213, SA 13, SA 96 y SA 139) como resistentes (SA 78A, SA 79A y SA 86B).

**Tabla 11.** Resultado de CBM de eritromicina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

CBM ERITROMICINA			
<i>S. aureus</i>	CBM pH 7.4 (µg/mL)	CBM pH 6.5 (µg/mL)	CBM pH 5.0 (µg/mL)
ATCC 29213	32	256	>256
SA 13	32	256	>256
SA 96	32	256	>256
SA 139	32	256	>256
SA 78A	>1024	>1024	>1024
SA 79A	>1024	>1024	>1024
SA 86B	>1024	>1024	>1024



### **III.5. Determinación de la CIM *in vitro* de la combinación de los diferentes antimicrobianos con el aceite esencial frente a *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.**

#### **III.5.1. Combinaciones aceite esencial y cloxacilina**

Luego de combinar el aceite esencial y cloxacilina a los valores de pH mencionados se puede observar la disminución de la concentración de antibiótico necesaria para lograr la inhibición bacteriana, tal como se muestra en la Tabla 12. La presencia del extracto vegetal en contacto con cloxacilina genera un efecto principalmente de sinergismo parcial a pH 7.4 para las cepas y aislamientos analizados; sinergismo a pH 6.5 para la cepa de referencia con indiferencia para las cepas salvajes; y por último, sinergismo para la cepa de referencia y sinergismo parcial para las salvajes a pH 5. Aquí se puede observar como la acidez del medio mejora la actividad del antibiótico, y esta, a su vez, incrementa su actividad aún más en presencia del aceite esencial, manteniendo la interacción sinérgica al descender el pH.

En base a los resultados obtenidos en las pruebas de sinergismo mediante tablero de damas se seleccionaron las combinaciones que presentaron valores de CFI menores para luego evaluarlos en los ensayos de curva de muerte bacteriana (Tabla 13).

#### **III.5.2. Combinaciones aceite esencial y rifaximina**

Al combinar aceite esencial de *M. armillaris* con rifaximina a pH 7.4, 6.5 y 5.0 se puede observar la disminución de la concentración de antibiótico necesaria para lograr la inhibición bacteriana, tal como se muestra en la Tabla 14. A pH 7.4 se obtuvieron combinaciones con sinergismo parcial. Con la acidificación del medio se lograron obtener combinaciones que presentaban sinergismo, siendo más evidente a pH 5.0. Fueron seleccionadas aquellas combinaciones con menores valores de CFI para cada cepa y aislamiento y pH (Tabla 15) para luego trabajar en la construcción de curvas de muerte bacteriana.

### **III.5.3. Combinaciones aceite esencial y eritromicina**

En el caso de las combinaciones del aceite esencial con eritromicina la situación fue diferente a la de los antibióticos anteriores. La CIM de este macrólido aumenta al acidificar el medio (Tabla 16). En cuanto a las combinaciones, se lograron obtener mezclas que presentan sinergismo parcial a los 3 valores de pH, pero en éstas la cantidad de aceite esencial no logró compensar la pérdida de actividad del antibiótico por la acidez del medio. De este modo, en las combinaciones obtenidas también se produjo un incremento en la concentración de la eritromicina a pHs más bajos. Al igual que en los casos anteriores, se seleccionaron las mezclas con valores de CFI menores (Tabla 17).

**Tabla 12.** Resultado de prueba de sinergismo de combinaciones aceite esencial/cloxacilina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	AE (μL/mL)	CLOX (μg/mL)	AE/CLOX (μL/mL/ μg/mL)	CFI	AE (μL/mL)	CLOX (μg/mL)	AE/CLOX (μL/mL/ μg/mL)	CFI	AE (μL/mL)	CLOX (μg/mL)	AE/CLOX (μL/mL/ μg/mL)	CFI
ATCC 29213	25	0.125	12.5/0.031 25/0.062 25/0.031	0.75 1.50 1.25	25	0.062	6.25/0.031 6.25/0.015 6.25/0.007	0.75 0.49 0.36	12.5	0.031	3.1/0.007 3.1/0.0035 6.25/0.0016	0.47 0.36 0.55
SA 13	12.5	0.5	6.25/0.125 3.12/0.25 6.25/0.25	0.75 0.75 1.00	12.5	0.125	12.5/0.062 12.5/0.031 12.5/0.016	1.50 1.25 1.12	6.25	0.031	3.1/0.015 3.1/0.007 3.1/0.0035	0.98 0.73 0.61
SA 139	12.5	0.5	6.25/0.125 6.25/0.062 12.5/0.031	0.75 0.62 1.06	12.5	0.125	12.5/0.062 12.5/0.031 12.5/ 0.016	1.50 1.25 1.12	6.25	0.031	3.1/0.015 3.1/0.007 3.1/0.0035	0.98 0.73 0.61
SA 96	12.5	0.5	6.25/0.125 3.12/0.25 6.25/0.25	0.75 0.75 1.00	12.5	0.125	12.5/0.062 12.5/0.031 12.5/ 0.016	1.50 1.25 1.12	6.25	0.031	3.1/0.015 3.1/0.007 3.1/0.0035	0.98 0.73 0.61
SARM 5-I	12.5	512	6.25/64 6.25/32 6.25/16	0.62 0.56 0.53	12.5	512	6.25/64 6.25/32 6.25/16	0.62 0.56 0.53	6.25	4	3.1/1 3.1/0.5 1.6/1	0.75 0.63 0.53

**Tabla 13.** Combinaciones aceite esencial/ cloxacilina elegidas para ensayo de curva de muerte bacteriana.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	CIM AE μL/mL	CIM CLOX μg/mL	CIM AE/CLOX (μL/mL)/(μg/mL)	CFI	CIM AE μL/mL	CIM CLOX μg/mL	CIM AE/CLOX (μL/mL)/(μg/mL)	CFI	CIM AE μL/mL	CIM CLOX μg/mL	CIM AE/CLOX (μL/mL)/(μg/mL)	CFI
ATCC 29213	25	0.125	12.5/0.031	0.75	25	0.062	6.25/0.007	0.36	12.5	0.031	3.1/0.0035	0.36
SA 13	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.016	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
SA 96	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.016	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
SA 139	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.016	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
SARM 5-I	12.5	512	6.25/16	0.53	12.5	512	6.25/16	0.53	6.25	4	1.6/1	0.53

**Tabla 14.** Resultado de prueba de sinergismo de combinaciones aceite esencial/rifaximina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	AE (μL/mL)	RIF (μg/mL)	AE/RIF (μL/mL/ μg/mL)	CFI	AE (μL/mL)	RIF (μg/mL)	AE/RIF (μL/mL/ μg/mL)	CFI	AE (μL/mL)	RIF (μg/mL)	AE/RIF (μL/mL/ μg/mL)	CFI
ATCC 29213	25	0.032	12.5/0.008	0.75	25	0.032	6.25/0.016	0.75	12.5	0.032	3.1/0.016	0.76
			12.5/0.004	0.63			6.25/0.008	0.51			3.1/0.008	0.51
			12.5/0.002	0.56			6.25/0.004	0.37			3.1/0.004	0.38
SA 13	12.5	0.032	6.25/0.008	0.75	12.5	0.032	3.1/0.016	0.76	6.25	0.032	1.6/0.016	0.76
			6.25/0.004	0.63			3.1/0.008	0.50			1.6/0.008	0.51
			6.25/0.002	0.56							1.6/0.004	0.38
SA 96	12.5	0.032	6.25/0.008	0.75	12.5	0.032	3.1/0.016	0.76	6.25	0.032	1.6/0.016	0.76
			6.25/0.004	0.63			3.1/0.008	0.50			1.6/0.008	0.51
			6.25/0.002	0.56							1.6/0.004	0.38
SA 139	12.5	0.032	6.25/0.008	0.75	12.5	0.032	3.1/0.016	0.76	6.25	0.032	1.6/0.016	0.76
			6.25/0.004	0.63			3.1/0.008	0.50			1.6/0.008	0.51
			6.25/0.002	0.56							1.6/0.004	0.38

**Tabla 15.** Combinaciones aceite esencial/rifaximina elegidas para ensayo de curva de muerte bacteriana.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	CIM AE μL/mL	CIM RIF μg/mL	CIM AE/RIF (μL/mL)/(μg/mL)	CFI	CIM AE μL/mL	CIM RIF μg/mL	CIM AE/RIF (μL/mL)/(μg/mL)	CFI	CIM AE μL/mL	CIM RIF μg/mL	CIM AE/RIF (μL/mL)/(μg/mL)	CFI
ATCC 29213	25	0.032	12.5/0.002	0.56	25	0.032	6.25/0.004	0.37	12.5	0.032	3.1/0.004	0.38
SA 13	12.5	0.032	6.25/0.002	0.56	12.5	0.032	3.1/0.008	0.50	6.25	0.032	1.6/0.004	0.38
SA 96	12.5	0.032	6.25/0.002	0.56	12.5	0.032	3.1/0.008	0.50	6.25	0.032	1.6/0.004	0.38
SA 139	12.5	0.032	6.25/0.002	0.56	12.5	0.032	3.1/0.008	0.50	6.25	0.032	1.6/0.004	0.38

**Tabla 16.** Resultado de prueba de sinergismo de combinaciones aceite esencial/eritromicina a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	AE (μL/mL)	ERI (μg/mL)	AE/ERI (μL/mL/ μg/mL)	CFI	AE (μL/mL)	ERI (μg/mL)	AE/ERI (μL/mL/ μg/mL)	CFI	AE (μL/mL)	ERI (μg/mL)	AE/ERI (μL/mL/ μg/mL)	CFI
ATCC 29213	25	0.5	12.5/0.5 12.5/0.125 6.25/0.25	1 0.75 0.75	25	1	3.1/0.25 1.6/0.5	0.37 0.62	12.5	8	6,25/4 6.25/2 6.25/1 3.1/2	1 0.75 0.62 0.50
SA 13	12.5	0.5	6.25/0.25 6.25/0.125	1 0.75	12.5	1	3.1/0.25 1.6/0.5	0.5 0.62	6.25	8	3.1/2 3.1/4	0.75 1
SA 96	12.5	0.5	6.25/0.25 6.25/0.125	1 0.75	12.5	1	3.1/0.25 1.6/0.5	0.5 0.62	6.25	8	3.1/2 3.1/4	0.75 1
SA 139	12.5	0.5	6.25/0.25 6.25/0.125	1 0.75	12.5	1	3.1/0.25 1.6/0.5	0.5 0.62	6.25	8	3.1/2 3.1/4	0.75 1
SA 78A	12.5	1024	6.25/256 6.25/128 6.25/64	0.75 0.62 0.56	6.25	>1024	3.1/512 3.1/256 3.1/128	<1 <0.75 <0.62	3.1	>1024	1.6/512 1.6/256 1.6/128	<1 <0.75 <0.62
SA 79A	12.5	1024	6.25/256 6.25/128 6.25/64	0.75 0.62 0.56	6.25	>1024	3.1/512 3.1/256 3.1/128	<1 <0.75 <0.62	3.1	>1024	1.6/512 1.6/256 1.6/128	<1 <0.75 <0.62
SA 86B	12.5	1024	6.25/256 6.25/128 6.25/64	0.75 0.62 0.56	6.25	>1024	3.1/512 3.1/256 3.1/128	<1 <0.75 <0.62	3.1	>1024	1.6/512 1.6/256 1.6/128	<1 <0.75 <0.62

**Tabla 17.** Combinaciones aceite esencial/eritromicina elegidas para el ensayo de curva de muerte bacteriana.

	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	CIM AE μL/mL	CIM ERI μg/mL	CIM AE/ERI (μL/mL)/(μg/mL)	CFI	CIM AE μL/mL	CIM ERI μg/mL	CIM AE/ERI (μL/mL)/(μg/mL)	CFI	CIM AE μL/mL	CIM ERI μg/mL	CIM AE/ERI (μL/mL)/(μg/mL)	CFI
<i>S. aureus</i>												
ATCC 29213	25	0.5	12.5/0.125	0.75	25	1	3.1/0.25	0.37	12.5	8	3.1/2	0.5
SA 13	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
SA 96	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
SA 139	12.5	0.5	6.25/125	0.75	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
SA 78A	12.5	1024	6.25/64	0.56	6.25	>1024	3.1/128	>0.62	3.1	>1024	1.5/128	>0.62
SA 79A	12.5	1024	6.25/64	0.56	6.25	>1024	3.1/128	>0.62	3.1	>1024	1.5/128	>0.62
SA 86B	12.5	1024	6.25/64	0.56	6.25	>1024	3.1/128	>0.62	3.1	>1024	1.5/128	>0.62

### III.6. Ensayo de curva de muerte bacteriana

Luego de evaluar las concentraciones inhibitorias del aceite esencial, de los antibióticos seleccionados y de sus mezclas, realizamos la construcción de las curvas muerte bacteriana. Este es un método cinético que permite evidenciar el poder bactericida de un antibacteriano. Se valoró la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de los antimicrobianos en estudio, en forma aislada y combinada con el aceite esencial. La curva de muerte bacteriana es un método complementario de la concentración bactericida mínima.

Se enfrentó un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en caldo. Las concentraciones utilizadas fueron 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM, más un control sin antimicrobianos. Se realizó recuento de colonias a los siguientes tiempos: 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas, los que fueron expresados en logaritmo de unidades formadoras de colonia ( $\text{Log}_{10}$  UFC). El poder bactericida se establece con la caída de 3 logaritmos decimales en un tiempo determinado.

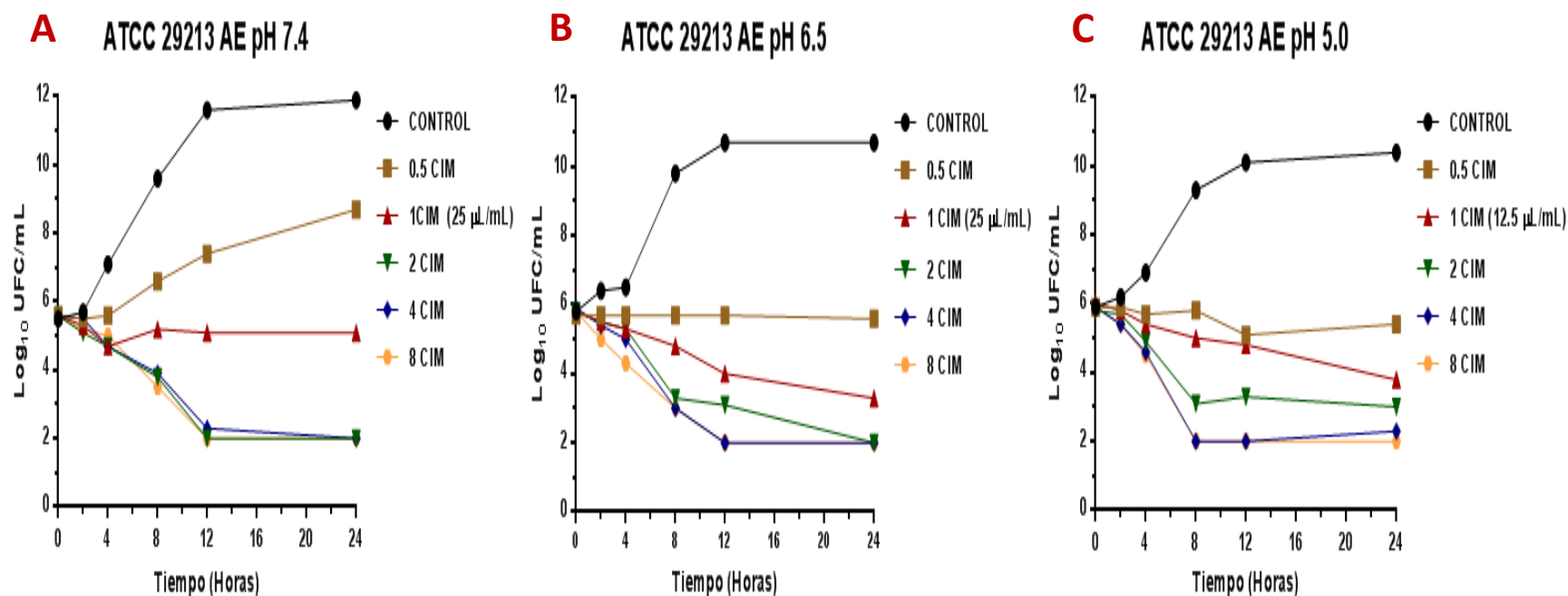
Cuando una población microbiana se expone a un agente letal, la cinética de la muerte es casi siempre exponencial ya que el número de sobrevivientes disminuye de forma geométrica con el tiempo. Si representamos gráficamente el logaritmo del número de sobrevivientes frente al tiempo, se obtiene una línea recta cuya pendiente negativa define la tasa de mortalidad. Esta tasa de mortalidad nos da una idea de la fracción de la población inicial que sobrevive durante un determinado período de tratamiento. Para determinar el número real de sobrevivientes es necesario conocer además el tamaño inicial de la población.

A continuación se presentan los análisis de las curvas de muerte bacteriana realizadas a las cepas y aislamientos de *S. aureus* salvajes seleccionadas y utilizadas en las pruebas de determinación de CIM y sinergismo en comparación con *S. aureus* ATCC 29213 (cepa de referencia), frente a cada uno de los tres antimicrobianos en estudio y sus combinaciones a pH 7.4, 6.5 y 5.0.

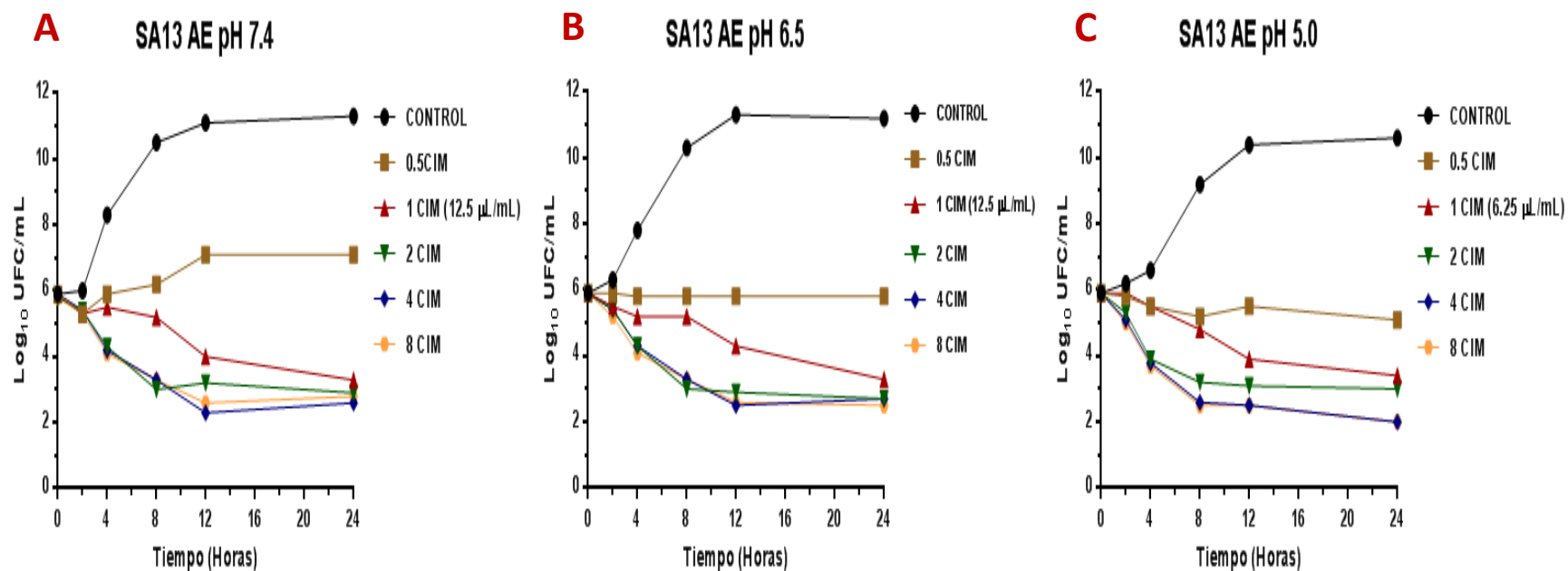
### **III.6.1. Aceite esencial**

Las Figuras 14 a 21 presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos y cepas de *S. aureus* seleccionados (n=7), como así también de la cepa de referencia ATCC 29213 frente a diferentes CIMs del aceite esencial a pH 7.4, 6.5 y 5.0 en CMH con 0.5% de Tween 80.

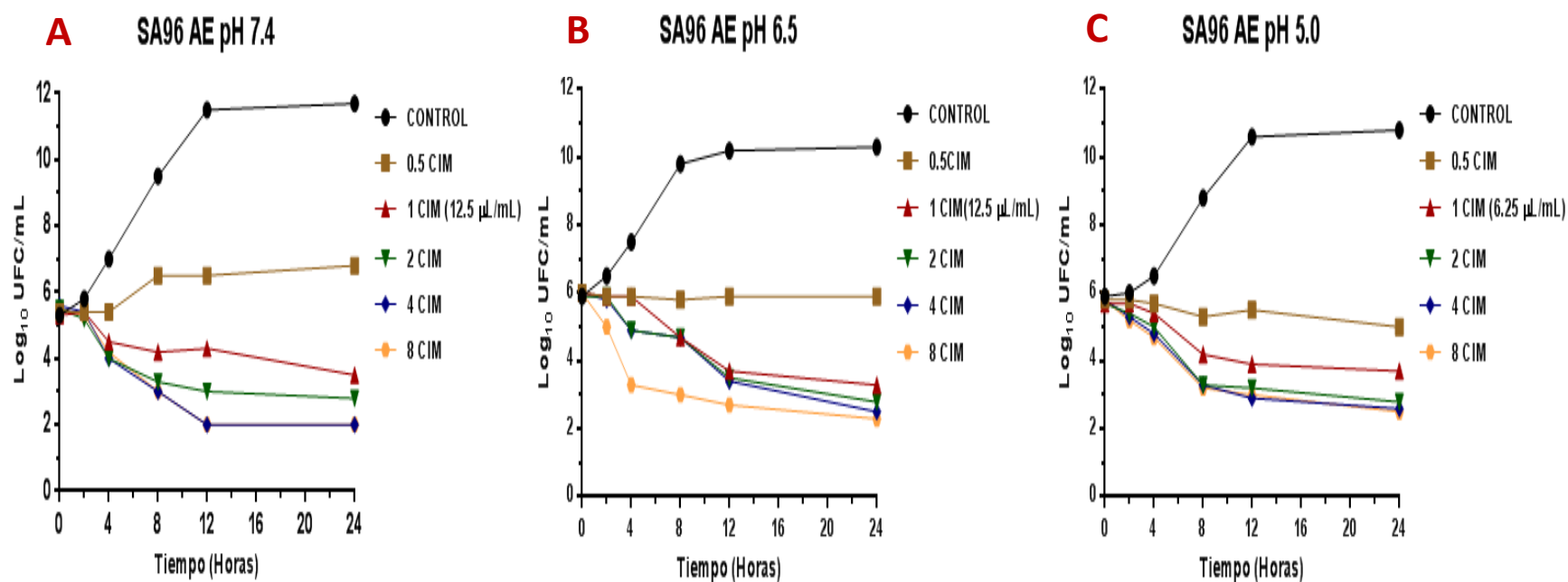




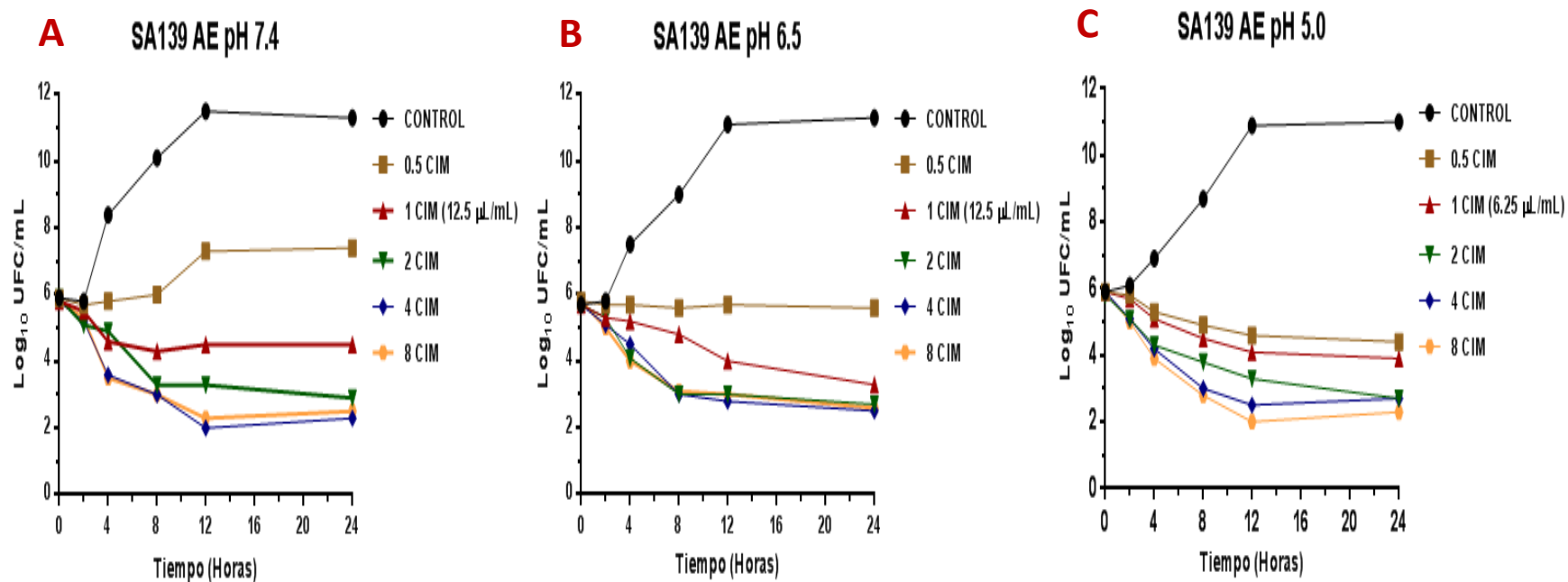
**Figura 14.** Curvas de muerte bacteriana para el aceite esencial de *M. armillaris* (AE) frente a la cepa de referencia ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



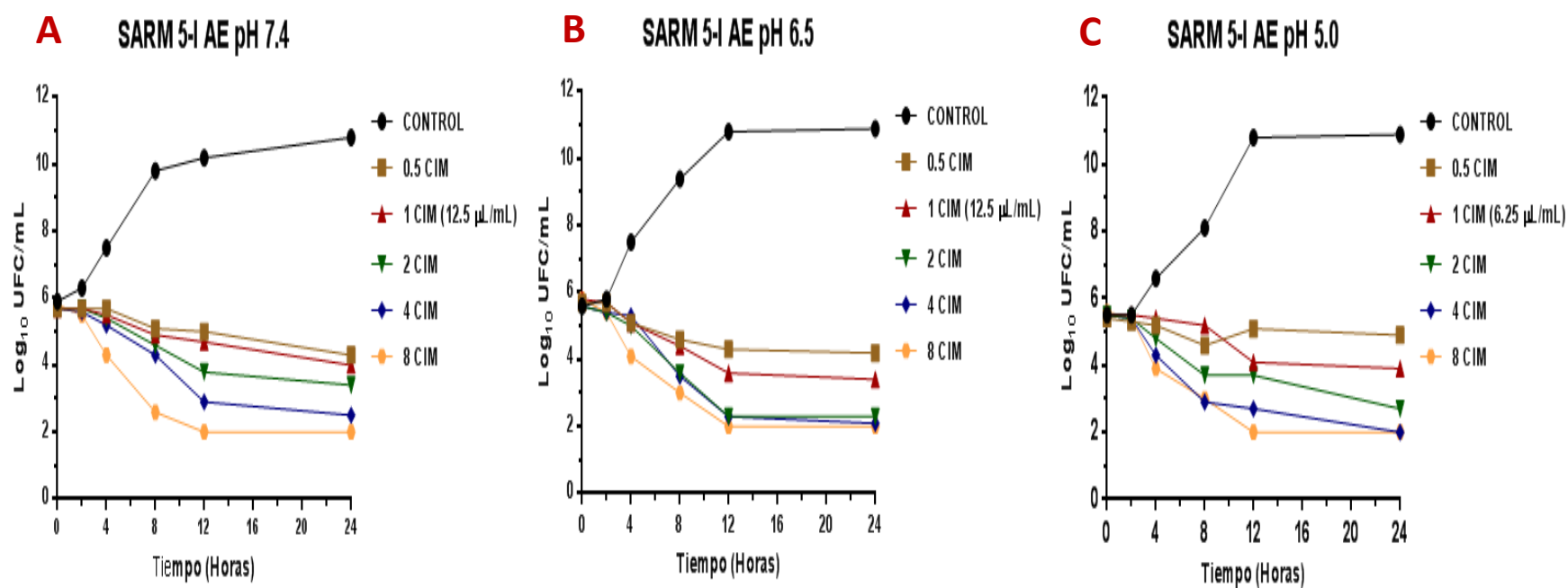
**Figura 15.** Curvas de muerte bacteriana para el aceite esencial de *M. armillaris* (AE) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



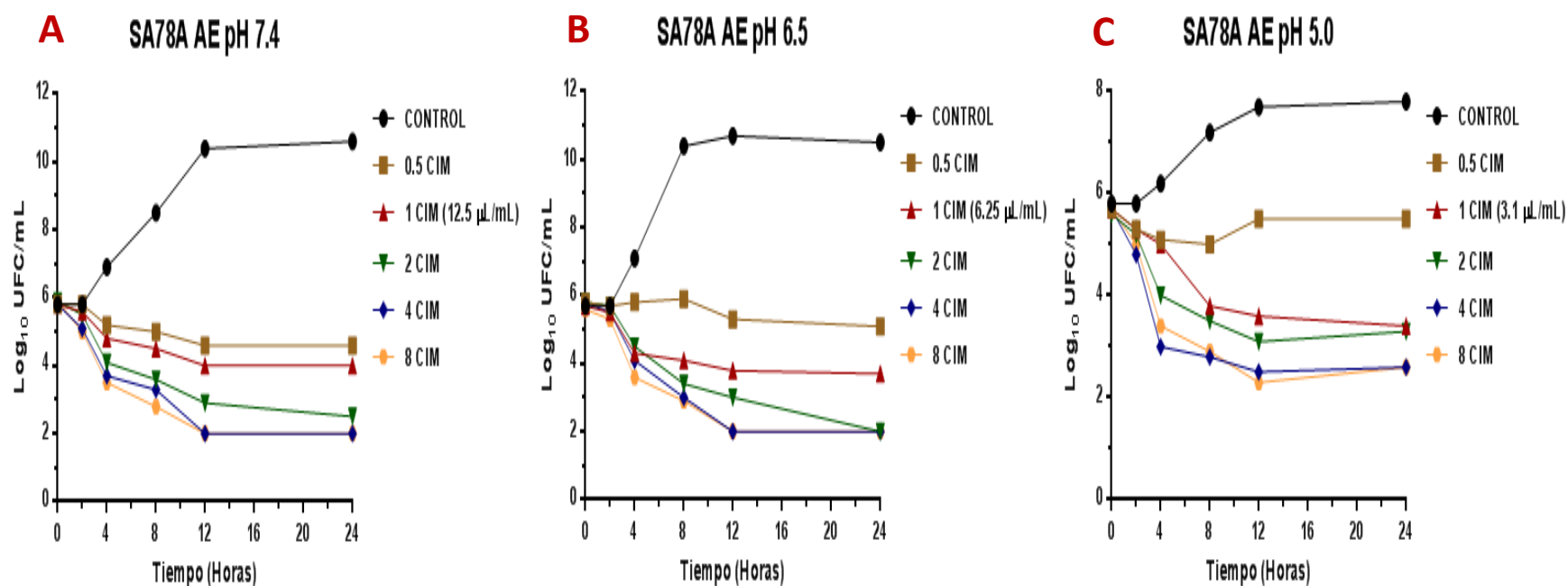
**Figura 16.** Curvas de muerte bacteriana para el aceite esencial de *M. armillaris* (AE) frente SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



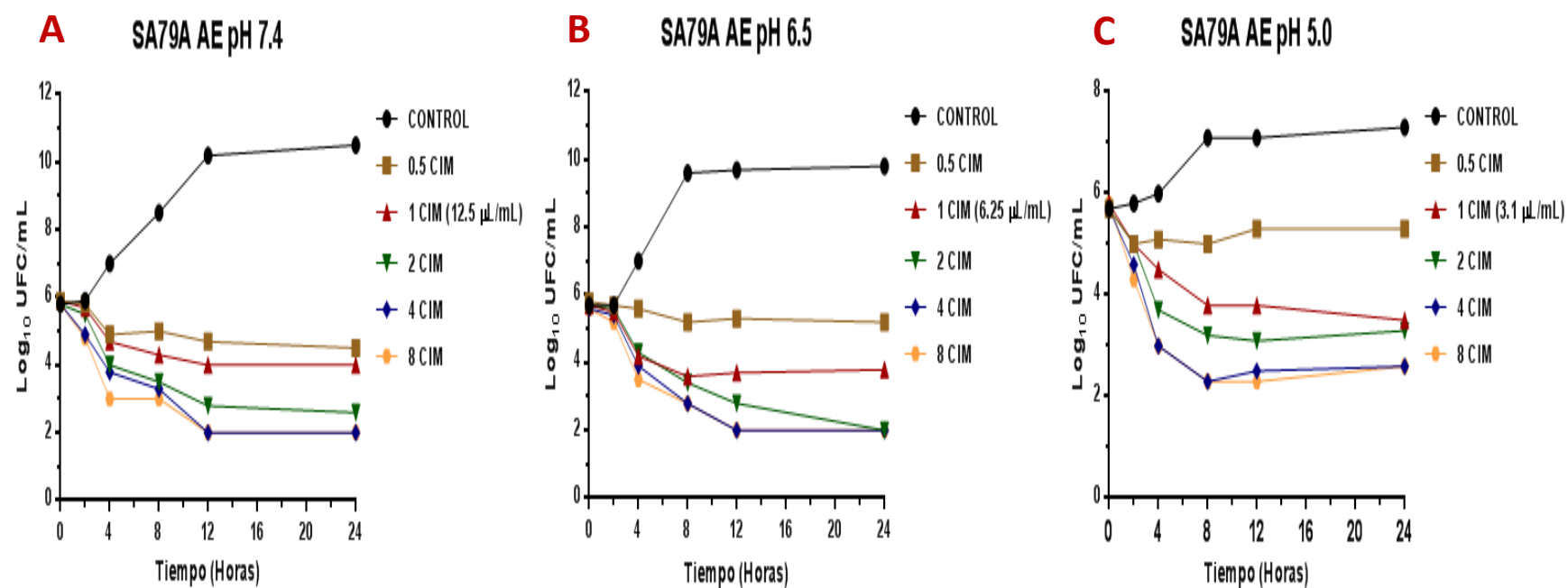
**Figura 17.** Curvas de muerte bacteriana para el aceite esencial de *M. armillaris* (AE) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



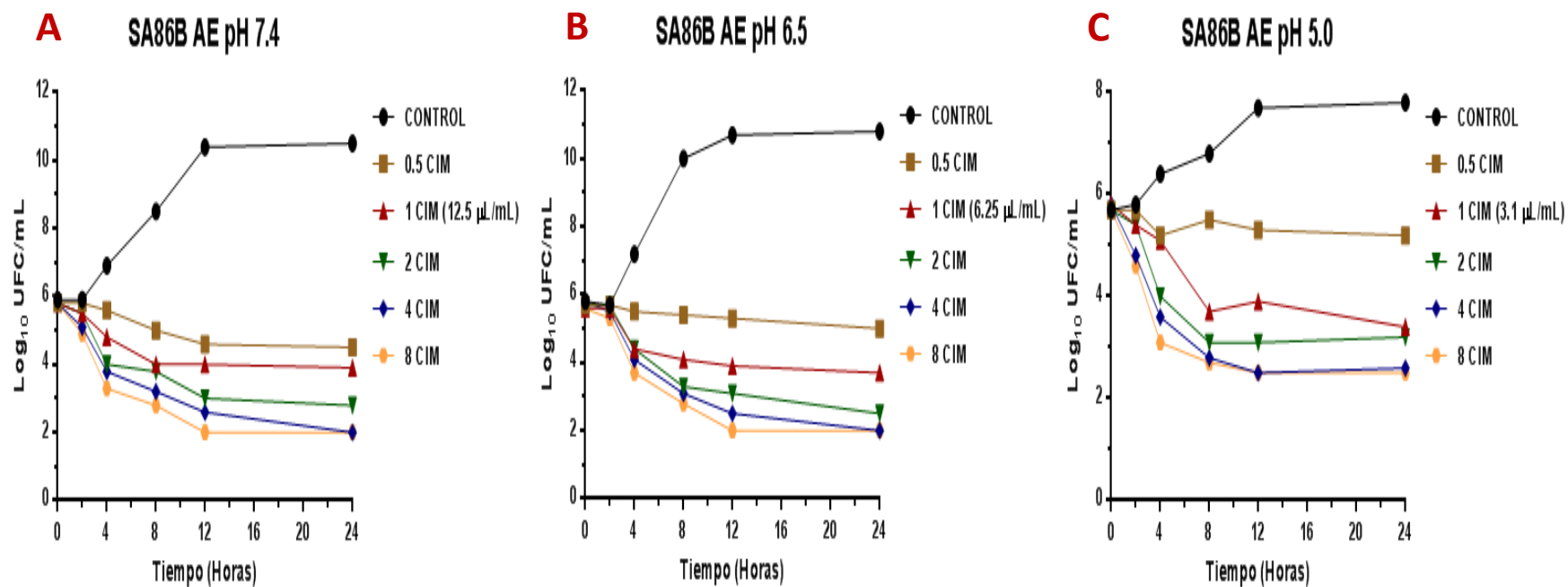
**Figura 18.** Curvas de muerte bacteriana para el aceite esencial de *M. armillaris* (AE) frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 19.** Curvas de muerte bacteriana para el aceite esencial de *M. armillaris* (AE) frente a SA78A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 20.** Curvas de muerte bacteriana para el aceite esencial de *M. armillaris* (AE) frente a SA79A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 21.** Curvas de muerte bacteriana para el aceite esencial de *M. armillaris* (AE) frente a SA86B a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

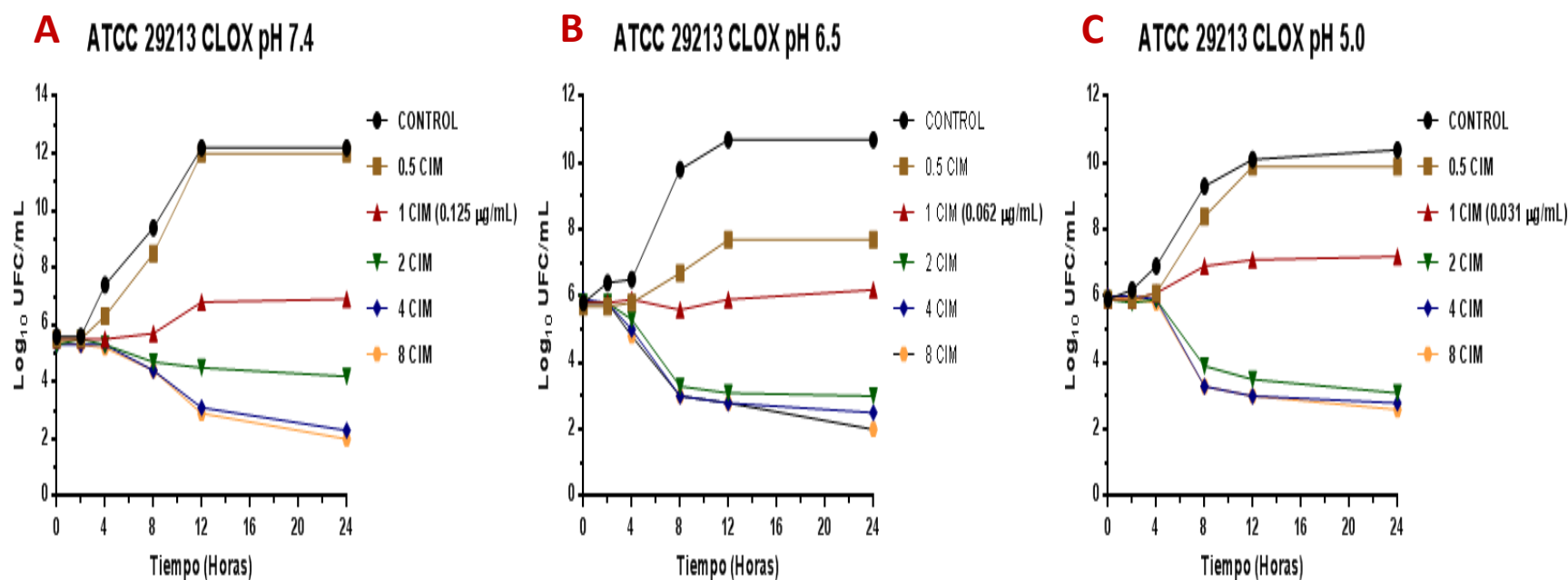


### III.6.2. Cloxacilina y combinaciones con aceite esencial

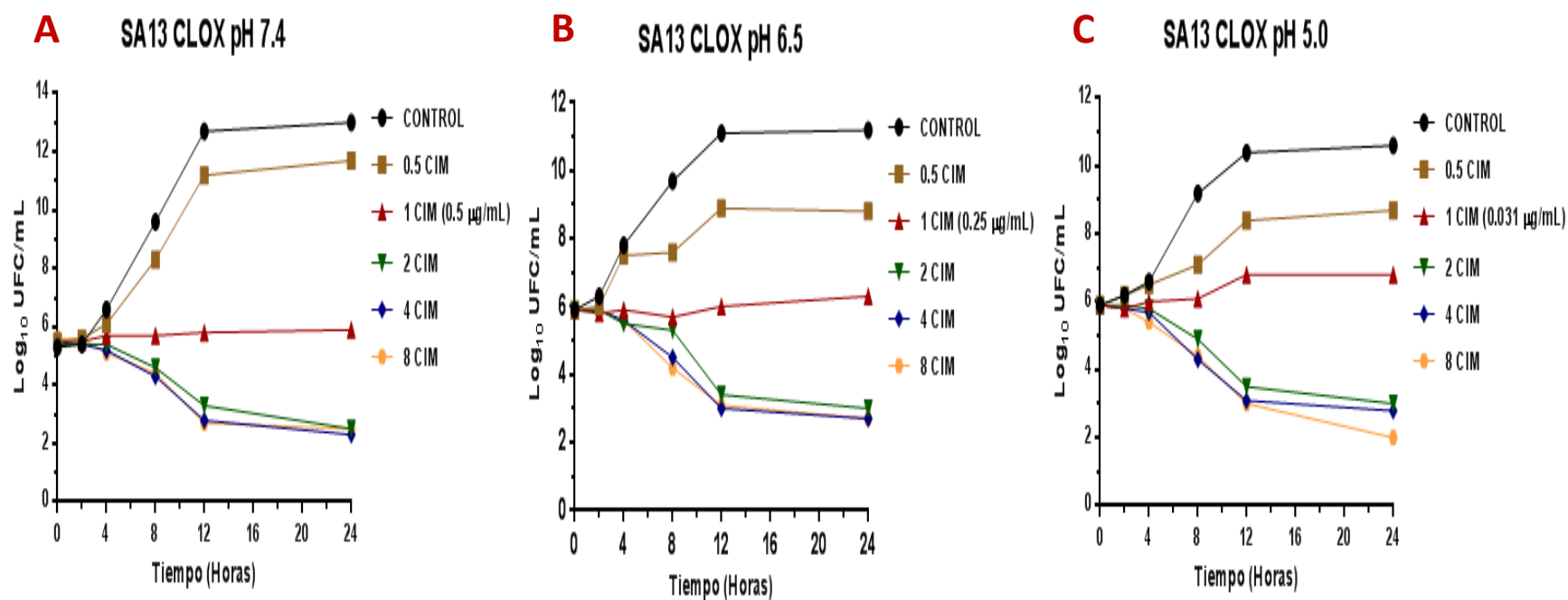
Las Figuras 22 a 26 presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos de *S. aureus* frente a cloxacilina a pH 7.4, 6.5 y 5.0 en CMH. Los microorganismos utilizadas fueron 3 sensibles (SA13, SA96 y SA139), una resistente (SARM 5-I) y la cepa de referencia ATCC 29213.

En base a los resultados de las pruebas de sinergismo entre el aceite esencial y cloxacilina mencionados en el punto III.5.1 se construyeron las curvas de muerte bacteriana. Los valores de CIM tomados para las mezclas fueron aquellos que presentaron mayor sinergismo, es decir menores valores de CFI. Estos se presentan en la Tabla 13 de la sección III.5.1.

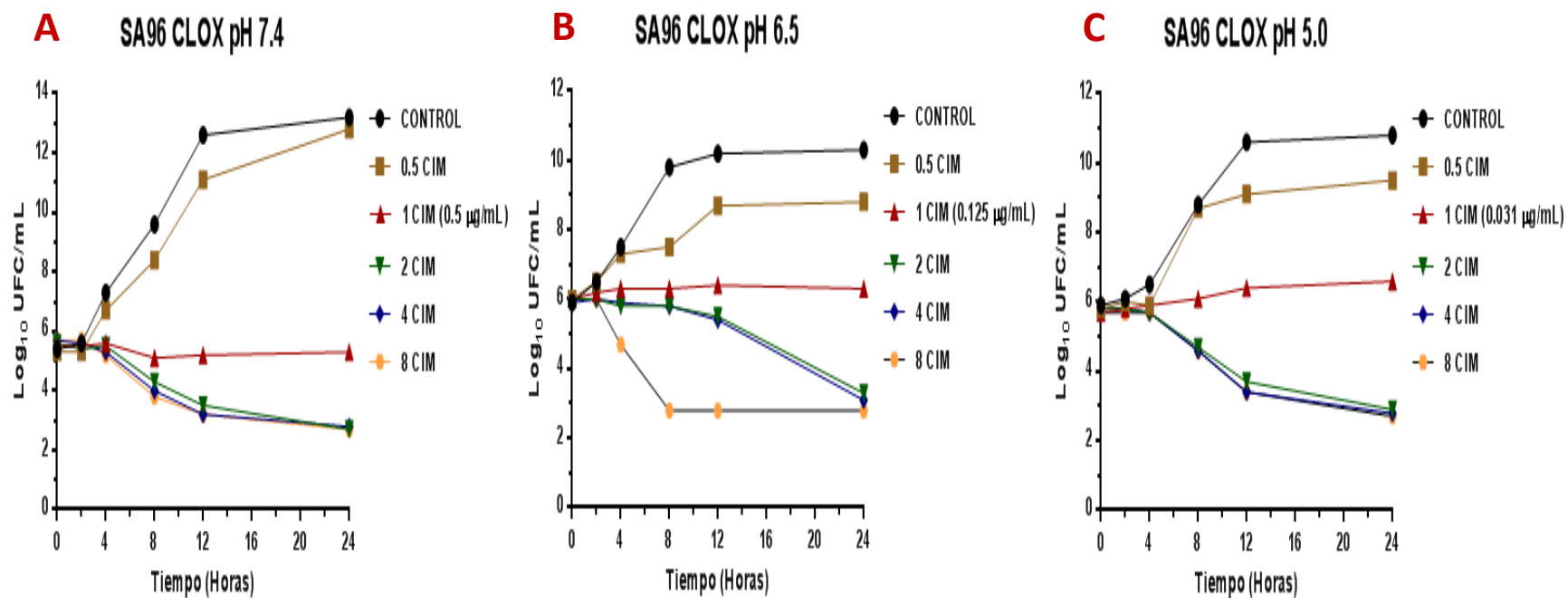
La proporción aceite esencial/cloxacilina obtenida como CIM se mantuvo para obtener las correspondientes a 0.5CIM, 2CIM, 4CIM y 8CIM. Estas curvas también se construyeron a pH 7.4, 6.5 y 5.0 en CMH al 0.5% Tween 80 y se muestran en las Figuras 27 a 31.



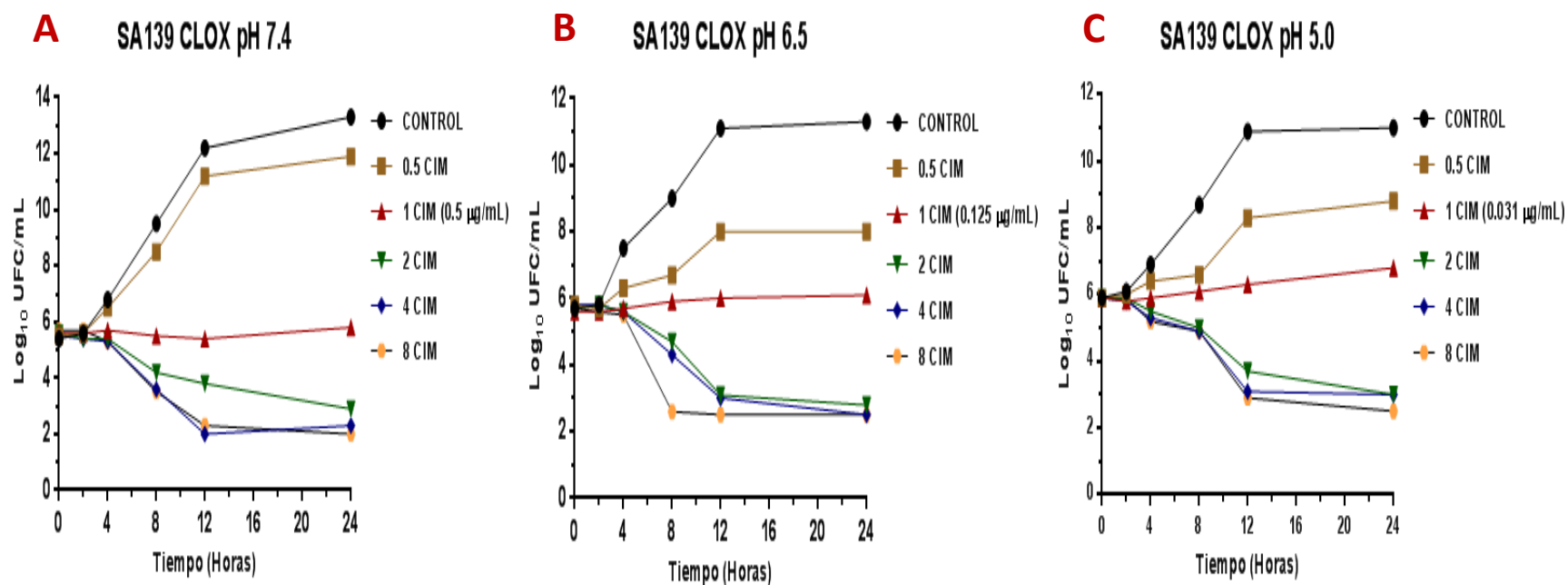
**Figura 22.** Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



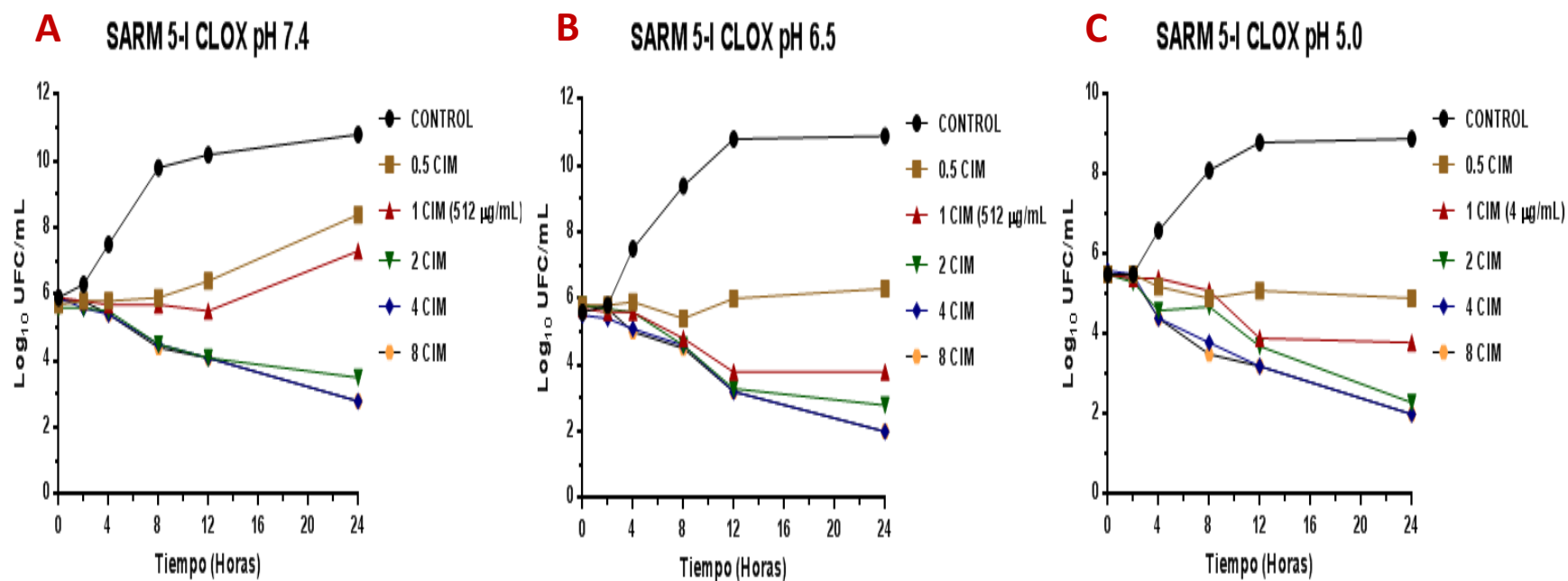
**Figura 23.** Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



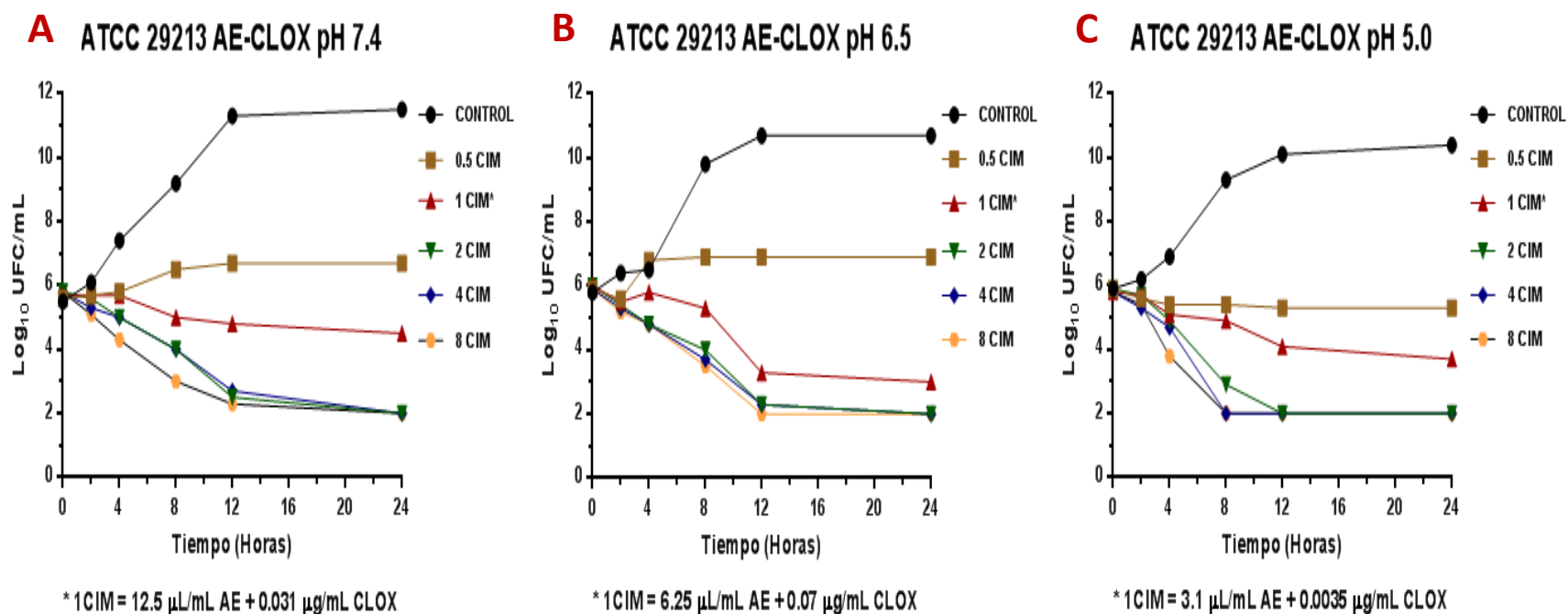
**Figura 24.** Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



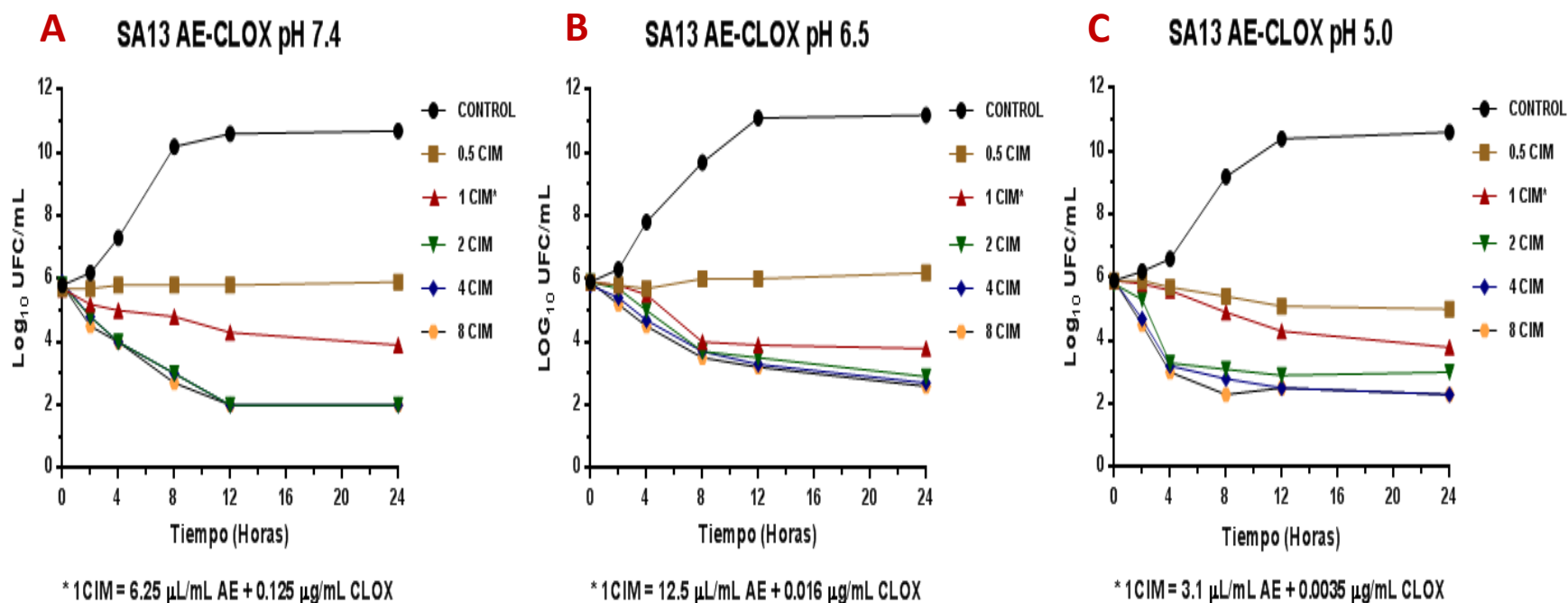
**Figura 25.** Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 26.** Curvas de muerte bacteriana para cloxacilina (CLOX) frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

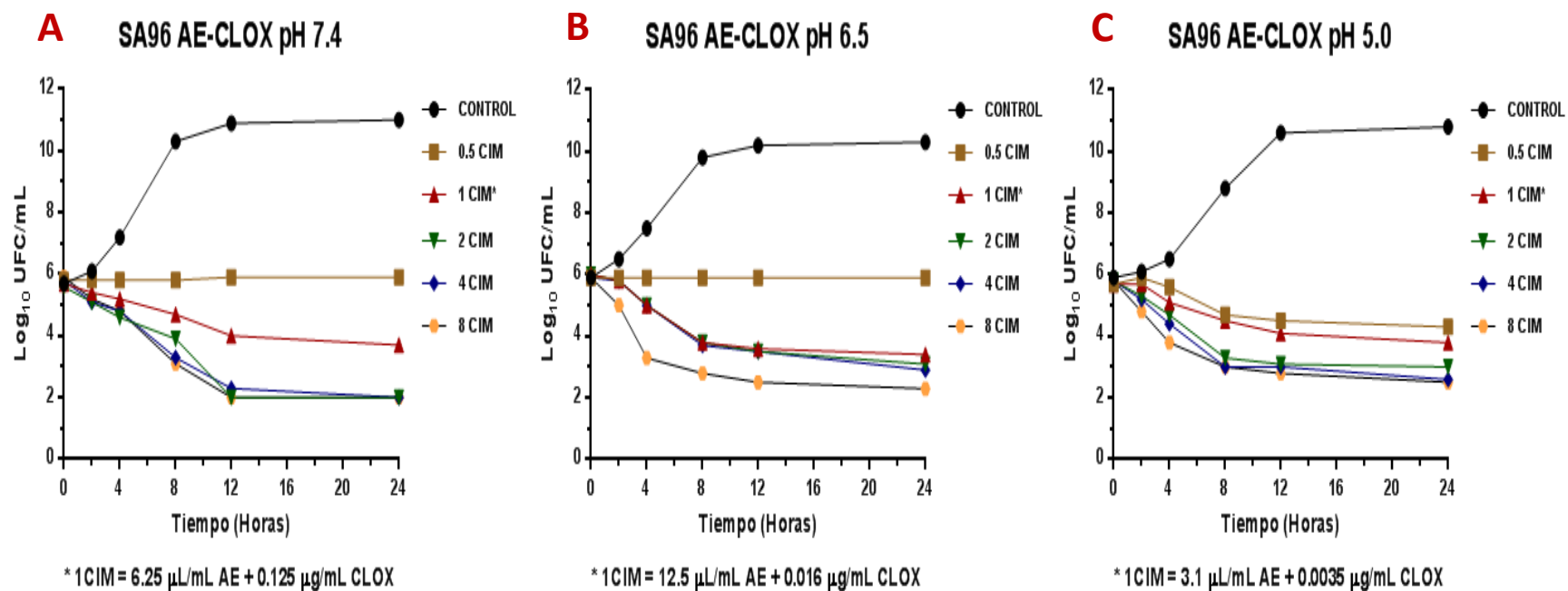


**Figura 27.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y cloxacilina (AE-CLOX) frente a la cepa ATCC29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

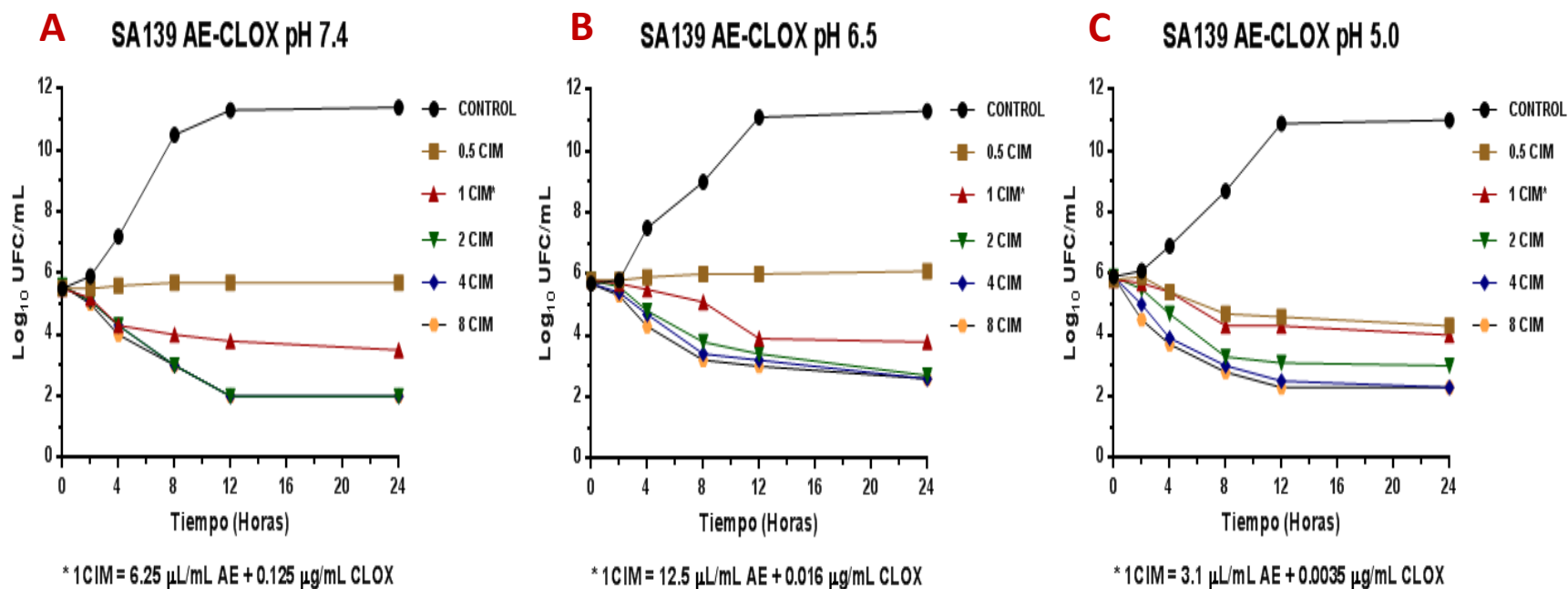


**Figura 28.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

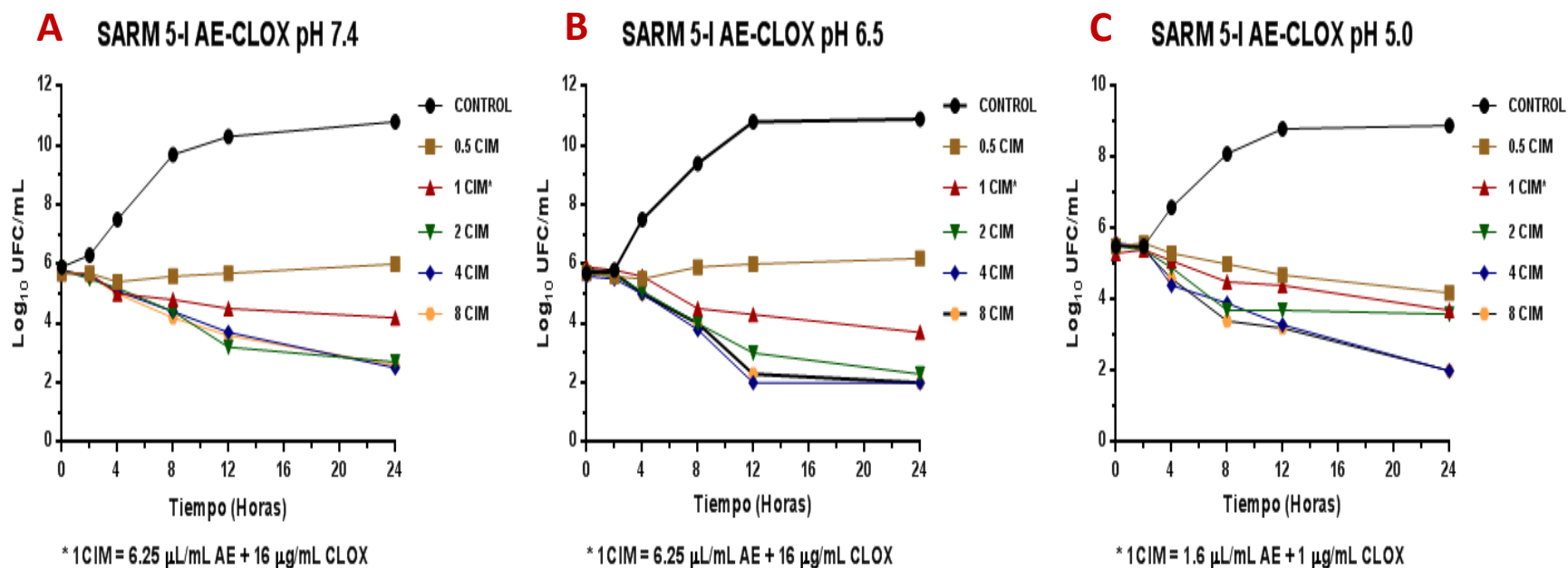




**Figura 29.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 30.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

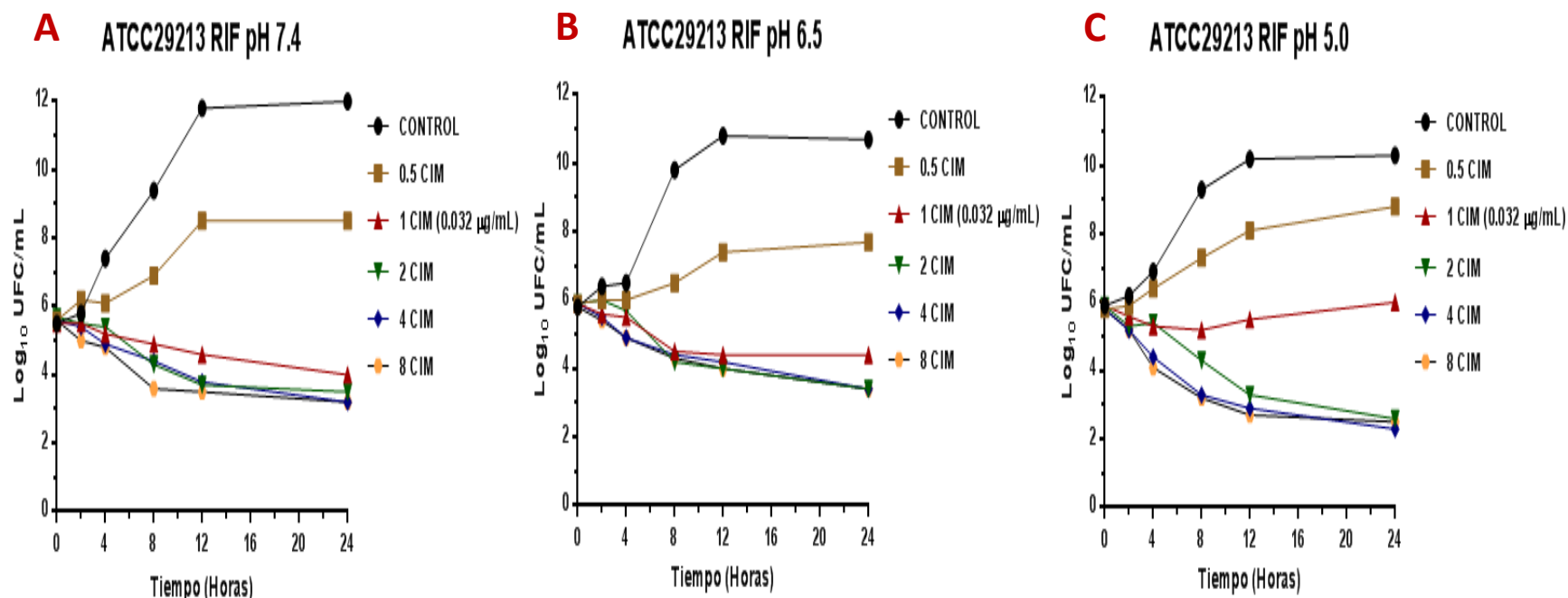


**Figura 31.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y cloxacilina (AE-CLOX) frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

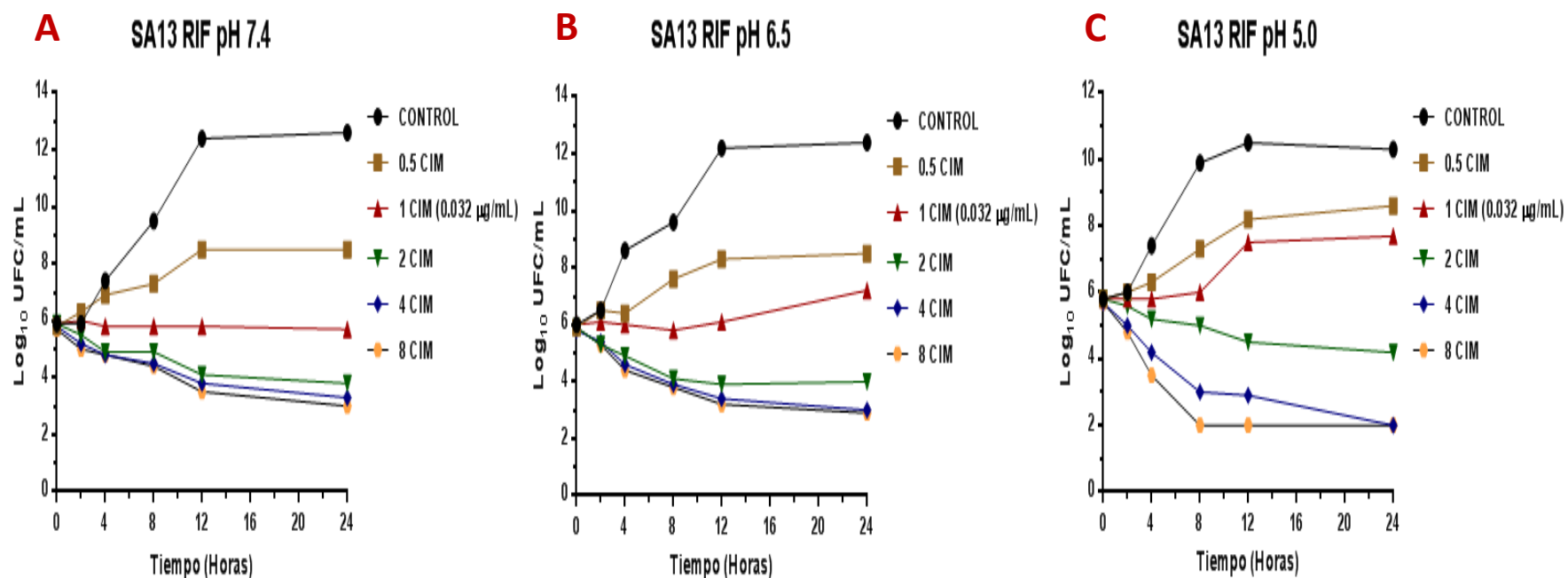
### III.6.3. Rifaximina y combinaciones con aceite esencial

Las Figuras 32 a 35 presentan las curvas de muerte bacteriana para las cepas y aislamientos de *S. aureus* seleccionados (n=4), como así también para la cepa de referencia ATCC 29213 frente a diferentes CIMs de rifaximina en CMH a pH 7.4, 6.5 y 5.0.

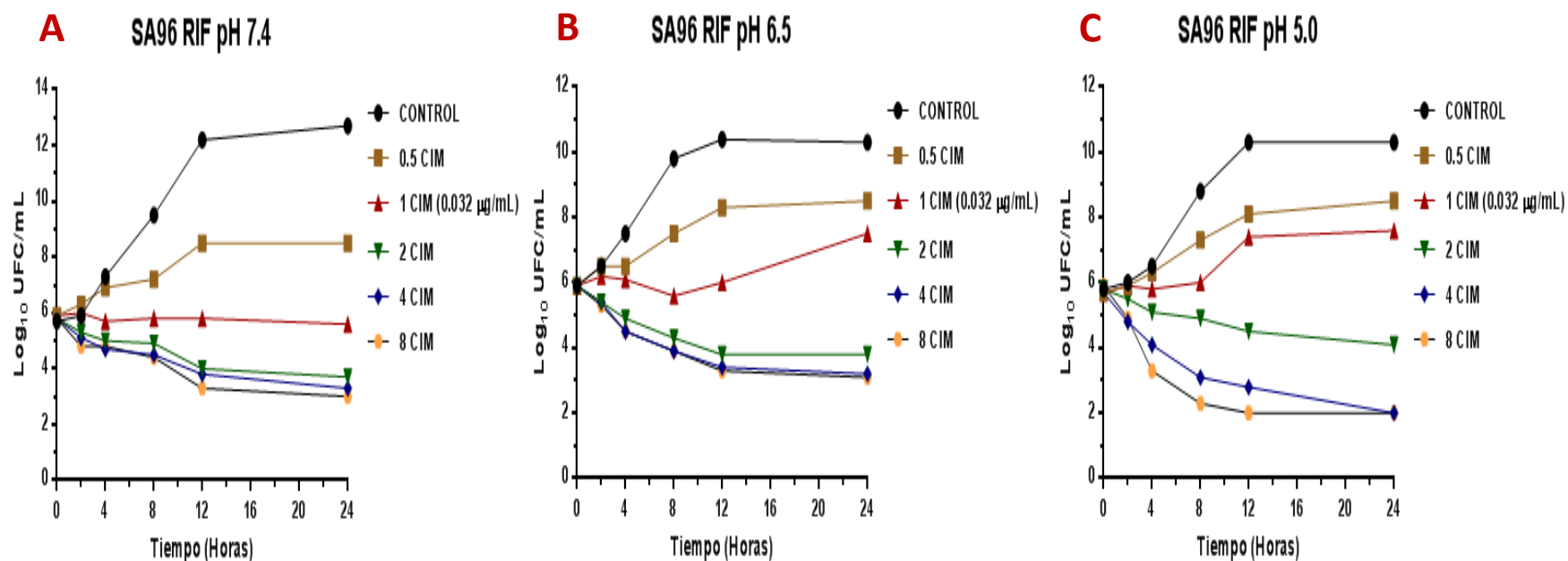
Luego, al igual que para cloxacilina, se construyeron curvas de muerte bacteriana para las combinaciones aceite esencial-rifaximina (Figuras 36 a 39). Los valores de CIM utilizados fueron los que presentaron mayor sinergismo. Estos se presentan en la Tabla 15 de la sección III.5.2.



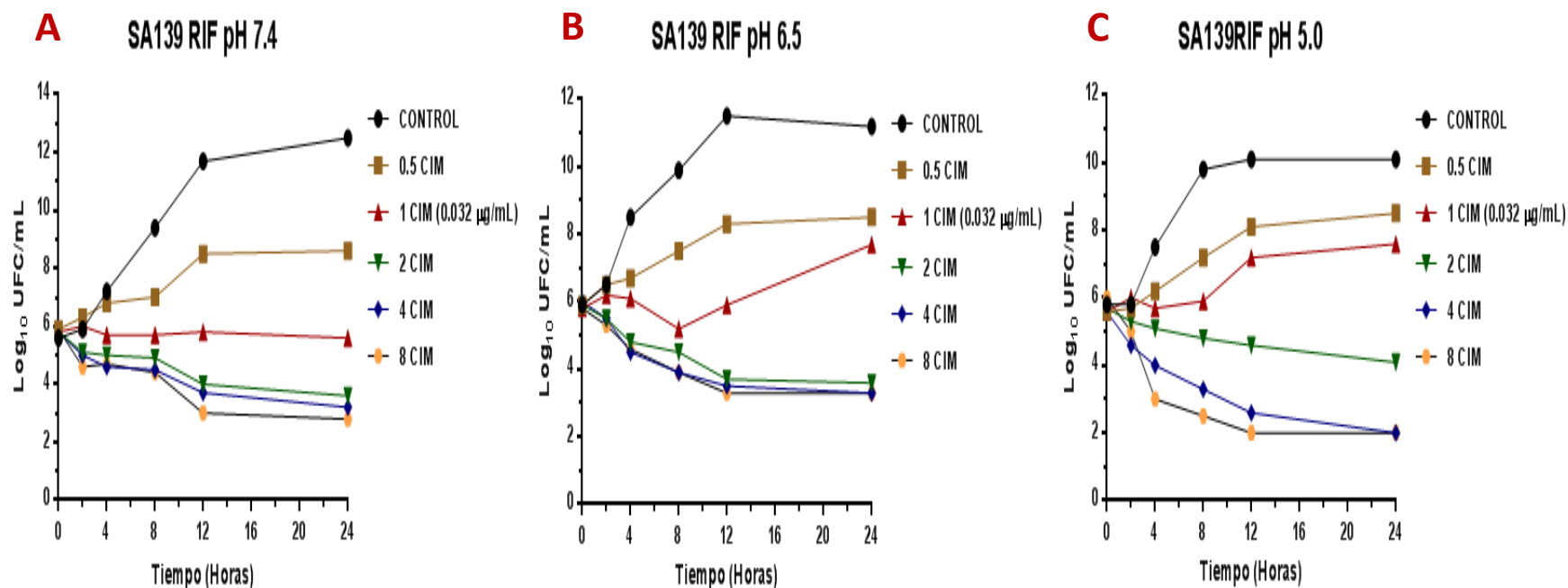
**Figura 32.** Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 33.** Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

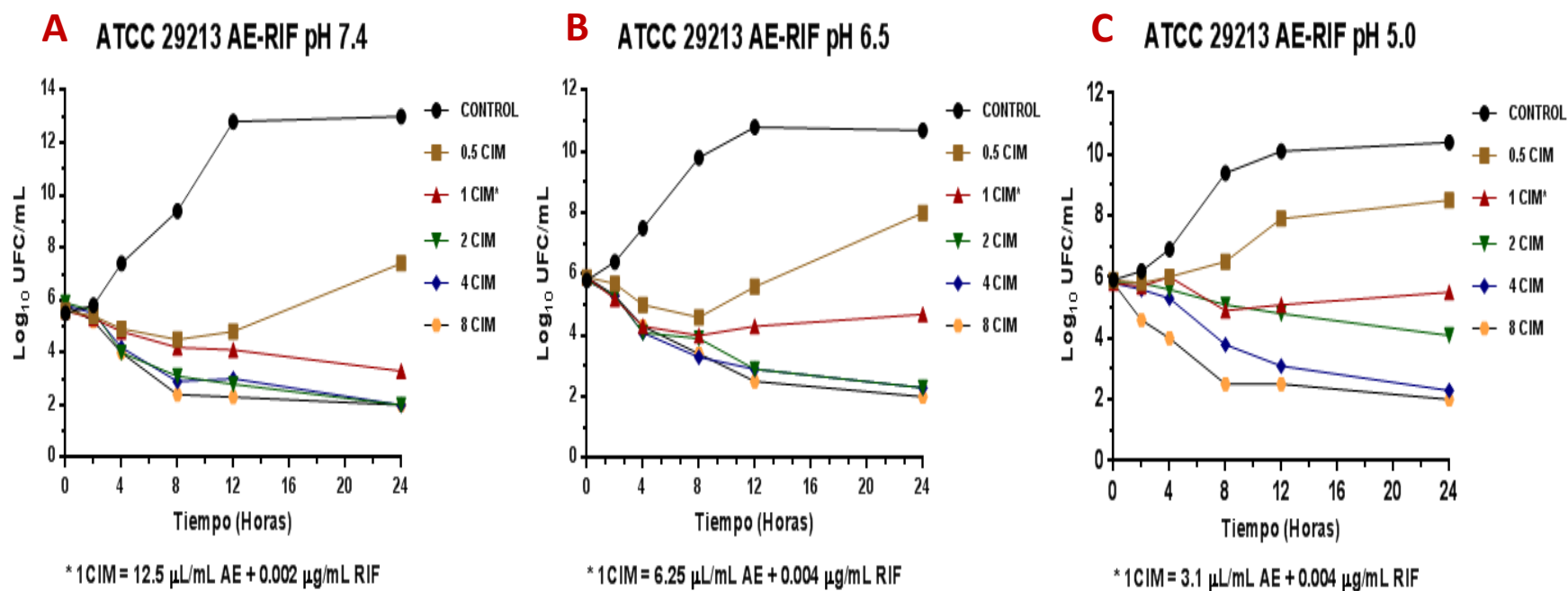


**Figura 34.** Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

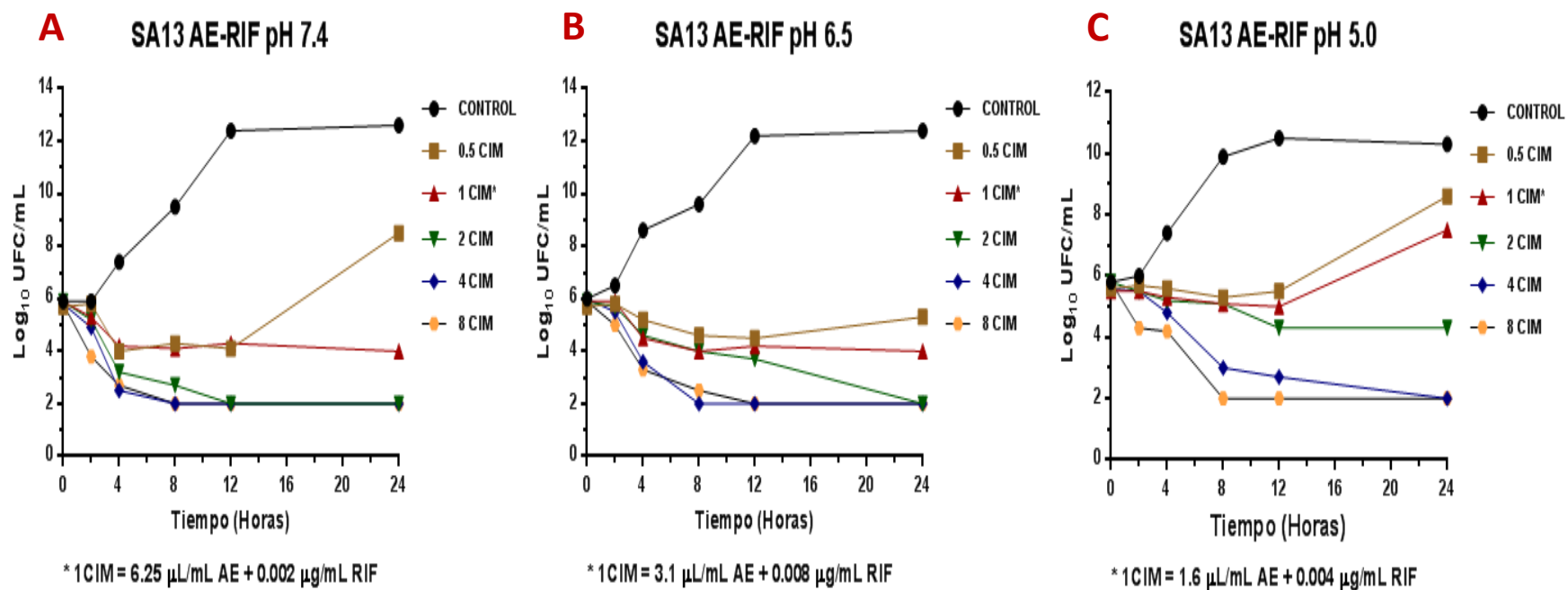


**Figura 35.** Curvas de muerte bacteriana para rifaximina (RIF) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

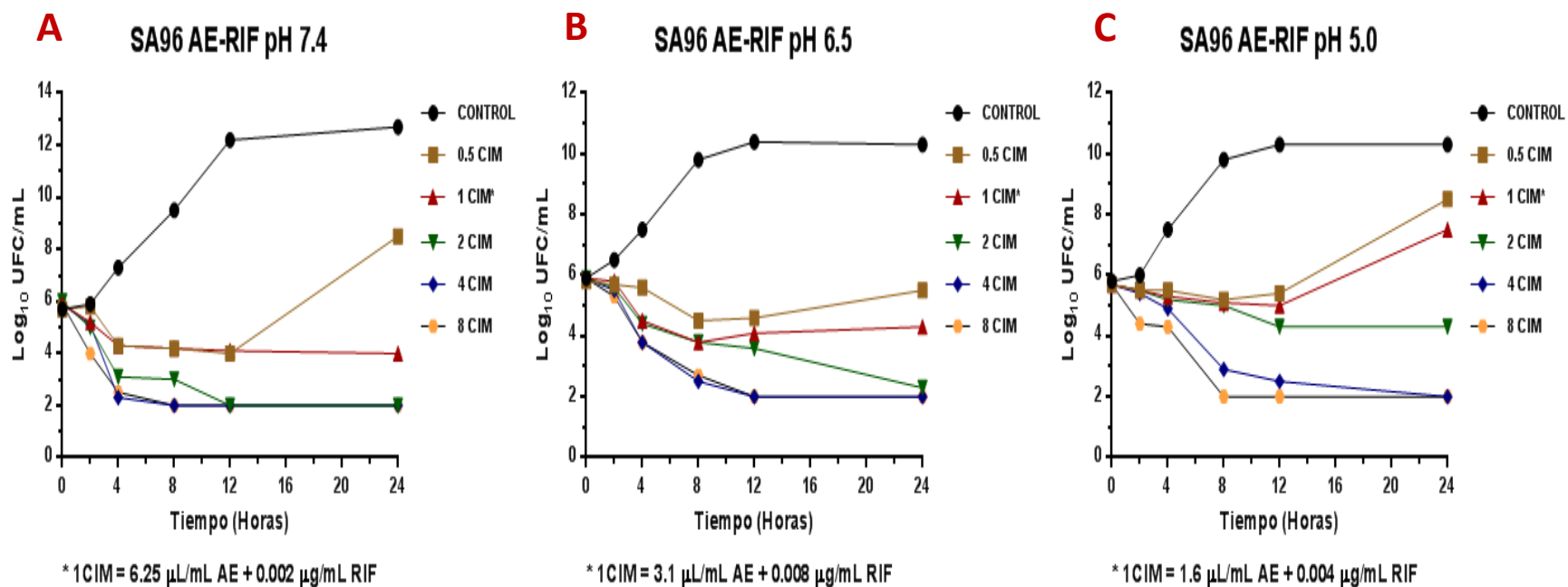




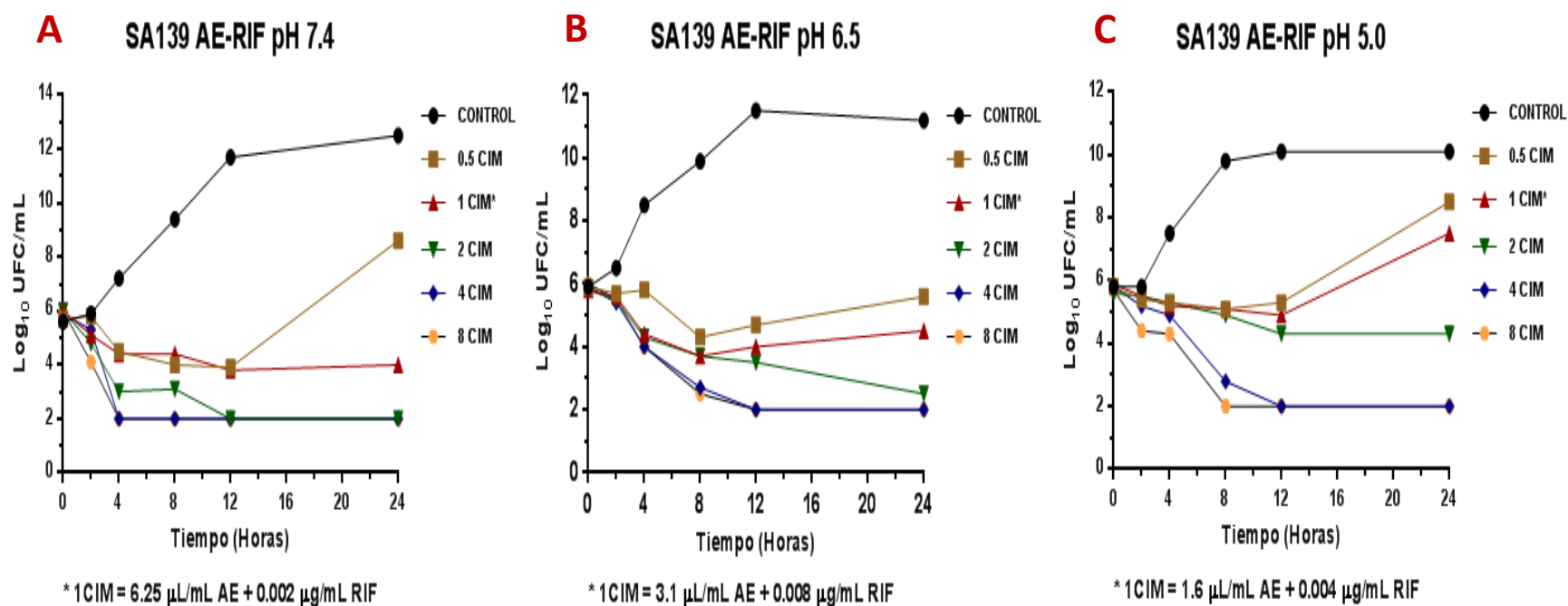
**Figura 36.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y rifaximina (AE-RIF) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 37.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y rifaximina (AE-RIF) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 38.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y rifaximina (AE-RIF) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

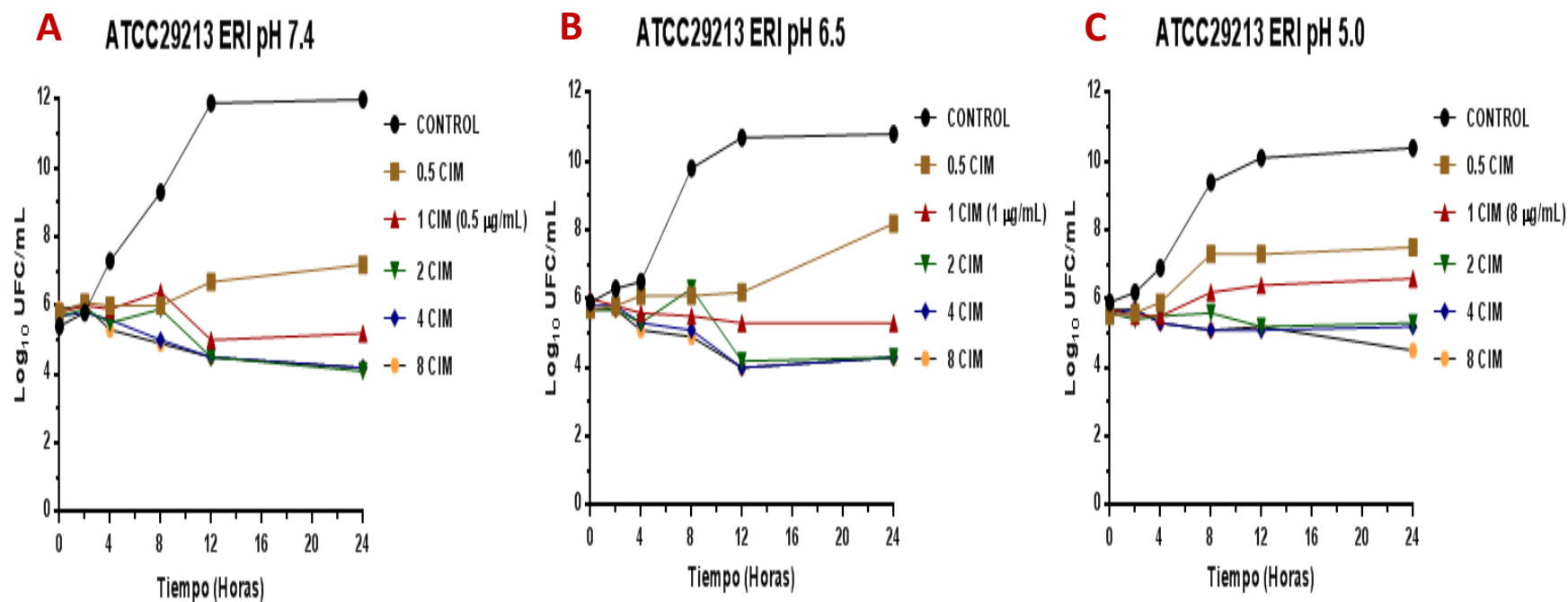


**Figura 39.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y rifaximina (AE-RIF) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

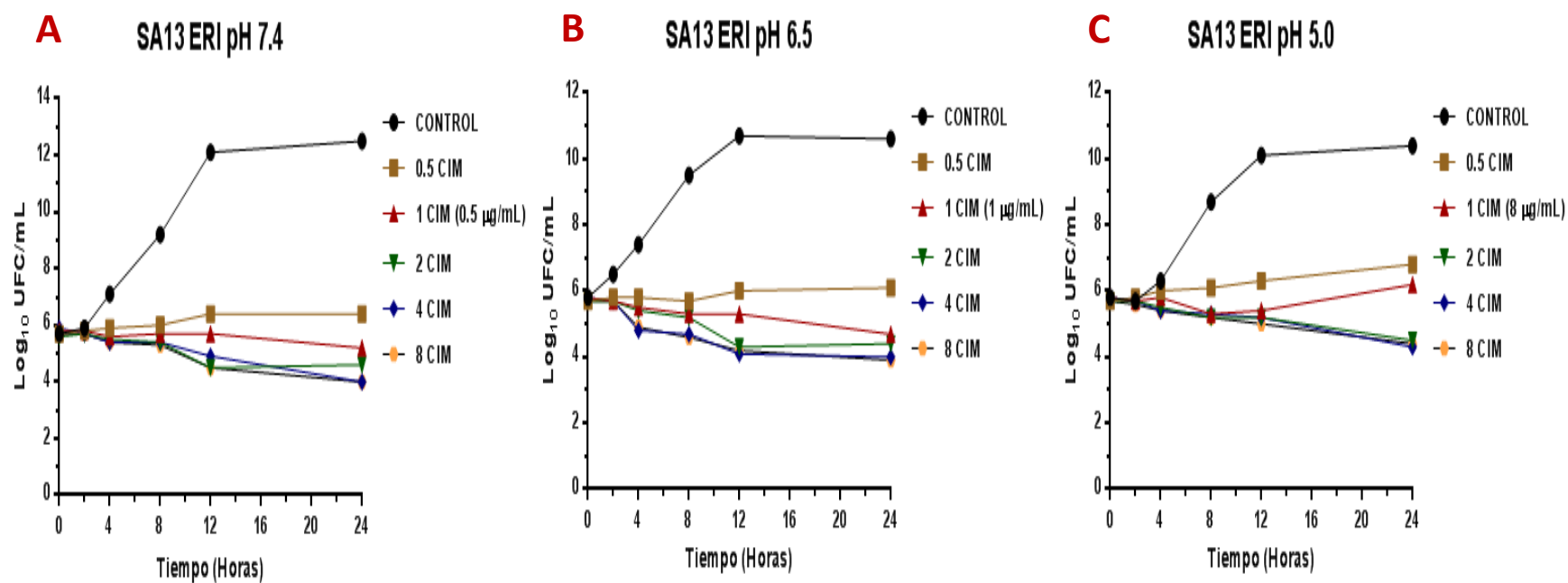
#### III.6.4. Eritromicina y combinaciones con aceite esencial

Las Figuras 40 a 46 presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos de *S. aureus* frente a eritromicina a pH 7.4, 6.5 y 5.0 en CMH. Se utilizaron 3 aislamientos sensibles (SA13, SA96 y SA139), 3 resistentes (SA78A, SA79A y SA86B) y la cepa de referencia ATCC 29213.

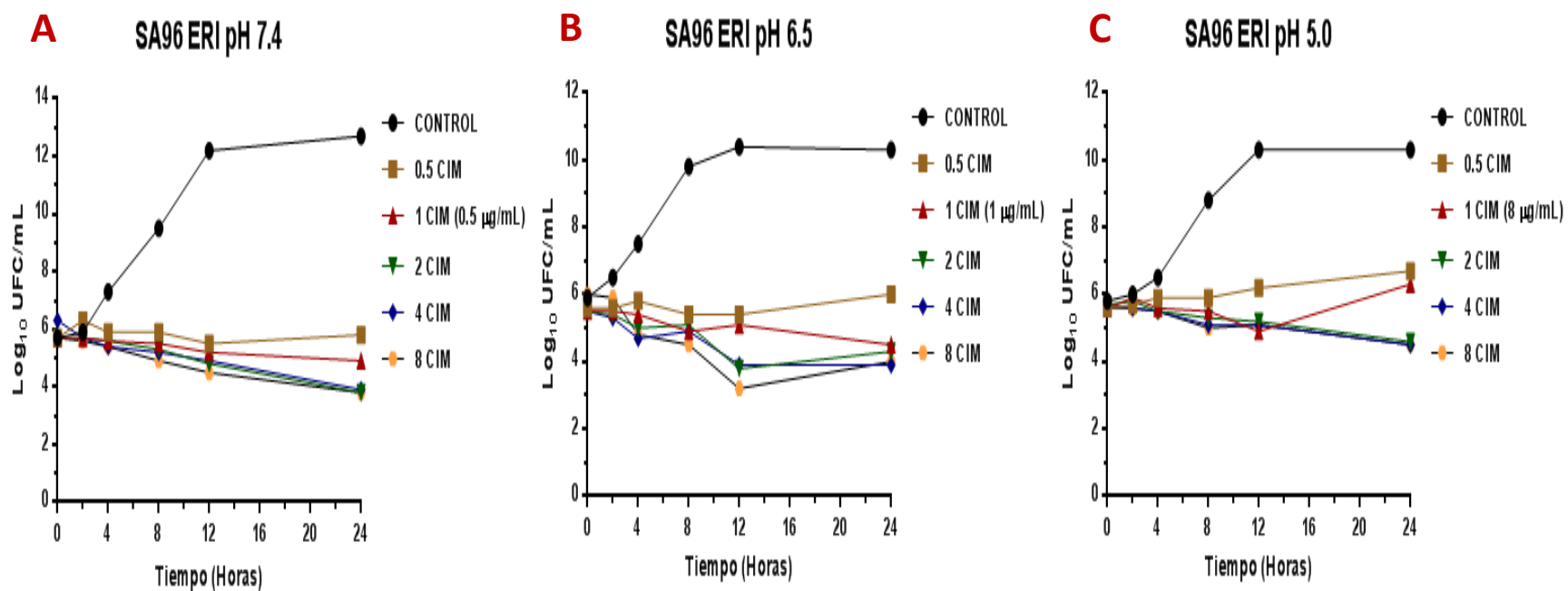
Posteriormente, al igual que para los antibióticos anteriores, se construyeron curvas de muerte bacteriana para las combinaciones aceite esencial-eritromicina (Figuras 47 a 53). Los valores de CIM utilizados fueron los que presentaron mayor sinergismo. Estos se muestran en la tabla 17 de la sección III.5.3.



**Figura 40.** Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

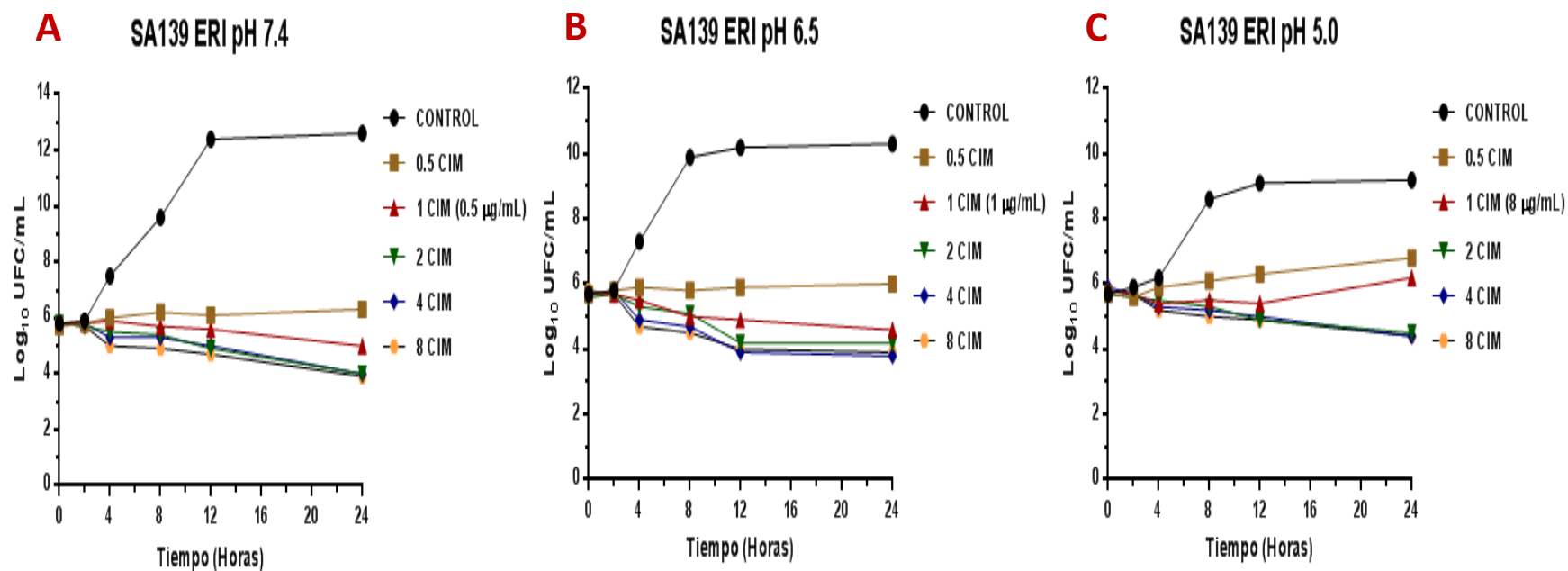


**Figura 41.** Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

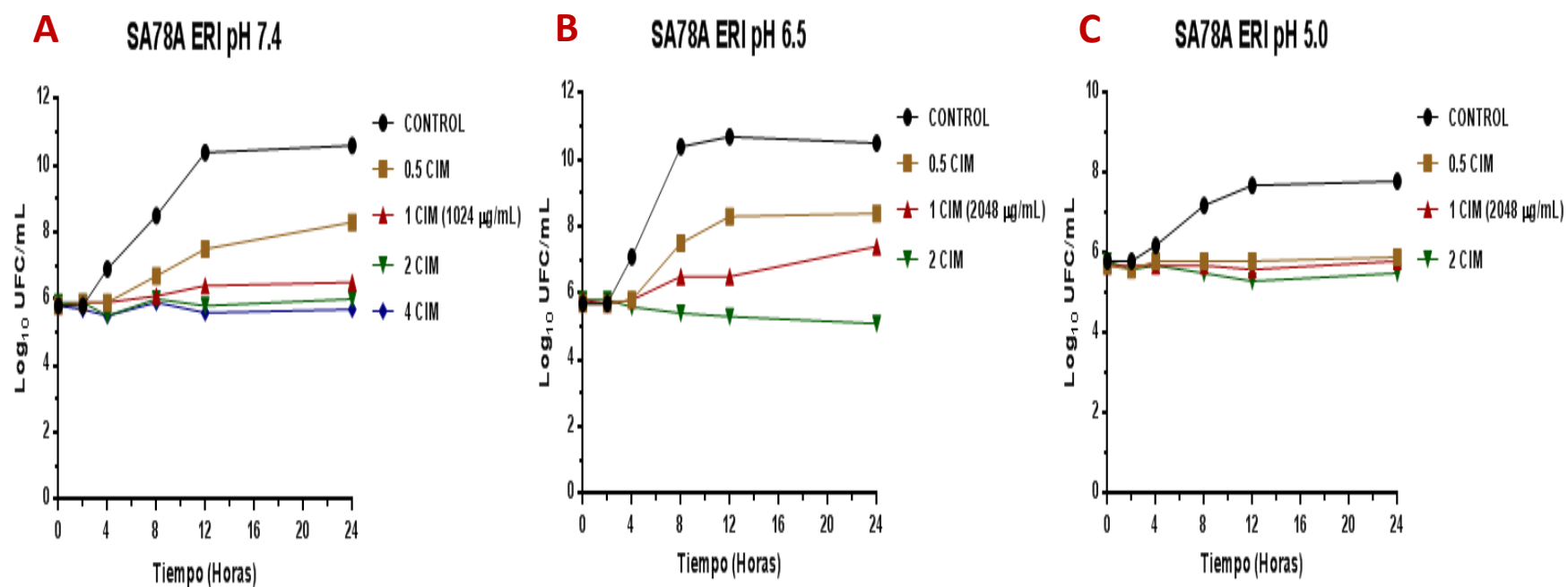


**Figura 42.** Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

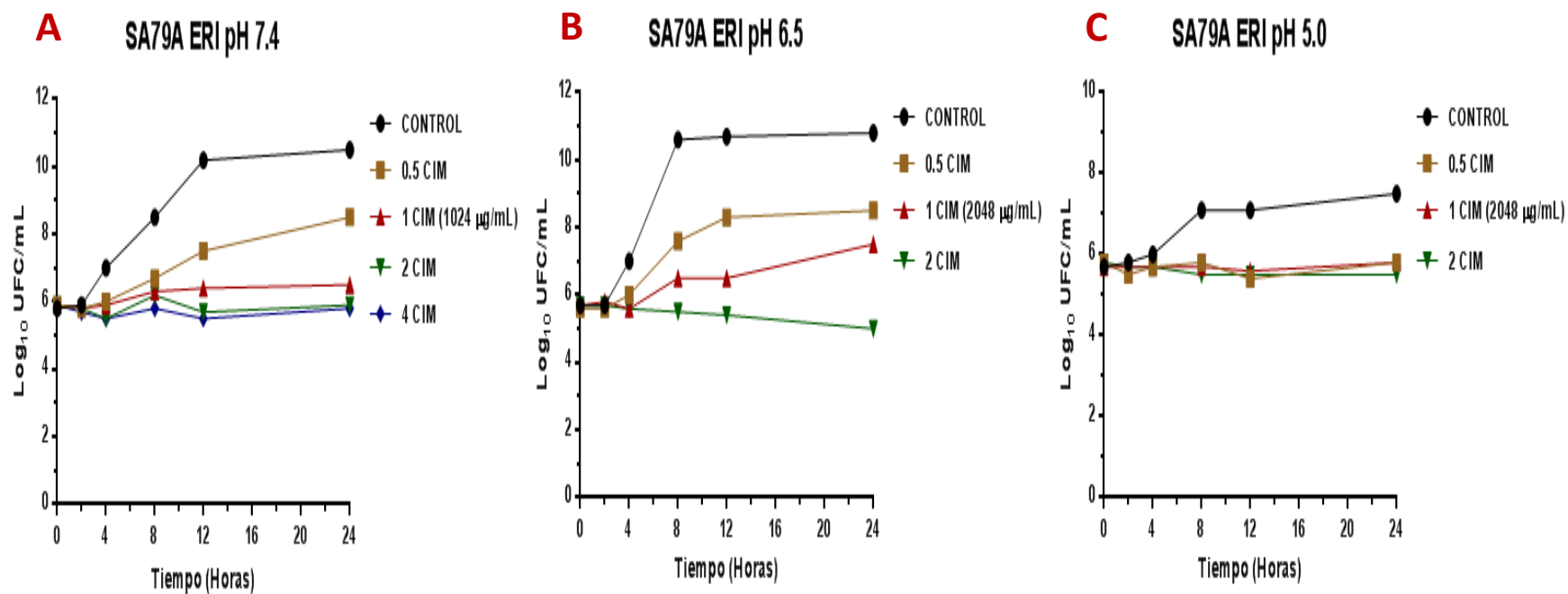




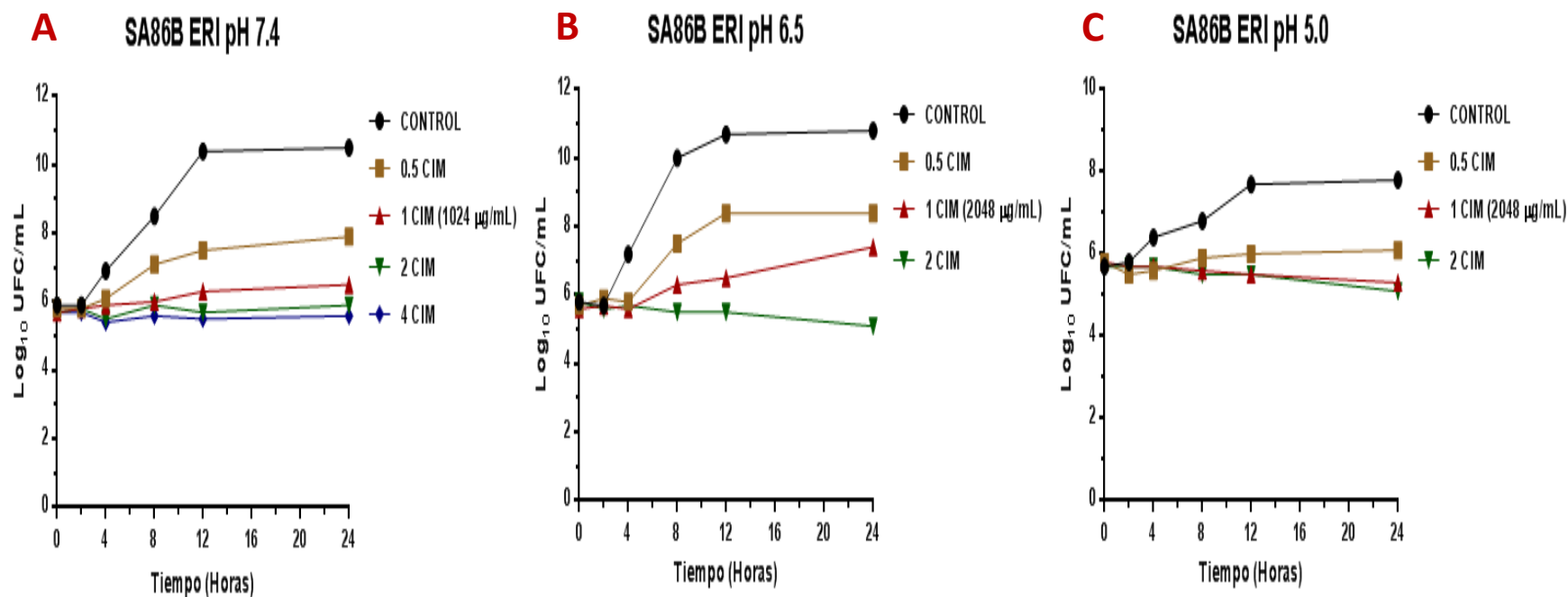
**Figura 43.** Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



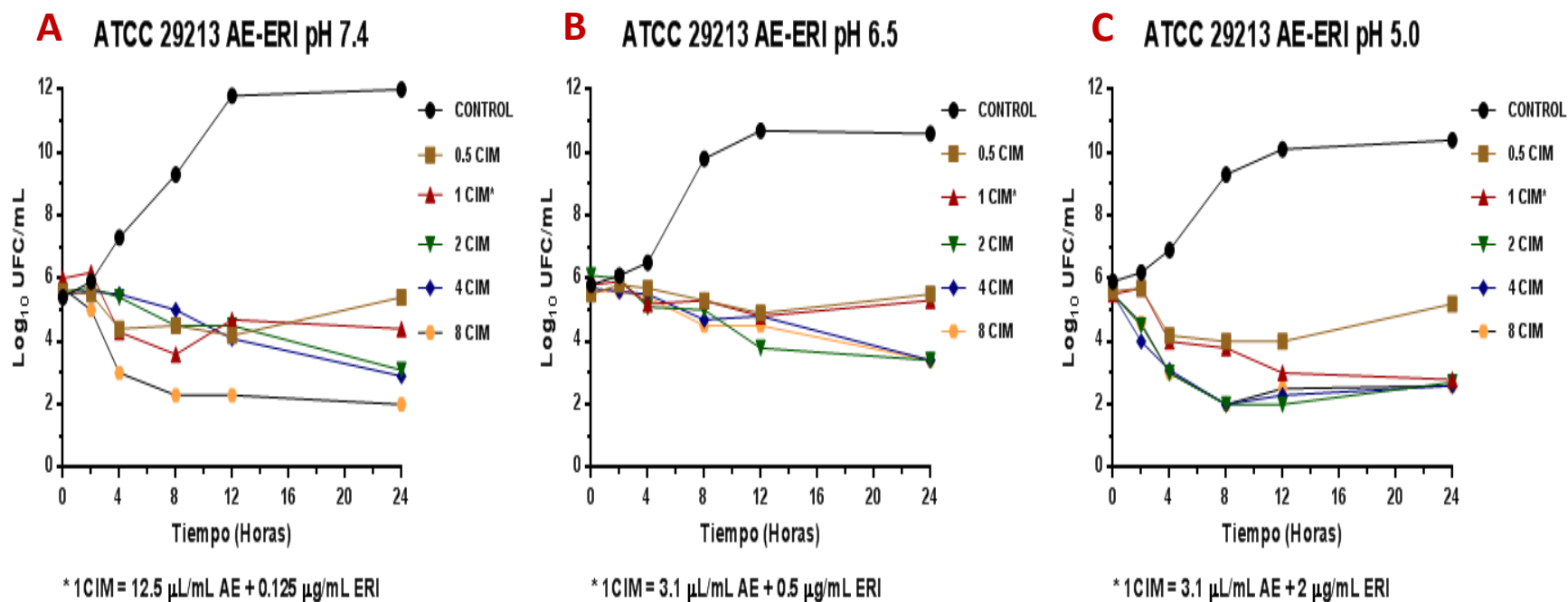
**Figura 44.** Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA78A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



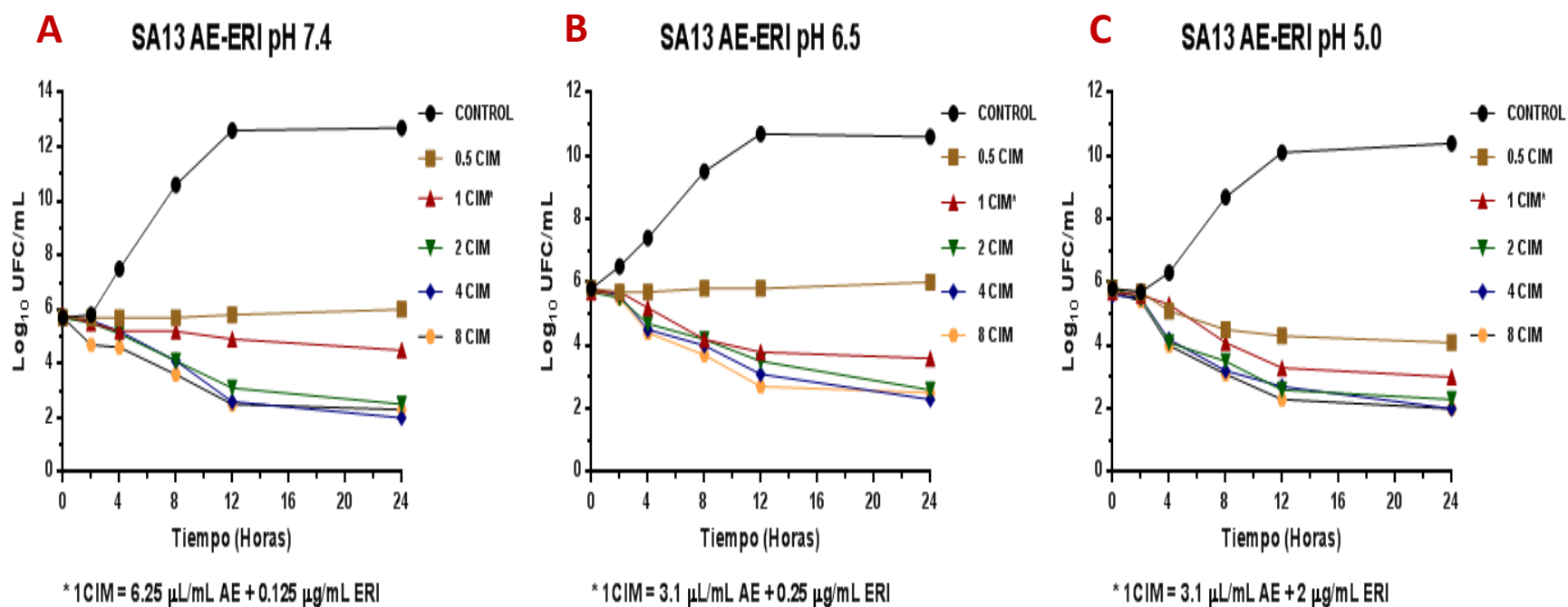
**Figura 45.** Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA79A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



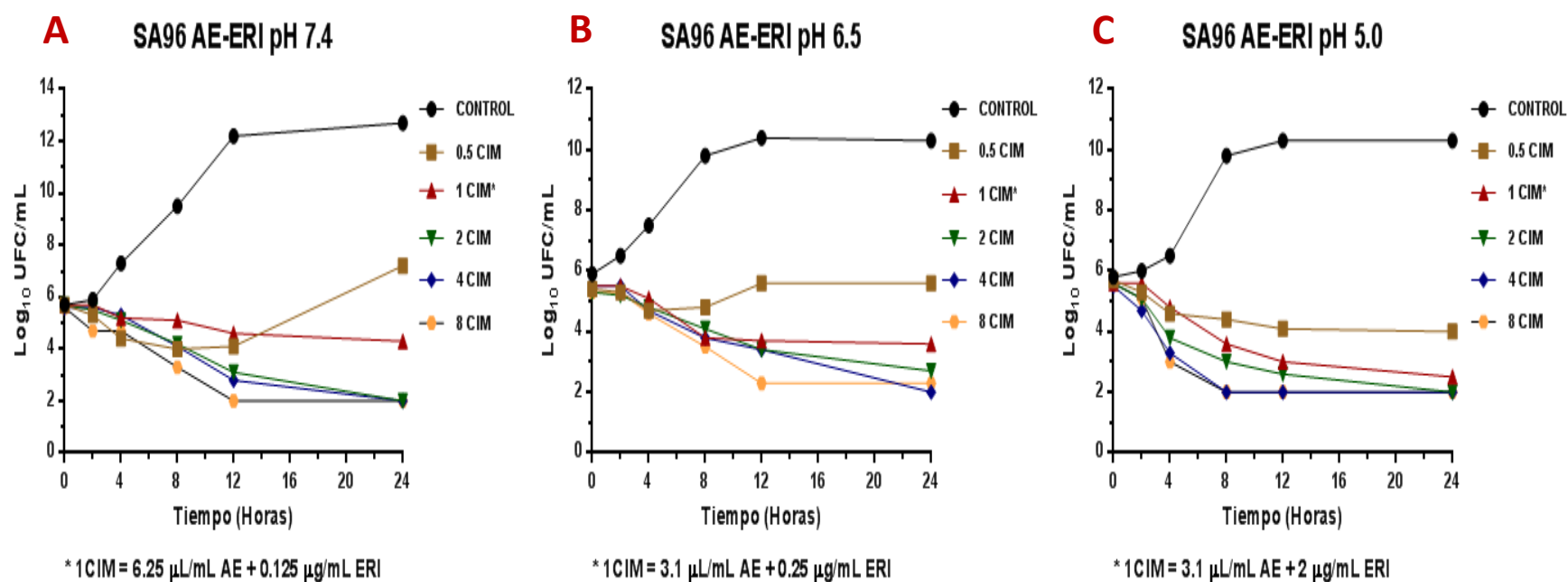
**Figura 46.** Curvas de muerte bacteriana para eritromicina (ERI) frente a SA86B a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



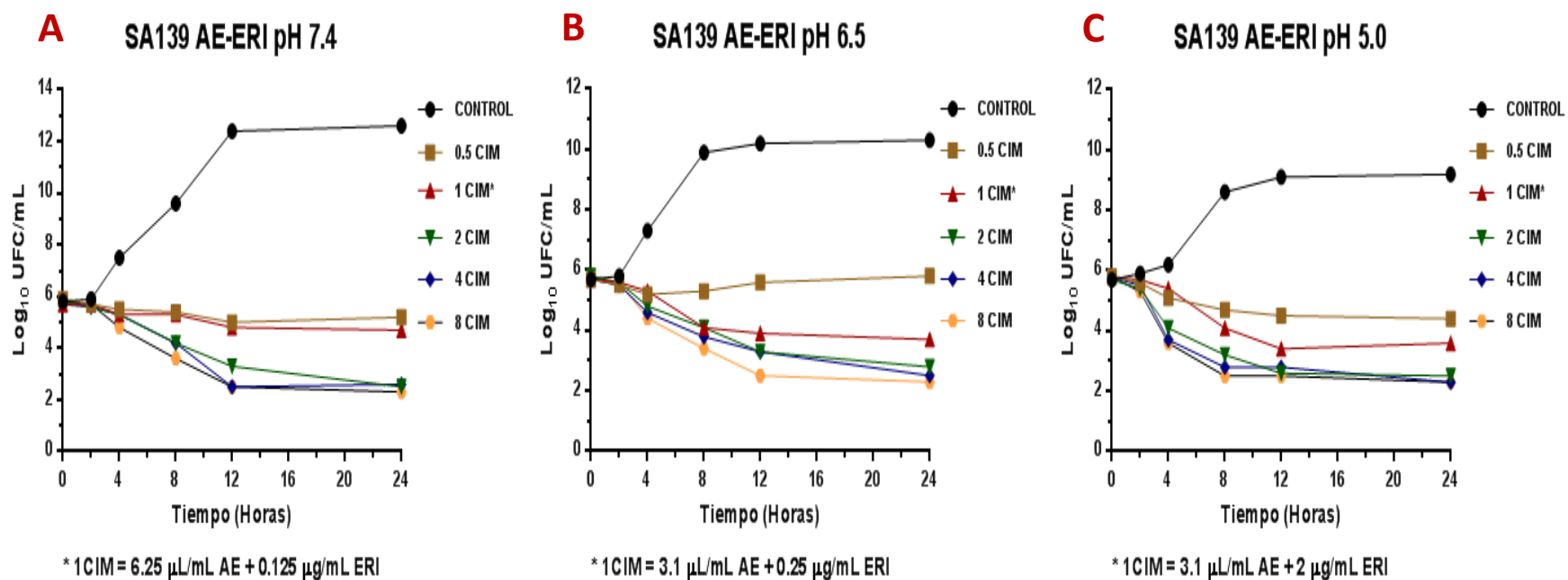
**Figura 47.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y eritromicina (AE-ERI) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 48.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y eritromicina (AE-ERI) frente a SA13 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

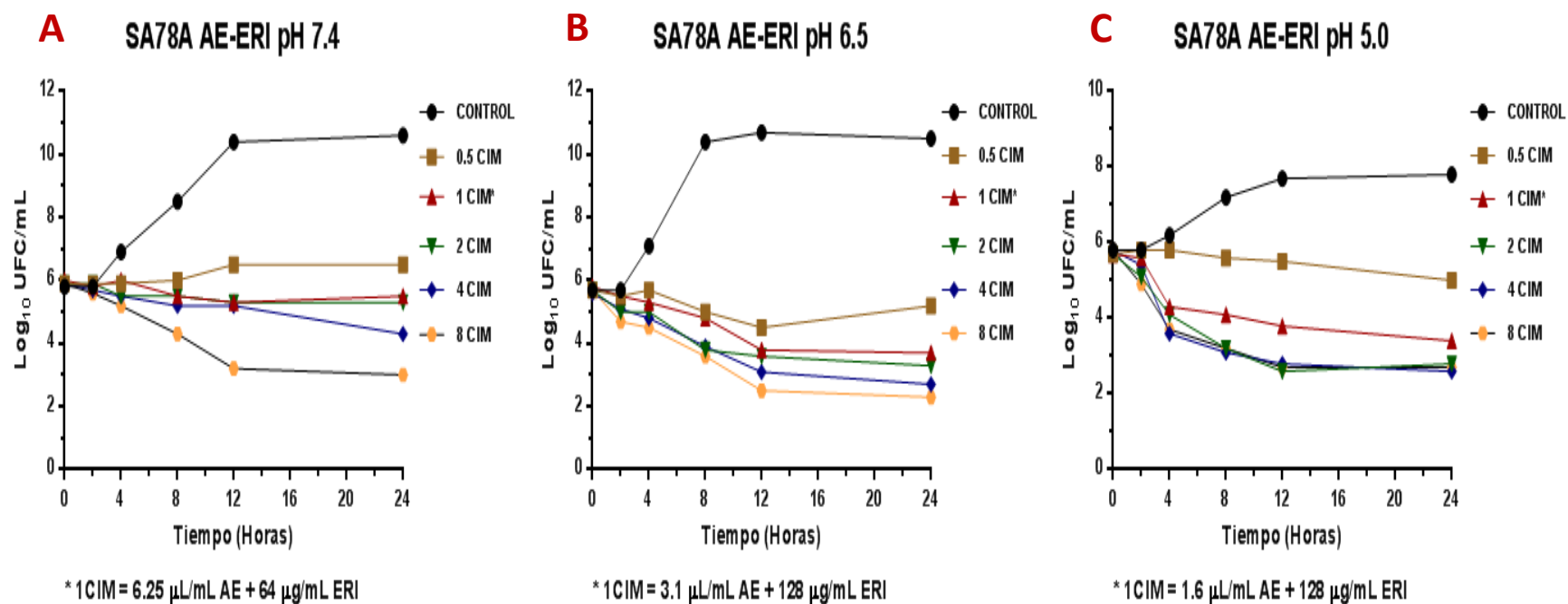


**Figura 49.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y eritromicina (AE-ERI) frente a SA96 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

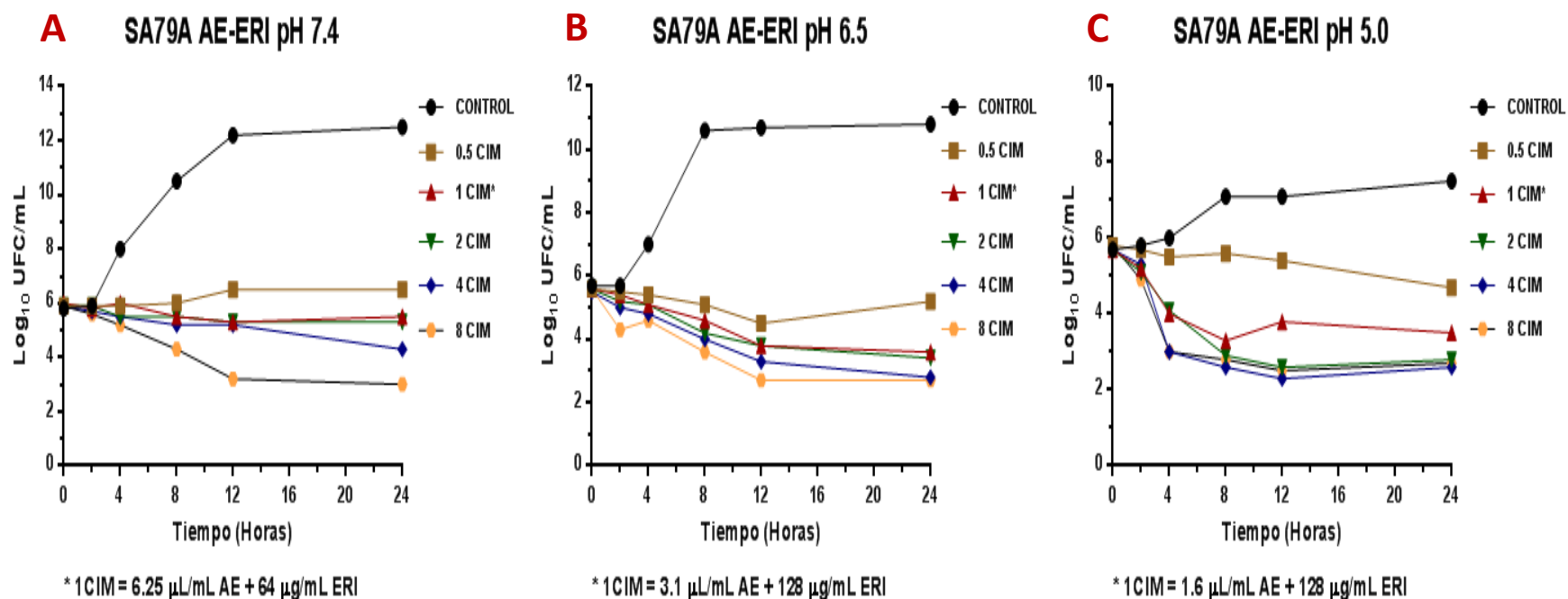


**Figura 50.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y eritromicina (AE-ERI) frente a SA139 a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

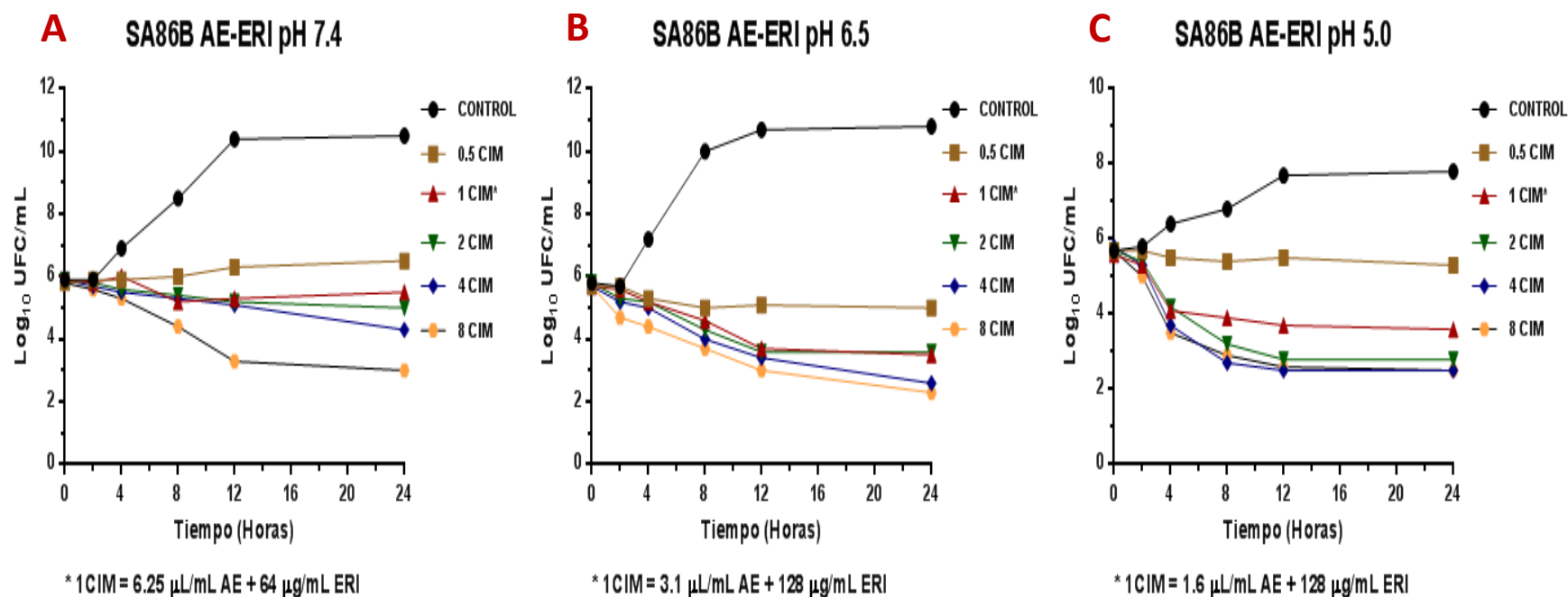




**Figura 51.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y eritromicina (AE-ERI) frente a SA78A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 52.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y eritromicina (AE-ERI) frente a SA79A a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).



**Figura 53.** Curvas de muerte bacteriana para combinaciones de aceite esencial y eritromicina (AE-ERI) frente a SA86B a pH 7.4 (A), 6.5 (B) y 5.0 (C).

### III.6.5. Evaluación del índice de actividad antibacteriana E

Con la evaluación del índice de actividad antibacteriana se pudo comparar la incidencia del aceite esencial en la actividad de la cloxacilina, la rifaximina y la ertitromicina frente a las cepas y aislamientos de *S. aureus*, además del efecto causado por la variación del pH.

#### III.6.5.1. Índice E de cloxacilina y de sus combinaciones con aceite esencial

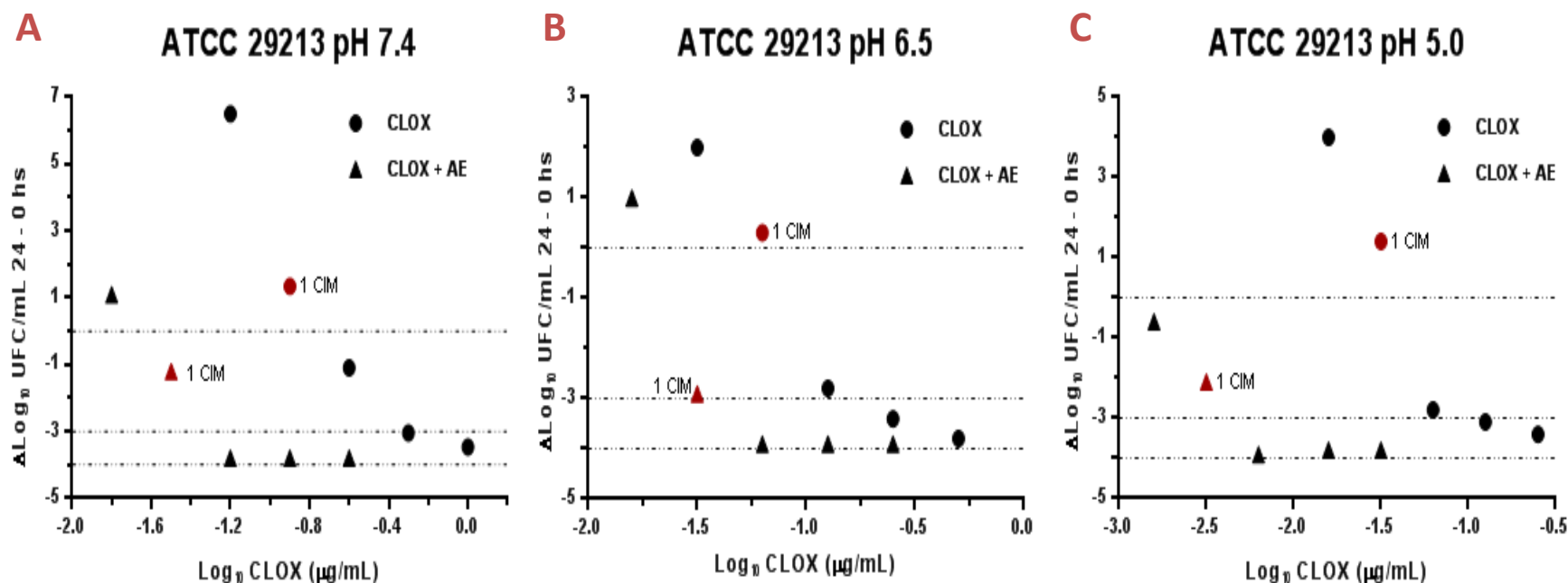
En las Figuras 54 a 58 se presentan los gráficos en los que se evalúa el índice E ( $\Delta\text{Log}_{10}$  UFC/mL (24-0) hs vs. el  $\text{Log}_{10}$  de la concentración de cloxacilina en presencia y ausencia del aceite esencial y bajo las diferentes condiciones de pH. Se observa como al acidificar el medio se potencia la actividad antimicrobiana de la cloxacilina frente a *S. aureus* (tanto para la cepa de referencia como las cepas y aislamientos salvajes). Al descender el pH se requieren menores concentraciones de antibiótico para obtener un valor E menor a -3 indicando un efecto bactericida. En los gráficos se puede ver como la presencia del aceite esencial favorece el accionar de la cloxacilina, ya que se alcanzan valores de E menores con concentraciones más bajas del antibiótico en comparación con los resultados obtenidos con cloxacilina sola.

En la cepa de referencia ATCC 29213 se logra alcanzar un efecto bactericida muy cercano a la erradicación virtual, dado que los valores de E son cercanos a -4. Esto se observa con concentraciones de 2, 4 y 8 veces la CIM de CLOX en la mezcla, a los 3 pHs evaluados (Figura 54).

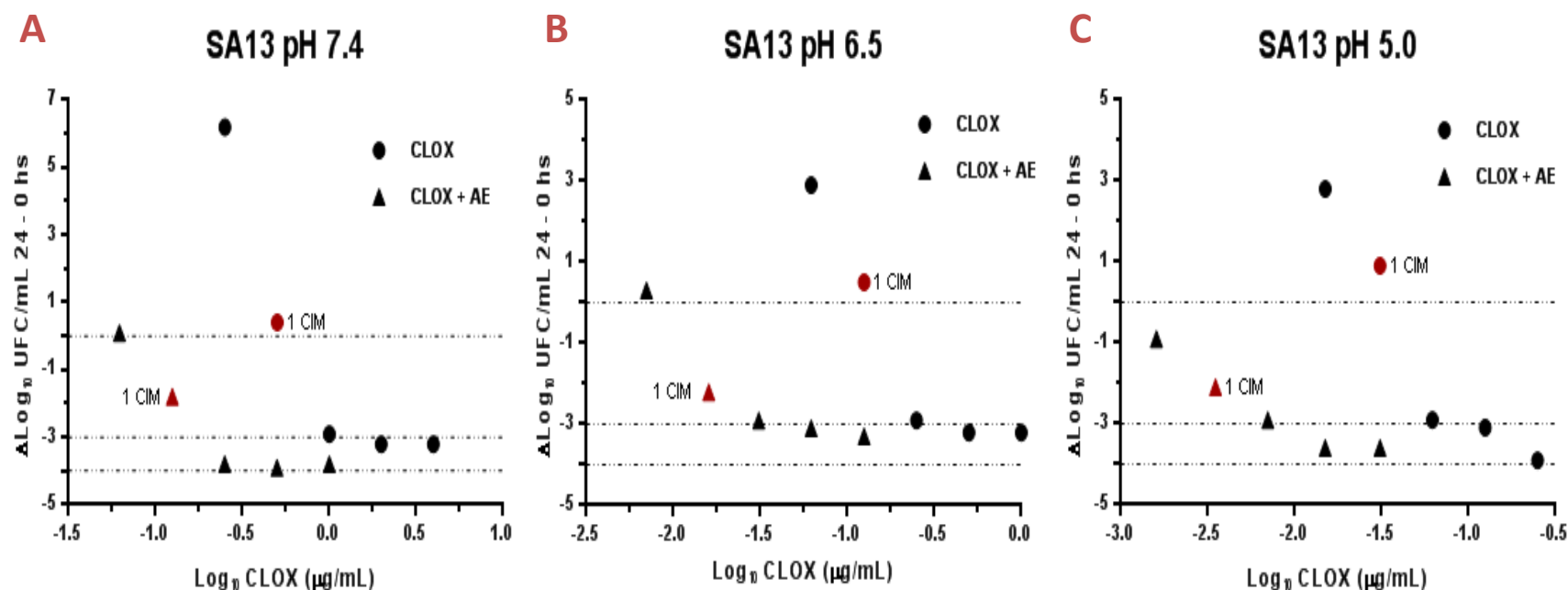
En los aislamientos salvajes sensibles a cloxacilina (SA13, SA96 y SA139) el comportamiento fue similar al observado para la cepa de referencia (Figuras 55, 56 y 57, respectivamente).

La Figura 58 corresponde a lo que sucede con la cepa resistente a cloxacilina (SARM 5-I). Aquí también se puede observar como la presencia del aceite esencial desplaza la curva hacia valores menores de cloxacilina en la mezcla. Es decir que se requieren menores de concentraciones de  $\beta$ -lactámico para alcanzar un mismo efecto bactericida respecto del antibiótico solo. A su vez, el pH ácido también influye positivamente para las mezclas

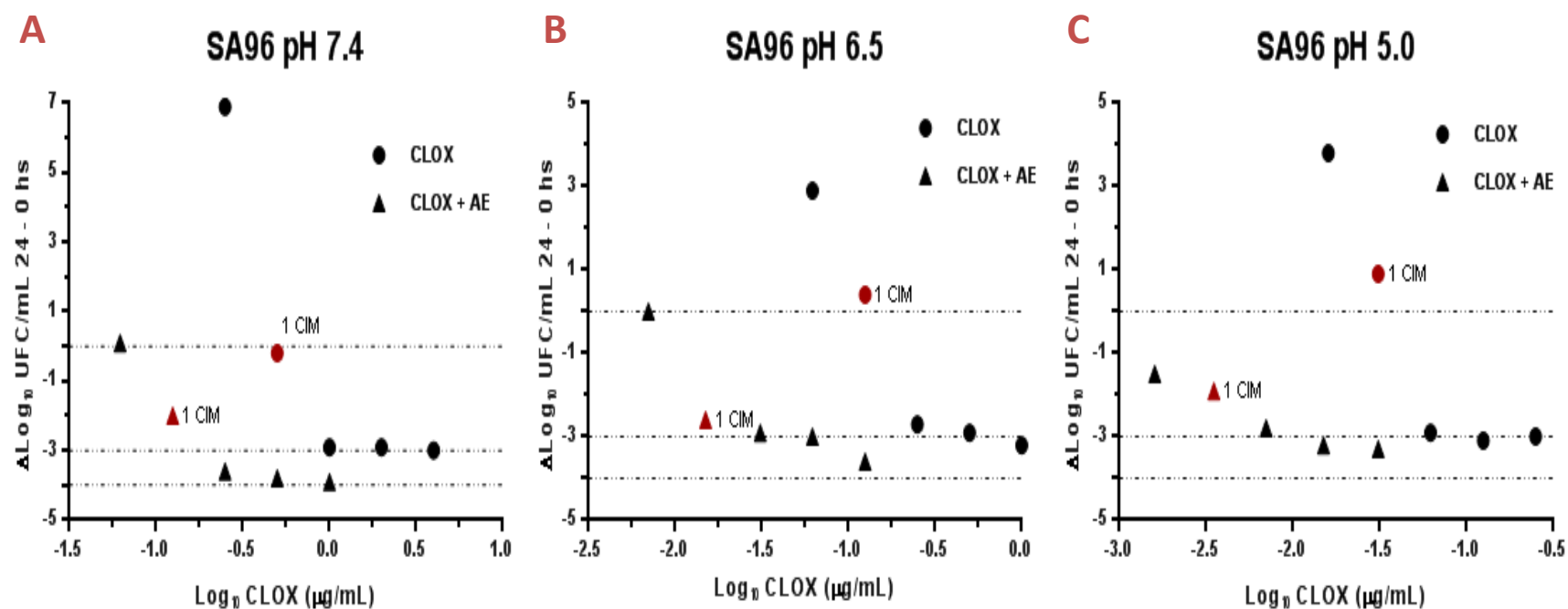
logrando reducir aún más la concentración de cloxacilina requerida para tener un efecto inhibitorio y bactericida sobre el *S. aureus*.



**Figura 54.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de cloxacilina (CLOX) frente a *S. aureus* ATCC 29213 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).

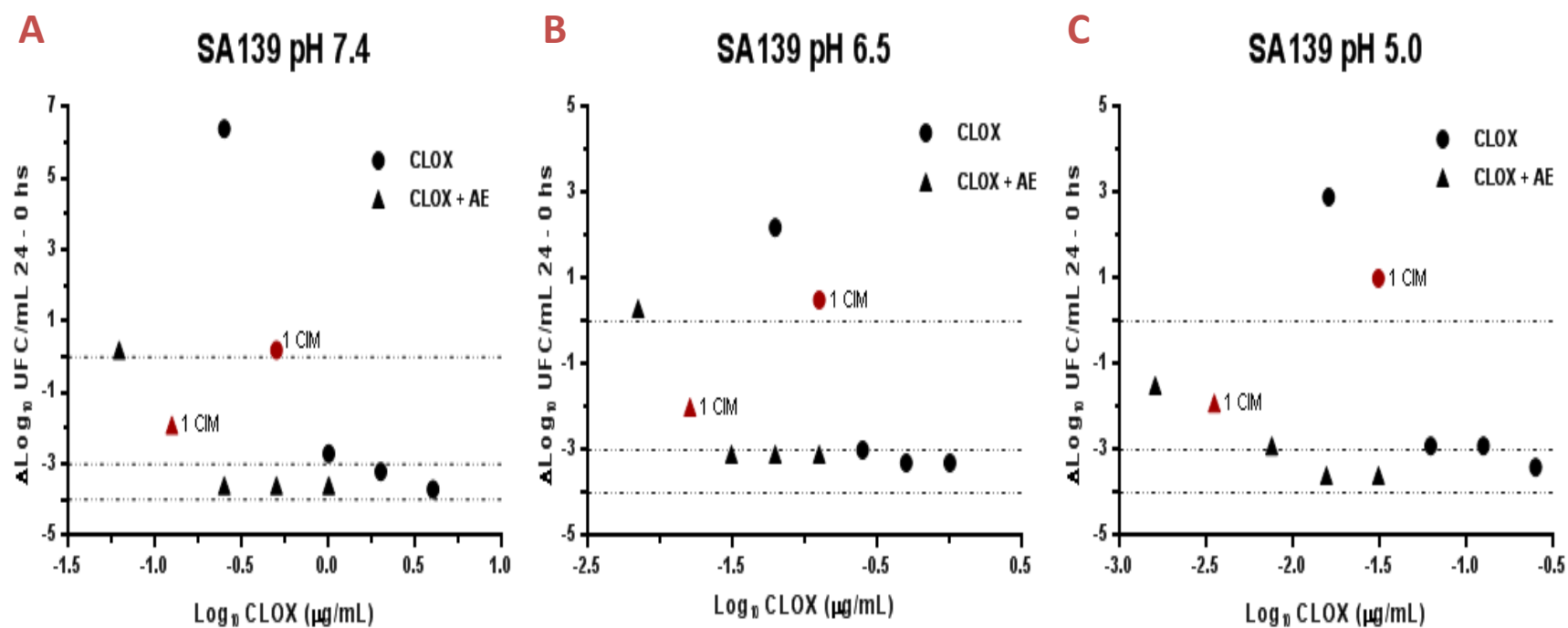


**Figura 55.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta \text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de cloxacilina (CLOX) frente a SA13 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).

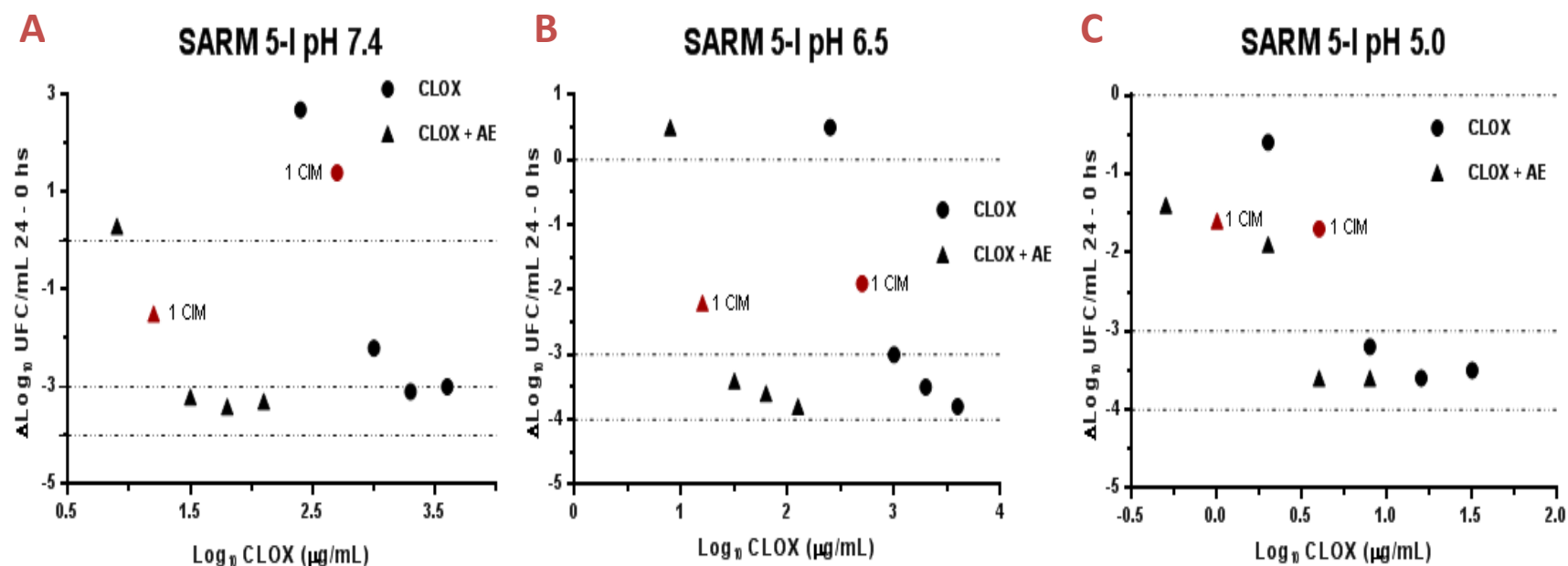


**Figura 56.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de cloxacilina (CLOX) frente a SA96 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).





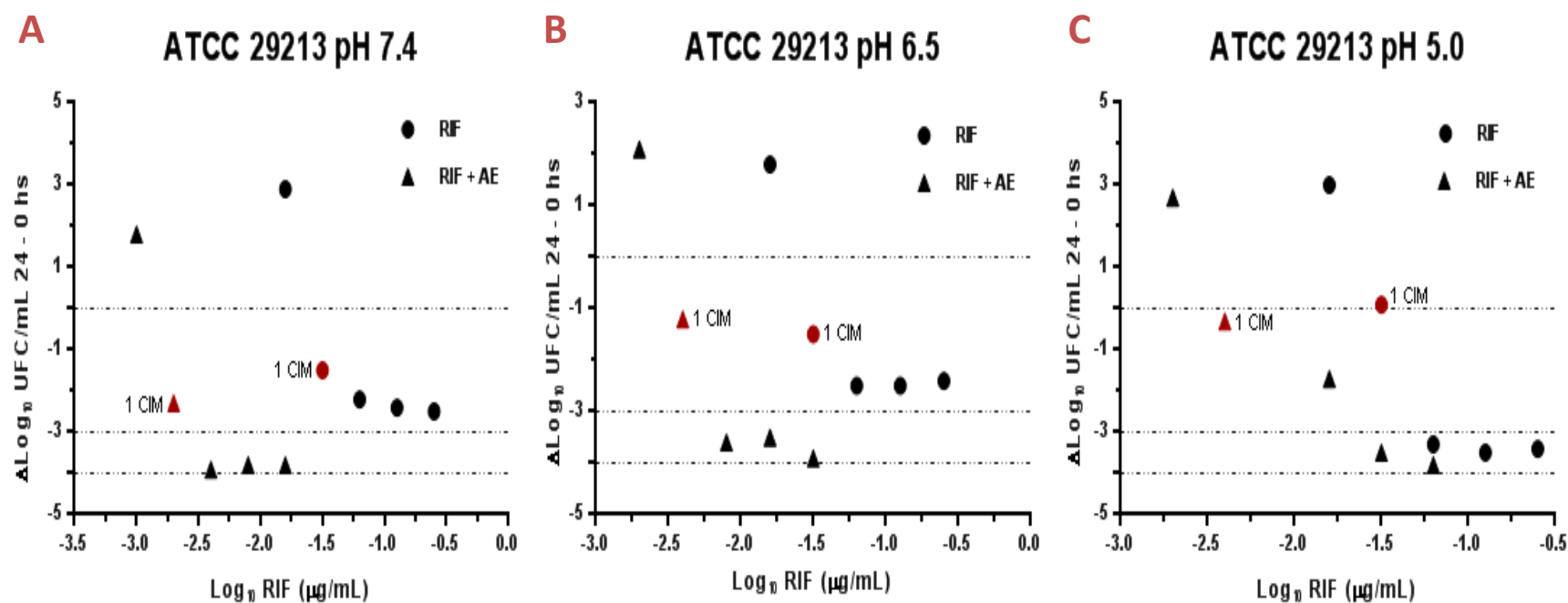
**Figura 57.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de cloxacilina (CLOX) frente a SA139 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).



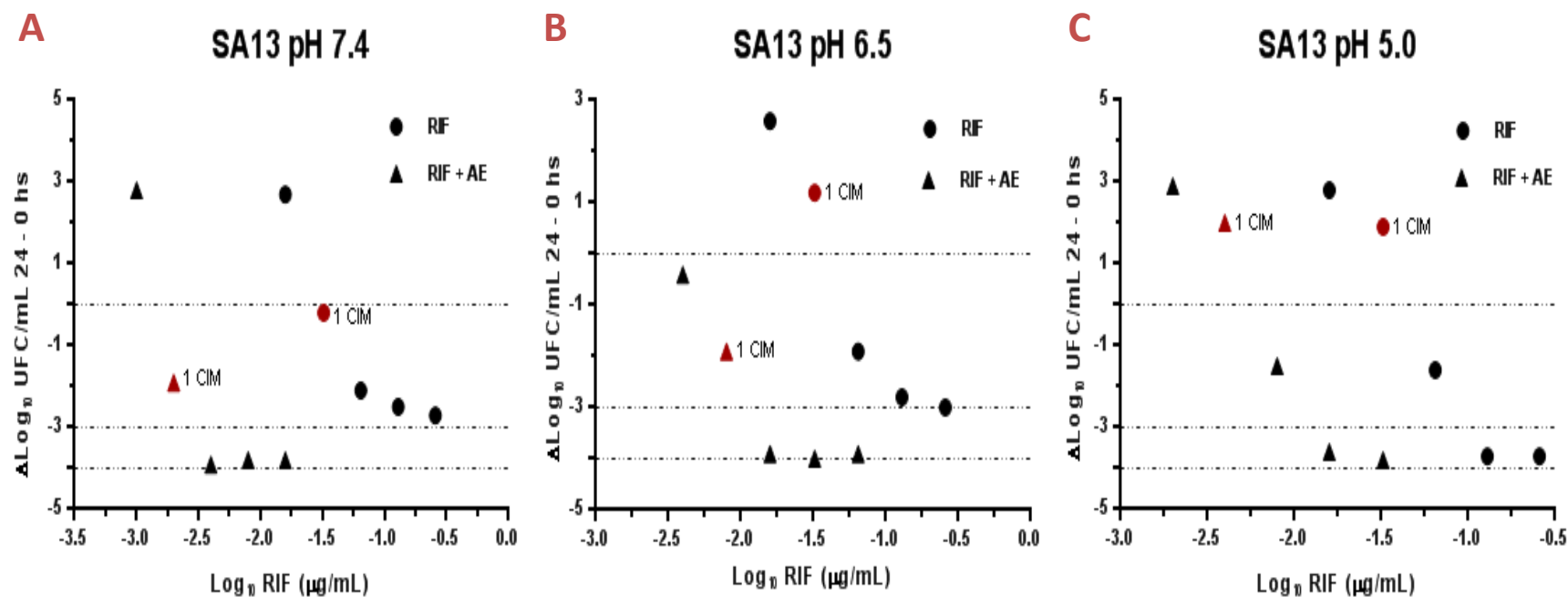
**Figura 58.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de cloxacilina (CLOX) frente a SARM 5-I a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).

**III.6.5.2. Índice E de rifaximina y de sus combinaciones con aceite esencial**

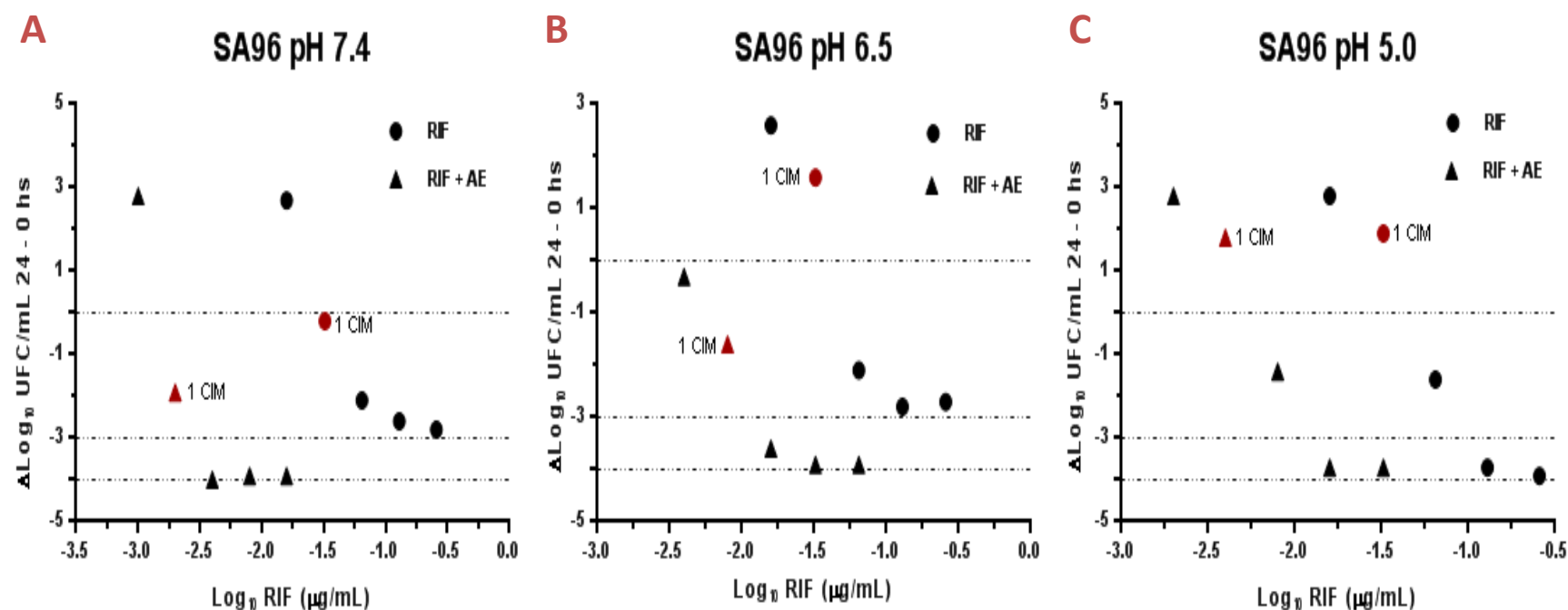
En el caso de la rifaximina, las Figuras 59 a 62 muestran los gráficos del índice E ( $\Delta\text{Log}_{10}$  UFC/mL (24-0) hs vs. el  $\text{Log}_{10}$  de la concentración de antibiótico en presencia y ausencia del aceite esencial y con variación del pH. Tanto para la cepa de referencia (Figura 59) como para los asilamientos salvajes SA13 (Figura 60), SA96 (Figura 61) y SA139 (Figura 62) la actividad inhibitoria (CIM) se mantiene aún al acidificar el medio. La actividad bactericida no se alcanza a pH 7.4 y 6.5 en ninguna de las concentraciones probadas, pero si se logra a pH 5.0 para las concentraciones de 2, 4 y 8 veces la CIM. En cuanto a las combinaciones se puede observar como la curva se desplaza hacia valores menores en la concentración de rifaximina, obteniéndose efecto bactericida cercano a la erradicación virtual para las 3 condiciones de pH.



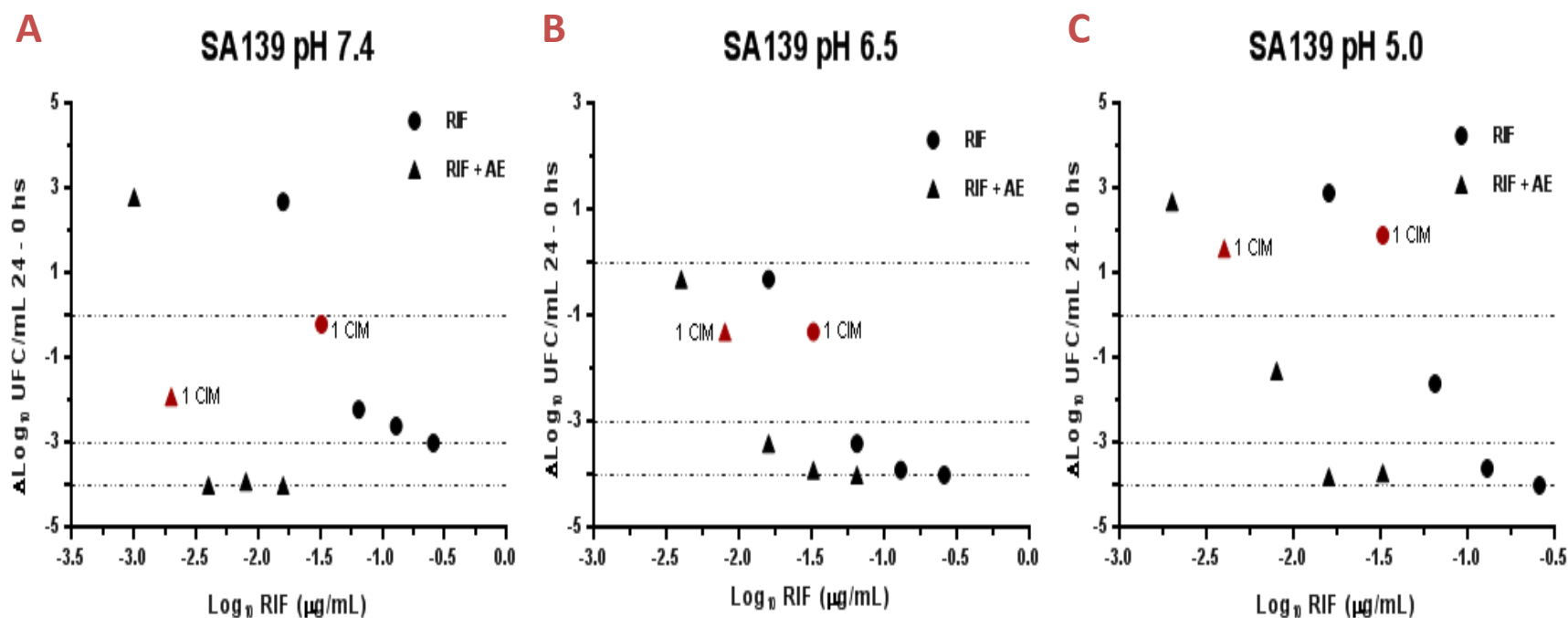
**Figura 59.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de rifaximina (RIF) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).



**Figura 60.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log}_{10} \text{UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de rifaximina (RIF) frente a SA13 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).



**Figura 61.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta \text{Log}_{10} \text{UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de rifaximina (RIF) frente a SA96 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).



**Figura 62.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de rifaximina (RIF) frente a SA139 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).

### III.6.5.3. Índice E de eritromicina y de sus combinaciones con aceite esencial

Al igual que para los antibióticos anteriores, se evaluó el índice E de actividad antibacteriana para eritromicina y sus combinaciones con el aceite esencial. Estos resultados se muestran en las Figuras 63 a 69.

Con el análisis de los gráficos se puede observar como al acidificar el medio disminuye la actividad antimicrobiana de la eritromicina frente a *S. aureus* (tanto para la cepa de referencia como los aislamientos salvajes). En el caso de la eritromicina no se logra actividad bactericida a ninguno de los valores de pH evaluados. Al descender el pH la CIM de este macrólido se incrementa sustancialmente.

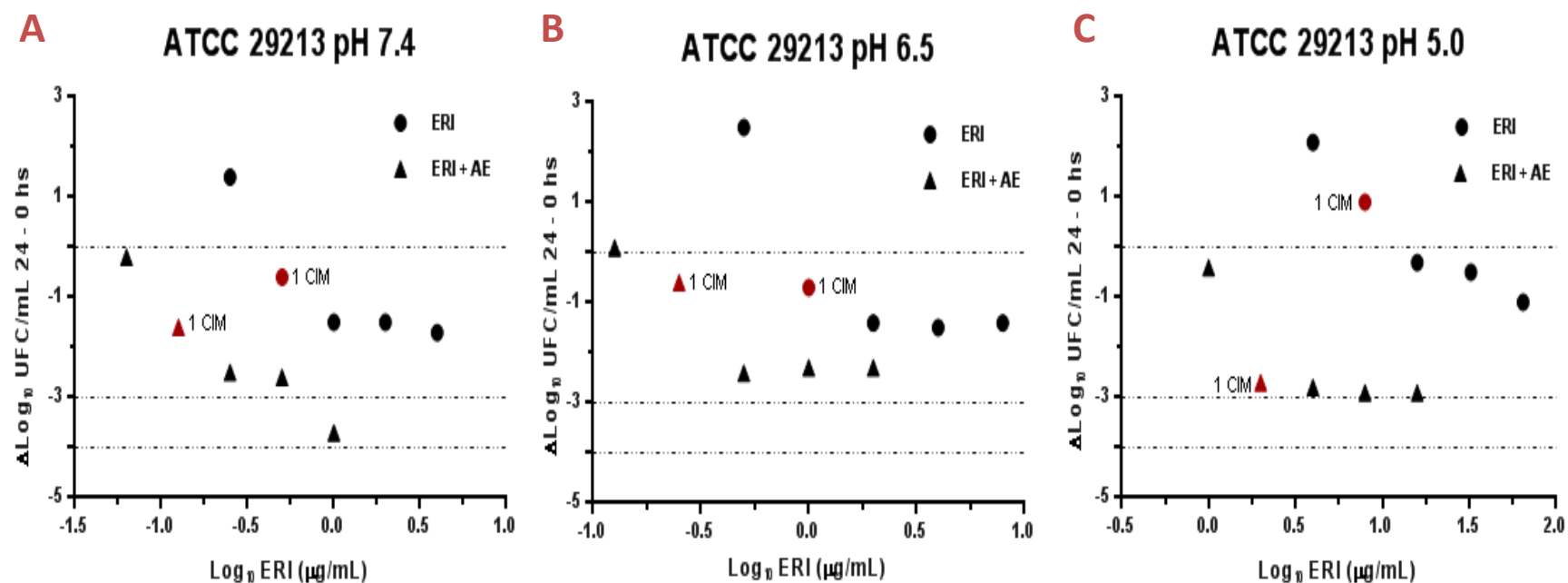
En ninguno de los casos se alcanza actividad bactericida para la eritromicina sola, independientemente de que sean cepas o aislamientos sensibles (ATCC 29213, SA13, SA96 y SA139) o resistentes (78A, 79A y 86B). En el caso de los aislamientos resistentes, a pH 7.4, se evaluó el índice E del antibiótico en concentraciones de 0.5, 1, 2 y 4 veces las CIM, sin evaluar 8 veces la CIM dado que era demasiado elevada (8192 µg/mL). A pH 6.5 y 5.0 para estos aislamientos la CIM fue mayor a 1024 µg/mL, por lo que se tomó como valor CIM a 2048 µg/mL y se evaluaron, además de esta, 0.5 y 2 veces esta CIM.

En los gráficos se puede ver como la presencia del aceite esencial favorece el accionar de la eritromicina, ya que se alcanzan mejores valores de E con concentraciones más bajas del antibiótico en comparación con los resultados obtenidos para eritromicina sola.

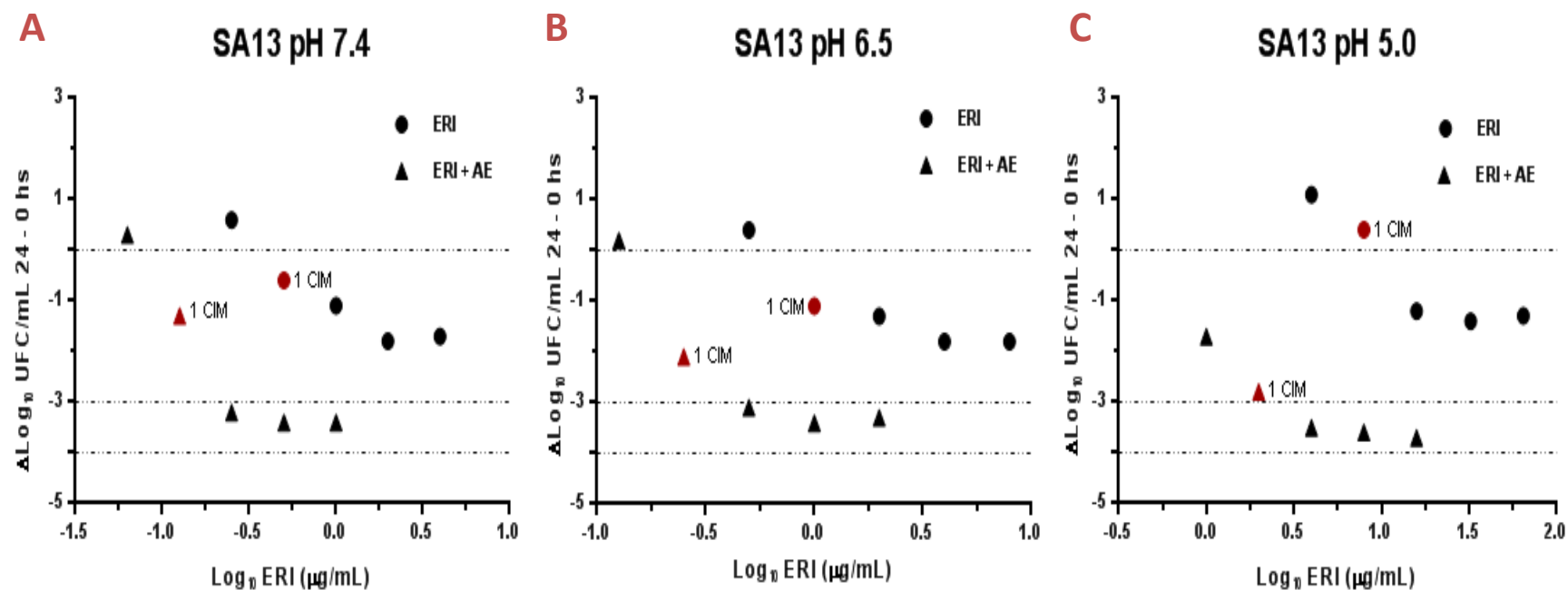
En los aislamientos salvajes sensibles a eritromicina el comportamiento fue similar al observado para la cepa de referencia.

Las Figuras 67, 68 y 69 corresponden a lo que sucede con los aislamientos resistentes a eritromicina. Aquí también se puede observar como la presencia del aceite esencial desplaza la curva hacia concentraciones menores de eritromicina en la mezcla. Es decir que se requieren menores concentraciones del macrólido para alcanzar un mismo efecto respecto del antibiótico solo. Además, la presencia de aceite esencial posibilita que se obtenga efecto bactericida, incluso a pH 6.5 y 5.0.

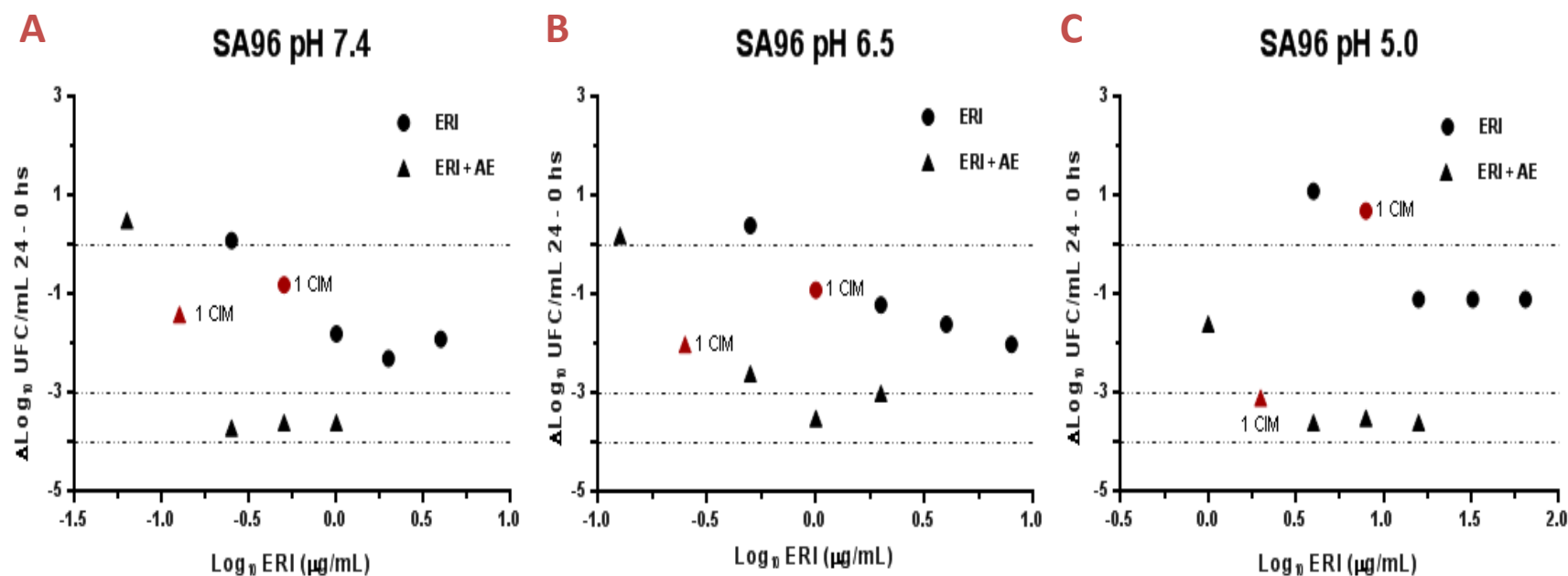




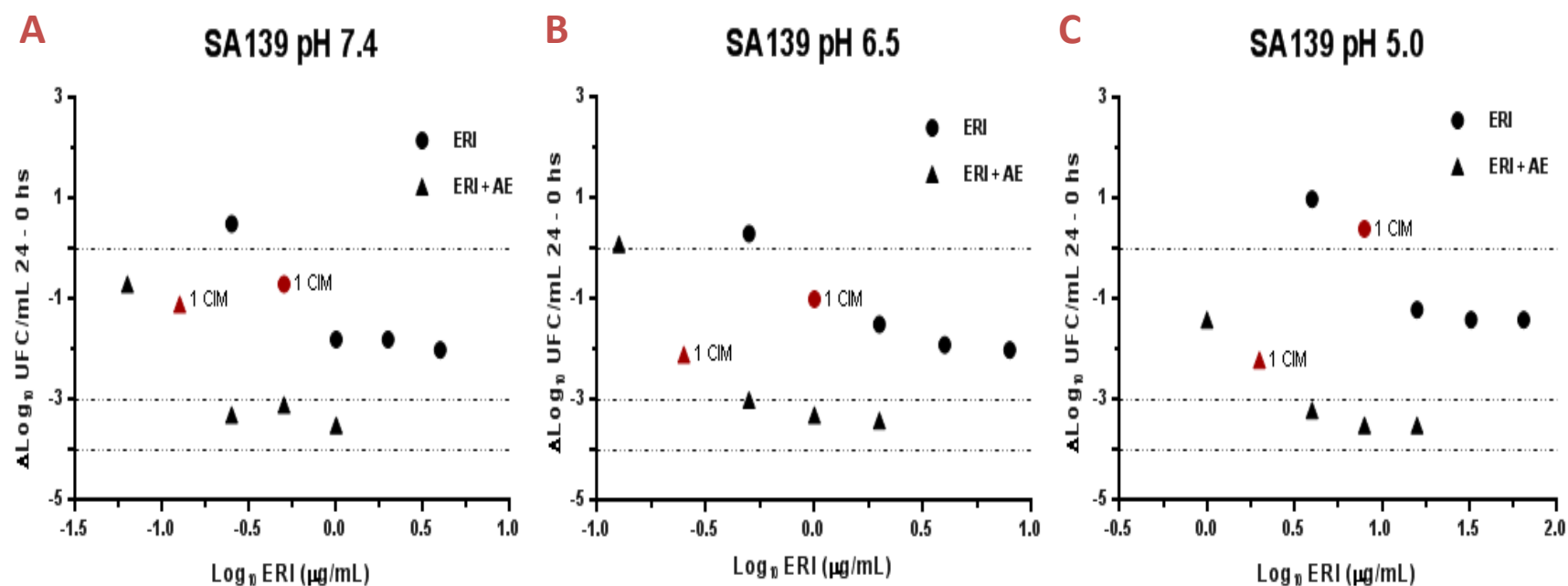
**Figura 63.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta \text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de eritromicina (ERI) frente a la cepa ATCC 29213 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).



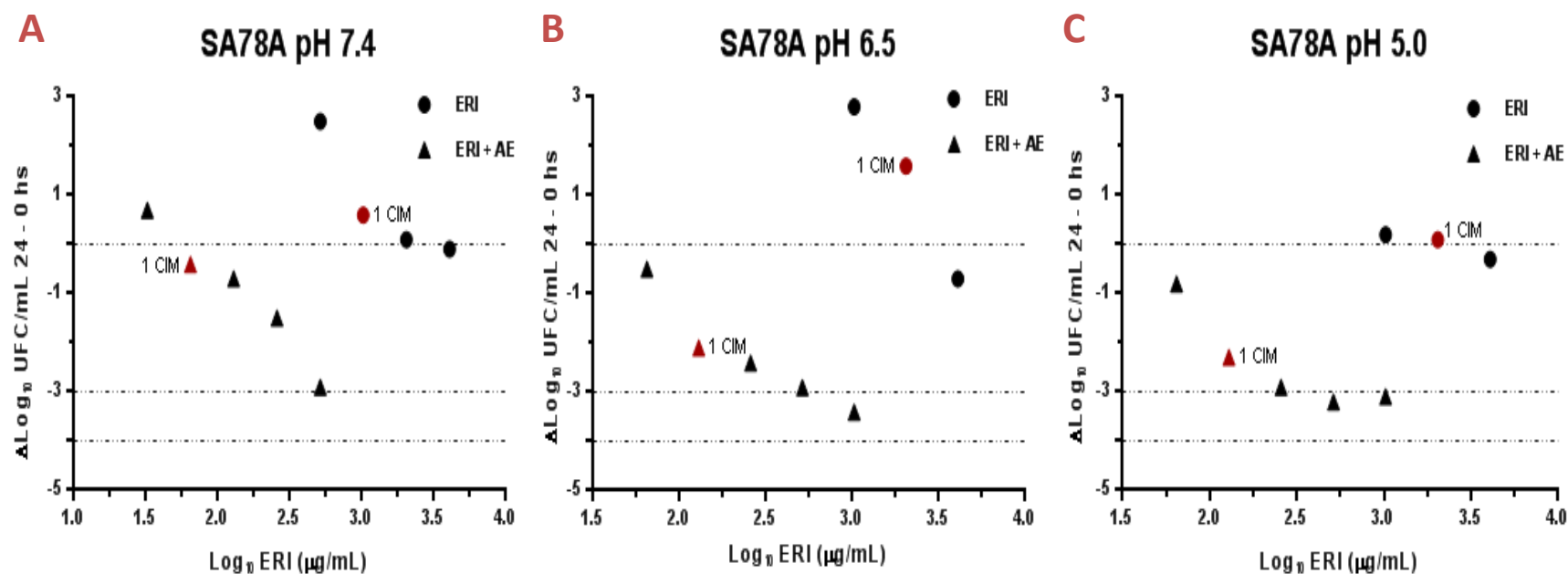
**Figura 64.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de eritromicina (ERI) frente a SA13 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).



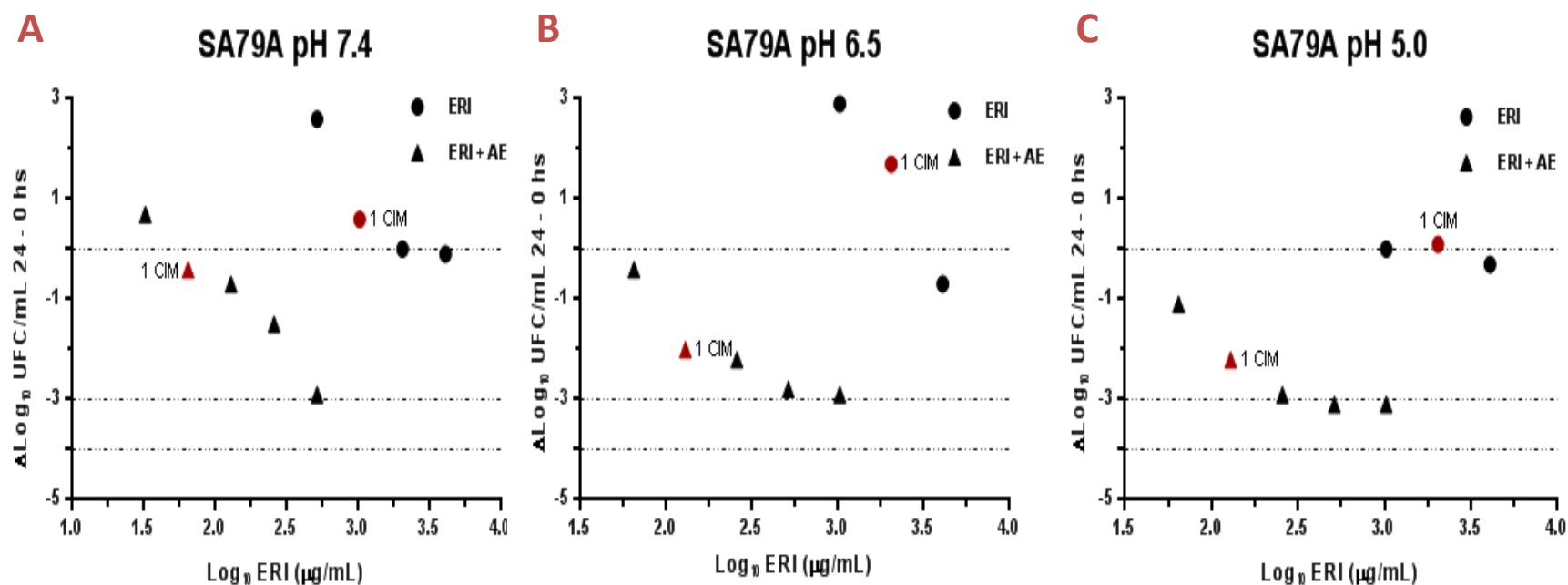
**Figura 65.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de eritromicina (ERI) frente a SA96 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).



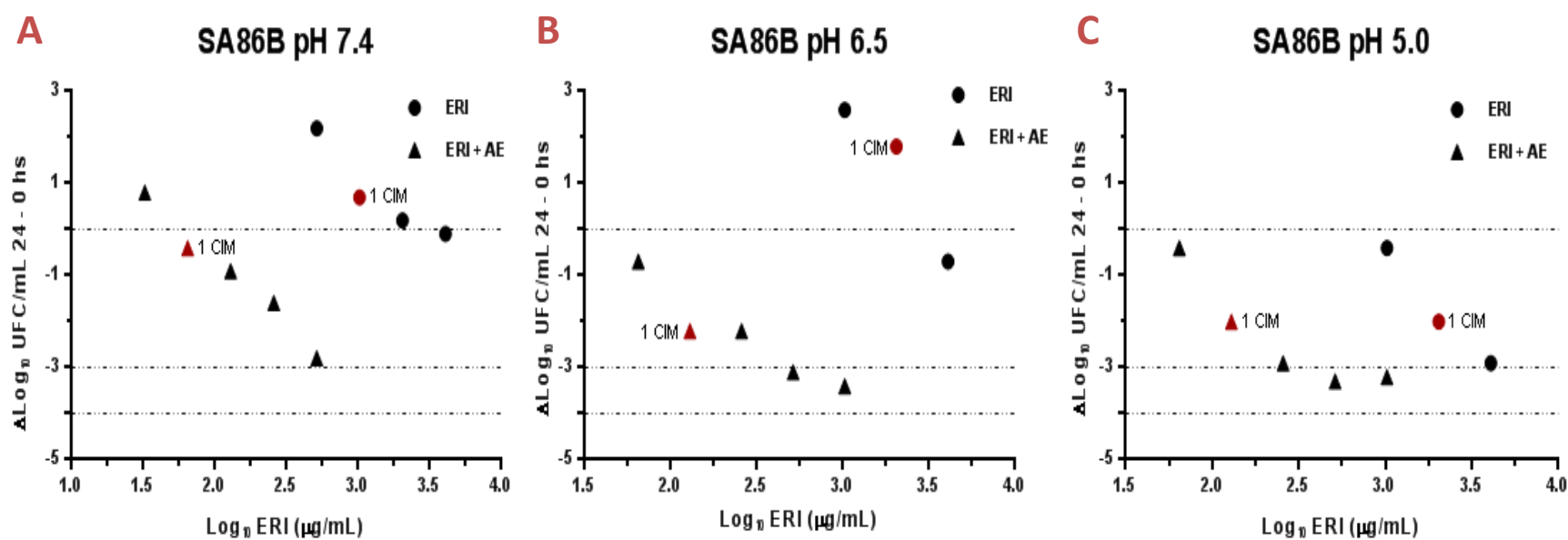
**Figura 66.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de eritromicina (ERI) frente a SA139 a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).



**Figura 67.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de eritromicina (ERI) frente a SA78A a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).



**Figura 68.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de eritromicina (ERI) frente a SA79A a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).



**Figura 69.** Representación gráfica del efecto antibacteriano ( $E$ :  $\Delta\text{Log UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$ ) de eritromicina (ERI) frente a SA86B a pH 7.4 (A); 6.5 (B) y 5 (C) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris* (AE).

## IV. DISCUSIÓN

### IV.1. Obtención y caracterización del aceite esencial de *M. armillaris*

La calidad de los aceites esenciales está determinada por un complejo grupo de factores agrobiológicos y tecnológicos, como el clima y las condiciones geográficas de cultivo, la duración del almacenamiento y las condiciones del mismo. Por esta razón es necesario estandarizar las características que el aceite esencial debe reunir para garantizar la actividad farmacológica que se le atribuye. El estudio de varias características fisicoquímicas marca la importancia práctica en la aplicación de estos en la vida diaria. Propiedades fisicoquímicas como el color, olor, densidad, índice de refracción, rotación óptica, índice de acidez, índice de esterificación, etc., influyen en la calidad de los aceites esenciales.

La importancia comercial de los aceites depende principalmente de estas propiedades fisicoquímicas, que proporcionan datos de referencia para determinar su idoneidad para el consumo (Bamgboye y Adejumo, 2010).

El volumen de aceite esencial obtenido fue de 550 mL, esta cantidad fue más que suficiente para desarrollar este trabajo de tesis. Al utilizar la misma esencia en todos los ensayos realizados, se logró minimizar las posibles variaciones por extracciones en diferentes épocas del año. Este es un factor importante dado que puede haber variabilidad en la concentración de los componentes de los aceites esenciales extraídos de diferentes plantas de una misma especie. El contenido porcentual de cada constituyente puede verse afectado por las condiciones ambientales al ser extraídos bajo diferentes condiciones (Curado *et al.*, 2006). En nuestro caso, la extracción se llevó a cabo en un equipo con producción de vapor *in situ*, donde el material vegetal se encontraba separado del agua en ebullición por una placa cribada. Esta forma de extracción es una de las más utilizadas (Shmidt, 2010).

La determinación de la calidad y la estandarización de un aceite esencial es fundamental para favorecer la inclusión de este tipo de extracto vegetal en la industria farmacéutica y avalar las propiedades medicinales del mismo. Dado que la actividad



antimicrobiana varía en función de los componentes de la mezcla, es importante conocer qué variantes logran mantener el efecto antimicrobiano obtenido frente a una determinada especie bacteriana. Respecto al aceite esencial de *Melaleuca armillaris* existen pocos estudios reportados sobre su actividad antimicrobiana y solo se han analizado la composición por cromatografía gaseosa. En nuestro trabajo establecimos parámetros fisicoquímicos que pueden ser tenidos en cuenta para el control de calidad del mismo.

El aceite esencial que obtuvimos presentó una consistencia líquida con coloración amarilla pálida y de un olor penetrante y fresco. El análisis cromatográfico de nuestro aceite esencial reveló la presencia de 1.8 cineol como componente principal (72.3%) y en menor magnitud limoneno (7.8%) y  $\alpha$ -pineno (6.0%). Estos están comúnmente presentes en aceites esenciales con buena actividad antimicrobiana. El 1.8 cineol es un monoterpeno monocíclico con gran acción antimicrobiana. Este compuesto es, en general, el principal componente en la esencia de las especies de *Eucalyptus* (Rodríguez *et al.*, 2006). En varios estudios (Chabir *et al.*, 2011; Farag *et al.* 2004; Rizk *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2007), también se ha informado al 1.8 cineol como componente principal del aceite esencial de *M. armillaris* (33.93% en Egipto; 85.8% en Túnez; 80.2% en Brasil; 33.9% en Egipto; respectivamente). Sin embargo, este resultado no está de acuerdo con otros autores como Amri *et al.* (2012) y Siddique *et al.* (2017) porque la concentración de este fue marcadamente baja (3.6% y 0.29%, respectivamente). Los otros dos compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial con gran actividad antimicrobiana son el limoneno,  $\alpha$ -pineno (Dai *et al.*, 2013).

#### **IV.2. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *M. armillaris* frente a *S. aureus***

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial se debió agregar al caldo de cultivo Tween 80 dado que la naturaleza lipofílica del extracto dificulta su disolución en el medio de cultivo acuoso. Este surfactante favorece la disolución de la esencia y al utilizarlo al 0.5% no presenta actividad antimicrobiana que interfiera con los

resultados obtenidos. Incluso al 1% no produciría la inhibición del *S. aureus* (Honorio *et al.*, 2015).

La CIM y CBM son los parámetros más utilizados para cuantificar la actividad antibacteriana de una droga frente un patógeno infeccioso. Sin embargo, la evaluación temporal de diferentes concentraciones del antimicrobiano frente a un microorganismo permite obtener una mejor descripción acerca de la magnitud del efecto antibacteriano (Craig, 1998). Por ello también es importante analizar que ocurre en el tiempo mediante la construcción de curvas de muerte bacteriana.

Luego de realizar los ensayos para establecer la CIM, la CBM y evaluar el comportamiento del microorganismo en estudio, mediante curvas de muerte bacteriana frente al aceite esencial solo, sin la adición de antibiótico, se ha determinado la existencia de actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, coincidiendo con lo reportado por Amri *et al.* (2012). Sin embargo, no es posible establecer un paralelismo con dicho trabajo debido a las diferencias en la composición de los aceites esenciales, aún siendo de plantas de la misma especie. Las diferencias fundamentales entre ambos son que el extracto obtenido en nuestro estudio presentó valores muy superiores de: 1.8 cineol (72.3% vs 3.6%); limoneno (7.8% vs ausencia);  $\alpha$ -pineno (6% vs ausencia); mirceno y  $\beta$ -pineno (2.2% vs ausencia); terpinen-4-ol (1.4% vs 0.4%) y  $\alpha$ -terpineol (1.4% vs 7.7%).

La CIM del aceite esencial de *M. armillaris* necesaria para inhibir *S. aureus* ATCC 29213 fue de 25  $\mu$ L/mL a pH 7.4 y 6.5, y disminuyó 2 veces a pH 5.0. Frente a todas las cepas y aislamientos salvajes ensayados, la CIM fue de 12.5  $\mu$ L/mL a pH 7.4, manteniéndose a pH 6.5 para 4 cepas y aislamientos (SA13, SA96, SA139 y SARM 5-I) y disminuyendo a la mitad para los 3 aislamientos restantes a pH 6.5 (SA78A, SA79A y SA86B). Variaciones debidas a la existencia de subpoblaciones bacterianas con diferentes sensibilidades. Al analizar lo sucedido a pH 5.0 se observó un descenso a la mitad de la CIM obtenida a pH 6.5 (6.25 y 3.1  $\mu$ L/mL, respectivamente). Algo similar ocurre al evaluar la CBM, ya que este parámetro disminuye entre 2 y 4 veces según la cepa o aislamiento comparando lo que sucede a pH 7.4 y 5.0.

Falci *et al.* (2015) estudiaron la composición y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de una especie de *Melaleuca* (no especificada) cultivada en Brasil, en la localidad de Pouso Alegre, al sur del estado de Minas Gerais. Este aceite esencial presentó 70.8% de 1.8 cineol, 8.95% de terpineol y 8.25% limoneno. La cantidad de 1.8 cineol, limoneno y mirceno (1.99%) fue similar al aceite esencial de *M. armillaris* que se obtuvo en este trabajo de tesis. Si bien no se especifica la especie de *Melaleuca*, se puede hacer un paralelismo con la composición de los aceites esenciales mencionados. Estos autores demostraron una importante actividad antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* con valores de CIM entre 1 y 2  $\mu\text{L/mL}$ , y CBM entre 2 y 4  $\mu\text{L/mL}$ . Li *et al.*, 2014 encontraron que la CIM del 1.8 cineol frente a *S. aureus* ATCC 25923 fue de 6.25  $\mu\text{L/mL}$ .

El alto contenido de 1.8 cineol puede ser uno de los factores que contribuyen a la actividad antibacteriana del aceite esencial, al cual se le ha atribuido como acción antimicrobiana la facilitación de la permeabilidad de las membranas de microorganismos como *S. aureus* debido a su gran hidrofobicidad (Carson *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2015). Este compuesto suele ser el más abundante en el aceite esencial de *Eucalyptus globulus*. Yanez Rueda y Cuadro Mogollón (2012) encontraron una importante actividad para esta especie frente *S. aureus* ATCC 29213 (CIM de 12.4  $\mu\text{g/mL}$ ), en la cual la composición del mismo fue similar a la de *M. armillaris* evaluada en esta tesis: 1.8 Cineol (82.27%), seguido de Limoneno (3.70%),  $\alpha$ -Pineno (3.16%), Terpinen-4-ol (1.4%),  $\alpha$ -Terpineol (1.2%),  $\beta$ -Mirceno (1.12%) y  $\alpha$ -Terpineno (1.1%), entre otros. Esto podría indicar un sinergismo entre estos componentes particularmente efectivo frente a cepas de *S. aureus*.

La relación existente entre CIM y CBM permite realizar el análisis acerca de si un antimicrobiano puede tener una actividad bactericida o bacteriostática. Un compuesto es bacteriostático si la relación CBM/CIM es mayor a 4 (Pankey y Sabath, 2004). La capacidad de un aceite esencial de actuar como bactericida o bacteriostático dependerá del quimitipo del mismo, es decir de los compuestos que conformen el extracto (Mayaud *et al.*, 2008). Al analizar la CIM y CBM del aceite esencial de *M. armillaris* encontramos que para los aislamientos SA13, SA96 y SA139 estos parámetros coinciden, y esta coincidencia se mantiene con los diferentes valores de pH. En cuanto a las demás cepas, la relación

CBM/CIM fue entre 2 y 4, manteniendo la relación al acidificar el medio de cultivo. Por lo tanto se puede decir que el aceite esencial de *M. armillaris* presenta una actividad bactericida frente al *S. aureus*, la cual es independiente del pH del medio.

Cuando se evaluaron las curvas de muerte bacteriana del aceite esencial frente a las cepas y aislamientos de *S. aureus* (figuras 14 a 21) se observó una disminución del recuento bacteriano en función del tiempo de exposición al mismo. Este tipo de ensayo ha sido utilizado generalmente para determinar la cinética de muerte bacteriana *in vitro*. Sin embargo, también puede ser muy útil para distinguir si la muerte bacteriana es dependiente de la concentración del antimicrobiano y/o si es dependiente del tiempo de contacto. La muerte bacteriana concentración dependiente se produce cuando la velocidad y el grado de muerte son mayores en presencia de concentraciones crecientes de antimicrobiano, como ocurre con aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Por otro lado, para aquellos que son tiempo dependiente, la muerte bacteriana ocurre cuando el incremento en las concentraciones por encima de la CIM no producen un mayor grado de muerte en forma proporcional, como ocurre con los  $\beta$ -lactámicos (Pankey y Sabath, 2004).

En las curvas de muerte bacteriana obtenidas con el aceite esencial de *M. armillaris* frente a las cepas y aislamientos de *S. aureus*, en general se puede observar una ligera caída de la pendiente de la curva cuando se evaluó una concentración equivalente a la CIM del aceite esencial para cada cepa y aislamiento. A su vez, para concentraciones de 0.5 CIM no se percibe un grado de crecimiento relevante, y en muchos casos hay una disminución del inóculo inicial. Para concentraciones de 2, 4 y 8 veces la CIM se evidencia una caída del conteo de células bacterianas a las 2 horas, continuando el descenso en forma exponencial hasta las 8-12 hs, para luego mantener el conteo bacteriano hasta las 24 hs post iniciado el ensayo. Este patrón se mantuvo en general para todas las cepas y aislamientos e incluso al modificar el pH del medio.

En el caso de la cepa de referencia (ATCC 29213) a pH 7.4 se logró alcanzar un descenso de 2.6 Log<sub>10</sub> del inóculo inicial para concentraciones de 2, 4 y 8 veces la CIM. A pH 6.5 el descenso para estas concentraciones fue de 2.8 Log<sub>10</sub>. A pH 5.0 el descenso del inóculo fue de 2.8 para 2CIM, 3.6 para 4CIM y 3.9 para 8 CIM. Con estos resultados se

puede ver que a mayor concentración y mayor acidez, la actividad antibacteriana del aceite esencial es más elevada, siendo similar para concentraciones de 4 y 8CIM.

En el caso de los aislamientos SA13, SA96 y SA139 la disminución del inóculo inicial para 2CIM a las 24 hs es de 2.7-3.0 Log<sub>10</sub> a pH 7.4, de 3.0-3.2 a pH 6.5 y 2.9-3.2 a pH 5.0. En cuanto a 4 y 8CIM, el descenso es de 2.5-3.5 Log<sub>10</sub> a pH 7.4, de 3.1-3.7 a pH 6.5 y 3.2-3.9 a pH 5.0. En lo que se refiere a los aislamientos SA78A, SA79A y SA86B se observa una caída de 3.1-3.8 para los 3 valores de pH a concentraciones de 4 y 8CIM. En el caso de la concentración de 2CIM para estas cepas la caída del inóculo fue entre 2.5 y 3.4 Log<sub>10</sub>. Por último, para la cepa SARM 5-I la situación es similar, donde con concentraciones de 4 y 8 veces la CIM el inóculo cae entre 3.2 y 3.6 unidades logarítmicas a los 3 valores de pH. De estos resultados se destaca la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *M. armillaris*, logrando disminuir el inóculo inicial aún con variación del pH.

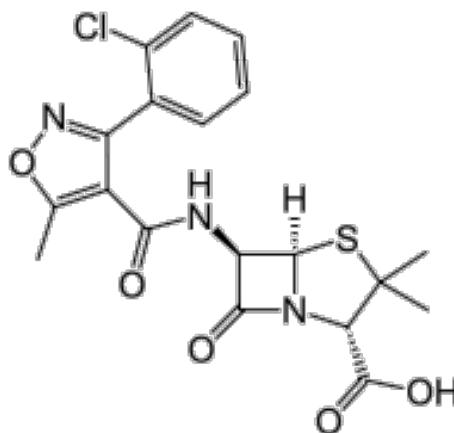
El efecto de la acidez sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está escasamente reportado en la bibliografía. Hood *et al.* (2004) demostraron que los aceites esenciales pueden tener un efecto significativo en el pH de los medios utilizados en los ensayos antimicrobianos y que este efecto parece reducirse. El grado de modificación del pH del medio dependerá del aceite esencial evaluado. En dicho estudio, los aceites esenciales de *M. alternifolia*, *Santalum spicatum* y *Lavandula angustifolia* en concentraciones de hasta el 10%, no ejercen una importante variación del pH. En cambio si resultó más relevante para el aceite esencial de *Backhousia citriadora*. La capacidad de acidificación del medio puede influir en la actividad antimicrobiana. Algunos aceites esenciales pueden tener un efecto significativo en el pH de los medios utilizados en los ensayos antimicrobianos, particularmente en concentraciones por encima del 2%-3%, y esta acción puede contribuir a la actividad antibacteriana de los aceites esenciales (Hood *et al.*, 2004). Si bien nosotros no evaluamos como afecta el aceite esencial de *M. armillaris* el medio de cultivo, se puede observar que una acidificación del mismo mejora la actividad antimicrobiana frente al *S. aureus*, ya que la CIM a pH 5.0 es menor a la observada a pH 7.4 para todas las cepas y aislamientos analizados.

El mecanismo de acción del aceite esencial de *M. armillaris* aún no ha sido investigado frente a *S. aureus*. Hayouni *et al.* (2008) estudiaron la actividad antimicrobiana de esta especie frente diferentes especies de *Lactobacillus*. Dado que 1.8 cineol fue el componente principal encontrado (68.92%), estos autores sugieren a modo de hipótesis que este compuesto podría haber desestabilizado la membrana citoplásmica de dichas bacterias, tal como lo han demostrado Li *et al.* (2014). Sin embargo, el modo de acción postulado de *M. armillaris* por Hayouni *et al.* (2008) involucra también a los componentes minoritarios hallados ( $\alpha$ -Pino Terpinen-4-ol, sabineno,  $\beta$ -Mirceno y  $\alpha$ -Terpineno, entre otros). Según este autor, dichas moléculas interactúan con la membrana celular, donde se disuelven en la bicapa fosfolipídica, alineándose entre las cadenas de ácidos grasos. Esta distorsión de la estructura física causaría expansión y desestabilización de la membrana, aumentando la fluidez de la membrana, lo que a su vez aumentaría la permeabilidad pasiva.

### **IV.3. Actividad antimicrobiana de cloxacilina y de su combinación con aceite esencial de *M. armillaris* frente a *S. aureus***

#### **IV.3.1. Cloxacilina**

La cloxacilina es un antimicrobiano semisintético derivado de la penicilina (Figura 70), que resiste la ruptura provocada por la enzima penicilinas. Es un antibiótico con actividad bactericida ampliamente utilizado en medicina veterinaria frente a *S. aureus* productor de  $\beta$ -lactamasa (Mestorino y Errecalde, 2012). Al evaluar la sensibilidad de las cepas y aislamientos de esta especie a cloxacilina, utilizamos como marcadores discos de oxacilina y cefoxitina. El primero representa a todas las penicilinas estables a penicilinas y el segundo representa el marcador sustituto de oxacilina (CLSI 2013, documento M100-S23).



**Figura 70.** Estructura molecular de la cloxacilina.

La CIM de cloxacilina se comparó con el valor obtenido para oxacilina (penicilina antiestafilocócica) frente a la cepa de referencia (*S. aureus* ATCC 29213) aplicando el rango de concentraciones (0.12-0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) indicado por la CLSI en su documento VET01-S2 (2013). La CIM de cloxacilina obtenida para *S. aureus* ATCC 29213 a pH 7.4 fue de 0.125  $\mu\text{g/mL}$  y la CBM de 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Croes *et al.* (2010) obtuvieron para la misma cepa frente a oxacilina una CIM de 0.25  $\mu\text{g/mL}$  con una CBM de 0.5  $\mu\text{g/mL}$ .

Los 3 aislamientos sensibles (SA13, SA96 y SA139) presentaron una CIM de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  a pH 7.4. En todos los casos, se observó una disminución de esta concentración al acidificar el medio de cultivo. Lo mismo ocurrió con la cepa SARM 5-I, donde a pH 7.4 y 6.5 la CIM fue de 512  $\mu\text{g/mL}$  mientras que disminuyó a 4  $\mu\text{g/mL}$  a pH 5.0. Se ha comprobado que los  $\beta$ -lactámicos mantienen la actividad a un pH de 5.0 (Barcia-Macay *et al.*, 2006). Este resultado también fue demostrado en este trabajo, donde no solo se vio que la potencia del antibiótico se mantiene, sino que se incrementa. Además, la cepa SARM recuperó parcialmente la sensibilidad a cloxacilina a pH 5.0, al igual que lo observado por Lemaire *et al.* (2007) empleando un medio con pH 5.5. El medio ácido podría generar un cambio en la estructura tridimensional de la PBP2a afectando su centro catalítico de modo que aumentaría la accesibilidad del antibiótico al sitio activo. Este sitio activo, en condiciones de pH cercano a 7, se mantendría cerrado e inaccesible para el antimicrobiano; como consecuencia a pH bajo se logra recuperar parcialmente la sensibilidad al mismo, siendo

un efecto que depende del  $\beta$ -lactámico, de la concentración y del tiempo de exposición al mismo (Lemaire *et al.*, 2008).

Al evaluar la CBM de la cloxacilina se observó que esta concentración fue entre 2 y 4 veces la CIM, lo que indica un efecto bactericida del  $\beta$ -lactámico. Se considera que un antibiótico es bacteriostático si la CBM/CIM es mayor a 4 (Pankey y Sabath, 2004). Nuevamente se pudo evidenciar, al igual que para la CIM, como la acidez del medio incrementa la actividad antimicrobiana del mismo. Incluso se logra mantener la relación CBM/CIM entre 2 y 4, al igual que para la cepa SARM 5-I. La actividad antibacteriana de cloxacilina a los 3 pHs evaluados, presentó un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones, revelando claramente que su actividad frente a *S. aureus* no se vió aumentada al incrementar las concentraciones de cloxacilina. Es decir, tal como lo reporta la literatura (Craig 1998) cloxacilina es un antibiótico acción bactericida dependiente del tiempo de contacto. Con el análisis del patrón de las curvas de muerte obtenidas, se puede observar como concentraciones de 4 y 8 veces la CIM disminuyen el inóculo bacteriano a una velocidad similar. La mayor caída en el recuento de microorganismos se produce entre las 4 y 12 hs para los aislamientos sensibles al antibiótico, independientemente del pH, a concentraciones de 2, 4 y 8CIM. En cambio, en el caso de la cepa SARM 5-I la caída es mucho más lenta, registrándose entre las 4 y 24 hs en las mismas condiciones. El grado de muerte en este patrón de actividad bactericida depende en gran medida del tiempo de exposición. La ausencia de mayores niveles de muerte bacteriana a mayores concentraciones es una característica común de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Craig 1998).

En las curvas de muerte bacteriana en las que se enfrenta a las cepas y aislamientos de *S. aureus* con la cloxacilina se puede ver que independientemente de la concentración del antibiótico, la caída en el recuento bacteriano comienza a evidenciarse a las 4 hs. Este comportamiento es típico de los antibióticos denominados *Tiempo dependientes*. En este tipo de antibióticos es importante mantener la concentración por encima de la CIM el 40-50% del tiempo entre dosis para obtener una eficacia por arriba del 85% (Errecalde, 2004).



#### IV.3.2. Combinación aceite esencial/Cloxacilina

La situación alarmante de la resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos ha influenciado la búsqueda de alternativas, y particularmente la idea de encontrar sinergismo entre estos fármacos y extractos vegetales. La combinación entre compuestos extraídos de plantas y antibióticos no siempre resulta en sinergismo, también pueden darse situaciones de antagonismo o indiferencia. Está establecido que el efecto es sinérgico si el efecto obtenido con la combinación es mayor de lo que sería si la concentración del segundo fármaco se reemplaza por el primer fármaco, mientras que el efecto antagónico se da cuando el efecto combinado es menor que el efecto obtenido con un solo fármaco. La existencia de sinergismo resulta en un aumento de la tasa de muerte, una potenciación del antibiótico, disminución en la capacidad de seleccionar cepas resistentes, etc. La comprensión del mecanismo de sinergia puede proporcionar una nueva estrategia para el tratamiento de enfermedades infecciosas al reducir los efectos secundarios producidos por las altas dosis de antibióticos (Bhardwaj *et al.*, 2016).

Entre las posibles ventajas que pueden presentar las interacciones sinérgicas de compuestos se pueden incluir el incremento de la eficacia terapéutica, la reducción del riesgo de toxicidad por disminución de la dosis inicial manteniendo la eficacia, la disminución del riesgo de selección de resistencia bacteriana y la provisión de sinergismo selectivo sobre el huésped (Chou, 2006).

El sinergismo entre dos compuestos antimicrobianos se produce cuando hay un descenso de  $2\text{Log}_{10}$  en el recuento de colonias bacterianas luego de 24 hs comparándolo con lo que sucede con el compuesto más activo administrado solo. En cambio, hay indiferencia si la caída en el conteo es menor a  $2\text{Log}_{10}$  o si hay un leve crecimiento en el mismo tiempo; y antagonismo si hay al menos un incremento de  $2\text{Log}_{10}$  (Pillai *et al.*, 2005). Las técnicas de curva de muerte bacteriana y del tablero de damas son las más utilizadas para establecer la existencia de sinergismo entre compuestos (Bhardwaj *et al.*, 2016).

Al evaluar combinaciones de aceite esencial y cloxacilina frente a las cepas y aislamientos de *S. aureus* seleccionados se pudo observar un efecto sinérgico, ya que los

valores CFI obtenidos fueron  $\leq 1$ , con excepción de lo ocurrido para los 3 aislamientos sensibles a pH 6.5 donde, el valor obtenido fue de 1.1.

Cuando enfrentamos estas combinaciones a las cepas y aislamientos de *S. aureus*, se evidenció una gran disminución en la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano. En la combinación aceite esencial/cloxacilina, el efecto bactericida se mantuvo incluso cuando el pH del caldo se redujo de 7.4 a 5.0, de manera similar a lo mencionado anteriormente cuando se evaluó el comportamiento del aceite esencial solo. De la misma manera, cuando el medio de cultivo se acidificó, la concentración de cloxacilina, en la mezcla aceite esencial/cloxacilina, se redujo incluso hasta 10 veces para inhibir el microorganismo en el caso de los aislamientos sensibles. Frente a la cepa resistente a meticilina (SARM 5-I) se obtuvieron valores de CFI de 0.53, el que se mantuvo con los cambios de pH, modificándose solo las concentraciones de antibiótico y aceite esencial. Es decir que en la mezcla las concentraciones de la esencia y de cloxacilina, y esta disminución es mayor al acidificar el medio. De este modo considerando el efecto sinérgico entre el extracto y el antibiótico, y sumándole la acción de la acidez del medio se logra que al bajar el pH a 5.0, y en presencia de 1.6  $\mu\text{L/mL}$  de aceite esencial, la cantidad de cloxacilina necesaria para inhibir la cepa meticilino-resistente sea 512 veces menor, respecto de lo que se necesita para lograr la inhibición solo con el  $\beta$ -lactámico a pH 7.4.

Como se mencionó en introducción, aún no existen trabajos publicados en los que se haya estudiado la interacción farmacológica entre el aceite esencial de *M. armillaris* y cloxacilina. En la bibliografía se encuentra mucha información acerca de la actividad antimicrobiana de otra especie de *Melaleuca*, *M. alternifolia* (árbol del té). El aceite esencial de esta planta ha sido investigado en busca de combinaciones sinérgicas, utilizando la técnica de tablero de damas frente a *S. aureus*. Sin embargo, los resultados obtenidos al combinar su aceite esencial con diferentes antibióticos como vancomicina (LaPlante, 2007), tobramicina (D'Arrigo *et al.*, 2010) y ciprofloxacina (Van Vuuren *et al.*, 2009) arrojaron un efecto de indiferencia o antagonismo.

Chaves *et al.* (2018) observaron la presencia de un efecto sinérgico entre el aceite esencial de *Eucalyptus camaldulensis* y  $\beta$ -lactámicos como cefalexina, amoxicilina y ampicilina frente a cepas SARM. Este aceite esencial presentó en su composición una concentración de 1.8 cineol,  $\alpha$ -pineno y  $\alpha$ -terpineol (76.93%, 7.15% y 2.39%, respectivamente) similar a nuestro aceite esencial de *M. armillaris* evaluado.

La actividad combinada del aceite esencial y cloxacilina, utilizada en nuestro estudio, también se evidenció en el efecto bactericida, establecido por el índice E. Como se indica en el apartado Resultados, el índice de actividad antibacteriana (E) es la diferencia entre los valores  $\text{Log}_{10}$  del número de bacterias viables (UFC/mL) al inicio (nt-0) y al final del ensayo (nt- 24). Con la finalidad de evaluar E, aplicamos tres puntos de corte teóricos: a) Efecto bacteriostático:  $E = 0$ ; no hay cambios en el valor de nt-0: b) Efecto bactericida:  $E = -3$ ; hay reducción de  $\geq 3 \log_{10}$  de nt-0 por eliminación del 99.9% de las bacterias iniciales y c) Efecto de erradicación virtual de bacterias:  $E = -4$ ; Hay reducción de  $\geq 4 \text{ Log}_{10}$  (eliminación del 99.99%) respecto del Log de nt-0.

Se observó una disminución en el inóculo bacteriano inicial  $-\text{Log}_{10}$  (UFC/mL)- en un factor de 3 en 24 horas tanto para el antibiótico solo como en la mezcla en el caso de las cepas y aislamientos sensibles al antimicrobiano (SA13, SA96, SA139 y ATCC29213). Sin embargo, la concentración del antibiótico en presencia del aceite esencial fue claramente menor y el valor de E obtenido fue más cercano al efecto de erradicación virtual ( $E = -4$ ) que la concentración necesaria cuando se aplica la  $\beta$ -lactámico solo. En un estudio realizado por Nascimento *et al.* (2007) el aceite esencial de *Eremanthus erythropappus* se evaluó en combinación con ampicilina (antibiótico  $\beta$ -lactámico) contra *S. aureus*, lográndose un efecto bactericida sinérgico después de una incubación de 24 horas. En el caso de la cepa SARM 5-I la caída del inóculo inicial a las 24 hs en presencia de la mezcla siguió un patrón similar al obtenido con los aislamientos sensibles. Es decir que la curva correspondiente a las combinaciones aceite esencial/cloxacilina se encuentran desplazadas hacia valores menores de concentración de  $\beta$ -lactámico. Además, esto se mantiene con la acidificación del medio. A pH 7.4 se requieren 12.5  $\mu\text{L/mL}$  de aceite esencial y 32  $\mu\text{g/mL}$  de cloxacilina para lograr un efecto bactericida ( $E = -3$ ), en el caso del

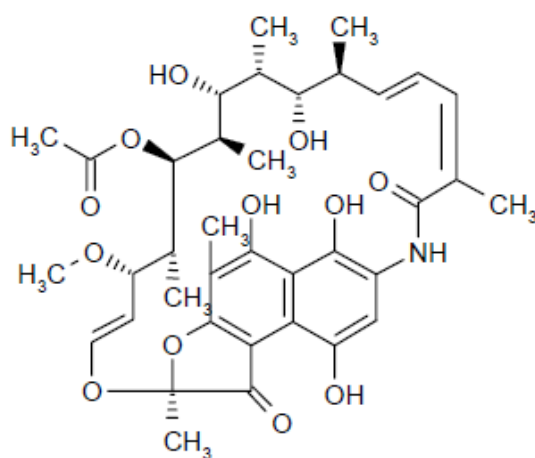
antibiótico solo se requieren 2048  $\mu\text{g/mL}$ . Al acidificar el medio a pH 5.0 el efecto bactericida de la mezcla se obtiene con 6.25  $\mu\text{L/mL}$  de aceite esencial y 4  $\mu\text{g/mL}$  de cloxacilina comparado con los 8  $\mu\text{g/mL}$  de cloxacilina para dicho antibiótico solo.

En conclusión, fue posible reducir la concentración del antibiótico necesario para inhibir a las cepas y aislamientos *S. aureus* sensibles y meticilino-resistente mediante la combinación de cloxacilina con aceite esencial *in vitro*. Considerando que la cloxacilina es un antimicrobiano del grupo de los  $\beta$ -lactámicos con buena actividad frente a *S. aureus* y con amplio uso en medicina veterinaria, el aceite esencial aumenta el efecto antibacteriano de la cloxacilina incluso cuando el pH intracelular fuera más ácido que el medio extracelular. Esto es importante para el tratamiento de infecciones intracelulares, en las que *S. aureus* se internaliza dentro de los fagolisosomas porque aumentaría la probabilidad de éxito terapéutico. Los resultados obtenidos sugieren un aumento de la susceptibilidad a los  $\beta$ -lactámicos debido al pH ácido que prevalece en las vacuolas donde vive y prospera *S. aureus*, lo que se vería facilitado por la acción del aceite esencial de *M. armillaris*. Como se mencionó anteriormente, el pH ácido provoca un cambio conformacional de la proteína diana de acción (PBP2a), lo que aumenta la afinidad de su centro catalítico por el  $\beta$ -lactámico (Craig, 1998; Mensa *et al.*, 2013). De este modo, la sinergia que fue encontrada entre la cloxacilina y el aceite esencial en condiciones ácidas podría tener lugar en el interior celular presentando un efecto importante contra *S. aureus* cuando es refractario a los mecanismos inmunológicos. Estos hallazgos se convierten en una valiosa alternativa para el tratamiento de infecciones estafilocócicas persistentes. El aceite esencial de *M. armillaris* es una buena opción a considerar en el diseño de futuras formulaciones para evaluar los efectos *in vivo*, a fin de maximizar la eficacia de los antimicrobianos actuales y futuros.

#### IV.4. Actividad antimicrobiana de rifaximina y su combinación con aceite esencial de *M. armillaris* frente a *S. aureus*

##### IV.4.1. Rifaximina

La rifaximina es un antibiótico semisintético derivado de la rifamicina perteneciente a la familia de las ansamicinas (Figura 71). Este antimicrobiano tiene acción bactericida y es de amplio espectro. Presenta como mecanismo de acción la inhibición de la síntesis del ARN bacteriano (Gobernado y Ponce, 2004), mediante unión a la ARN polimerasa dependiente del ADN bacteriano en el lugar del híbrido ADN-ARN inhibiendo la unión fosfodiéster, lo que ocasiona el bloqueo de la síntesis de ARN y en consecuencia inhibe la transcripción (Hartmann *et al.*, 1967). Si bien son de amplio espectro con actividad sobre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, la sensibilidad de estas últimas es mayor. En el hombre no se absorbe por vía oral, alcanzando una concentración muy alta en la luz intestinal, por lo que se la indica para el tratamiento de enfermedades infecciosas del aparato gastrointestinal (Manjarrez *et al.*, 2012). En medicina veterinaria, se usa principalmente en el tratamiento de enfermedades que afectan la piel en todas las especies animales, en la terapia y la profilaxis de la mastitis en vacas (Malinowski *et al.*, 2008), y en el tratamiento de perros con enteropatía crónica (Menozzi *et al.*, 2016).



**Figura 71.** Estructura molecular de la rifaximina.

Los valores de CIM que se encuentran en la bibliografía frente a *S. aureus* para la rifaximina son bajos. Hoover *et al.* (1993) encontraron para cepas de esta especie valores que oscilan entre  $\leq 0.015$  y  $0.03 \mu\text{g/mL}$ . En otro estudio, llevado a cabo por Pistiki *et al.* (2014) los valores reportados como CIM de rifaximina fueron  $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ .

En el presente estudio, la rifaximina presentó una elevada actividad antimicrobiana frente a las cepas de *S. aureus* ATCC 29213, SA13, SA96 y SA139. Para este antibiótico no se evaluaron cepas resistentes porque no se encontraron ejemplares con sensibilidad disminuida a los mismos. El valor de CIM obtenido fue bajo y similar para todas las cepas y aislamientos analizados ( $0.032 \mu\text{g/mL}$ ), lo cual indica una importante potencia antibiótica frente a *S. aureus*. Este valor de concentración inhibitoria fue independiente del pH, ya que no se observaron cambios en los valores CIM. Sin embargo, la CBM varió al analizar la actividad antimicrobiana al pH más ácido. A pH 7.4 y 6.5, la CBM fue de  $0.512 \mu\text{g/mL}$  para todos los microorganismos, mientras que a pH 5.0 disminuyó a  $0.064 \mu\text{g/mL}$  para la cepa ATCC 29213 y  $0.128 \mu\text{g/mL}$  para los 3 aislamientos restantes.

Al evaluar, mediante curva de muerte bacteriana, como incide la presencia de rifaximina en el crecimiento de la cepa de referencia de *S. aureus* se observó crecimiento a una concentración de 0.5 CIM ( $0.016 \mu\text{g/mL}$ ), aunque menor que el control, a los 3 valores de pH. Concentraciones de 2, 4 y 8 CIM arrojaron curvas con un perfil similar, independientemente del pH del medio. Con ninguna de las concentraciones evaluadas ( $0.016$ - $0.256 \mu\text{g/mL}$ ) se logró obtener un descenso de al menos 3  $\log_{10}$  del inóculo inicial a pH 7.4 y 6.5. En cambio, a pH 5.0 se logró efecto bactericida para 2, 4 y 8 CIM, esto coincide con lo observado en la determinación de la CBM, ya que el valor obtenido para este parámetro fue de  $0.512 \mu\text{g/mL}$  (pH 7.4 y 6.5) y  $0.064 \mu\text{g/mL}$  (pH 5.0).

Algo similar ocurrió en el caso de los aislamientos salvajes SA13 y SA96, donde a pH 7.4 y 6.5 no se logró ver efectos bactericidas con las concentraciones evaluadas. A partir de pH 5.0 el inóculo inicial cayó más de 3  $\log_{10}$  con concentraciones de 4 y 8 CIM, correspondiéndose con concentraciones de  $0.128$  y  $0.256 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Estos valores también resultaron acordes a los obtenidos en la determinación de CBM, ya que para estos aislamientos y a este pH este valor fue de  $0.128 \mu\text{g/mL}$ . En el caso del

aislamiento SA139, se observó que a pH 7.4, se obtuvo un efecto bactericida con concentraciones de 8CIM (0.256 µg/mL) mediante el método de curva de muerte bacteriana y cuando se determinó la CBM en placas de microtitulación fue de 0.512 µg/mL. Por otro lado, a pH 6.5 se logró obtener un efecto bactericida con concentraciones de 4 y 8 CIM, al igual que a pH 5.0.

La caída en el recuento bacteriano de las cepas y aislamientos de *S. aureus* frente a rifaximina puede observarse ya a partir de las 2 horas de iniciado el ensayo de construcción de curva de muerte bacteriana. Para este antibiotico, no está aún bien determinado si es un antimicrobiano tiempo o concentración dependiente. Varios estudios confirman que la rifampina (también conocida como rifampicina, perteneciente a la familia de ansamicinas) actúa de esa manera (Gumbo *et al.*, 2007; Jayaram *et al.*, 2003). Este antibiótico debe ser combinado con otros antimicrobianos, como penicilinas resistentes a las penicilinasas, vancomicina o trimetoprima, debido a que rápidamente selecciona cepas resistentes cuando es utilizada como monodroga. La resistencia a la rifampina se genera por mutación cromosómica, y se desarrolla con facilidad en la mayoría de las bacterias. Tales mutantes muestran cambios estables en la ARN polimerasa (sitio blanco de la acción antimicrobiana) impidiendo la fijación. Esto resulta como consecuencia de mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa bacteriana, donde se unen estos antibióticos (Goldstein, 2014).

#### IV.4.2. Combinación aceite esencial/rifaximina

En la bibliografía no se encuentran datos sobre combinaciones de ansamicinas con aceites esenciales frente a *S. aureus*. Solo existen algunos reportes de extractos naturales con este tipo de fármacos, por ejemplo, Liu *et al.* (2018) encontraron una fuerte actividad sinérgica entre rifampicina y miel manuka frente a cepas de *S. aureus* productoras de biofilm.

Combinando la rifaximina con el aceite esencial de *M. armillaris* en el tablero de damas, encontramos un efecto sinérgico entre ambos, ya que se potenciaba el antibiótico, particularmente a los pHs 6.5 y 5.0, en todas las cepas y aislamientos analizados. A pH 7.4

se lograron obtener combinaciones que presentaban un sinergismo parcial con  $CFI=0.56$ , muy cercano al valor de  $CFI$  considerado de sinergismo (0.5). En este caso se logró disminuir, para las 4 cepas estudiadas, 16 veces la CIM de la rifaximina con una disminución a la mitad de la CIM correspondiente al aceite esencial aplicado solo. Al observar lo que sucedía a pH 6.5, el descenso en la concentración inhibitoria del antibiótico fue menor (4 veces para los aislamientos salvajes y 8 para la cepa de referencia). Sin embargo aquí fue más evidente la disminución en la cantidad de aceite esencial necesaria para potenciar el antibiótico, ya que para todas las cepas y aislamientos el descenso fue de 4 veces la CIM del extracto vegetal. Por último, observando lo ocurrido a pH 5.0, la CIM de rifaximina disminuyó 8 veces para todas las cepas y aislamientos. En este último caso es mucho más evidente la disminución en la concentración inhibitoria de la esencia, ya que nuevamente disminuyó en un factor de 4. Por lo tanto, a raíz de la importante reducción en las concentraciones inhibitorias a pH 5.0, tanto de aceite esencial como de antibiótico, se lograron obtener valores de  $CFI=0.38$ , marcando un importante sinergia entre ambos.

Al igual que lo ocurrido con las combinaciones cloxacilina/aceite esencial, para las mezclas rifaximina/aceite esencial se observó un efecto potenciado por la suma de dos factores: combinación de los antibióticos con el extracto vegetal y la acidificación del medio de cultivo.

Con la construcción de las curvas de muerte podemos ver como para la rifaximina sola, la caída en el recuento bacteriano es lenta, y se produce mayoritariamente entre las 12 y 24 horas de iniciado el ensayo. En cambio, al combinarlo con el aceite esencial de *M. armillaris* se observa una fuerte caída en el recuento bacteriano a las 4 horas con su máximo nivel a las 8 horas. A medida que se acidifica el medio de cultivo, tanto para la rifaximina sola como cuando se la combina con el aceite esencial se ve casi siempre con la CIM un recrecimiento a partir de las 12 h para bajas concentraciones, es decir a 0.5 CIM. También se puede ver como la caída de las pendientes de las curvas es más importante con la mezcla que con el aceite esencial solo, ya que este produce la mayor caída en el conteo de células viables a las 12 horas.



Al graficar la disminución del número de bacterias (Índice E) observamos como la curva en la que el *S. aureus* se enfrentó solo a la rifaximina se encuentra desplazada hacia valores más altos en la concentración de antibiótico. Esto quiere decir que la presencia de aceite esencial de *M. armillaris* favorece la disminución de la cantidad de antibiótico necesaria para la inhibición del microorganismo. A su vez, a pH 7.4 y 6.5 la rifaximina no fue capaz de producir un efecto bactericida por sí sola a las concentraciones evaluadas (como si ocurrió a pH 5.0). Mientras que la combinación con el aceite esencial de *M. armillaris* permitió lograr, con menores concentraciones, un efecto bactericida incluso cercano a la erradicación virtual. Por ejemplo, una mezcla de 0.004 µg/mL de rifaximina y 12.5 µL/mL de aceite esencial permitió alcanzar un efecto de erradicación virtual contra aislamientos de tipo salvaje a pH 7.4. Algo similar ocurrió con la cepa de referencia. La acidificación de los medios mejora la actividad de la combinación aceite esencial/rifaximina. La rifaximina resultó ser un potente antibiótico contra *S. aureus* y no requiere el uso de adyuvantes. Sin embargo, estos resultados son hallazgos importantes para el tratamiento de infecciones estafilocócicas de difícil resolución, ya que con la aparición de la resistencia antimicrobiana de *S. aureus* a los antibióticos convencionales, las opciones de tratamiento para las infecciones se han limitado.

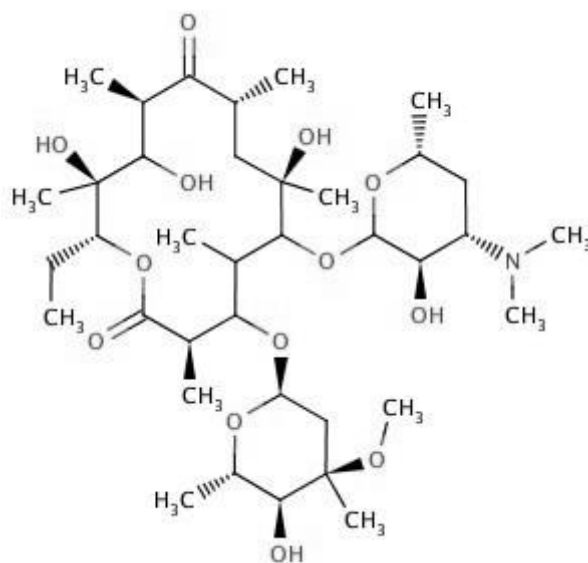
#### **IV.5. Actividad antimicrobiana de eritromicina y su combinación con aceite esencial de *M. armillaris* frente a *S. aureus***

##### **IV.5.1. Eritromicina**

Los macrólidos pertenecen a uno de los grupos de antibióticos utilizados contra las infecciones causadas por *S. aureus*. Se los considera agentes bacteriostáticos, aunque pueden ejercer efecto bactericida en determinadas condiciones. Actúan sobre la subunidad ribosomal 50S e interfirieron en la síntesis proteica. Son particularmente activos contra bacterias grampositivas y micoplasmas (Sádaba y Azanza, 2005). Entre las ventajas de los macrólidos podemos mencionar las altas concentraciones intracelulares alcanzadas, amplia distribución en el organismo, semivida de eliminación prolongada y

actividad contra importantes patógenos microbianos. La acumulación intracelular dentro de células fagocíticas es muy interesante, ya que puede generar un efecto inmunomodulante, observado en la mayoría de los macrólidos (Prescott, 2002). Uno de los antimicrobianos pertenecientes a este grupo es la eritromicina (Figura 72). Como consecuencia de su uso excesivo existe una alta incidencia de resistencia a estos fármacos. Son varios los mecanismos de resistencia desarrollados por *S. aureus* que afectan a la actividad de los macrólidos (Piatkoswka *et al.*, 2012).

Existen básicamente 3 mecanismos de resistencia de las bacterias frente a los macrólidos. En primer lugar por la modificación del sitio diana por metilación o mutación impidiendo la unión del antibiótico a su objetivo ribosomal. Un segundo mecanismo implica el eflujo del antibiótico, y un tercero la inactivación del fármaco. En microorganismos patógenos, el impacto de los 3 mecanismos es desigual en términos de incidencia y de implicaciones clínicas. La modificación de la diana ribosomal confiere resistencia de amplio espectro a macrólidos mientras que el flujo de salida y la inactivación afectan solo a algunas de estas moléculas (Leclercq, 2002).



**Figura 72.** Estructura molecular de la eritromicina.

Una de las propiedades más relevantes de los macrólidos es su gran volumen de distribución (Lucas *et al.*, 2007; Mulazimoglu *et al.*, 2005; Prescott, 2002). Estos

antibióticos tienen la capacidad de concentrarse en los tejidos y acumularse en el interior de células eucariotas. Esta acumulación podría deberse a la difusión de la forma molecular en estado no protonado a través de la membrana y la retención de la forma protonada (con menor capacidad para difundir) en el interior de los compartimientos celulares con pH ácido, como los lisosomas. Debido al gran volumen de distribución de estos fármacos, las concentraciones que se encuentran en sangre suelen ser bajas, mientras que las logradas en los tejidos y en el interior celular son altas, siendo una gran ventaja para el tratamiento de infecciones localizadas a este nivel (Lucas *et al.*, 2007; Mulazimoglu *et al.*, 2005).

El mecanismo por el cual se acumulan los macrólidos probablemente consista en la difusión de la forma no protonada de las moléculas a través de la membrana y el atrapamiento de la forma protonada (con menor capacidad para difundir por la membrana) dentro de compartimientos celulares con pH ácido, tales como los lisosomas. En esta localización celular se concentran por atrapamiento iónico (Prescott, 2002).

Es posible que a nivel intracelular existan factores moduladores capaces de aumentar o disminuir la actividad antibiótica. Estos factores posiblemente se deban a la alteración de la susceptibilidad bacteriana, modificaciones en la actividad o diferente biodisponibilidad del fármaco en los distintos compartimientos subcelulares. Por ejemplo, puede darse la ausencia de actividad debido a cambios en el pH cuando los macrólidos ingresan al lisosoma cuyo pH interno es ácido, ya que estos antibióticos pierden aproximadamente 90% de su actividad por cada unidad de pH que disminuye (Shryock *et al.*, 1998).

La gran acumulación de antibiótico a nivel intralisosomal no implica una buena actividad antibacteriana, ya que la forma no ionizada es la única que posee acción antibacteriana. Esto puede generar una pérdida de actividad debido a cambios en el pH cuando los macrólidos ingresan a los lisosomas cuyo pH interno es ácido (Shryock *et al.*, 1998). Los antibióticos no solo necesitan penetrar la célula eucariota y alcanzar dentro de esta al microorganismo patógeno, también necesita conservar su actividad a dicho nivel.

Al evaluar la CIM de eritromicina frente a *S. aureus* obtuvimos para los aislamientos sensibles (SA13, SA96 y SA139) y para la cepa ATCC 29213 una CIM de 0.5 µg/mL,

mientras que en el caso de los aislados resistentes (SA78A, SA79A y SA86B) este valor fue muy elevado, 1024  $\mu\text{g/mL}$ . Modificamos el pH del medio de cultivo con el fin de emular las condiciones subcelulares a las cuales se encuentra asociado el *S. aureus* de vida intracelular, asumiendo que el cambio de pH, pudiera ser un factor limitante en la acción del antimicrobiano, ya que en la bibliografía se reporta la susceptibilidad a la degradación de este macrolido en presencia de un medio ácido (Prescott, 2002)

Al acidificar el medio de cultivo, se observó una sustancial pérdida de potencia, lo cual se hizo evidente por el aumento de hasta 2 veces su CIM a pH 6.5 y 16 veces su CIM a pH 5.0 en comparación a cuando las mismas cepas y aislamientos fueron analizados al pH fisiológico de 7.4 en el caso de los aislamientos sensibles. En cuanto a los aislamientos resistentes, la pérdida de potencia llevó a la CIM a valores superiores a 1024  $\mu\text{g/mL}$ , corroborando de esta manera lo mencionado en la bibliografía en cuanto a la pérdida de potencia de la eritromicina en medio ácido (Lucas *et al.*, 2007; Prescott, 2002).

Como se mencionó anteriormente, la eritromicina es un antibiótico bacteriostático. La relación CBM/CIM mayor a 4 es indicativo de que un compuesto es bacteriostático (Pankey y Sabath, 2004), relación que obtuvimos en nuestro estudio. Los aislamientos sensibles a eritomicina y la de referencia ATCC 29213 presentaron a pH 7.4 una CBM 64 veces superior a la CIM, de 256 a pH 6.5 y a pH 5.0 se puede decir que el incremento fue mayor a 32 veces (ya que la CBM fue establecida como  $>256 \mu\text{g/mL}$ ). Por otro lado, la CBM de los aislamientos resistentes al macrolido fue establecida como  $>1024 \mu\text{g/mL}$ , evidenciándose un incremento respecto de la CIM a pH 7.4 solamente, ya que a pH 5.0 también estos valores fueron determinados como  $>1024 \mu\text{g/mL}$ . Estos resultados confirman la pérdida de potencia que sufre este antibiótico con la acidificación del medio de cultivo.

Al analizar las curvas de muerte bacteriana construidas para eritromicina frente a las cepas y aislamientos de *S. aureus*, se puede observar (Figuras 40 a 46) como a las concentraciones evaluadas, el antimicrobiano actúa en forma bacteriostática ya que en 24hs de ensayo no se logró obtener una caída importante del recuento bacteriano, independientemente del pH y del perfil de sensibilidad de las cepas. La incidencia del pH

se observa en la cantidad de antibiótico utilizada, ya que las concentraciones usadas en todos los casos son mayores con la acidificación del medio de cultivo, para lograr un mismo efecto.

En las figuras 63 a 69 se puede ver al analizar la caída del recuento bacteriano en función de la concentración del antibiótico. En ningún caso se observó una caída de  $3\text{Log}_{10}$  de bacterias considerando finales menos iniciales, esto es compatible con el comportamiento de un fármaco bacteriostático.

#### IV.5.2. Combinación aceite esencial/eritromicina

La combinación del aceite esencial de *M. armillaris* con eritromicina resultó interesante particularmente en el caso de los aislamientos de *S. aureus* resistentes a este macrólido. Estos aislamientos (SA78A, SA79A y SA86B) presentaron valores de CIM muy elevados (1024  $\mu\text{g/mL}$ ), y al acidificar el medio de cultivo la pérdida de potencia incrementó este valor. La combinación con el extracto vegetal permitió obtener mezclas cuyo CFI fue cercano a 0.5, indicando sinergismo parcial. Pequeñas cantidades de aceite esencial de *M. armillaris* permitieron disminuir notablemente la concentración necesaria para la inhibición de estas cepas de *S. aureus* con elevada resistencia a eritromicina.

A pH 7.4 los 3 aislamientos resistentes presentaron valores CFI de 0.56, en los que la cantidad de antibiótico necesaria para la inhibición disminuyó 16 veces (1024 frente a 64  $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de 6.25  $\mu\text{L/mL}$  (la CIM del aceite esencial disminuyó a la mitad). Al analizar lo ocurrido a pH 6.5, el coeficiente CFI fue menor a 0.65 (no lo pudimos establecer exactamente ya que la CIM del antibiótico solo en esta condición fue determinada como mayor a 1024  $\mu\text{g/mL}$ ). En este caso la CIM del antibiótico disminuyó al menos 16 veces también (>1024 a 128  $\mu\text{g/mL}$ ) pero en presencia de 3.1  $\mu\text{L/mL}$  de la esencia, donde el aceite esencial disminuyó su CIM a la mitad. Por último, en lo que respecta a pH 5.0 la situación fue muy similar a la observada a pH 6.5, ya que la CIM de la eritromicina se redujo de >1024 a 128  $\mu\text{g/mL}$ , con la diferencia de que la cantidad de extracto vegetal fue aún menor. La cantidad de aceite esencial en la mezcla a este pH fue de 1.5  $\mu\text{L/mL}$ .

Dentro de los diferentes mecanismos de resistencia a macrólidos se puede mencionar la modificación del sitio blanco (por metilación del ARNr, mutación del ARNr 23S, mutación de las r-proteínas), síntesis de pequeños péptidos, inactivación enzimática y eflujo activo (Lucas *et al.*, 2007). Es difícil poder establecer mediante que mecanismo el aceite esencial de *M. armillaris* ejerce acción sinérgica con la eritromicina. La gran cantidad de compuestos que se encuentran en el extracto genera una acción en diferentes blancos bacterianos. El 1.8 cineol (principal componente encontrado en el aceite esencial de *M. armillaris*) es capaz de desintegrar la membrana celular y reducir el citoplasma, generando daños en la estructura de *S. aureus* (Li *et al.*, 2014). En cuanto a los demás componentes de este aceite esencial, se ha postulado que el  $\alpha$ -Pineno, Terpinen-4-ol, sabineno,  $\beta$ -Mirceno y  $\alpha$ -Terpineno también estarían implicados en la interacción con la membrana celular, donde se disuelven en la bicapa fosfolipídica alineándose entre las cadenas de ácidos grasos (Hayouni *et al.*, 2008). Esta distorsión física de la estructura causaría expansión y desestabilización de la membrana, aumentando la fluidez de la misma, por lo que a su vez aumentaría la permeabilidad pasiva (Hayouni *et al.*, 2008).

Una posible explicación de la sinergia entre el aceite esencial de *M. armillaris* y la eritromicina sería que la desestabilización en la membrana, pared celular y una eventual disminución en la actividad de bombas de eflujo aumentaría la llegada de antibiótico al interior celular, por lo que se concentraría aún más. Algo similar podría ocurrir a nivel de la pared celular. En este mismo sentido, al acidificar el medio como ocurre en el interior celular respecto del medio extracelular, la pérdida de potencia del macrólido podría compensarse por el aumento en las concentraciones intracelulares alcanzadas.

Piatkoswka *et al.* (2012) estudiaron cepas de *S. aureus* resistentes a eritromicina. En este caso, dicha resistencia fue consecuencia de una fuerte disminución en la permeabilidad de la pared celular a la eritromicina. Según estos autores, esta variante de los mecanismos de resistencia resulta ser la más eficiente, creando las cepas más resistentes, con un valor de concentración inhibitoria mínima (CIM) superior a 1024  $\mu\text{g/mL}$ . Las cepas altamente resistentes no presentaron gran acumulación del macrólido a nivel intracelular al desestabilizar la membrana celular, por lo cual la barrera que frena su

ingreso estaría en la pared bacteriana. Entre otras conductas observadas, las células de cepas altamente resistentes tendían a formar agregados más grandes y más estables, lo que indica que difieren en la composición de la pared celular de las menos resistentes. Es posible entonces que la actividad del aceite esencial tenga repercusión a nivel de la pared celular.

Un aspecto importante que presentó diferencias fue el cambio en las formas de las curvas de muerte bacteriana. Todas las cepas cuando se enfrentaron a la eritromicina sola en las 3 condiciones de pH presentaron curvas de crecimiento que se corresponden con un antibiótico bacteriostático, lo cual también se vio reflejado en que las relaciones CBM/CIM fueron en todos los casos superiores a 4 (como se mencionó anteriormente esto es común para antimicrobianos bacteriostáticos). Al agregar aceite esencial al medio de cultivo, se logran obtener efectos bactericidas. Esto no solo se ve en las curvas de muerte bacteriana, donde se obtiene una caída del recuento bacteriano entre 2 y 4 horas de haber iniciado el ensayo, sino que también se ve reflejado en el análisis de índice E. De manera similar a lo observado para cloxacilina y rifaximina, los gráficos de Índice E vs  $\log_{10}$  concentración de antibiótico, muestran como la curva está desplazada hacia concentraciones menores de eritromicina en presencia de aceite esencial. Por otro lado se puede observar claramente como la adición del extracto vegetal favorece el alcance del efecto bactericida. Nuevamente, la acidificación del medio de cultivo presenta un efecto similar al descrito anteriormente con el análisis de los valores de CIM para el antibiótico. Esto es particularmente importante para los aislamientos resistentes, en donde con mezclas correspondientes a 4 CIM a pH 6.5 y 2 CIM a pH 5.0 se alcanzan efectos bactericidas. Mientras que a pH 7.4 se requiere mayor cantidad de ambos para lograr ese efecto. Para estos aislamientos estamos hablando de concentraciones de 512  $\mu\text{g/mL}$  (con 12.5  $\mu\text{L/mL}$  de aceite esencial) a pH 6.5 y de 256  $\mu\text{g/mL}$  (con 3.1  $\mu\text{L/mL}$  de aceite esencial) a pH 5.0. Estas concentraciones no son una exageración en el caso de eritromicina, ya que los macrólidos tienen la capacidad de concentrarse a nivel intracelular, principalmente dentro de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (Gómez-Lus *et al.*, 2005). Se ha reportado que la eritromicina puede acumularse entre 4 y 38 veces más a nivel

intracelular respecto del medio extracelular en macrófagos, 8 veces en polimorfos nucleares y de 6 a 12 veces en células epiteliales (Bosnar *et al.*, 2005; Montenez *et al.*, 1999; Villa *et al.*, 1988).

Por lo tanto, es factible alcanzar estos niveles y la combinación con aceite esencial de *M. armillaris* es una buena alternativa para el tratamiento del *S. aureus* a nivel intracelular.



## V. CONCLUSIONES

Luego de analizar y discutir los resultados obtenidos podemos mencionar algunas conclusiones.

1.- El aceite esencial de plantas de *M. armillaris* cultivadas en las cercanías de la ciudad de La Plata, obtenido mediante destilación de arrastre de vapor de agua durante el mes de julio, presentó una composición rica en 1.8 cineol, y en menor medida de limoneno y  $\alpha$ -pineno, entre otros. En cuanto al rendimiento este fue del 1.55% v/p, lo que no es un valor despreciable en términos productivos. Para este aceite esencial también se obtuvieron parámetros fisicoquímicos que podrían utilizarse en el control de adulteraciones en una posible explotación comercial del mismo.

2.- El aceite esencial de *M. armillaris* presenta buena actividad antimicrobiana frente a cepas y aislamientos de *S. aureus*. Esta mejora ligeramente con la acidificación del medio de cultivo y presenta una actividad bactericida donde la CBM es cercana a la CIM.

3.- La cloxacilina presentó actividad bactericida, cuya potencia mejora al acidificar el medio, incluso para cepas SARM. En cambio la eritromicina disminuye su potencia y la rifaximina parece no verse afectada al modificar el pH del medio entre 7.4 y 5.0.

4.- Considerando la necesidad del alcanzar al *S. aureus* intracelular donde el medio es más ácido que el extracelular, es importante que los antibióticos sean efectivos a este nivel. En este sentido tanto la cloxacilina como la rifaximina son buenos antimicrobianos para controlar estas infecciones si se logra facilitar el acceso del mismo a la localización subcelular del *S. aureus*.

5.- Al combinar el aceite esencial con los 3 tipos de antibióticos mencionados pudimos establecer sinergismo, lo cual lo convierte en un buen adjuvante para estos.

6.- En el caso de la cloxacilina la sinergia fue muy importante y mejoró al acidificar el medio de cultivo, particularmente para la cepa SARM.

7.- En el caso de la rifaximina, frente a aislamientos sensibles de *S. aureus* hubo sinergismo que mejoró de forma importante al bajar el pH del medio de cultivo. El antibiótico por si solo y las combinaciones tuvieron actividad bactericida.

8.- Por último, las combinaciones con eritromicina resultaron en sinergismo parcial. Sin embargo las concentraciones del macrólido lograron disminuirse en gran medida con pequeñas cantidades de aceite esencial, tanto para cepas y aislamientos sensibles como resistentes. La eritromicina tuvo actividad bacteriostática cuando se utilizó sola, pero al combinarse con la esencia se comportó como bactericida. Esto sumado a la gran capacidad de la eritromicina de acumularse a nivel intracelular permitiría considerarlo como alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones estafilocócicas.

## VI. REFERENCIAS

1. Adams, R.P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Ed., Allured, Carol Stream, IL.
2. Amri, I., Mancini, E., De Martino, L., Marandino, A., Hamrouni, L., Mohsen, H., *et al.* (2012). Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils from Three *Melaleuca* Species Grown in Tunisia. *International journal of molecular sciences*, 13(12), 16580-91. doi: doi:10.3390/ijms131216580
3. Aubry-Damon, H., Grenet, K., Ndiaye-Sall, P., Che, D., Corderio, E., Bougnoux, M., *et al.* (2004). Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. *Emerging infectious diseases*, 10(5), 873-9. doi: 10.3201/eid1005.030735
4. Babushok, V.I., Linstrom, P.J., y Zenkevich, I.G. (2011). Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4), 1-47. doi: doi.org/10.1063/1.3653552
5. Bamgboye, A.I., y Adejumo, O.I. (2010). Physicochemical properties of Roselle seed oil. *Nutrition & Food Science*. 40(2), 186-92. doi: doi.org/10.1108/00346651011029219
6. Barcia-Macay, M., Seral, C., Mingeot-Leclercq, M.P., Tulkens, P.M., y Van Bambeke, F. (2006). Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(3), 841-51. doi: 10.1128/AAC.50.3.841-851.2006
7. Begun, J. (2005). *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a highthroughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. *Infection and immunity*, 73(2), 872-7. doi: 10.1128/IAI.73.2.872-877.2005

8. Berenbaum, M.C. (1978). A method for testing the synergy with any number of agents. *The Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 122-30.
9. Bergey, D.H., Holt, J.G., Krieg, N.R., y Sneath, P.H.A. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
10. Bhattacharyya, D., Banerjee, J., Bandyopadhyay, S., Mondal, B., Nanda, P.K., Samanta, I., *et al.* (2016). First report on vancomycin- resistant *Staphylococcus aureus* in bovine and caprine milk. *Microbial Drug Resistant*, 22(8), 675-81. doi: 10.1089/mdr.2015.0330
11. Bhardwaj, M., Singh, B.R., Sinha, D.K., Kumar, V., Prasanna Vadhana, O.R., *et al.* (2016). Potential of Herbal Drug and Antibiotic Combination Therapy: A New Approach to Treat Multidrug Resistant Bacteria. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 7(11), 523. doi: 10.4172/2153-2435.1000523
12. Bosnar, M., Kelnerić, Z., Munić, V., Eraković, V., Parnham, M. J. (2005). Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2372-7. doi: 10.1128/AAC.49.6.2372-2377.2005
13. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. doi: doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
14. Calvo, J., y Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52.

15. Canton, R., y Morosini. M.I. (2011). Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews banner*, 35(5), 977–91. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00295.x
  
16. Carson, C.F., Hammer, K.A., y Riley, T.V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1) 50-62. doi: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006
  
17. Cefai, C., Ashurst, S., y Owens, C. (1994). Human carriage of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* linked with pet dog. *The Lancet*, 344(8921), 539–40.
  
18. Cervantes-García, E., García-González, R., y Salazar-Schettino, P.M. (2014). Características generales del *Staphylococcus Aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
  
19. Chabir, N., Romdhane, M., Valentin, A., Moukarzel, B., Marzoug, H.N., Brahim, N.B., et al. (2011). Chemical study and antimalarial, antioxidant, and anticancer activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm essential oil. *Journal of Medicinal Food*, 14, 1383–1388. doi: 10.1089/jmf.2010.0168
  
20. Chaves, T.P., Pinheiro, R.E.E., Melo, E.S., Soares, M.J., Souza, J.S.N., Brito de Andrade, T., et al. (2018). Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates  $\beta$ -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. *Industrial Crops & Products*, 112, 70–4. doi: doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.048
  
21. Chou, T. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621-81; doi: doi.org/10.1124/pr.58.3.10

22. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents M26-A; Approved Guideline. Wayne, Pennsylvania, USA.
23. CLSI. (2008) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard, 3rd edn. CLSI document M31-A3. CLSI, Wayne, USA.
24. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standard Institute.
25. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; second informational supplement. CLSI document VET01-S2. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standard Institute.
26. Craig, W.A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases*, 26(1), 1-10, quiz 11-2.
27. Croes, S., Beisser, P.S., Terporten, P.H., Neef, C., Deurenberg, R.H., y Stobberingh, E.E. (2010). Diminished in vitro antibacterial activity of oxacillin against clinical isolates of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7), 979-85. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.02956.x

28. Croteau, R., Kutchan, T.M., y Lewis, N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Chap. 24, 1st ed., B. Buchanan, W. Gruissen, and R. Jones (eds). New Jersey: ASPB and Wiley.
  
29. Curado, M.A., Oliveira, C.B.A., Jesus, J.G., Santos, S.C., Seraphin, J.C., y Ferri, P.H. (2006). Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*, 67(21), 2363–9. doi: doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.002
  
30. D'Arrigo, M., Ginestra, G., Mandalari, G., Furneri, P.M., y Bisignano, G. (2010). Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Phytomedicine*, 17(5), 317–22. doi: 10.1016/j.phymed.2009.07.008
  
31. Dai, J., Zhu, L., Yang, L., y Qiu, J. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*. *EXCLI Journal*, 12, 479–90.
  
32. de Kraker, M.E.A., Jarlier V., Monen, J.C.M., Heuer, O.E., van de Sande, N., y Grundmann, H. (2013). The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), 860-8. doi: 10.1111/1469-0691.12028.
  
33. Declercq, P., Petre', D., Gordts, B., y Voss, A. (2008). Complicated community-acquired soft tissue infection by MRSA from porcine origin. *Infection*, 36(6), 590–2. doi: 10.1007/s15010-007-7029-4

34. Egea, A.L., Gagetti, P.S., Lamberghini, R., Faccone, D.F., Lucero, C. *et al.* (2014). New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 1086-99. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.08.002.
35. Eliopoulos, G.M. (1989). Synergism and antagonism. *Pharmacology*, 3(3), 399-406.
36. Elshafie, H.S., Mancini, E., Sakr, S., de Martino, L., Mattia, C.A., de Feo, V., y Camele, I. (2015). Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L. essential oil against postharvest disease of peach fruit. *Journal of Medicinal Food*, 18(8), 929-34. doi: 10.1089/jmf.2014.0167.
37. Errecalde, J. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Estudio de incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. FAO. Roma.
38. Falci, S.P.P., Teixeira, M.A., Chagas, P.F., Martinez, B.B., Teixeira Loyola, A.B.A., Ferreira, L.M., y Veiga, D.F. (2015). Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Cirurgica Brasileira*, 30(7), 491-6. doi: dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150070000007
39. Farag, R.S., Shalaby, A.S., El-Baroty, G.A., Ibrahim, N.A., Ali, M.A., y Hassan, E.M. (2004). Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytotherapy Research*, 18(1), 30–5. doi: 10.1002/ptr.1348
40. Gobernado, M., y Ponce, J. (2004). Rifaximina. *Revista Española de Quimioterapia*. 17(2), 141-53.



41. Gibbons, S., Oluwatuyi, M., Veitch, N.C., y Gray, Al. (2003). Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. *Phytochemistry*, 62(1), 83–7.
42. Gill, A.O., y Holley, R.A. (2006). Disruption of *E. coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 1-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009
43. Goldstein, B.P. (2014). Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of Antibiotics* 67, 625–30. doi: 10.1038/ja.2014.107
44. Gómez-Lus, M.L., Calvo, A., Bouza, E., y Prieto, J. (2005). Quimioterapia antiinfecciosa y antitumoral: Antibióticos y quimioterápicos. Generalidades. En: Leza Cerro, J.C., Lizasoain Hernández, I., Lorenzo Fernández, P., Moreno González, A., Moro Sánchez, M.A. (eds): Velásquez Farmacología básica y clínica (20ª Ed) Buenos Aires, Ed. Panamericana, p. 825-39.
45. Goto, M., y Al-Hasan, M.N. (2013). Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(6), 501–9. doi: 10.1111/1469-0691.12195
46. Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F., Holst, B.K., Landrum, L.R., *et al.* (2008). World checklist of Myrtaceae. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew.
47. Grattapaglia, D., Vaillancourt, R.E., Shepherd, M., Thumma, B.R., Foley, W., Kulheim, C., *et al.* (2012). Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. *Tree Genetics & Genomes*, 8(3): 463-508.
48. Grob R., y Barry, E. (2004). Modern Practice of Gas Chromatography. 4d Ed. John Wiley, New York, 2004, 888 p.

49. Grundmann, H., Aires de Sousa, M., Boyce, J., y Tiemersma, E. (2006). Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public health threat. *Lancet*, 368(9538), 874–85. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68853-3
  
50. Gumbo, T., Louie, A., Deziel, M.R., Liu, W., Parsons, L.M., Salfinger, M., y Drusano, G.L. (2007). Concentration-dependent Mycobacterium tuberculosis killing and prevention of resistance by rifampin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 3781–8. doi: 10.1128/AAC.01533-06
  
51. Haddadin, A.S., Fappiano, S.A., y Lipsett, P.A. (2002). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgraduate medical journal*, 78(921), 385-92. doi: 10.1136/pmj.78.921.385
  
52. Halberstein, R.A. (2005). Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. *Annals of Epidemiology*, 15(9), 686-99. doi: 10.1016/j.annepidem.2005.02.004
  
53. Harrewijn, P., van Oosten, A.M., y Piron, P.G.M. (2001). Natural Terpenoids as Messengers. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
  
54. Hartmann, G., Honikel, K.O., Knusel, F., y Nuesch, J. (1967). The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by ryfamycin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 145(3), 843-4.
  
55. Hayouni, E.A., Bouix, M., Abedrabba, M., Leveau, J.Y., y Hamdi, M. (2008). Mechanism of action of *Melaleuca armillaris* (Sol. Ex Gaertu) Sm. essential oil on six LAB strains as assessed by multiparametric flow cytometry and automated microtiter-based assay. *Food Chemistry*. 111(3), 707–18.

56. Holley, R.A., y Patel, D. (2005). Improved shelf life and safety of perishable foods using plant essential oils and smoked antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-92. doi: doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.006
  
57. Holmgren, P.K., Holmgren N.H., y Barnett, L.C. (1990). Index Herbariorum. The herbaria of the world. 8th edn. P 1: New York Botanical Gardens: Bronx, New York.
  
58. Hood, J. R., Cavanagh, H.M., y Wilkinson, J.M. (2004). Effect of essential oil concentration on the pH of nutrient and Iso-sensitest broth. *Phytotherapy Research*, 18, 947-9. doi:10.1002/ptr.1581
  
59. Hoover, W.W., Gerlach, E.H., Hoban, D.J., Eliopoulos, G.M., Pfaller, M.A., y Jones, R.N. (1993). Antimicrobial activity and spectrum of rifaximin, a new topical rifamycin derivative. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 16(2), 111-8.
  
60. Huijsdens, X.W., van Dijke, B.J., Spalburg, E., Santen-Verheuvél, M.G., Heck, M.E., et al. (2006) Community-acquired MRSA and pig-farming. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 5, 26. doi: 10.1186/1476-0711-5-26
  
61. Hurdle, J.G., O'Neill, A.J., Chopra, I., y Lee, R.E. (2011). Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. *Nature reviews. Microbiology*, 9(1), 62-75.
  
62. Jayaram, R., Gaonkar, S., Kaur, P., Suresh, B.L., Mahesh, B.N., Jayashree, R., et al. (2003) Pharmacokinetics-pharmacodynamics of rifampin in an aerosol infection model of tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7), 2118-24. doi: 10.1128/AAC.47.7.2118-2124.2003

63. Jones, T., Creech, B., Erwin, P., Baird, S., Woron, A.M., y Schaffner, W. (2006). Family outbreaks of invasive community-associated methicillin-resistant *S. aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 42(9), e76-8. doi: 10.1086/503265
64. Joulain, D., y König, W.A. (1998). The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E. B.-Verlag, Hamburg.
65. Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., y Weisslowicz, H. (1994). Factors that Interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(6), 626–31.
66. King, M.D., Humphrey, B.J., Wang, Y.F., Kourbatova, E.V., Ray, S.M., *et al.* (2006) Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Annals of Internal Medicine*, 144(5), 309–17.
67. Kloss, W.E., Schleir, K.H., y Goirtz, F. (1992). The genus *Staphylococcus*. In: Balows A, Truper HG, Dwoekin M, eds. The Prokaryotes, 2nd Ed. New York, Spring-Verlag.
68. Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., y Baba, T. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 357(9264), 1225-40.
69. Kwok, G.M.L., O'Donoghue, M.M., Doddangoudar, V.C., Ho, J., y Boost, M.V. (2013). Reduced vancomycin susceptibility in porcine ST9 MRSA isolates. *Frontiers in microbiology*, 4, 316. doi: 10.3389/fmicb.2013.00316
70. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., y Nychas, G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453–62.

71. Langeveld, W.T., Veldhuizen, E.J., y Burt, S.A. (2013). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(1), 76-94. doi: 10.3109/1040841X.2013.763219
  
72. LaPlante, K.L. (2007). In vitro activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57(4), 413–18. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.09.007
  
73. Lawrence, B.M. (2008). Essential Oils. *Progress in Essential Oils*. 1979–1980, 1981–1987, 1988–1991, 1992–1994, 1995–2000, 2001–2004, 2005–2007. Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL.
  
74. Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*, 34(4), 482-92. doi: 10.1086/324626
  
75. Lemaire, S., Van Bambeke, F., Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., y Tulkens, P.M. (2007). Intraphagocytic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* are susceptible to Meropenem and Cloxacillin: role of acid pH. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(5), 1627-32. doi: 10.1128/AAC.01192-06
  
76. Lemaire, S., Olivier, A., Van Bambeke, F., Tulkens, P.M., Appelbaum, P.C., y Glupczynski, Y. (2008). Restoration of Susceptibility of Intracellular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to {beta}-Lactams: Comparison of Strains, Cells, and Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2797-805. doi: 10.1128/AAC.00123-08

77. Levy, S.B., FitzGerald, G.B., y Macone, A.B. (1976). Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *The New England Journal of Medicine*, 295(11), 583–8. doi: 10.1056/NEJM197609092951103
  
78. Lewis, H., Molbak, K., Reese, C., Aarestrup, F., Selchau, M., *et al.* (2008). Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerging Infectious Diseases journal*, 14(9), 1383–9. doi: 10.3201/eid1409.071576
  
79. Li, L., Li, ZW., Yin, Z.Q., *et al.* (2014). Antibacterial activity of leaf essential oil and its constituents from *Cinnamomum longepaniculatum*. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(7), 1721-7.
  
80. Lieberman, J.M. (2003). Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 22(12), 1143-51. doi: 10.1097/01.inf.0000101851.57263.63
  
81. Liu, M.Y., Cokcetin, N.N., Lu, J., *et al.* (2018). Rifampicin-Manuka Honey Combinations Are Superior to Other Antibiotic-Manuka Honey Combinations in Eradicating *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Frontiers in microbiology*, 8, 2653. doi: 10.3389/fmicb.2017.02653
  
82. Livermore, D.M. (2011). Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 1941–4. doi: 10.1093/jac/dkr262
  
83. Lowy, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, 111(9), 1265-73. doi: 10.1172/JCI18535

84. Lucas, M.F., Mestorino, N., y Errecalde, J. (2007) Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. *Analecta Veterinaria*, 27(1), 36-45.
85. Malinowski E., Lassa H., Smulski S., Klossowska A., y Kaczmarowski M. (2008). Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from cows with mastitis in 2006-2007. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 52, 565–72.
86. Mancini, E., Camele, I., Elshafie, H.S., de Martino, L., Pellegrino, C., Grulova, D., y de Feo, V. (2014). Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from different areas in the Southern Apennines (Italy). *Chemistry & Biodiversity*, 11(4), 639–51. doi: 10.1002/cbdv.201300326
87. Manian, F.A. (2003). Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clinical Infectious Diseases*, 36(2), e26–28. doi: 10.1086/344772
88. Manjarrez, J.L.A., Ávila Téllez, A., Rosiles Martínez, R., y Fuentes Hernández, V.O. (2012). Determination Of Rifaximine In Milk Of Dairy Cows Using high Pressure Liquid Chromatography (HPLC). *Revista Científica, FCV-LUZ*, 22(2), 112–9.
89. Manzaner Molina, J.J. (2005). Flora Ornamental del centro urbano de Cabezo de Torres (Murcia). Proyecto de Fin de Carrera. Universidad Politecnica de Cartagena.
90. Marchetti, M.L., Errecalde, J., y Mestorino, N. (2012). Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine on antimicrobial agent susceptibility in multidrugresistant isogenic and veterinary *Escherichia coli* field strains. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 6):786-92. doi: 10.1099/jmm.0.040204-0

91. Maree, C.L., Daum, R.S., Boyle-Vavra, S., Matayoshi, K., y Miller, L.G. (2007). Community- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections. *Emerging infectious diseases*, 13(2), 236-42. doi: 10.3201/eid1302.060781
  
92. Mc Dowell, R. (1981). Limitations for dairy production in developing countries. *Journal of Dairy Science*, 64(12), 2463-74. doi: doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82871-8
  
93. McGuinness, W.A., Malachowa, N., y DeLeo, F.R. (2017). Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale journal of biology and medicine*, 90(2), 269-81.
  
94. Menozzi A., Dall' Aglio M., Quintavalla F., Dallavalle L., Meucci V., y Bertini S. (2016). Rifaximin is an effective and safe alternative to metronidazole for the treatment of chronic enteropathy in dogs: a randomised trial. *BMC Veterinary Research* 12, 217. doi: 10.1186/s12917-016-0851-0
  
95. Mensa, J., Soriano, A., Llinares, P., Barberán, J., Montejo, M., et al. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Revista Española de Quimioterapia*, 26(1) ,1-84.
  
96. Mestorino, N., y Errecalde, J. (2012). Pharmacokinetic-Pharmacodynamic considerations for bovine mastitis treatment. In: Pérez Marín CC, editor. A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine. InTech, Croatia. p. 423-72. doi: 10.5772/31721
  
97. Mestorino, N., y Marchetti, M.L. (2019). Antimicrobianos parte 1. Microbiología Veterinaria. En Stanchi N, editor. Microbiología general. Intermédica, Argentina. Cap 19. En prensa.



98. Moghaddam, M., y Mehdizadeh, L. (2017). Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. *Soft Chemistry and Food Fermentation*. 13:379-419
99. Montenez, J.P., Van Bambeke, F., Piret, J., Brasseur, R., Tulkens, P.M., y Mingeot-Leclercq, M.P. (1999). Interactions of macrolide antibiotics (Erythromycin A, roxithromycin, erythromycylamine [Dirithromycin], and azithromycin) with phospholipids: computer-aided conformational analysis and studies on acellular and cell culture models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156,129–40. doi: 10.1006/taap.1999.8632
100. Moreno Anzola, M.A., Castillo Huertas, M.A., Ferrebuz, A.J., Osorio Zambrano, W.F., Torres Caycedo, M.I., y López Velandia, D.P. (2018). Resistencia bacteriana en pequeños animales, potencial riesgo para la salud humana - Bacterial resistance in small animals, risk potential for human health. *Revista Electrónica de veterinaria*, 19(2), 1-24.
101. Moreno, C., González, R., y Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 69, 192-185. doi: dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014
102. Mulazimoglu, L., Tulkens, P.M., y Van Bambeke, F. (2005). Macrolides. In: Yu VL, Edwards G, McKinnon PS, Peloquin C and Morse GD (eds), *Antimicrobial Therapy and Vaccines, Volume II: Antimicrobial Agents* (2nd Ed) Pittsburg, ESun Technologies, p. 243-280.
103. Munita, J., y Arias, C. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

104. Murray, P. (2008). Microbiología médica. 5ta ed. España: Elsevier.
  
105. Nascimento, A.M., Brandão, M.G., Oliveira, G.B., Fortes, I.C., y Chartone-Souza, E. (2007). Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or beta-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92(1), 95-100. doi: 10.1007/s10482-006-9139-x
  
106. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., y De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(12), 1451-74. doi: 10.3390/ph6121451
  
107. NCCLS. 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard. 3rd Ed. Wayne, Pennsylvania (USA). 99p.
  
108. Neu, H.C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257(5073), 1064–73.
  
109. Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science*, 264(5157), 382–8.
  
110. Oliveira, K.A.R., Sousa, J.P., Medeiros, J.A.C., Figueiredo, R.C.B.Q., Maganni, M., de Siqueira, J.P.Jr., *et al.* (2015). Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. *Food Control*, 47, 334–9. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.014
  
111. OMS. (2018). Antimicrobial resistance. Fact sheet. January 2018. [ONLINE]. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

112. Oussalah, M., Caillet, S., y Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69( 5), 1046–55.
  
113. Pankey, G.A., y Sabath, L.D. (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864–870. doi: doi.org/10.1086/381972
  
114. Pauli, A., y Schilcher, H. (2010). *In Vitro* antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia, 6th edn. En Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, K. H. C. Baser, G. Buchbauer (eds.), Taylor & Francis: Boca Raton.
  
115. Piatkowska, E., Piatkowski, J., y Przondo-Mordarska, A. (2012). The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* to erythromycin is caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. *Cellular & molecular biology letters*, 17(4), 633-45. doi: 10.2478/s11658-012-0034-3
  
116. Pillai, S.K., Moellering, R.C.Jr, y Eliopoulos, G.M. (2005). Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine (5th edn) Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
  
117. Pistiki, A., Galani, I., Pyleris, E., Barbatzas, C., Pimentel, M., y Guiamarellos-Bourboulis, E.J. (2014). *In vitro* activity of rifaximin against isolates from patients with small intestinal bacterial overgrowth. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(3), 236–241

118. Plaza, M., y Ricalde M. (2015). Establecer parámetros de control de calidad físico-químicos del aceite esencial del *Schinus molle* L. obtenido por arrastre de vapor. *Revista Ciencia, Tecnología e Innovación*, 11 (12), 693-6.
119. Plesiat, P., y Nikaido, H. (1992). Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Molecular Microbiology*, 6(10), 1323–33.
120. Prescott, J.F. (2002) Lincosamidas, macrólidos y pleuromutilinas. En: Prescott JF, Baggot JD, Walter RD (eds): *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria* (3ª Ed) Argentina, Ed. Intermédica, p. 204-32.
121. Rahman, S., Ali, T., Ali, I., Khan, N., Han, B., y Gao, J. (2018). The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. *BioMed research international*, 2018, 9519718. doi: 10.1155/2018/9519718
122. Raut, J.S., y Karuppayil S.M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–64. doi: doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055
123. Reyes, J., Rincón, S., Díaz, L., Panesso, D., Contreras, G. A., Zurita, J., et al. (2009). Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clinical infectious diseases*, 49(12), 1861-7. doi: 10.1086/648426.
124. Rioba, N.B., Itulya, F.M., Saidi, M., Dudai, N., y Bernstein, N. (2015). Effects of nitrogen, phosphorus and irrigation frequency on essential oil content and composition of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), 21–9. doi: doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.01.003

125. Rizk, M., Ibrahim, N., y El-Rigal, N. (2012). Comparative *In vivo* Antioxidant Levels in *Schistosoma mansoni* Infected mice Treated with Praziquantel or Essential Oil of *Melaleuca armillaris* Leaves. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(20): 971-978.
  
126. Rodrigues, F.F., Costa, J.G., y Coutinho, H.D. (2009). Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*. 16(11), 1052–5. doi: 10.1016/j.phymed.2009.04.004
  
127. Rodríguez, P., Sierra, W., Rodríguez, S., y Menéndez, P. (2006). Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of *Eucalyptus* oils. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3). doi: dx.doi.org/10.4067/S0717-34582006000300011
  
128. Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., y Antonietta Milillo, M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14(11), 727-32. doi: 10.1016/j.phymed.2007.01.005
  
129. Sádaba, B., y Azanza, J.R. (2005) Antibióticos macrólidos y otros antibióticos. En: Leza Cerro JC, Lizasoain Hernández I, Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Moro Sánchez MA (eds): Velásquez Farmacología básica y clínica (20ª Ed) Buenos Aires, Ed. Panamericana, p. 825-839.
  
130. Shryock, T.R., Mortensen, J.E., y Baumholtz, M. (1998). The effects of macrolides on the expression of bactericidal virulence mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41(5), 505-12.

131. Shmidt, E. (2010). Production of essential oils. En Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, K. H. C. Baser, G. Buchbauer (eds.), Taylor & Francis: Boca Raton.
132. Si, H., Hu, J., Liu, Z., y Zeng, Z.L. (2008). Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53(2), 190–4. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00414.x
133. Siddique, S., Parveenb, Z., Bareen, F., Chaudhary, M.N., Mazhar, S., y Nawaz, S. (2017). The essential oil of *Melaleuca armillaris* (Sol. ex Gaertn.) Sm. leaves from Pakistan: A potential source of eugenol methyl ether. *Industrial Crops and Products*, 109, 912-7. doi: doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.048
134. Sidhu, P., Landoni, M., Aliabadi, F., y Lees, P. (2011). PK-PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Research in Veterinary Science*, 88(1),134-41. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.05.013
135. Sieradzki, K., Roberts, R.B., Haber, S.W., y Tomasz, A. (1999). The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *The New England Journal of Medicine*, 340(7), 517–23. doi: 10.1056/NEJM199902183400704
136. Sifri, C.D., Barech-Bernal, A., Calderwood, S.B., y von Eiff, C. (2006). Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model. *Infection and immunity*, 74(2), 1091-6. doi: 10.1128/IAI.74.2.1091-1096.2006

137. Silva, C.J., Barbosa, L.C., Maltha, C.R., Pinheiro, A.L., y Ismail, F.M. (2007). Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*. 22(6), 474–8. doi: doi.org/10.1002/ffj.1823
  
138. Simoons-Smit, A.M., Savelkoul, P.H., Stoof, J., Starink, T.M., y Vandenbroucke-Grauls, C.M. (2000). Transmission of *Staphylococcus aureus* between humans and domestic animals in a household. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 19(2), 150–2.
  
139. Smith, T.C., Male, M.J., Harper, A.L., Kroeger, J.S., Tinkler, G.P., *et al.* (2009). Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in Midwestern U.S. swine and swine workers. *PLOS ONE* 4(1) e4258. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0004258
  
140. Stashenko, E.E. (2009). Aceites esenciales. División de Publicaciones, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
  
141. Swamy, M.K., Akhtar, M.S., y Sinniah, U.R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2016, ID3012462, 21p. doi: dx.doi.org/10.1155/2016/3012462
  
142. Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34(5 Suppl 1), S3-10; S64-73.
  
143. Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnel, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., y Cullen, P.J. (2009). Aplicación de antimicrobianos naturales para la conservación de alimentos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5987-6000.

144. Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., *et al.* (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474-8. doi: 10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005
145. Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., y Smid, E.J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, 174(4), 233–8.
146. Ultee, A., y Smid, E.J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 373–8. doi: doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00480-3
147. Ultee, A., Bennik, M.H., y Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561-8. doi: 10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002
148. Van Vuuren, S.F., Suliman, S., y Viljoen, A.M. (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*, 48(4), 440-6. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x
149. Van Vuuren, S., y Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies—Methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica*, 77(11), 1168-82. doi: 10.1055/s-0030-1250736.
150. Vazquez Guillamet, M.C., Vazquez, R., Deaton, B., Shroba, J., Vazquez, L., y Mercier, R.C. (2018). Host-Pathogen-Treatment Triad: Host Factors Matter Most



- in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia Outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(2), e01902-17. doi: 10.1128/AAC.01902-17
151. Villa, P., Sassella, D., Corada, M., y Bartosek, I. (1988). Toxicity, uptake, and subcellular distribution in rat hepatocytes of roxithromycin, a new semisynthetic macrolide, and erythromycin base. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(10), 1541-6.
152. Wiley/NIST. (2008). The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 8th Ed. J. Wiley & Sons, Inc., New York/NIST/EPA/NIH (2005) Mass Spectral Library, vers. 2.0.
153. Wilson, P.G., O'Brien, M.M., Gadek, P.A., y Quinn, C.J. (2001). Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany*, 88(11), 2013-25. doi: doi.org/10.2307/3558428
154. Yáñez Rueda, X., y Cuadro Mogollón, O.F. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 52-61.
155. Yap, P.S., Yiap, B.C., Ping, H.C., y Lim, S.H.E. (2014). Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *The open microbiology journal*, 8, 6-14. doi: 10.2174/1874285801408010006
156. Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L., y Bishai, W.R. (2005). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(5), 275-86. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70112-2