

## 31. Salud Animal

### **Combinación de cloxacilina y aceite esencial de *Melaleuca armillaris* como alternativa contra *Staphylococcus aureus***

Buldain, Daniel; Gortari, Lihuel

[danibuldain@gmail.com](mailto:danibuldain@gmail.com); [lihuelgcastillo@gmail.com](mailto:lihuelgcastillo@gmail.com)

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

#### **Resumen**

La resistencia antimicrobiana representa un grave problema para la salud humana y animal. Los aceites esenciales son un gran recurso para enfrentar esta problemática. *Melaleuca armillaris* es una planta cuyo aceite esencial (AE) ha sido reportado como antimicrobiano. La cloxacilina (CLOX) es un antibiótico de amplio uso en medicina veterinaria contra *Staphylococcus aureus*. Nuestro objetivo fue evaluar la interacción farmacodinámica de la combinación del AE con CLOX en busca de un efecto sinérgico que maximiza la actividad antibacteriana contra *S. aureus*.

Se establecieron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) frente a *S. aureus* (3 cepas salvajes aisladas de vacas Holstein y ATCC 29213 como referencia) para CLOX, AE y la combinación de ambos mediante microdilución en caldo a pH 7.4; 6.5 y 5.0. El AE se obtuvo mediante destilación por arrastre de vapor. Se aplicó el método de tablero de damas para evaluar la interacción CLOX/AE, estableciendo el índice de concentración fraccionaria inhibitoria (CFI). Luego evaluamos el índice de actividad antibacteriana E, diferencia entre el Log<sub>10</sub> del número de bacterias viables iniciales (nt0) y finales (nt24) de las combinaciones con CFI más bajos. Se construyeron curvas de muerte bacteriana de CLOX y AE/CLOX a 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM en caldo a pH 7.4; 6.5 y 5.0 considerando efecto bacteriostático (E = 0), bactericida (E = -3) y de erradicación virtual (E = -4).

Se observó una clara actividad sinérgica entre el AE y CLOX, permitiendo reducir la CIM del β-lactámico contra *S. aureus*. Esta interacción se vio favorecida por la acidificación del medio, donde concentraciones más bajas de CLOX lograron un efecto bactericida cercano a la erradicación virtual en presencia de pequeñas cantidades de AE.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, *Melaleuca armillaris*, aceite esencial, cloxacilina, resistencia.

## Introducción

La mastitis bovina es uno de los problemas que más afecta a la producción de ganado lechero en todo el mundo, y la terapia antimicrobiana es la herramienta principal para su tratamiento. Esta enfermedad es responsable de un efecto negativo en la economía de varios países, debido a la disminución en el nivel de producción y la calidad de la leche. El patógeno más frecuente que causa mastitis subclínica en vacas lecheras es *Staphylococcus aureus* (Mestorino y Errecalde, 2012). Este microorganismo se caracteriza por su capacidad de seleccionar resistencia contra los antimicrobianos tradicionales, de formar biopelículas, y de invadir y sobrevivir dentro de las células epiteliales (Rich, 2005). La aparición de resistencia a múltiples antibióticos se ha visto favorecida por el abuso en la aplicación de antimicrobianos en varias áreas: medicina humana, veterinaria, agricultura.

En la actualidad, el creciente número de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM) aisladas de humanos y animales pone en peligro la eficacia de los tratamientos antimicrobianos tradicionales. El uso excesivo e irracional de antimicrobianos favoreció la aparición de resistencia a múltiples familias de antibióticos. Es probable que la introducción de antimicrobianos resistentes a las  $\beta$ -lactamasas en la

década de 1960 haya conducido a la aparición de SARM (Nami, Le Dell, Sabetti, Borchadt, Boxrud y Elianne, 2003). En la literatura de medicina veterinaria, el aislamiento de SARM en animales ha sido reportado desde 1975 (Devriese y Hommez, 1975). Esto ha estado generando una diseminación de cepas resistentes y multirresistentes transmitidas entre humanos y animales (Cervantes-García, García-González, Salazar-Schettino, 2014).

La cloxacilina (CLOX) es un antimicrobiano semisintético derivado de la penicilina, que resiste la ruptura provocada por la enzima penicilinasas. CLOX es un antibiótico ampliamente utilizado en medicina veterinaria contra *S. aureus* (Mestorino y Errecalde, 2012). Tiene actividad bactericida contra *S. aureus* productor de  $\beta$ -lactamasas. Sin embargo, la creciente aparición de resistencia a la meticilina y la consiguiente dificultad en el control de estas infecciones fomenta la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Una alternativa para enfrentar el problema de la resistencia bacteriana es el uso de productos derivados de extractos vegetales. En el pasado, los productos naturales y fitoquímicos se usaban en el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas. Las plantas sintetizan naturalmente compuestos químicos aromáticos y metabolitos

secundarios que sirven como mecanismo de defensa contra los microorganismos (Zomorodian *et al.*, 2013). La actividad biológica de una planta medicinal generalmente se basa en la presencia de uno o un conjunto de componentes químicos ubicados en los tejidos de la planta. Los compuestos con actividad antimicrobiana están presentes principalmente en los aceites esenciales, que pueden presentarse en uno o más órganos dependiendo de la especie (López-Malo, Palou y Alzamora, 2005). Los aceites esenciales resultan ser el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas (Vega-Portocarrero y López-Malo, 2009). Son extractos conformados por mezclas complejas de compuestos con elevada actividad antimicrobiana. Resulta muy útil aprovechar esta propiedad y transferirla al tratamiento de bacterias resistentes a los antibióticos. Existen muchos trabajos que establecen la restauración de la actividad antimicrobiana de los antibióticos, que han disminuido su efectividad frente a los microorganismos, cuando se combinan con aceites esenciales (Yap, Yiap, Ping, Lim, 2014; Rosato, Vitali, De Laurentis, Armenise, Milillo, 2007; Rodrigues, Costa y Coutinho, 2009; Orchard y van Vuuren, 2017).

La explotación de aceites esenciales en la prevención de la resistencia bacteriana es prometedora, ya que la multiplicidad de

componentes con diferentes dianas de acción, en comparación con muchos agentes antimicrobianos convencionales que solo tienen un único sitio de acción. Dependiendo de la composición de los aceites esenciales, se pueden atribuir diferentes mecanismos de acción, incluido el daño a proteínas esenciales del patógeno, bloqueo de enzimas de membrana con las cuales los microorganismos pueden bombear el principio activo, cambios en el metabolismo, permeabilización de sus membranas. Estos aceites contienen una amplia gama de polifenoles y terpenoides, que tienen una 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, dando lugar a la fuga del contenido celular (Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, De Feo, 2013).

Varios autores están investigando sobre la aplicación de aceites esenciales como adyuvante para aumentar el efecto de los antimicrobianos contra las especies bacterianas. Este es un nuevo concepto con alto potencial. Por ejemplo, el aceite esencial de *Pelargonium graveolens* reduce la dosis efectiva mínima de norfloxacin contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Rosato *et al.*, 2007). Rodrigues *et al.* (2009) informaron

que el aceite esencial de hojas de *Croton zehntneri* es capaz de aumentar la actividad de la gentamicina en un 42.8% contra *Pseudomonas aeruginosa* por contacto gaseoso, lo que sugiere que el aceite tiene potencial para ser utilizado como adyuvante en terapia antimicrobiana. Las bacterias Gram positivas como *S. aureus* son más susceptibles a los aceites esenciales que las Gram negativas (Azhdarzadeh y Hojjati, 2016), porque estas últimas tienen una capa externa con lipopolisacáridos que cubren el peptidoglicano y limitan la difusión de compuestos hidrófobos a través de este (Chouhan, Sharm, Guleria, 2017).

Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales promueven el interés científico en el estudio de ellos como un nuevo grupo de compuestos farmacológicos. Poseen una enorme variedad química y estructural, lo que las convierte en mezclas funcionalmente versátiles (Yap et al., 2014). Aunque su actividad puede asociarse con los componentes principales, todos ellos influyen en el efecto farmacológico. Es probable que la alta concentración de los principales compuestos enmascare los efectos de los demás. Sin embargo, en términos de actividad antimicrobiana, cada componente aislado muestra menos efecto antibacteriano que el aceite esencial completo (Burt, 2004). También

se ha demostrado que la función de los compuestos principales está regulada por las moléculas minoritarias, lo que contribuye al efecto sinérgico (Bassole et al., 2010). Teniendo en cuenta la gran cantidad de estructuras químicas que componen los aceites esenciales, es probable que las propiedades antibacterianas no se puedan atribuir a un solo compuesto químico, y por lo tanto podría haber varios sitios diana de acción en las células microbianas donde actuarían dando como resultado una influencia potenciadora. Es por eso que es razonable estudiar los aceites esenciales como un todo y aprovechar la sinergia de todos los componentes (Bassolé y Juliani, 2012).

*Melaleuca armillaris* (Soland. Ex Gaertn.) Sm. es una de las plantas de *Melaleuca* más cultivadas. Crece en la forma de un arbusto grande o como un árbol pequeño. Los trabajos publicados sobre el aceite esencial de *M. armillaris* (AE) siguen siendo escasos. Las investigaciones de la composición de su AE por GC-MS revelaron la presencia de 1.8-cineol como principal componente (Chabir et al., 2011; Hayouni, Bouix, Abedrabba, Leveau, Hamdi, 2008; Silva, Barbosa, Maltha, Pinheiro, Ismail, 2007). Se han determinado varias actividades para este AE. Rizk et al. (2012) obtuvieron resultados positivos *in vivo* utilizando este AE en el tratamiento contra el parasitoido

*Schistosoma mansoni*, respondiendo a la actividad oxidante generada por el patógeno. También se encontró actividad inhibidora, *in vitro*, contra algunas especies bacterianas tales como *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (Rizk, Ibrahim, El-Rigal, 2012; Amri *et al.*, 2012). Las actividades que se ha observado para el AE de *M. armillaris* en forma pura permiten suponer que los buenos resultados obtenidos por sí mismos pueden incrementarse en sistemas sinérgicos para el mismo propósito, como la mejora de antibióticos para tratar infecciones causadas por cepas resistentes a los tratamientos convencionales. No se ha encontrado bibliografía que indique el uso del aceite esencial de *M. armillaris* como potenciador de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos, particularmente contra cepas de *S. aureus*. Este patógeno es responsable de un alto porcentaje de infecciones persistentes. El uso indiscriminado de antimicrobianos está generando microorganismos resistentes a múltiples antibióticos, convirtiéndose en un problema grave para la salud pública global (WHO, 2018).

## Objetivos

Nuestro objetivo fue evaluar la interacción farmacodinámica establecida mediante la combinación del AE de *M.*

*armillaris* con CLOX emulando las condiciones de pH extracelular e intracelular (pH 7.4, 6,5 y pH 5) en la búsqueda de un efecto sinérgico que maximice la actividad del antibiótico contra *Staphylococcus aureus*.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal y extracción del aceite esencial.

Se recolectaron hojas y ramas herbáceas de *M. armillaris* durante mes de julio en las afueras de la ciudad de Coronel Brandsen, cerca de la ciudad de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Esta región se encuentra en latitud 35°06'18.9"S y longitud 58°10'57.0"O. El material vegetal se depositó en el Herbario LPAG de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP (Holmgren, Holmgren, Barnett, 1990).

La extracción de AE se realizó por destilación de arrastre de vapor de agua con un equipo de destilación con capacidad de 385 litros. Se utilizaron 38.5 litros de agua para la destilación y la cantidad de hojas y ramas herbáceas fue de 44.750 kg. El AE obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y almacenó en un frasco de vidrio ámbar en heladera a 4 ° C.

### Análisis de composición.

El AE fue analizado por un GC-FID-MS Agilent (Agilent Technologies, Santa

Clara, CA, EE. UU.) 7890A/5975C, equipado con un inyector (relación de división 1: 100), conectado por un divisor de flujo a dos columnas capilares (HPWAX y DB-1-MS, ambos 60 m x 0.25 mm con 0.25  $\mu$ m de fase fija). La columna polar se conectó a un FID, mientras que la columna no polar se conectó a un detector de masas cuadrupolar (HP 5975C) (70 eV). Se usó helio como gas portador, a 1,8 mL/min. La temperatura del inyector se ajustó a 250 °C. El volumen de inyección fue 0.3  $\mu$ L. La temperatura de la columna se programó de acuerdo con el siguiente gradiente: 100 °C, aumentando a 2 °C/min hasta 240 °C y se mantuvo constante durante 15 min. La temperatura del FID fue de 260 °C y las temperaturas para la línea de transferencia y la fuente iónica se ajustaron a 280 y 230 °C, respectivamente. El rango de masa ( $m/z$ ) fue 40-500 Da. La adquisición de datos, el procesamiento y el control de instrumentos se realizaron utilizando el software Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). La identificación de los compuestos se logró mediante el análisis de los índices de retención (relativos a n-alcanos C8-C24) obtenidos en ambas columnas y comparados con los de los compuestos de referencia identificados en aceites esenciales químicamente conocidos y de la bibliografía (Joulain y König, 1998; Babushok, Linstrom, Zenkevich, 2011).

Además, cada espectro de masas obtenido se comparó con los de la base de datos (Joulain y König, 1998; Adams, 2007; Wiley/NIST, 2008) y los espectros de masas obtenidos a partir de los compuestos de referencia. La contribución relativa porcentual de los compuestos se calculó a partir de la respuesta FID mediante una integración computarizada suponiendo que todos los factores de respuesta fueron 1.

#### Microorganismo y antibiótico

El estudio se llevó a cabo utilizando 3 cepas salvajes de *S. aureus* y como cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 para el control de calidad. Las cepas salvajes fueron aisladas a partir de muestras de leche obtenidas de vacas Holstein con mastitis subclínica. Se identificaron por la morfología de las colonias y por pruebas bioquímicas de rutina como: tinción de Gram, prueba de coagulasa y catalasa, desarrollo de  $\beta$ -hemólisis, fermentación de glucosa y crecimiento en medio salino (7,5%).

Se usó un estándar de CLOX, potencia del 96.4% (Sigma-Aldrich, Chemical Company, St. Louis, EE. UU.) para realizar este trabajo.

#### Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de CLOX y AE de *M. armillaris*

Para determinar la CIM de CLOX y AE, utilizamos placas de microtitulación de

poliestireno de 96 pocillos con caldo Mueller Hinton (CMH) suplementado con 0,5% de Tween 80 (para mejorar la disolución del AE). El caldo se ajustó a pH 7.4, 6.5 y 5.0 con ácido clorhídrico 1N (Anedra, Argentina), con el fin de emular las condiciones de pH a nivel extracelular e intracelular. El rango de concentraciones de CLOX (aplicando un esquema de dilución en serie a la mitad) fue de 256 a 0.007 µg/mL. Las concentraciones de AE evaluadas fueron de 50 µL/mL a 0.1µL/mL. En ambos casos, cada pocillo se inoculó con una concentración bacteriana final de  $5 \times 10^5$  UFC/ml obtenida a partir de diluciones de una suspensión correspondiente a la del 0.5 de la escala de Mc Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Las placas se incubaron a 35 °C durante 18-24 horas. La CIM se estableció como la concentración más baja que inhibió el crecimiento bacteriano. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y en todos los casos se usaron controles positivos y negativos con CMH conteniendo 0,5% de Tween 80.

#### Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la combinación CLOX/AE.

La CIM de la mezcla se realizó como se describió previamente para CLOX y AE. Las combinaciones del antibiótico y el extracto vegetal se prepararon de acuerdo con la técnica de tablero de damas (Grzybowska; Banaszczyk-Ru; Wójcik,

Tyski, 2004) frente a las cepas seleccionadas. La placa de microtitulación consistió en una fila con una dilución en serie a la mitad de AE y una columna con una dilución en serie a la mitad de CLOX (como control de CIM). Los pocillos intermedios presentaron combinaciones AE/CLOX. Los resultados se interpretaron de la misma manera que para la CIM de los antimicrobianos en forma individual, pero considerando este parámetro como una mezcla. Los inóculos bacterianos de las cepas salvajes de *S. aureus* y la cepa de referencia utilizada fueron de  $5 \times 10^5$  UFC/mL por pocillo. La incubación se llevó a cabo a 35 °C durante 18-24 horas. El índice de concentración fraccionaria inhibitoria (CFI) se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Donde (A): CIM de CLOX en combinación con AE; (B): CIM de AE en combinación con CLOX; (CIM)a y (CIM)b: CIM del antimicrobiano y AE en forma individual, respectivamente. Se consideró sinergismo (S) si  $FIC \leq 0,5$ ; sinergismo parcial o bajo (PS) si  $0,5 < FIC < 1$ ; indiferencia o adición (I) si  $1 \leq FIC < 2$  y antagonismo (A) cuando  $FIC \geq 2$ .

#### Ensayo de Curva de muerte e índice de actividad antibacteriana de la combinación AE/CLOX

El índice de actividad antibacteriana (E) se evaluó a partir de aquellas combinaciones que mostraron los valores más bajos de CFI, establecidos como el valor CIM de la mezcla. Para este fin, llevamos a cabo ensayos de curva de muerte bacteriana para diferentes concentraciones (0.5MIC; 1MIC; 2MIC; 4MIC; 8MIC) de AE, CLOX y la combinación. Para esta última, 1MIC corresponde a la mezcla con valor CFI más bajo, y los demás (0.5MIC, 2MIC, 4MIC, 8MIC) mantienen la proporción de ambos compuestos (diluyendo o concentrando según sea el caso). Preparamos 7 tubos en cada caso (considerando el control positivo y negativo) con 1 mL de volumen final que contiene CMH al 0.5% de Tween 80, antimicrobiano (o combinación AE/CLOX) y los inóculos. Todos los tubos tenían una concentración bacteriana de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL (excepto el control negativo). Se incubaron a  $35^\circ\text{C}$  y se obtuvieron muestras a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas para construir las curvas de muerte por recuento en placa. Esos se realizaron para todas las cepas a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

El índice 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 de la prueba (nt-24) según la siguiente ecuación:  $E = (\text{nt}-24) - (\text{nt}-0)$ . Para evaluar E, se aplicaron tres

puntos de corte teóricos (Sidhu, Landoni, Aliabadi, Lees, 2011): a) Efecto bacteriostático:  $E = 0$ ; no hay cambios en el valor de nt-0; b) Efecto bactericida:  $E = -3$ ; hay una reducción de  $\geq 3 \log_{10}$  de nt-0 y c) Efecto de erradicación virtual de bacterias:  $E = -4$ ; hay una reducción de  $\geq 4 \text{Log}_{10}$  (99.99%) respecto al Log de nt-0. Los resultados obtenidos se graficaron usando el programa GraphPad Prism 6 para obtener curvas E versus  $\text{Log}_{10}$  (concentración de CLOX). Los ensayos se realizaron por triplicado y las cepas silvestres se agruparon obteniendo una  $n=3$ .

## Resultados y Discusión

El proceso de destilación duró 5 horas y se extrajeron 550 ml de aceite esencial. El análisis de su composición reveló la presencia de 1.8 cineol (72.3%), limoneno (7.8%) y  $\alpha$ -pineno (6%) como los componentes más abundantes en el AE.

Las cepas utilizadas en este estudio se identificaron como miembros de la especie *S. aureus* después de caracterizarlas bioquímicamente, resultado cepas Gram positivas, coagulasa positivas, catalasa positivas,  $\beta$ -hemolíticas, fermentadoras de glucosa y con crecimiento en medio salino (7,5%).

La CIM de CLOX obtenida para *S. aureus* ATCC 29213 a pH 7.4 fue de 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo que está de acuerdo con las recomendaciones del CLSI 2009.



Las 3 cepas silvestres (denominadas SA13, SA96 y SA139) presentaron una CIM de 0.5 µg/mL a pH 7.4. En todos los casos, se observó una disminución de esta concentración al acidificar el medio de cultivo (Tabla 1).

Respecto al AE de *M. armillaris*, para *S. aureus* ATCC 29213, la CIM fue de 25 µL/mL, mientras que para las 3 cepas salvajes fue de 12.5 µL/mL. Estos valores disminuyeron ligeramente con la acidez del medio de cultivo (Tabla 2).

Cepa	CIM pH 7.4	CIM pH 6.5	CIM pH 5.0
ATCC 29213	25 □l/mL	25 □l/mL	12.5 □l/mL
SA 13	12.5 □l/mL	12.5 □l/mL	6.25 □l/mL
SA 96	12.5 □l/mL	12.5 □l/mL	6.25 □l/mL
SA 139	12.5 □l/mL	12.5 □l/mL	6.25 □l/mL

**Tabla 1.** Valores de CIM de CLOX a pH 7,4; 6,5 y 5,0.

Cepa	CIM pH 7.4	CIM pH 6.5	CIM pH 5.0
ATCC 29213	0.125 □g/mL	0.062 □g/mL	0.031 □g/mL
SA 13	0.5 □g/mL	0.125 □g/mL	0.031 □g/mL
SA 96	0.5 □g/mL	0.125 □g/mL	0.031 □g/mL
SA 139	0.5 □g/mL	0.125 □g/mL	0.031 □g/mL

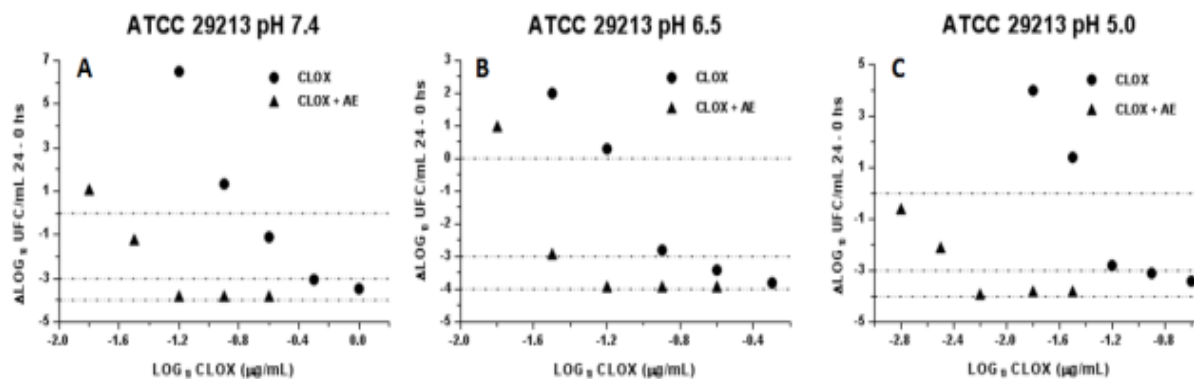
**Tabla 2.** Valores de CIM del AE a pH 7,4; 6,5 y 5,0.

Con la evaluación del índice de actividad antibacteriana pudimos comparar la incidencia de AE en la actividad CLOX, además del efecto causado por la variación del pH. Esto se visualiza en las Figuras 1-2. Se observa cómo la acidificación del medio aumenta la actividad antimicrobiana de CLOX contra *S. aureus* (para la cepa de referencia y las cepas salvajes). Los

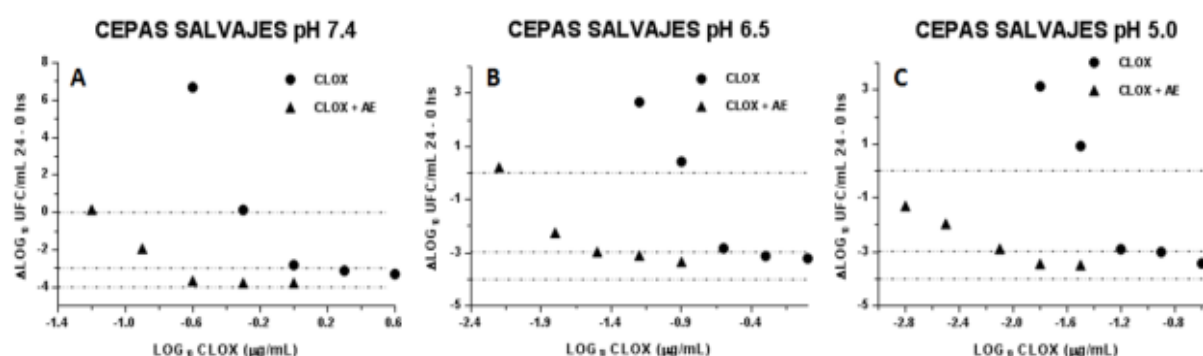
valores de pH más bajos requieren una menor cantidad de antibiótico para obtener un valor de E inferior a -3 indicando un efecto bactericida. En los gráficos se puede ver cómo la presencia de AE favorece la acción de CLOX, ya que se alcanzan valores de E más bajos con concentraciones más bajas del antibiótico en comparación con los resultados obtenidos solo para CLOX.

Para la cepa de referencia ATCC 29213, se logró un efecto bactericida muy cercano a la erradicación virtual, ya que los valores E están cerca de -4. Esto se observó a partir de concentraciones de 2 veces la CIM de CLOX en la mezcla, a los 3 pHs evaluados (Figura 1). En los aislamientos salvajes, el comportamiento fue similar al observado para la cepa de referencia (Figura 2). El análisis cromatográfico de nuestro AE reveló la presencia de 1.8 cineol como componente principal (72,3%) y en menor cantidad de limoneno (7,8%) y α-pineno (6,0%). Estos comúnmente están presentes en aceites esenciales eficaces como antimicrobianos.

El 1.8 cineol es un monoterpeno monocíclico con alta actividad antimicrobiana. En varios trabajos (Chabir *et al.* 2011; Rizk *et al.* 2012; Farag *et al.* 2004; Yvon *et al.* 2012;), el componente principal reportado también fue el 1.8 cineol, pero este resultado no concuerda con otros autores como Amri *et al.* 2012 porque la concentración de este fue



**Figura 1.** Efecto antibacteriano (E:  $\Delta\text{Log}_{10}$  UFC/mL 24 - 0 h) de CLOX contra *S. aureus* ATCC 29213 (n=3) a pH 7,4 (A); 6,5 (B) y 5,0 (C) en presencia y ausencia de AE



**Figura 2.** Efecto antibacteriano (E:  $\Delta\text{Log}_{10}$  UFC/mL 24 - 0 h) de CLOX contra cepas salvajes de *S. aureus* (n=3) a pH 7,4 (A); 6,5 (B) y 5,0 (C) en presencia y ausencia de AE

marcadamente baja (3.6%).

Existe evidencia de que las diferencias encontradas en la concentración de los componentes en los aceites esenciales, extraídos de diferentes plantas, se verían afectadas por las condiciones ambientales (Curado, Oliveira, Jesu, Santos, Seraphin, Ferri, 2006). El compuesto principal de la mezcla generalmente ejerce la actividad más fuerte, pero puede ser influenciado por las otras moléculas (Lang y Buchbauer, 2012).

En nuestro estudio, el AE solo, sin la adición del antimicrobiano, ha demostrado una fuerte actividad antibacteriana contra

*S. aureus*, este resultado concuerda con la investigación llevada a cabo por Amri *et al.* 2012. La CIM contra *S. aureus* ATCC 29213 fue de 25  $\mu\text{L/mL}$  a pH 7.4 y disminuyó 2 veces a pH 5. Este resultado también se observó en cepas salvajes.

Se observó un claro efecto sinérgico para la combinación AE/CLOX, ya que los valores de CFI obtenidos fueron  $\leq 1$ . Cuando enfrentamos la combinación AE/CLOX contra las cepas de *S. aureus*, hubo una gran disminución en la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano.

En la combinación AE/CLOX, el efecto bactericida se mantuvo incluso cuando el pH del caldo se redujo de 7.4 a 5.0, como hemos mencionado anteriormente cuando se estudió el AE sin CLOX. De la misma manera, cuando se acidificó el medio de cultivo, la concentración de CLOX, en la mezcla AE/CLOX, se redujo aún más de 10 veces para inhibir el microorganismo (Tabla 4). Como mencionamos en la introducción, todavía no hay trabajos publicados donde se haya estudiado la interacción farmacológica entre el AE de *M. armillaris* y CLOX. En la bibliografía se encuentran gran cantidad de trabajos que han investigado ampliamente otra especie de Melaleuca, *M. alternifolia* (árbol de té), utilizando la técnica de tablero de damas contra *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, Suliman, Viljoen, 2009) fueron indiferencia o efecto antagonista.

La actividad combinada de AE y CLOX, utilizada en nuestro estudio, también se

evidenció en el efecto bactericida, establecido por el índice E. La disminución del inóculo bacteriano inicial  $-\text{Log}_{10}$  (UFC/mL) - en un factor de 3 en 24 horas marcó una actividad bactericida, la cual se observó tanto para CLOX solo como en la mezcla. Sin embargo, la concentración del antimicrobiano en presencia del AE fue claramente menor y el valor de E obtenido estuvo más cerca del efecto de erradicación virtual ( $E=-4$ ) que la concentración necesaria cuando se aplicó el  $\beta$ -lactámico solo. En un estudio realizado por Nascimento *et al.* (2007) se evaluó el aceite esencial de *Eremanthus erythropappus* en combinación con ampicilina (antibiótico  $\beta$ -lactámico) contra *S. aureus* logrando un efecto sinérgico bactericida después de 24 horas de incubación (Nascimento, Brandão, Oliveira, Fortes, Chartone-Souza, 2007).

## Conclusiones

Fue posible reducir la concentración del antibiótico necesario para inhibir *S. aureus* combinando CLOX con AE *in vitro*. Teniendo en cuenta que CLOX es un

Cepa	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	CIM AE $\mu\text{L/mL}$	CIM CLOX $\mu\text{g/ml}$	CIM EO/CLOX $(\mu\text{L/mL})/(\mu\text{g/mL})$	CFI	CIM AE $\mu\text{L/mL}$	CIM CLOX $\mu\text{g/mL}$	CIM AE/CLOX $(\mu\text{L/mL})/(\mu\text{g/mL})$	CFI	CIM AE $\mu\text{L/mL}$	CIM CLOX $\mu\text{g/mL}$	CIM AE/CLOX $(\mu\text{L/mL})/(\mu\text{g/mL})$	CFI
ATCC 29213	25	0.125	25/0.031	0.75	25	0.062	0.62/0.007	0.36	12.5	0.031	3.1/0.0035	0.36
13	12.5	0.5	6.25/0.125	0.62	12.5	0.125	12.5/0.015	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
139	12.5	0.5	6.25/0.125	0.62	12.5	0.125	12.5/0.015	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
96	12.5	0.5	6.25/0.125	0.62	12.5	0.125	12.5/0.015	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61

**Tabla 4.** Índices de concentración fraccionaria inhibitoria (CFI) obtenidos para la combinación aceite esencial/Cloxacilina (AE/CLOX) en diferentes condiciones de pH vs, CIMs individuales.

antimicrobiano del grupo de los  $\beta$ -lactámicos con buena actividad contra *S. aureus* y con amplio uso en medicina veterinaria, el AE mejora el efecto antibacteriano de CLOX incluso cuando el pH intracelular es más ácido que el medio extracelular. Esto es importante para el tratamiento de las infecciones intracelulares en las que *S. aureus* se internaliza en los fagolisosomas debido a que la probabilidad de éxito terapéutico sería realmente mayor. Nuestros resultados sugieren un aumento de la susceptibilidad a los  $\beta$ -lactámicos debido al pH ácido que prevalece en las vacuolas donde *S. aureus* es capaz de vivir y prosperar, lo que se vería facilitado por la acción del AE de *M. armillaris*. El pH ácido causa un cambio conformacional de la proteína de acción diana (PBP2a), aumentando la afinidad de su centro catalítico por el  $\beta$ -lactámico. De este modo, la sinergia que encontramos entre CLOX y AE en condiciones ácidas podría tener lugar en el interior celular y tener un efecto importante frente a *S. aureus* cuando es refractario a los mecanismos inmunológicos. Estos hallazgos se convierten en una valiosa alternativa para el tratamiento de infecciones estafilocócicas persistentes. Es necesario tener en cuenta la actividad del AE de *M. armillaris* en el diseño de formulaciones futuras para evaluar los efectos *in vivo*,

con el fin de maximizar la eficacia de los antimicrobianos actuales y futuros.

### Bibliografía

- Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. 4th Ed., Allured (2007). Carol Stream, IL.
- 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. *Int J Mol Sci*, 13:16580-16591. doi:10.3390/ijms131216580
- Azhdarzadeh, F., Hojjati, M. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutr Food Sci Res*, 3: 43–50. doi: 10.18869/acadpub.nfsr.3.1.43
- Babushok, V.I., Linstrom, P.J., Zenkevich, I.G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *J Phys Chem*, 40 (4): 1-47. doi:10.1063/1.3653552
- Bassole, I.H., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., et al. (2010). Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*, 15 (11): 7825-39. doi:10.3390/molecules15117825

- Bassolé, I.H., Juliani, H.R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17: 3989–4006. doi:10.3390/molecules17043989
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int J Food Microbiol*, 94 (3): 223-53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Cervantes-García, E., García-González, R., Salazar-Schettino, P.M. (2014). Características generales del *Staphylococcus Aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 61 (1): 28-40.
- Chabir, N., Romdhane, M., Valentin, A., Moukarzel, B., Marzoug, H., Brahim, N., Mars Mm, Bouajila, J. (2011). Chemical study and antimalarial, antioxidant, and anticancer activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm essential oil. *J Med Food*, 14: 1383–1388. doi: 10.1089/jmf.2010.0168
- Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines (Basel)*, 4 (3): 58. doi: 10.3390/medicines4030058
- CLSI. (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 19th Informational Supplement. M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Curado, M.A., Oliveira, C.B.A., Jesus, J.G., Santos, S.C., Seraphin, J.C., Ferri, P.H. (2006). Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*, 67: 2363–2369. doi:doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.002
- D'Arrigo, M., Ginestra, G., Mandalari, G., et al. (2010). Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Phytomedicine*, 17: 317–22. doi: 10.1016/j.phymed.2009.07.008
- Devriese, L.A., Hommez, J. (1975). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res Vet Sci*, 19 (1): 23-7).
- Farag, R.S., Shalaby, A.S., El-Baroty G.A., Ibrahim, N.A., Ali, M.A., Hassan, E.M. (2004). Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phyther Res*, 18: 30–35. doi: 10.1002/ptr.1348
- Grzybowska, W., Banaszczyk-Ru, M., Wójcik, A., Tyski, S. (2004). Comparison of checkerboard and time-kill methods for the analysis of two antibiotics combined. *Med Dosw Mikrobiol*, 56(4):391-403.
- Hayouni, E.A., Bouix, M., Abedrabba, M., Leveau, J., 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*

- Chem*, 111: 707–718. doi: doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.044
- Holmgren, P.K., Holmgren, N.H., Barnett, L.C. (1990). Index Herbariorum. Part I: The herbaria of the world 8th ed. New York Botanical Gardens. Bronx, New York.
  - Joulain, D., König, W.A. (1998). The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. EB Verlag, Hamburg. doi: 10.1021/np990755n
  - Lang, G., Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr J*, 27:13-39. doi: 10.1002/ffj.2082
  - LaPlante, K.L. (2007). *In vitro* activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 57:413–18. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.09.007
  - López-Malo, A., Palou, E., Alzamora, S. (2005). “Naturally occurring compounds – plants sources”. In: Davidson PM, Sofos JN, Branen AL, editors. Antimicrobials in Food. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 428-51.
  - Mestorino, N., Errecalde, J. “Pharmacokinetic-Pharmacodynamic considerations for bovine mastitis treatment”. In: Pérez Marín CC, editor. A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine. InTech, Croatia. (2012). p. 423-72. doi: 10.5772/31721
  - Nami, T.S., Le Dell, K.H., Sabetti, K., Borchadt, S.M., Boxrud, D.J., Elianne, J. (2003). Comparison of community and health care associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA*, 290: 2976-2984. doi:10.1001/jama.290.22.2976
  - Nascimento, A.M., Brandão, G., Oliveira, G.B., Fortes, I.C., 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
  - Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6: 1451-1474. doi:10.3390/ph6121451
  - Orchard, A., van Vuuren, S. (2017). Commercial essential oils as potential antimicrobials to treat skin diseases. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017:1-92. doi: 10.1155/2017/4517971
  - Rich, M. (2005). Staphylococci in animals: Prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British journal of biomedical science*, 62(2): 98-105. doi 10.1080/09674845.2005.11732694
  - Rizk, M., Ibrahim, N., El-Rigal, N. (2012). Comparative in vivo antioxidant levels in *Schistosoma mansoni* infected

mice treated with praziquantel or essential oil of *Melaleuca armillaris* leaves. *Pak J Biol Sci*, 15 (20): 971-978.

- Rodrigues, F.F., Costa, J.G., 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

- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise D, Milillo AM. (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

- Sidhu, P., Landoni, M., Aliabadi, F., Lees P. 2011. PK-PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Res in Vet Sci*. 88:134-41. doi: 0.1016/j.rvsc.2009.05.013

- Silva, C.J., Barbosa, L.C., Maltha, C.R., Pinheiro, A.L., Ismail, F.M. (2007). Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. *Flavour Frag J*, 22:474–478. doi: doi.org/10.1002/ffj.1823

- Van Vuuren, S.F., Suliman, S., Viljoen, A.M. (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol*, 48: 440–6. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x

- Vega-Portocarrero, E., López-Malo, A. (2009). Agentes antimicrobianos

presentes en especies y hierbas. *Temas selectos de ingeniería en alimentos*, 3-1: 85-95.

- WHO. Antimicrobial resistance. Fact sheet. January 2018. [ONLINE]. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

- 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.

- Yap, P.S., Yiap, B.C., Ping, H.C., Lim, S.H.E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *Open Microbiol J*, 8: 6–14. doi:10.2174/1874285801408010006

- Yvon, Y., Raelison, E.G., Razafindrazaka, R., Randriantsoa, A., Romdhane. M., Chabir, N., Mkaddem, M.G., Bouajila J. (2012). Relation between chemical composition or antioxidant activity and antihypertensive activity for six essential oils. *J Food Sci*, 7 (8):H185-H191. doi:doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02812.x

- Zomorodian, K., Moein, M., Lori, Z.G., Ghasemi, Y., Rahimi, M.J., Bandegani, A., et al. (2013). Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Myrtus communis* leaves. *J Essent Oil Bear PI*, 16 (1): 76-84. doi: 10.1080/0972060X.2013.764183