

Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* frente a *Staphylococcus aureus*

Antimicrobial effect of combinations of cloxacillin and essential oil of *Melaleuca armillaris* against *Staphylococcus aureus*

Buldain D^{1,2*}, Buchamer A¹, Marchetti L¹, Aliverti F¹, Borja C¹, Mestorino N¹

¹Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT)

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP)

*Correo electrónico del autor: dbuldain@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: La problemática actual de la resistencia bacteriana, promovida básicamente por el abuso en la utilización de antibióticos, lleva a la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas más eficaces para enfrentar las infecciones bacterianas. Los aceites esenciales representan una gran herramienta para enfrentar esta crisis. Nuestro objetivo fue evaluar la interacción farmacodinámica establecida al combinar aceite esencial de *Melaleuca armillaris* con cloxacilina en busca de un efecto sinérgico que maximice la actividad del antibiótico frente a *Staphylococcus aureus*. Cepas de referencia y salvajes de dicha especie fueron enfrentadas al extracto vegetal y al antimicrobiano en forma individual y combinada mediante microdilución en caldo, modificando las condiciones del pH para emular el ambiente subcelular. Se determinó la interacción mediante la técnica de tablero de damas o *checkerboard*, se calculó el índice de concentración fraccionaria inhibitoria y, finalmente, se estableció el índice de actividad antibacteriana de la combinación. Nuestros resultados demuestran una clara actividad antimicrobiana del aceite esencial, que permite reducir las concentraciones mínimas inhibitorias del antibiótico betalactámico para el *S. aureus*. Esta interacción se ve favorecida por la acidificación del medio, lo que permite que menores concentraciones de cloxacilina logren un efecto bactericida, cercano a la erradicación virtual, en presencia de pequeñas cantidades de aceite esencial. Estos hallazgos resultan prometedores para enfrentar infecciones estafilocócicas de difícil resolución.

Palabras clave: *Melaleuca armillaris*, cloxacilina, *Staphylococcus aureus*, resistencia, sinergismo

Abstract: The current problem of bacterial resistance, largely promoted by indiscriminate use of antibiotics, leads to find more effective therapeutic alternatives to combat bacterial infections. Essential oils are a potential tool to deal with this issue. Our objective was to evaluate the pharmacodynamic interaction of *Melaleuca armillaris* essential oil and cloxacillin in search of a synergistic effect that maximizes the activity of the antibiotic against *Staphylococcus aureus*. Reference and wild strains of *S. aureus* were confronted to the essential oil and the antibiotic individually and in combination by microdilution in broth, modifying the pH conditions to emulate the subcellular environment. The interaction was determined by the *checkerboard* technique, the index of inhibitory fractional concentration was calculated and the index of antibacterial activity of the combination was finally established. Our results demonstrate a clear antimicrobial activity of the essential oil, which allows reducing the minimum inhibitory concentrations of cloxacillin for *S. aureus*. This interaction is favored by medium acidification, where lower concentrations of cloxacillin achieved a bactericidal effect, close to virtual eradication, in the presence of small amounts of essential oil. These findings are promising for dealing with staphylococcal infections with a difficult resolution.

Key words: *Melaleuca armillaris*, cloxacillin, *Staphylococcus aureus*, resistance, synergism

Introducción

Los antibióticos constituyen una parte fundamental del tratamiento de las enfermedades infecciosas. El desarrollo de mecanismos evolutivos, por parte de los microorganismos para evadir la acción antibiótica, genera riesgos en la terapia y en la salud, tanto animal como humana. A pesar de que durante años de investigación se han logrado encontrar y desarrollar nuevos fármacos antimicrobianos, se observan aún, y cada vez con mayor frecuencia, situaciones en las que aparecen infecciones difíciles de tratar, ocasionadas por patógenos que se han convertido en resistentes al tratamiento, lo cual se ha incrementado de forma alarmante durante los últimos años (OMS, 2015). Una alternativa para combatir la resistencia bacteriana la representan los extractos vegetales, donde se pueden aprovechar los metabolitos secundarios que las plantas utilizan en su defensa contra microorganismos. Sus compuestos con acción antimicrobiana se encuentran mayoritariamente presentes en los aceites esenciales (AE), que pueden presentarse en uno o más órganos, dependiendo de la especie vegetal. Estos resultan ser el producto final del metabolismo secundario de plantas aromáticas y se conforman fundamentalmente de terpenos con actividad y composición variada de entre 20-60 compuestos (Vega-Portocarrero & López-Malo, 2009).

Se ha observado que los compuestos que conforman la mezcla de un AE presentan efectos sinérgicos potenciándose entre sí. A pesar de que muchos de estos componentes no pueden producir efectos inhibidores significativos cuando son utilizados solos, si se usan en combinación con fármacos convencionales, el efecto logrado supera la actividad individual y produce mejoras en la acción antimicrobiana (Gibbons et al., 2003).

Melaleuca armillaris es una de las plantas del género *Melaleuca* sp. más ampliamente cultivadas, cuyo AE, aún poco estudiado, debido a la presencia de 1,8-cineol entre sus principales componentes, se transforma en una alternativa terapéutica con prometedoras acciones farmacológicas (Chabir et al., 2011). Se encontró actividad inhibitoria, *in vitro*, frente a especies bacterianas como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Amri et al., 2012).

S. aureus es un patógeno de importancia en salud animal y humana. La convivencia con animales portadores de estos microorganismos puede generar infecciones ocasionadas por cepas que han incrementado su resistencia a diversos antibióticos. Las infecciones e intoxicaciones alimentarias continúan representando graves problemas en salud pública. 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 intracelular de los antimicrobianos 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 AE podrían tener importancia por su lipofilia y capacidad de permeabilizar las membranas celulares.

La cloxacilina (CLOX) es un antimicrobiano del grupo de los betalactámicos con buena actividad sobre *S. aureus* y de amplio uso en medicina veterinaria. Estos compuestos mantienen su actividad a pH 5 (Barcia-Macay et al., 2006), lo cual es importante por la capacidad de este patógeno de permanecer dentro de los fagolisosomas, donde el pH es cercano a 5,5. El pH ácido ocasiona un cambio conformacional en la proteína diana de acción (PBP2a), aumentando la afinidad de su centro catalítico por el betalactámico (Mensa et al., 2013).

Existe evidencia documentada que el AE de *M. armillaris* en forma pura tiene actividad antibacteriana *in vitro* frente a múltiples microorganismos (Amri et al., 2012). Esto permite suponer que si se combina con un fármaco antimicrobiano en sistemas sinérgicos, podrían optimizarse los resultados, incluso frente a microorganismos resistentes a los tratamientos convencionales. Hasta el momento, no hemos encontrado referencias que indiquen el uso del AE de *M. armillaris* como potenciador de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones microbianas, particularmente contra cepas de *S. aureus*. Por ello en este trabajo nos propusimos estudiar la posible existencia de un efecto sinérgico entre el AE de *M. armillaris* y la CLOX frente a *S. aureus*.

Materiales y métodos

Obtención del aceite esencial de *M. armillaris*

Se recolectaron hojas y ramas herbáceas de plantas de *M. armillaris* en la localidad de Coronel Brandsen, provincia de Buenos Aires, durante el mes de julio. Las mismas se sometieron a destilación por arrastre de vapor de agua, en un equipo especialmente preparado (Figura 1). Para la extracción de AE se utilizaron 26,12 kg de hojas y ramas herbáceas. El proceso duró 4,5 h. El AE obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro y se guardó en frascos de vidrio color ámbar en heladera a 4 °C. Se obtuvieron muestras del espécimen vegetal utilizado, que se depositaron en el Herbario LPAG de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP (Holmgren et al., 1990).

Figura 1. Destilador de aceites esenciales por arrastre de vapor.



Staphylococcus aureus

El estudio se llevó a cabo usando 3 cepas salvajes de *S. aureus*. La cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 se utilizó como control de calidad. Las cepas salvajes fueron obtenidas a partir de aislamientos realizados en vacas Holstein portadoras de mastitis subclínica. Estas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas de rutina, tinción de Gram, pruebas de coagulasa y catalasa, desarrollo de β -hemólisis, fermentación de glucosa y crecimiento en medio salino (7,5 %).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de CLOX y del AE de *M. armillaris* mediante microdilución en caldo

Para determinar la CIM de CLOX se utilizaron placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos con caldo Mueller Hinton (MH) a pH 7,4, pH 6,5 y pH 5. El rango de concentraciones evaluado fue de 256 a 0,007 $\mu\text{g/ml}$. Se siguieron las pautas establecidas por la CLSI (2009) en su documento M31-A3.

Para la determinación de la CIM del AE se preparó el caldo MH agregando Tween® 80 al 0,5 % para mejorar la disolución de la esencia a los 3 pH mencionados para CLOX. Se probaron concentraciones desde 50 $\mu\text{l/ml}$ hasta 0,1 $\mu\text{l/ml}$.

En ambos casos, cada pocillo fue inoculado con una concentración bacteriana final de 5×10^5 UFC/ml. Se incubó a 37 °C en estufa durante 18-24 h y se estableció como CIM la primera concentración en la que no se observó la formación de botón de crecimiento ni turbidez. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y en todos los casos se utilizaron controles positivos y negativos con caldo MH conteniendo Tween® 80 al 0,5 %.

Determinación de la CIM de la combinación CLOX/AE de *M. armillaris*

Se evaluaron combinaciones del antibiótico y del extracto vegetal (en placas de microtitulación de 96 pocillos, con caldo MH con Tween® 80 al 0,5 % a pH 7,4, 6,5 y 5) frente a los aislados de *S. aureus* y a la cepa de referencia, mediante la técnica de tablero de damas o checkerboard (Grzybowska *et al.*, 2004). El inóculo bacteriano utilizado fue de 5×10^5 UFC/ml por pocillo. Se realizó la incubación a 37 °C durante 18-24 h. Se determinó el índice de concentración fraccionaria inhibitoria (ICF) según la siguiente ecuación:

$$[(A) / (CIM)a] + [(B) / (CIM)b] = ICF$$

Donde (A) es la CIM de CLOX en combinación con el AE; (B) es la CIM del AE en la mezcla con CLOX; (CIM)a es la CIM del antimicrobiano solo y (CIM)b es la CIM del AE solo. Se consideró sinergismo (S) si $ICF \leq 0,5$; sinergismo parcial o bajo (SP) si $0,5 < ICF < 1$; indiferencia o adición (I) si $1 \leq ICF < 2$ y antagonismo (A) cuando $ICF \geq 2$.

Evaluación del índice de actividad antibacteriana de la combinación AE/CLOX

A partir de aquellas combinaciones que arrojaran los menores valores de ICF, tomadas como valor CIM de la mezcla, se evaluó el índice de actividad antibacteriana (*E*). El índice *E* se cuantificó como la diferencia entre los valores \log_{10} del número de bacterias viables (UFC/ml) al inicio (n_{t_0}) y al final del ensayo ($n_{t_{24}}$), según la siguiente ecuación: $E = n_{t_{24}} - n_{t_0}$. Para ello se prepararon 6 tubos con 1 ml de volumen final conteniendo la mezcla AE/CLOX (control sin antimicrobianos, 0,5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM de la mezcla), para luego incubar a 37 °C y obtener muestras a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h, para construir curvas de muerte bacteriana mediante recuento de bacterias en placa.

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 n_{t_0} ; b) efecto bactericida: $E = -3$; hay reducción de $\geq 3 \log_{10}$ de n_{t_0} y c) efecto de erradicación virtual de bacterias: $E = -4$; hay reducción de $\geq 4 \log_{10}$ (99,99 %) respecto del \log de n_{t_0} .

Los resultados obtenidos fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism 6 a fin de obtener curvas *E* vs. \log_{10} (concentración de CLOX). Los ensayos fueron realizados por triplicado y las cepas salvajes fueron agrupadas obteniéndose una $n=3$.

Resultados

Las cepas utilizadas en este estudio fueron aquellas identificadas como la especie *S. aureus* luego de caracterizarlas bioquímicamente, dando como

resultados cepas Gram +, coagulasa +, catalasa +, β-hemolíticas, fermentadoras de glucosa y con crecimiento en medio salino (7,5 %).

La CIM de la CLOX obtenida para *S. aureus* ATCC 29213 a pH 7,4 fue de 0,125 µg/ml, lo cual es acorde a las recomendaciones de la CLSI (2009). Las 3 cepas salvajes (denominadas como SA13, SA96 y SA139) presentaron una CIM de 0,5 µg/ml a pH 7,4. En todos los casos se observó un descenso de esta concentración al acidificar el medio de cultivo (Tabla 1).

En cuanto 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).

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos al combinar la CLOX con el AE a los 3 valores de pH mencionados y los menores valores de ICF hallados.

Con la evaluación del índice de actividad antibacteriana se pudo comparar la incidencia del AE en la actividad de la CLOX, además del efecto causado por la variación del pH. Esto se observa en las tablas 4, 5, 6 y en las figuras 2 y 3.

Aquí se observa cómo, al acidificar el medio, se potencia la actividad antimicrobiana de la CLOX

Tabla 1. Valores de concentración inhibitoria mínima de cloxacilina obtenidos para las 4 cepas a pH 7,4, 6,5 y 5.

Cepa	CIM pH 7,4	CIM pH 6,5	CIM pH 5
ATCC 29213	0,125 µg/ml	0,062 µg/ml	0,031µg/ml
SA 13	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	0,031µg/ml
SA 96	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	0,031µg/ml
SA 139	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	0,031µg/ml

CIM: concentración inhibitoria mínima

Tabla 2. Valores de concentración inhibitoria mínima del aceite esencial de *M. armillaris* obtenidos para las 4 cepas a pH 7,4; 6,5 y 5.

Cepa	CIM pH 7,4	CIM pH 6,5	CIM pH 5
ATCC 29213	25,0 µl/ml	25,0 µl/ml	12,50 µl/ml
SA 13	12,5 µl/ml	12,5 µl/ml	6,25 µl/ml
SA 96	12,5 µl/ml	12,5 µl/ml	6,25 µl/ml
SA 139	12,5 µl/ml	12,5 µl/ml	6,25 µl/ml

CIM: concentración inhibitoria mínima

Tabla 3. Índices de concentración fraccionaria obtenidos para la combinación aceite esencial/cloxacilina en diferentes condiciones de pH vs. concentraciones inhibitorias mínimas individuales.

Cepa	pH 7,4				pH 6,5				pH 5			
	CIM AE µl/ml	CIM CLOX µg/ml	CIM AE/CLOX (µl/ml)/(µg/ml)	ΣICF	CIM AE µl/ml	CIM CLOX µg/ml	CIM AE/CLOX (µl/ml)/(µg/ml)	ΣICF	CIM AE µl/ml	CIM CLOX µg/ml	CIM AE/CLOX (µl/ml)/(µg/ml)	ΣICF
ATCC 29213	25	0,125	25/0,03	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

ICF: índices de concentración fraccionaria; AE/CLOX: aceite esencial/cloxacilina; CIM: concentración inhibitoria mínima

Tabla 4. Índices de actividad bacteriana (E) con su desvío estándar (DE) para la CLOX sola y en combinación con AE (AE/CLOX) a diferentes concentraciones (CIM) para *S. aureus* ATCC 29213 (n=3) y para *S. aureus* salvajes (n=3), a pH 7,4.

CIM	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 pH 7,4				<i>S. aureus</i> salvajes pH 7,4			
	CLOX (µg/ml)	E ± DE	CLOX/AE (µg/ml)/(µl/ml)	E ± DE	CLOX (µg/ml)	E ± DE	CLOX/AE (µg/ml)/(µl/ml)	E ± DE
0,5	0,062	6,50 ± 0,04	0,015/12,5	1,07 ± 0,06	0,25	6,69 ± 0,71	0,062/3,13	0,15 ± 0,07
1	0,125	1,34 ± 0,15	0,031/25	-1,25 ± 0,09	0,5	0,13 ± 0,30	0,125/6,25	-1,94 ± 0,10
2	0,25	-1,10 ± 0,12	0,062/50	-3,83 ± 0,06	1	-2,82 ± 0,08	0,25/12,5	-3,66 ± 0,13
4	0,5	-3,05 ± 0,08	0,125/100	-3,77 ± 0,09	2	-3,12 ± 0,21	0,5/25	-3,78 ± 0,14
8	1	-3,46 ± 0,14	0,25/200	-3,76 ± 0,08	4	-3,31 ± 0,39	1/50	-3,77 ± 0,15

E: índice de actividad bacteriana; DE: desvío estándar; CLOX: cloxacilina, AE: aceite esencial; CIM: concentración inhibitoria mínima

frente a *S. aureus* (tanto para la cepa de referencia como para las cepas salvajes). Al descender el pH se requieren menores concentraciones de antibiótico para obtener un valor E menor a -3 , indicando un efecto bactericida. En las figuras 2 y 3 se puede ver cómo la presencia del AE favorece el accionar de la CLOX, ya que se alcanzan valores de E menores con concentraciones más bajas del antibiótico en comparación con los resultados obtenidos para CLOX 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 pH evaluados (Figura 2).

En los aislamientos salvajes, el comportamiento fue similar al observado para la cepa de referencia (Figura 3).

Tabla 5. Índices de actividad bacteriana (E) con su desvío estándar (DE) para la CLOX sola y en combinación con AE (AE/CLOX) a diferentes concentraciones (CIM) para *S. aureus* ATCC 29213 ($n=3$) y para *S. aureus* salvajes ($n=3$) a pH 6,5.

CIM	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 pH 6,5				<i>S. aureus</i> salvajes pH 6,5			
	CLOX		CLOX + AE		CLOX		CLOX + AE	
	CLOX ($\mu\text{g/ml}$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX/AE ($\mu\text{g/ml}/(\mu\text{l/ml})$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX ($\mu\text{g/ml}$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX/AE ($\mu\text{g/ml}/(\mu\text{l/ml})$)	$E \pm \text{DE}$
0,5	0,031	$1,96 \pm 0,12$	0,015/12,5	$1,04 \pm 0,04$	0,062	$2,67 \pm 0,39$	0,007/6,25	$0,21 \pm 0,14$
1	0,062	$0,34 \pm 0,15$	0,031/25	$-2,94 \pm 0,05$	0,125	$0,43 \pm 0,05$	0,015/12,5	$-2,25 \pm 0,28$
2	0,125	$-2,80 \pm 0,12$	0,062/50	$-3,95 \pm 0,09$	0,25	$-2,84 \pm 0,16$	0,031/25	$-2,97 \pm 0,09$
4	0,25	$-3,41 \pm 0,04$	0,125/100	$-3,90 \pm 0,10$	0,5	$-3,13 \pm 0,23$	0,062/50	$-3,11 \pm 0,06$
8	0,5	$-3,77 \pm 0,05$	0,25/200	$-3,89 \pm 0,07$	1	$-3,22 \pm 0,03$	0,125/100	$-3,35 \pm 0,24$

Tabla 6. Índices de actividad bacteriana (E) con su desvío estándar (DE) para la CLOX sola y en combinación con AE (AE/CLOX) a diferentes concentraciones (CIM) para *S. aureus* ATCC 29213 ($n=3$) y para *S. aureus* salvajes ($n=3$), a pH 5.

CIM	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 pH 5				<i>S. aureus</i> salvajes pH 5			
	CLOX		CLOX + AE		CLOX		CLOX + AE	
	CLOX ($\mu\text{g/ml}$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX/AE ($\mu\text{g/ml}/(\mu\text{l/ml})$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX ($\mu\text{g/ml}$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX/AE ($\mu\text{g/ml}/(\mu\text{l/ml})$)	$E \pm \text{DE}$
0,5	0,015	$4,02 \pm 0,05$	0,0016/6,25	$-0,59 \pm 0,07$	0,015	$3,13 \pm 0,54$	0,0015/3,1	$-1,30 \pm 0,31$
1	0,031	$1,35 \pm 0,07$	0,0035/12,5	$-2,09 \pm 0,05$	0,031	$0,92 \pm 0,03$	0,0035/6,25	$-1,96 \pm 0,12$
2	0,062	$-2,79 \pm 0,04$	0,007/25	$-3,90 \pm 0,07$	0,062	$-2,90 \pm 0,03$	0,007/12,5	$-2,89 \pm 0,05$
4	0,125	$-3,13 \pm 0,16$	0,015/50	$-3,84 \pm 0,08$	0,125	$-3,01 \pm 0,13$	0,015/25	$-3,44 \pm 0,23$
8	0,25	$-3,37 \pm 0,12$	0,031/100	$-3,81 \pm 0,05$	0,25	$-3,43 \pm 0,44$	0,031/50	$-3,49 \pm 0,17$

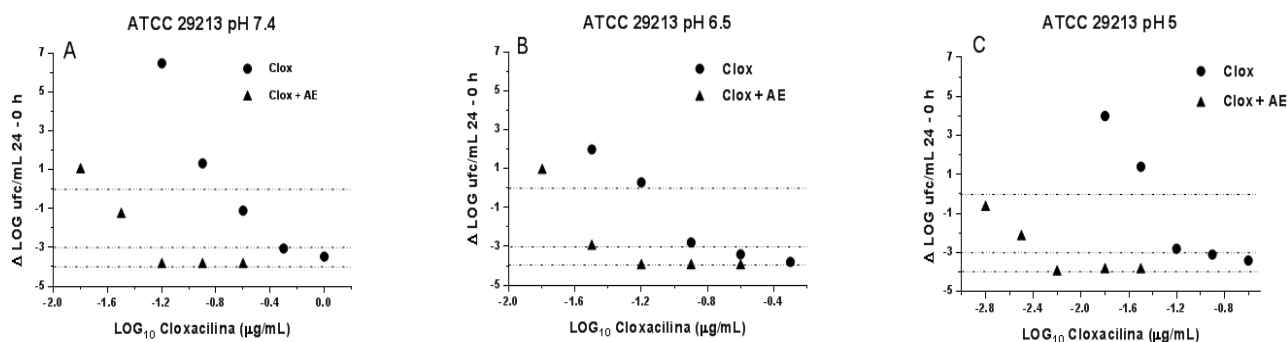


Figura 2. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta \log \text{UFC/ml } 24 - 0 \text{ h}$) de cloxaciclina frente a *S. aureus* ATCC 29213 ($n=3$) a pH 7,4 (a), 6,5 (b) y 5 (c) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris*.

Discusión y conclusiones

Los AEs son mezclas complejas cuyas propiedades antimicrobianas han sido ampliamente estudiadas para muchas especies vegetales y resultan ser un gran recurso para combinar con antibióticos que han disminuido su efectividad frente a microorganismos (Yap et al., 2014).

El AE de *M. armillaris* utilizado solo en este estudio presentó actividad inhibitoria frente a *S. aureus*. Su CIM frente a *S. aureus* ATCC 29213 fue de 25 µl/ml a pH 7,4 y disminuyó a la mitad a pH 5. Esta disminución, en un factor de dos, también se observó para los aislamientos salvajes. Dichos resultados marcan una importante actividad antibacteriana, la cual también fue determinada por Amri et al. (2012).

La capacidad de los AEs de potenciar el efecto de antibióticos frente a especies bacterianas es un concepto nuevo. El AE de *Pelargonium graveolens* logró reducir la dosis mínima eficaz de norfloxacin frente a *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *S. aureus* (Rosato et al., 2007). Rodrigues et al. (2009) informaron que el AE 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. En nuestros resultados se observa un efecto antimicrobiano claro para la combinación AE/CLOX, ya que se obtuvieron valores de ICF que marcan la presencia de sinergismo entre ellos al enfrentarlos con cepas de *S. aureus*, logrando disminuir notoriamente la concentración del antibiótico en presencia del AE. Este efecto se mantuvo al disminuir el pH del medio de 7,4 a 5, permitiendo bajar aún más la cantidad de CLOX necesaria para lograr la inhibición del microorganismo.

La actividad conjunta del AE de *M. armillaris* y la CLOX, utilizados en nuestro trabajo, se evidenció también en el efecto bactericida, establecido por el índice *E*. El descenso del inóculo bacteriano inicial -log₁₀ (UFC/ml)- en un factor de 3 en 24 horas, marca actividad bactericida; esto se observó tanto para la CLOX sola como para la mezcla. Sin embargo, la

concentración del antimicrobiano en presencia del AE fue claramente menor y el *E* obtenido fue más cercano al efecto de erradicación virtual (*E*=-4) que la concentración necesaria cuando se aplica el antibiótico betalactámico solo. En un estudio realizado por Nascimento et al. (2007) se evaluó el AE de *Eremanthus erythropappus* en combinación con ampicilina (antibiótico betalactámico) frente a *S. aureus*, logrando obtener un efecto sinérgico bactericida tras una incubación de 24 horas.

Al combinar el AE de *M. armillaris* con CLOX se logró disminuir la concentración del antibiótico necesaria para inhibir al *S. aureus*, incluso modificando el pH del medio, lo cual es importante para el tratamiento de infecciones intracelulares por la acidez del fagolisosoma (donde se logra internalizar el *S. aureus*) respecto del medio extracelular. Esto se refleja también en la actividad bactericida logrando un efecto cercano a la erradicación virtual. Se obtuvieron resultados prometedores frente al tratamiento de infecciones estafilocócicas. Este hallazgo se transforma en una valiosa alternativa para el tratamiento de infecciones estafilocócicas persistentes.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONICET por la financiación parcial mediante la beca de doctorado 2016-2021. Este trabajo es parcialmente financiado por el LEFyT y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANP-CyT) (PICT 2015-831).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Bibliografía

Amri I, Mancini E, De Martino L, Marandino A, Lamia H, Mohsen H, Basssem J, Scognamiglio M, Reverchon E, De Feo V. 2012. Chemical composition and biological activities of the essential oils from three *Melaleuca* species grown in Tunisia. International Journal of Molecular Science. 13:16580-91. doi: 10.3390/ijms131216580.

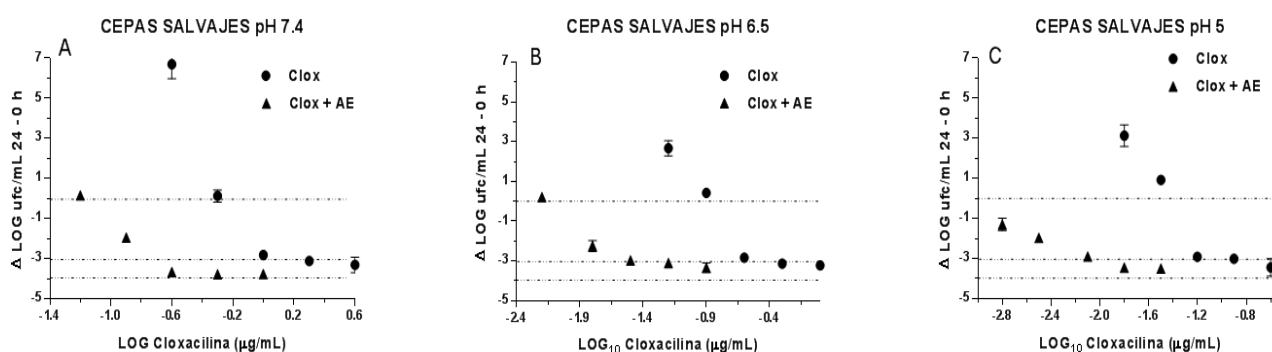


Figura 3. Representación gráfica del efecto antibacteriano (*E*: $\Delta \text{log}_{10} \text{ UFC/ml } 24 - 0 \text{ h}$) de cloxacilina frente a cepas de *S. aureus* salvajes (n=3) a pH 7,4 (a), 6,5 (b) y 5 (c) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2006. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 50:841-51. doi: 10.1128/AAC.02609-12.

Chabir N, Romdhane M, Valentin A, Moukarzel B, Marzoug HN, Brahim NB, Mars M, Bouajila J. 2011. Chemical study and antimalarial, antioxidant, and anticancer activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm essential oil. *Journal of Medicinal Food*. 14:1383-8. doi: 10.1089/jmf.2010.0168.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals; Nineteenth Informational Supplement. Clinical Laboratory Standard Institute. Wayne, Pennsylvania, EE.UU.

Gibbons S, Oluwatuyi M, Veitch NC, Gray AI. 2003. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. *Photochemistry*. 62(1):83-7. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00446-6.

Grzybowska W, Banaszczyk-Ru M, Wójcik A, Tyski S. 2004. Comparison of checkerboard and time-kill methods for the analysis of two antibiotics combined. *Medycyna Doswiadczalna Mikrobiologia*, 56(4):391-403.

Holmgren PK, Holmgren NH, Barnett LC. 1990. Index Herbariorum. The herbaria of the world. 8^oEd. New York Botanical Gardens, Bronx, New York, EE.UU.

Mensa J, Soriano A, Llinares P, Barberán J, Montejo M, Salavert M, Alvarez Rocha L, Maseda E, Moreno A, Pasquau J, Gómez J, Parra J, Candel J, Azanza JR, García JE, Marco F, Soy D, Grau S, Arias J, Fortun J, de Alarcón CA, Picazo J. 2013. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Revista Española de Quimioterapia*. 26(1):1-84.

Nascimento AM, Brandão MG, Oliveira GB, Fortes IC, 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.

Rodrigues FF, Costa JG, Coutinho HD. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. 2009. *Phytomedicine*. 16(11):1052-5. doi: 10.12691/ajmr-4-1-2.

Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, 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.

Sidhu P, Landoni M, Aliabadi F, Lees P. 2011. PK-PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Research in Veterinary Science*. 88:134-41. doi:10.1016/j.rvsc.2009.05.013.

OMS. Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva N°194. Abril de 2015. [ONLINE] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>. [Consultado: 16/06/2016].

Vega-Portocarrero E, López-Malo A. 2009. Agentes antimicrobianos presentes en especies y hierbas. *Temas selectos de ingeniería en alimentos*. 3(1):85-95.

Yap Polly Soo, Yiap Beow Chin, Ping Hu Cai, Lim Swee Hua. 2014. Essential oils. A new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*. 8:6-14. doi: 10.2174/1874285801408010006.