

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE ACEITES  
ESENCIALES SOBRE *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE**

**KARLA JOHANA CRUZ CUELLAR**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
PAMPLONA  
2017**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE ACEITES  
ESENCIALES SOBRE *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE**

**KARLA JOHANA CRUZ CUELLAR**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE MICROBIÓLOGA**

**Director**

**Raquel Amanda Villamizar Gallardo, MSc. PhD.**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
PAMPLONA  
2017**

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

---

---

---

Firma del Primer Jurado

---

Firma del Segundo Jurado

Pamplona (Norte de Santander - Colombia), 12 de Junio 2017.

## **DEDICATORIA**

### **A Dios.**

Por permitirme llegar hasta este punto, por haberme dado paciencia y fuerzas para lograr mis objetivos, por colocar en mi camino aquellas personas que me guiaron y me motivaron a no rendirme.

### **A mi madre Isabel.**

Por brindarme todo su amor, por inculcarme tantos valores que me han permitido ser una persona de bien, por sus consejos y su motivación. ¡Te amo Mami!

### **A mi padre Orlando.**

Por todos los consejos que me has dado, por su perseverancia y por todo el amor que me brindas día a día. ¡Te amo padre!

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a Dios por guiarme por el sendero correcto de la vida, por permitirme estar donde estoy y ser la persona que soy ahora.

A mi familia por sus consejos e impulsarme a ser cada día mejor, por respaldarme en mis decisiones, les agradezco de todo corazón por todos los valores inculcados y por sus constantes enseñanzas de vida.

A mi directora de tesis Raquel Amanda Villamizar, por brindarme la oportunidad de unirme a **NANOSOST** y poder realizar mi trabajo allí, por tenerme paciencia y por guiarme en cada paso de este proyecto.

A la Universidad de Pamplona, a todos los profesores que hicieron parte de mi formación profesional como Microbióloga.

A mis Amigos, por brindarme palabras de aliento, por la ayuda prestada en momentos de crisis y por la motivación que me dieron para seguir adelante.

## TABLA DE CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN .....  | 11 |
| 1. OBJETIVOS .....  | 13 |
| 1.1. Objetivo General .....   | 13 |
| 1.2. Objetivos Específicos.....   | 13 |
| 2. JUSTIFICACIÓN.....   | 14 |
| 3. MARCO REFERENCIAL.....   | 15 |
| 3.1. MARCO TEÓRICO.....   | 15 |
| 3.1.1.GENERALIDADES DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 15 |
| 3.1.1.1. ESTRUCTURA.....  | 15 |
| 3.1.1.2. IDENTIFICACIÓN.....  | 16 |
| 3.1.2.COMPONENTES ESTRUCTURALES.....  | 16 |
| 3.1.2.1. CÁPSULA.....   | 16 |
| 3.1.2.2. PEPTIDOGLICANO.....  | 17 |
| 3.1.2.4. ENZIMAS .....  | 17 |
| 3.1.3.PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i> ..                               | 19 |
| 3.1.3.1. Leucocidina de Panton-Valentine (LPV).....   | 19 |
| 3.1.3.2. Hemolisinas.....   | 20 |
| 3.1.3.3. Modulinas Solubles en Fenol (PSMs).....  | 20 |
| 3.1.3.4. Proteína A.....  | 20 |
| 3.1.3.5. Proteínas de unión a Fibronectina (FnBP).....  | 20 |
| 3.1.3.6. ACME (Arginine Catabolic Mobile Element) .....   | 20 |
| 3.1.3.7. QUORUM-SENSING (QS).....   | 21 |
| 3.1.3.8. BIOFILM.....   | 21 |
| 3.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> METICILINA RESISTENTE (SARM).....                                     | 21 |
| 3.1.4.1. GEN <i>mecA</i> .....  | 22 |
| 3.1.4.2. Cassete cromosómico estafilocócico ( <i>SCCmec</i> ).....  | 23 |
| 3.1.5.ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE <i>Staphylococcus aureus</i> METICILINA RESISTENTE. .... | 23 |
| 3.1.5.1. VANCOMICINA .....  | 23 |
| 3.1.5.2. GENTAMICINA.....   | 24 |
| 3.1.5.3. CIPROFLAXINA .....   | 24 |
| 3.1.5.4. ERITROMICINA.....  | 24 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1.6. ACEITES ESENCIALES .....   | 24 |
| 3.1.6.1. ACEITES ESENCIALES EN COLOMBIA.....  | 25 |
| 3.1.6.2. <i>Lippia alba</i> .....   | 26 |
| 3.1.6.3 <i>Lippia origanoides</i> .....   | 27 |
| 3.1.6.4. <i>Eucalyptus globulus labill</i> .....  | 27 |
| 4. MARCO LEGAL .....  | 28 |
| 4.1. DECRETO 3553 DE 2004.....  | 28 |
| 4.2. DECRETO NÚMERO 677 DE 1995 (abril 26) .....  | 28 |
| 4.3. RESOLUCIÓN 5107 DE 2005.....   | 29 |
| 4.4. RESOLUCIÓN 2674 DE 2013 (Julio 22) .....   | 29 |
| 4.5. PROTOCOLO DE CARTAGENA .....   | 29 |
| 5. ANTECEDENTES.....  | 30 |
| 6. METODOLOGÍA.....   | 33 |
| 6.1. CARACTERIZACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i> METICILINA<br>RESISTENTE .....                         | 33 |
| 6.1.1. CEPAS BACTERIANAS CONTROL .....  | 33 |
| 6.1.2. PREPARACIÓN DE CULTIVOS.....   | 33 |
| 6.2. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....   | 33 |
| 6.2.1. EVALUACIÓN DE LOS AGENTES INHIBITORIOS .....   | 34 |
| 6.2.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS .....   | 34 |
| 6.2.3. DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD Y/O RESISTENCIA DE SARM<br>FRENTE A LOS ACEITES ESENCIALES ..... | 35 |
| 6.2.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIOTICOS .....  | 35 |
| 6.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....  | 36 |
| 6.3.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA DE<br>ACEITES ESENCIALES .....                  | 36 |
| 6.3.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MÍNIMA BACTERICIDA DE<br>ACEITES ESENCIALES .....                  | 37 |
| 6.4. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Meticilina Resistente</i> .....     | 38 |
| 6.5. ANALISIS ESTADISTICO.....  | 38 |
| 7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....   | 39 |
| 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 40 |

|  |    |
|--|----|
| 8.1. CARACTERIZACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i> METICILINA RESISTENTE.....  |    |
| .....  | 40 |
| 8.2. EVALUACIÓN DE LOS AGENTES INHIBITORIOS.....   | 41 |
| 8.2.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS .....  | 41 |
| 8.2.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA USANDO ACEITES ESENCIALES .....   | 44 |
| 8.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS .....   | 50 |
| 8.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....   | 54 |
| 8.4.1. ANÁLISIS DE VARIANZA APLICADA A LOS TRATAMIENTOS EMPLEADOS PARA LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINA RESISTENTE</i> ..... | 54 |
| 9. CONCLUSIONES.....   | 57 |
| 10. RECOMENDACIONES.....   | 58 |
| 11. BIBLIOGRAFIA .....   | 59 |
| 12. ANEXOS .....   | 71 |



## LISTA DE TABLAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1.</b> Características de los Aceites Esenciales obtenidos de plantas.....  | <b>34</b> |
| <b>Tabla 2.</b> Rangos de resistencia o susceptibilidad de los antimicrobianos.....  | <b>35</b> |
| <b>Tabla 3.</b> Estándares de diámetro de halo establecidos para <i>Staphylococcus aureus</i> frente a diferentes grupos de antibióticos según la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).....  | <b>36</b> |
| <b>Tabla 4.</b> Estándares de diámetro de halo establecidos para <i>Staphylococcus aureus</i> frente a diferentes grupos de antibióticos según la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).....  | <b>36</b> |
| <b>Tabla 5.</b> Representación esquemática del ensayo de pozos usando diferentes concentraciones de los aceites esenciales.....  | <b>37</b> |
| <b>Tabla 6.</b> Resultados de los ensayos de actividad inhibitoria de los extractos de Aceites esenciales ( <i>Lippia origanoides</i> , <i>Lippia alba</i> y <i>Eucalyptus globulus</i> ) a una concentración del 100% frente a SARM, <i>S. aureus</i> y <i>E.coli</i> ..... | <b>41</b> |
| <b>Tabla 7.</b> Efecto Inhibitorio de los Aceites esenciales sobre A) SARM B) <i>S. aureus</i> C) <i>E.coli</i> vs 1) <i>Lippia origanoides</i> 2) <i>Lippia alba</i> 3) <i>Eucalyptus globulus</i> 4) Control negativo 5) Control positivo.....                             | <b>43</b> |
| <b>Tabla 8.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas de <i>Lippia origanoides</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (SARM), <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .....                    | <b>45</b> |
| <b>Tabla 9.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas de <i>Lippia alba</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (SARM), <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .....                           | <b>47</b> |
| <b>Tabla 10.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas de <i>Eucalyptus globulus</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (SARM), <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .....                  | <b>49</b> |
| <b>Tabla 11.</b> Resultados de los ensayos de actividad inhibitoria antibióticos ( <i>Gentamicina</i> , <i>Ciproflaxina</i> y <i>Eritromicina</i> ) frente a SARM, <i>S. aureus</i> y <i>E.coli</i> .....  | <b>50</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 12.</b> Efecto Inhibitorio de los Antibióticos obre A) SARM B) <i>S. aureus</i> C) <i>E.coli</i> vs 1) <i>Gentamicina</i> 2) <i>Ciproflaxina</i> 3) <i>Eritromicina</i> 4) Control negativo 5) Control positivo..... | <b>52</b> |
| <b>Tabla 13.</b> Resumen de valores de Análisis de Varianza por un factor.....  | <b>54</b> |
| <b>Tabla 14.</b> Resultados del Análisis de Varianza aplicado a cada uno de los grupos.....   | <b>55</b> |
| <b>Tabla 15.</b> Prueba Tukey, establece las diferencias significativas entre los grupos de tratamientos.....   | <b>56</b> |

#### LISTA DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | <b>19</b> |
| <b>Figura 2.</b> Crecimiento característico de <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Baird Parker.....   | <b>40</b> |
| <b>Figura 3.</b> Microscopía de barrido electrónica de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente: <b>A.</b> Sin tratamiento <b>B.</b> Después de haber sometida a <i>Lippia organoides</i> ..... | <b>42</b> |

#### LISTA DE ANEXOS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Anexo 1.</b> Registro fotográfico de la participación en la Feria de los Microorganismos 2017, organizada por el Departamento de Microbiología (Pamplona, Norte de Santander)..... | <b>70</b> |
|---|-----------|

## INTRODUCCIÓN

Los antibióticos a lo largo del tiempo se han generalizado y han sido mal utilizados tanto en humanos como en animales, de manera que favorecen la selección y diseminación de bacterias resistentes. En consecuencia, los fármacos antibacterianos se han vuelto menos eficaces, lo que genera una emergencia de salud mundial (WHO, 2015). Según un estudio realizado por el Centro de Control de Enfermedades y Prevención (CDC, 2015), en EE.UU más de dos millones de personas cada año se ven afectadas por infecciones resistentes a antibióticos y han generado al menos 23.000 muertes. Las bacterias multiresistentes más frecuentes son: *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las infecciones más difíciles de tratar se presentan en unidades de cuidados intensivos de neonatales. Las especies estafilocócicas, sobre todo *S. epidermidis* y *S. aureus*, causan el 60-70% de las infecciones y numerosos brotes han sido relacionados con cepas resistentes a la metilina (Prestinaci F. *et al.*, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a la problemática creciente de bacterias multirresistentes a antibióticos en hospitales, publicó una lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. Dentro de este grupo se encuentra *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina (WHO, 2015).

*Staphylococcus aureus* es un patógeno importante que causa diversos cuadros clínicos en ambientes hospitalarios y comunitarios. Esto se debe, principalmente, a su habilidad para colonizar el cuerpo humano, a la presencia y expresión de importantes factores de virulencia y a su capacidad para desarrollar resistencia a varios antibióticos (Rincón S *et al.*, 2014). Este microorganismo puede producir enfermedad por toxinas, invadir cualquier órgano o tejido y ocasionar supuración, necrosis tisular, trombosis vascular y bacteriemia. Coloniza determinadas áreas de la piel y las mucosas, causando reinfecciones (Gómez L. *et al.*, 2016).

Debido a la problemática actual se busca establecer nuevos métodos de control para la inhibición de bacterias resistentes. Es allí donde surge un método alternativo basado en el uso de aceites esenciales. Varios reportes experimentales han mostrado que a nivel *in vitro* es altamente efectivo inhibiendo el crecimiento microbiano lo cual se debe a la composición de los mismos. Estos compuestos químicos, son hidrofóbicos, lo que les permite

adherirse a la membrana de las células bacterianas, afectando su presión y por consiguiente la hace más permeable ocasionando la fuga de iones presentes al interior de la célula.

Por tanto, en el presente trabajo se pretende evaluar el efecto antibacteriano de aceites esenciales obtenidos de plantas; *Lippia Origanoides*, *Lippia alba* y *Eucalyptus globulus* sobre *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente SARM. Se pretendió por tanto, identificar cuál de los tres tipos de compuestos químicos despliega una mayor capacidad inhibitoria y que pueda convertirse en un mecanismo alternativo de control de este patógeno.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo General

Evaluar el efecto antibacteriano de aceites esenciales obtenidos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente (SARM).

### 1.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto antibacteriano ejercido por tres aceites esenciales obtenidos de distintas plantas (frutales, herbáceas, y ornamentales) sobre *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente (SARM) realizando ensayos en placa
- Comparar el efecto inhibitorio de los aceites esenciales Vs antibióticos sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (SARM).
- Calcular las concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas de los aceites esenciales con mejor actividad inhibitoria.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) se ha convertido en causas importantes de morbilidad y mortalidad tanto en hospitales como en la comunidad. Las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente se clasifican actualmente como cepas Asociadas hospitalarias (HA-MRSA) y asociadas a la comunidad (CA-MRSA). Las cepas MRHA tienden a ser resistentes a múltiples fármacos ya que colonizan e infectan a los pacientes durante hospitalización o en establecimientos de salud, después de la cirugía. Los brotes periódicos de infección se notificaron por primera vez en los hospitales donde se usaban altos niveles de oxacilina o meticilina y en entornos de cuidados intensivos (Prestinaci F. et al., 2015).

En Colombia se han reportado estudios referentes a la prevalencia de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. En Popayán, entre los años 2009 y 2010, se encontró una prevalencia de infección por *Staphylococcus aureus* adquirido en la comunidad SAMR-CO de 45,1%, con una edad promedio de aparición de 55 meses, afectando a niños. Según los datos reportados por el grupo de resistencia bacteriana de Bogotá (GREBO), el porcentaje de resistencia de *S. aureus* resistentes a meticilina en los servicios de hospitalización pediátrica fue similar en el 2012 y en el 2013 (42,3% vs 40%), con persistencia del fenotipo comunitario, dado que la resistencia a la clindamicina es baja (6,1%), al igual que la resistencia a trimetoprim sulfa (2,5%) (Camacho G et al., 2014).

En los últimos años la evolución de los mecanismos de resistencia de *S. aureus* ha incentivado el desarrollo de estudios que exploren nuevas estrategias de control antibacteriano. Por tal motivo, a través de esta investigación se buscó evaluar el efecto antibacteriano de aceites esenciales sobre SARM con el fin de encontrar estrategias efectivas y naturales que puedan potencialmente ser aplicadas para ayudar a mitigar esta problemática.

### 3. MARCO REFERENCIAL

#### 3.1. MARCO TEÓRICO

##### 3.1.1. GENERALIDADES DE *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , pertenece al género *Staphylococcus*, de la familia *Micrococcaceae*. Es un coco Gram positivo, no móvil, aerobio y anaerobio facultativos, no formador de esporas y generalmente sin capsula. El nombre del género fue designado por Ognston en 1883 y deriva del riego “*sthapyle*” (racimo de uvas) por la forma que adoptan las bacterias en las tinciones. Es característica la pigmentación dorada de las colonias (*aureus*, en latín —oroll), debido a la producción de carotenoides durante su crecimiento. Crece bien en medios no selectivos, tolera altas concentraciones de NaCL, es coagulasa, DNAsa y catalasa positiva, y fermenta el manitol. Estas características permiten diferenciarle de otras especies de *Staphylococcus* (Cervantes E. *et al.*, 2014). Contiene 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos, algunas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, y otras se encuentran sólo entre la biota de otros mamíferos y aves. Algunas de estas especies son patógenas cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped o en presencia de cuerpos extraños. Por lo general, cada especie tiende a ocupar una localización anatómica específica en el huésped que coloniza. Entre las especies que colonizan al humano, las de mayor importancia clínica son: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus lugdunensis*; en tanto que en animales se encuentra además de *S. aureus* a *Staphylococcus intermedius*. *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* son comúnmente responsables de infecciones relacionadas con dispositivos e infecciones del tracto urinario, siendo éstos menos infecciosos que *S. aureus* (Kloss W *et al.*, 1992).

##### 3.1.1.1. ESTRUCTURA

Los componentes esenciales de la pared celular de este tipo de bacterias son los ácidos teicóicos y el peptidoglicano. Este último le proporciona forma y estabilidad al microorganismo, tiene actividad endotóxica e interviene de manera significativa en la patogenia de la infección. Los ácidos teicóicos son polímeros compuestos por ribitol y N-acetil-glucosamina (Polisacárido A), son específicos de especie y están unidos de forma covalente al peptidoglicano de la pared o ligados a los lípidos de la membrana celular. Intervienen en la unión del *S. aureus* a las superficies mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina; adicionalmente está revestido por la proteína A, la coagulasa y cuenta además con otras proteínas de superficie que son importantes en la

adherencia a los tejidos del huésped mediante uniones específicas al colágeno, elastina y fibronectina. La membrana citoplasmática sirve de barrera osmótica para la célula y está compuesta de hidratos de carbono, lípidos y un complejo de proteínas (Cervantes E. *et al.*, 2016)

### **3.1.1.2. IDENTIFICACIÓN**

La identificación de *S. aureus* se realiza con el empleo de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, fermentación de glucosa, que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*, que también se considera una catalasa positiva pero no fermenta la glucosa. La prueba de la coagulasa sigue siendo la más utilizada. Se basa en la capacidad de *S. aureus* para producir la enzima extracelular que coagula el plasma. La detección de la coagulasa permite diferenciar *S. aureus* coagulasa positivo de las demás especies de estafilococos coagulasa negativos. Con la prueba de la DNAsa termoestable se identifica fácilmente en el medio que contiene DNA y verde de malaquita. Otras pruebas son específicas de especie como la fermentación del manitol y la producción de la fosfatasa alcalina. *S. aureus* también puede identificarse a través de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real, utilizando genes específicos de especie. Sin embargo, estas técnicas son costosas y laboriosas. En ocasiones, se requiere identificar cepas o grupos de cepas con fines epidemiológicos para lo cual se pueden emplear técnicas fenotípicas y genotípicas (Vivoni M. *et al.*, 2005).

## **3.1.2. COMPONENTES ESTRUCTURALES**

### **3.1.2.1. CÁPSULA**

Es de naturaleza polisacárida denominado *slime* o cápsula mucoide, que facilita la adherencia de las bacterias a diversas células, además de tener capacidad antifagocitaria. Se han identificado 11 serotipos capsulares, de los cuales los tipos 1 y 2 producen grandes cantidades de polisacárido, dándole a la bacteria apariencia mucoide en los medios de cultivos; sin embargo, estos tipos son poco frecuentes en las muestras clínicas, en contraste con los serotipos 5 y 8 que son responsables de más de 75% de las infecciones clínicas. Junto con las adhesinas intercelulares, los polisacáridos capsulares de *S. aureus* incrementan el desarrollo de la biopelícula, aumentando su adhesividad (Watts A *et al.*, 2005). *S. aureus* tiene dos componentes en la pared celular: el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano. La parte hidrofóbica del ácido lipoteicoico juega un papel en la adherencia, mientras que la parte covalente del peptidoglicano se une a las proteínas con función de adhesinas (Roche F *et al.*, 2003).



### 3.1.2.2. PEPTIDOGLICANO

El peptidoglicano es el componente básico de la pared celular, tanto de bacterias Gram positivas como de las Gram negativas; está compuesto por cadenas de ácido-N-acetilmurámico y ácido N-acetilglucosamina y de subunidades de disacáridos. En *S. aureus*, representa la mitad del peso seco de la pared celular, le confiere resistencia y tolerancia osmótica, tiene importantes propiedades biológicas: presenta actividad endotóxica, desencadena la producción de interleucina-1 (IL-1) por monocitos, estimula la quimiotaxis y la agregación de los leucocitos, activa el complemento e induce la producción de anticuerpos opsonizantes (De Leo F *et al.*, 2009).

La pared celular es una estructura importante, es el blanco de antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos y glicopéptidos como la vancomicina. Las modificaciones en la síntesis del peptidoglicano es una respuesta de resistencia de los estafilococos al ataque de estos antibióticos (De Lencastre H *et al.*, 2007). Los ácidos teicoicos o polisacáridos A representan más del 50% del peso seco purificado de las paredes de los estafilococos. Los ácidos teicoicos están constituidos por polímeros de ribitol fosfato entrecruzados con ácido N-acetilglucosamina, son específicos de especie, pueden estar unidos covalentemente al peptidoglicano de la pared celular y ligados a los lípidos de la membrana citoplasmática. Los ácidos teicoicos juegan un papel fisiológico importante en el metabolismo de la pared celular. Su función es mediar la unión de estafilococos a las superficies de las mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina. Tienen además la capacidad de inducir la producción de anticuerpos (Crossley K *et al.*, 2009).

Los ácidos lipoteicóicos están unidos a la membrana plasmática, tienen una estructura similar a los ácidos teicóicos, excepto porque contienen fosfatos de poliglicerol, además de unirse a un diacilglicerol que sirve como anclaje a la membrana plasmática. Los ácidos lipoteicoicos están involucrados en la inflamación y en la liberación de citocinas por los macrófagos y otras moléculas del sistema inmune (De Leo F *et al.*, 2009).

### 3.1.2.4. ENZIMAS

*Staphylococcus aureus* produce un gran número de exoenzimas, proteínas de membranas activas (hemolisinas y leucocidinas), así como toxinas involucradas en las enfermedades. Existen otras proteínas que pueden unir a la capa externa del peptidoglicano mediante enlaces covalentes que favorecen la adhesión del microorganismo como la proteína fijadora al

colágeno, proteína fijadora de fibronectina, el factor de agregación (*clumping factor*) y la coagulasa ligada a la célula que se une al fibrinógeno, facilitando la agregación bacteriana, la proteína A, activa el complemento y bloquea la fracción Fc de las IgG, por lo que previene la eliminación del microorganismo mediada por anticuerpos inhibiendo la opsonización y la fagocitosis (Crossley K. *et al.*, 2009).

✓ **Coagulasa**

Se presenta en dos formas como factor de agregación o coagulasa ligada (*clumping factor*) y la coagulasa libre. La coagulasa ligada es capaz de convertir directamente sin intervención de factores plasmáticos el fibrinógeno en fibrina, produciendo la coagulación del plasma, facilitando el desarrollo de sepsis y abscesos. Existe una fuerte correlación entre la producción de coagulasa y la virulencia de la cepa. Es usada como marcador de virulencia, ya que permite diferenciar *S. aureus* coagulasa positivo. Su importancia en la patogenia radica en la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico localizando la infección y con ello se evita la fagocitosis de la bacteria (Cervantes E. *et al.*, 2014).

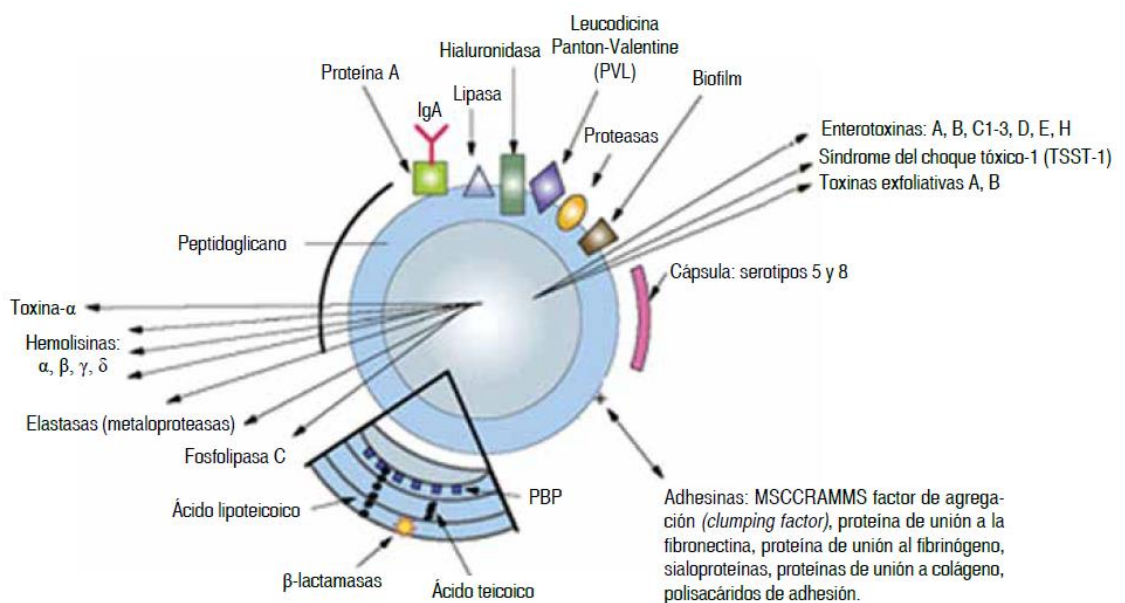
✓ **Catalasa**

Enzima que degrada el peróxido de hidrógeno dándole protección al microorganismo contra la fagocitosis, mientras que la hialuronidasa degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo facilitando la diseminación de la infección (Cervantes E. *et al.*, 2014).

La mayoría de los *Staphylococcus aureus* están recubiertos por una proteína denominada proteína A, la cual se utiliza para pruebas específicas de aglutinación con anticuerpos monoclonales en la identificación de *S. aureus*. La detección de la proteína A, la coagulasa libre o *clumping factor* son fundamentales para la identificación de *S. aureus*. Además sintetizan otras enzimas como lipasas, nucleasas y proteasas, las cuales destruyen los tejidos del hospedero, enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos y estafiloquinasas (Dinges M. *et al.*, 2000). La penicilinasasa actualmente es producida por casi todas las cepas de *S. aureus*. Es una  $\beta$ -lactamasa que inactiva la penicilina hidrolizando el anillo  $\beta$ -lactámico (Cervantes E. *et al.*, 2014).

### 3.1.3. PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA DE *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* es capaz de producir una amplia variedad de toxinas y factores de virulencia. En relación con la emergencia de SARM-AC (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente Asociado a la Comunidad), el más importante es la Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV). Se han estudiado muchos otros factores de virulencia, entre los que destacan las hemolisinas, las modulinas solubles en fenol (PSMs), proteína A, proteínas de unión a la fibronectina (FnBP) y el elemento móvil ACME (*arginine catabolic mobile element*). Recientemente se está dando importancia a la diferente expresión de estos factores en la patogenia de las infecciones por SARM-AC (Barrios M, 2012).



**Figura 1.** Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*. (Tomado de Cervantes E *et al.*, 2014).

#### 3.1.3.1. Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV)

Esta toxina fue descrita por Pantón y Valentine en 1931. Está compuesta por dos proteínas, codificadas por los genes *luk SPV* y *luk FPV*, secretadas de forma independiente conocidas como S y F, que actúan de forma sinérgica. Su unión con las superficies celulares induce la formación de poros en leucocitos y eritrocitos, alterando su permeabilidad, induciendo la lisis osmótica, la activación celular y liberación de mediadores inflamatorios, con el consecuente daño tisular. Esta toxina se encuentra con más frecuencia en las cepas comunitarias, y parece tener un papel importante en la patogénesis de las infecciones de piel y tejidos blandos, osteomielitis y neumonía contribuyendo a la necrosis tisular y formación de abscesos. A pesar de que se comprende el mecanismo molecular de la actividad de la LPV, la relevancia de esta toxina no está clara, principalmente porque existen otros

factores implicados en la virulencia de *S. aureus* (Genestier A *et al.*, 2005; Boyle-Vavra S y Daum R, 2007).

### **3.1.3.2. Hemolisinas**

Las  $\alpha$ -hemolisinas son toxinas producidas por un alto porcentaje de cepas *S. aureus*, con diferente expresión entre las diferentes cepas. Inducen la formación de poros en la membrana celular de gran variedad de células (no en neutrófilos) produciendo la lisis celular y liberación de citocinas inflamatorias. Son principalmente dermonecroticas, y de acuerdo a modelos en ratones, parecen tener también un papel importante en la patogenia de la neumonía necrotizante (Wardenburg JB *et al.*, 2007; Bartlett AH *et al.*, 2008).

### **3.1.3.3. Modulinas Solubles en Fenol (PSMs)**

Las PSMs son péptidos recientemente descritos con actividad leucotóxica *in vitro* e *in vivo*, actividad proinflamatoria y quimiotáctica, que se han propuesto como factores más importantes que la LPV en la lisis de neutrófilos (Diep BA y Otto M, 2008). Las cepas de SARM-AH (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente Asociado a Hospitales) no producen PSMs o lo hacen en poca cantidad, sin embargo, SARM-AC sintetiza gran cantidad de las mismas. La diferente expresión de estas proteínas puede ser una de las causas que explique la mayor actividad lítica de SARM-AC. Se ha demostrado en modelos animales la importancia de las PSMs en la producción de abscesos y bacteriemias por SARM-AC (Wang R *et al.*, 2007).

### **3.1.3.4. Proteína A**

Esta proteína impide la opsonización y fagocitosis de *S. aureus*, tiene un importante papel en inflamación pulmonar, y parece aumentar la actividad de las hemolisinas, aunque su importancia como factor de virulencia no está clara (Labandeira- Rey M *et al.*, 2007).

### **3.1.3.5. Proteínas de unión a Fibronectina (FnBP)**

Estas proteínas aumentan la capacidad de adhesión e invasión de *S. aureus*. Se han estudiado en el contexto de osteomielitis, y se han relacionado con mayor gravedad de estas infecciones (Bocchini CE. *et al.*, 2006).

### **3.1.3.6. ACME (Arginine Catabolic Mobile Element)**

ACME contiene un grupo de genes que codifican la vía de desaminación de la arginina y al OPP-3, parte del sistema de transportadores celulares. Aunque existe controversia en relación al papel de ACME en la virulencia de SARM-AC parece facilitar la colonización y supervivencia de esta bacteria en la piel, y por tanto su diseminación (Montgomery CP. *et al.*, 2009).

### **3.1.3.7. QUORUM-SENSING (QS)**

Las bacterias regulan muchos procesos en respuesta a la señalización célula-célula. Estos procesos incluyen factores de virulencia, producción de antibióticos y formación de biopelículas (biofilm). A menudo las bacterias utilizan la señalización célula-célula para regular la densidad de la población conocida como percepción de *quórum*. Los sistemas de QS en estafilococos tienen enorme impacto en el éxito del patógeno durante la infección, controlando la fisiología y los factores de virulencia. En estafilococos, el sistema QS es llamado *agr* (gene accesorio regulador). Este sobregula la expresión de toxinas y la degradación de exoenzimas como las proteasas. Tiene una baja regulación de varias proteínas de adhesión durante la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria. El gen regulador *agr* utiliza un péptido feromona (péptido autoinductor AIP) cuando la concentración de inicio es alcanzada a cierta densidad celular uniéndose a la membrana donde se localiza una cinasa de histidina (AgrC), la cual activa una proteína reguladora AgrA involucrada en la transcripción del operón Agr (Kuruda M. *et al.*, 2001).

### **3.1.3.8. BIOFILM**

Algunas de las cepas de *S. aureus* producen una capa polisacárida extracelular denominada *biofilm* o *biopelícula*. Ésta es una red extracelular que ayuda a la comunidad bacteriana a adherirse a diferentes superficies. La producción de la biopelícula se describió por primera vez en *Staphylococcus coagulasa* negativo, y está implicada en la colonización y persistencia de la bacteria en catéteres, prótesis y sondas. La composición polisacárida de esta biopelícula es homóloga a la producida por las cepas de *S. epidermidis*, la cual sirve para adherirse y colonizar nuevos sitios, además de protegerlas de la fagocitosis, así como de los antibióticos. La biopelícula podría prolongar la infección y colonización, así como la diseminación de diferentes sitios del cuerpo humano, presente en cepas de hospitales y comunidad (Cervantes E *et al.*, 2014).

### **3.1.4. *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE (SARM)**

*Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista responsable de una gran cantidad de infecciones tanto en humanos como en animales. Los seres humanos son un reservorio natural de este microorganismo y, aunque la colonización asintomática es más común que la infección, este microorganismo puede encontrarse, causando desde infecciones menores en la piel hasta infecciones en heridas quirúrgicas, neumonía y otro tipo de

infecciones que pueden comprometer la vida del paciente. El SAMR fue aislado por primera vez en un cultivo en 1961, 2 años después de la introducción de la meticilina como tratamiento en la práctica clínica. Esto inicialmente ocurría en hospitales del nivel terciario, pero el SAMR se encuentra cada vez con más frecuencia en la comunidad. La primera infección de la comunidad por SAMR, fue reportada en 1980 en Estados Unidos, existiendo ciudades de ese país en que más del 50% de las infecciones estafilocócicas de la comunidad son producidas por SAMR (Sánchez M *et al.*, 2013).

La resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* significa que posee un mecanismo que le convierte en resistente clínicamente a todos los antibióticos betalactámicos, incluyendo la meticilina y antibióticos similares, como la cloxacilina; pero también a los inhibidores de las betalactamasas, como el ácido clavulánico y a todas las cefalosporinas (incluyendo las más modernas como la cefepima) a los monobactámico (aztreonam) y a los carbapenemes (imipenem y meropenem). Además, con mucha frecuencia, los SARM suelen ser resistentes a otros antibióticos no betalactámicos (sobre todo a eritromicina y fluoroquinolonas como ciprofloxacino o levofloxacino) y con cierta frecuencia también pueden ser resistentes a los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y ampicacina) (Alkiza M. *et al.*, 2004).

#### **3.1.4.1. GEN *mecA***

El gen *mecA*, responsable de la resistencia a la meticilina en *S. aureus*, se encuentra integrado al cromosoma bacteriano, pudiendo ser detectado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de expresión de este gen es una proteína de unión a la penicilina de 78 kDa, con baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos, llamadas PBP2' o PBP2a. Este gen se encuentra dentro de un elemento cromosomal móvil heterogéneo conocido como "*Staphylococcal cassette chromosome mec*" (SSC*mec*). Los aislamientos que poseen este elemento genético presentan una disminución en la afinidad a meticilina, lo cual genera la resistencia bacteriana, por lo cual han sido utilizados en diversos estudios para caracterizar la resistencia a B-lactámicos (Sánchez M *et al.*, 2013). La expresión fenotípica de la resistencia a la meticilina es compleja, y varía según las condiciones del cultivo. Se diferencian dos tipos de cepas, unas con resistencia homogénea, o de alto nivel, y otras con resistencia heterogénea, en las que sólo una población minoritaria expresaría dicha cualidad, mientras que el resto tendrían bajos niveles de resistencia a meticilina. Se han descrito otras modalidades de resistencia en las que no se demuestra la presencia del gen *mecA* ni de la PBP2a, como la denominada —borderline II, con niveles de resistencia a meticilina bajos por hiperproducción de lactamasas, y en cuyo mecanismo,

están implicados otros genes. Estas cepas pueden responder al tratamiento con penicilinas semisintéticas (Barrios M, 2012).

#### **3.1.4.2. Cassette cromosómico estafilocócico (SCCmec)**

El SCCmec es un elemento genético móvil que contiene el complejo *mec*, formado por el gen *mecA*, los genes que regulan su transcripción (*mecR*) y secuencias de inserción (IS431*mec*). Además, SCCmec contiene genes que codifican las recombinasas responsables de su integración y excisión (*ccr*) (Katayama Y. y Ito T, 2000). Existen diferentes tipos de SCCmec, la mayoría de los aislados SARM asociados a la comunidad poseen el SCCmec tipo IV, y de forma menos frecuente el tipo V. El tipo IV es pequeño, fácilmente transmisible, y no contiene genes de multirresistencia. Estas características podrían tener un papel en la emergencia, permiten mayor rapidez de replicación y supervivencia de SARM-AC. El SCCmec tipo V es de tamaño similar, con pequeñas diferencias en su estructura y plasticidad. Es poco frecuente en aislados de EEUU y Europa. Las cepas de SARM-AH están asociadas a los tipos I-III, grandes, con poca movilidad, y contienen otros genes de multirresistencia antibiótica (Deresinski S., 2005).

#### **3.1.5. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE.**

##### **3.1.5.1. VANCOMICINA**

Es un glicopéptido con acción frente a la mayoría de bacterias grampositivas (aerobias y anaerobias). Es eficaz en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias resistentes a los antibióticos beta-lactámicos. Vancomicina es el antibiótico de elección en el tratamiento de las infecciones graves por: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (SAMR) entre otras bacterias resistentes. El uso de la Vancomicina se sugiere como terapia de elección en el caso de bacteriemias, tanto complicada como no complicada. Es una de las drogas recomendadas en pacientes con neumonía por SAMR. Sin embargo, vancomicina es un antibiótico que tiene algunas limitaciones, como por ejemplo, pobre penetración tisular e intracelular, falta de actividad contra microorganismos que crecen en el interior del *biofilm*, lento efecto bactericida, falta de interferencia con la producción de toxinas y escasa actividad contra aislamientos heterorresistentes o con resistencia intermedia (Deresinski S, 2007). La vancomicina podría ser adecuada para infecciones por aislamientos de SAMR con CIM baja (inferior a 1 µg/mL) (Chen SY *et al.*, 2012). Los pocos resultados obtenidos con Vancomicina en el tratamiento de infecciones causadas por SAMR: un 43 % de bacteriemia persistente en endocarditis (Fowler *et al.*, 2005), un 46 % de fallo en osteomielitis (Dombrowski JC. *et al.*,

2008), y 54 % de mala respuesta en neumonía nosocomial (Wunderink R. *et al.*, 2003).

#### **3.1.5.2. GENTAMICINA**

Según algunos estudios *in vitro* se ha demostrado sinergia entre gentamicina y vancomicina contra aislamientos de SAMR (De Vedia L *et al.*, 2014). En modelos animales de endocarditis, la adición de gentamicina acortó la duración de la bacteriemia (Tsuji BT *et al.*, 2005). Sin embargo, ningún estudio ha comparado la vancomicina sola *versus* vancomicina más gentamicina en pacientes con infecciones graves por SAMR (De Vedia L *et al.*, 2014).

#### **3.1.5.3. CIPROFLAXINA**

Los inhibidores de fluoroquinolona de ADN girasa por ejemplo, ciprofloxacina son potentes agentes antibacterianos que han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones bacterianas difíciles, incluyendo aquellas que implican cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. La resistencia a las fluoroquinolonas es ahora muy común, la aparición de la resistencia a las fluoroquinolonas es especialmente preocupante dado que relativamente pocos agentes antimicrobianos son eficaces contra las infecciones estafilocócicas resistentes a la meticilina. Se ha revelado que la resistencia a la ciproflaxina en *S. aureus* se asocia con mutaciones similares encontradas en *E. coli*, ya que la región N- terminal de la subunidad A girasa de *S. aureus* es altamente homóloga a la de *E. coli* (Sreedharan S. *et al.*, 1990).

#### **3.1.5.4. ERITROMICINA**

Un grupo importante de antimicrobianos empleados para el tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus aureus* es el denominado complejo MLSB que incluye macrólidos (eritromicina). El mecanismo de acción de este complejo MLSB, consiste en la inhibición de la síntesis proteica mediante una metilasa ribosomal que se une al sitio P en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. La elevada capacidad del microorganismo de generar resistencia a los antimicrobianos se ve reflejada en la resistencia al grupo MLSB, la cual presenta dos variables, la resistencia constitutiva (MLSBc) y la inducible (MLSBi)<sup>14</sup>: ambas están relacionadas con la expresión de los genes *erm* (Erythromycin Ribosome Methylation) (Tamariz J *et al.*, 2009).

#### **3.1.6. ACEITES ESENCIALES**

Las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de sus actividades metabólicas enfocado a sus sistemas de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Esa gran diversidad de mecanismos bioquímicos que intervienen en el metabolismo secundario de



las plantas superiores ha permitido la producción de una amplia variedad de principios activos (García C. *et al.*, 2010)

El término aceite esencial (AE) es utilizado para referirse a sustancias líquidas, volátiles, de carácter lipofílico y con fuertes propiedades aromáticas. La mayoría de los AE son extractos de plantas aromáticas localizadas en zonas templadas y cálidas como áreas mediterráneas y tropicales. Son líquidos, volátiles, cristalinos, raramente coloreados, solubles en disolventes orgánicos y generalmente con menor densidad que el agua y estas sustancias son sintetizadas por las plantas como metabolitos secundarios y pueden ser extraídas mediante métodos físicos como la destilación a vapor o hidrodestilación. En la actualidad se conocen alrededor de 3000 AE, 300 de los cuales son comercialmente importantes para la industria farmacéutica, sanitaria, cosmética y alimentaria. Los AE y/o muchos de sus componentes son ampliamente usados en perfumería, cosmética, en industria farmacéutica, odontología, agricultura, como aditivos en la industria alimentaria y como remedios naturales. Por ejemplo, d-limoneno, geranyl acetato o d-carvona, se utilizan en perfumes, cremas, jabones, como aroma en productos químicos de limpieza y como aditivos en alimentación. Además, el uso de mezclas de AE está siendo ampliado en la actualidad con fines terapéuticos y en aromaterapia (Sánchez P., 2011).

Químicamente, son metabolitos secundarios derivados de terpenos (mono y sesquiterpenos) y sus compuestos oxigenados incluyendo carbohidratos, alcoholes, éter, aldehídos y cetona; por tanto la presencia de aceites esenciales y su composición son responsables de las fragancias y de las propiedades biológicas de las plantas aromáticas y medicinales (Kalemba & Kunicka, 2003; Olivero J *et al.*, 2009; García C *et al.*, 2010).

Aproximadamente 17.500 especies de plantas con propiedades aromáticas ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas, principalmente *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Verbenaceae*, *Myrtaceae*, *Pinaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Umbeliferae*, entre otras; de las cuales se reportan altos contenidos de aceites esenciales (Peris y Asencio, 2002). Varios aceites producen efectos: farmacológicos, antiinflamatorios, antioxidantes y propiedades anticancerígenas. Otros son biocidas contra una amplia gama de organismos tales como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas (Kalemba & Kunicka, 2003; Thembo K *et al.*, 2010).

### **3.1.6.1. ACEITES ESENCIALES EN COLOMBIA**

Colombia posee más de 45.000 especies vegetales diferentes en su territorio, Un programa actual para el desarrollo de la agroindustria en Colombia explora maneras sostenibles de obtener productos valiosos de esta biodiversidad.

Esto incluye estudios de plantas aromáticas nativas, entre las que destacan las del género *Lippia* (familia *Verbenaceae*) (Stashenko E *et al.*, 2008). Se ha demostrado que los aceites y extractos de diversas especies de *Lippia* tienen actividades antimaláricas, sedantes, hipotensoras y antiinflamatorias (Pascual M *et al.*, 2001).

Las actividades biológicas de los aceites esenciales dependen de su composición química, que, curiosamente, también es diversa en muchas especies. Los quimiotipos, otra faceta de la biodiversidad, son plantas morfológicamente similares que poseen una composición de metabolitos secundarios diferente. Sin embargo, existen otras causas de diferencias en la composición del aceite esencial para plantas de la misma especie. Su composición varía durante las etapas de desarrollo de la planta o debido a variaciones en las condiciones de cultivo o como resultado de modificaciones estructurales o fisiológicas de la planta, causadas por factores ambientales específicos (plasticidad fenotípica) (Stashenko E., *et al.*, 2010).

En Colombia, la planta *Lippia origanoides* es conocida como se Oregano del Monte (orégano de montaña), y se encuentra en altitudes entre 400 y 2500m en varios estados andinos y en la península norte de Guajira. Tradicionalmente, *Lippia origanoides* se utiliza en las infusiones de sus hojas y flores y se emplea en la medicina popular para el tratamiento del dolor de estómago, la indigestión, la náusea, el flatus y como un antiséptico general para la boca, la garganta y las heridas (Pascual M *et al.*, 2001). Se ha informado sobre la existencia de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* que crecen en proximidad, en estado silvestre, en el cañón del río Chicamocha en Colombia (Stashenko E *et al.*, 2008).

### **3.1.6.2. *Lippia alba***

La planta *Lippia alba* (familia *Verbenaceae*), un subarbusto muy aromático, está ampliamente distribuida y crece espontáneamente en America Central y del Sur. También es conocida como *Lippia geniculata* HBK o *Lantana alba* Mill y en Colombia, por sus nombres populares “Pronto alivio” (Antioquia), “Curatodo” y “Orégano de cerro”. Esta especie se ha empleado como estomacal y antiespasmódico en infusión teiforme; también se ha usado como sedante, desinfectante, diaforética y emenagoga. La planta se caracteriza por su intenso y penetrante olor y contiene de 0,1 a 1,2% del aceite volátil. La composición química del aceite esencial de *L. alba* depende sensiblemente del origen geográfico de la planta, las condiciones de su cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción, y de algunos otros factores geobotánicos (Senatore & Rigano, 2001).

### **3.1.6.3 *Lippia origanoides***

Es un arbusto silvestre que se distribuye en algunos países de América Central hasta el norte de Argentina, con áreas de alta diversidad especialmente en la región amazónica del centro y el este de Brasil, Colombia y Venezuela (O`Leary N *et al.*, 2011). En Colombia *L. origanoides* se conoce comúnmente como “orégano de monte” y “orégano silvestre”, encontrándose en ambientes semiáridos de los departamentos de la Guajira, Magdalena, Cauca, Cundinamarca, Santander, Norte de Santander (Vicuña G *et al.*, 2009) y Nariño (Arango O *et al.*, 2012; Bueno J *et al.*, 2009).

*Lippia origanoides* presenta tallos delgados entre 1 a 3 metros de longitud, perenne, posee hojas ovaladas muy aromáticas, presencia de pubescencia estrigosa o hispida (no grisáceo, seríceo), inflorescencias sin brácteas apicales frondosas en racimo, axilares y blancas. Esta planta presenta diferentes usos etnobotánicos utilizada tradicionalmente como condimento culinario, remedio para desordenes gastrointestinales, antiséptico, tratamiento para problemas estomacales y tratamiento para enfermedades respiratorias; especialmente por los metabolitos secundarios que genera esta especie (O`Leary N *et al.*, 2011).

### **3.1.6.4. *Eucalyptus globulus labill***

Es una especie originaria de Australia y Tasmania, cuenta con más de 500 especies encontrándose distribuida en toda la cuenca Mediterránea, Francia, España, Italia, Portugal, Marruecos, Sudáfrica y en grandes zonas de Asia. En América se cultiva en climas tropicales, subtropicales y templados, desde California hasta Argentina. Es un árbol de 70 a 90 m de altura, hojas con capa cerosa blanca. Se caracteriza por un importante polimorfismo, las plantas jóvenes son opuestas, oblongas de 7 a 15 cm de largo; cuando son adultas son alternas. Inflorescencia axilar, solitaria, botones sésiles, flores de 4 cm de ancho, masa proveniente de estambres, frutos cónico de 2 a 3 cm de ancho y numerosas semillas. Tronco largo generalmente liso (Chávez A y Rodríguez I., 2014).

## 4. MARCO LEGAL

### 4.1. DECRETO 3553 DE 2004

La norma se refieren a las farmacopeas y textos de referencia oficialmente aceptados, clasificación de los productos fitoterapéuticos, expedición del Instrumento de Verificación de Cumplimiento de Condiciones Sanitarias por parte del Ministerio de la Protección Social, un plan gradual de cumplimiento que permita la implementación, desarrollo y aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura, BPM, acciones del Invima por incumplimiento de los fabricantes sobre BPM, controles de calidad de los productos fitoterapéuticos, pruebas de eficacia, expendio de productos fitoterapéuticos, autorización del envase, requisitos para la expedición del registro sanitario de los productos fitoterapéuticos de uso tradicional importados y autoridad sanitaria competente (MSPS, 2004).

### 4.2. DECRETO NÚMERO 677 DE 1995 (abril 26)

Por el cual se reglamenta parcialmente el Régimen de Registros y Licencias, el Control de Calidad, así como el Régimen de Vigilancia Sanitaria de Medicamentos, Cosméticos, Preparaciones Farmacéuticas a base de Recursos Naturales, Productos de Aseo, Higiene y Limpieza y otros productos de uso doméstico y se dictan otras disposiciones sobre la materia (MSPS,1995).

**Artículo 1º.** **Ámbito de aplicación.** Las disposiciones contenidas en el presente Decreto regulan parcialmente el régimen de registros y licencias, control de calidad y vigilancia sanitaria de los medicamentos cosméticos, preparaciones farmacéuticas a base de recursos naturales, productos de aseo, higiene y limpieza y otros productos de uso doméstico en lo referente a la producción, procesamiento, envase, expendio, importación, exportación y comercialización.

**Parágrafo.** Las preparaciones farmacéuticas a que hace referencia el presente artículo, son aquellas producidas a base de recursos naturales que tradicionalmente han sido utilizados en forma empírica con fines terapéuticos y a través de este uso y por la sustentación bibliográfica, se consideran eficaces y seguros.

#### **4.3. RESOLUCIÓN 5107 DE 2005.**

Por la cual se adopta el instrumento de verificación de cumplimiento de condiciones sanitarias para los laboratorios que elaboren productos fitoterapéuticos (MSPS, 2005)

#### **4.4. RESOLUCIÓN 2674 DE 2013 (Julio 22)**

El artículo 126 del Decreto-ley 019 de 2012, establece que los alimentos que se fabriquen, envasen o importen para su comercialización en el territorio nacional, requerirán de notificación sanitaria, permiso sanitario o registro sanitario, según el riesgo de estos productos en salud pública, de conformidad con la reglamentación que expida el Ministerio de Salud y Protección Social.

Que conforme con lo anterior, se hace necesario establecer los requisitos y condiciones bajo las cuales el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima), como autoridad sanitaria del orden nacional, deberá expedir los registros, permisos o notificaciones sanitarias. Notificada a la Organización Mundial del Comercio (OMC), mediante los documentos identificados con las firmas G/SPS/N/COL/249 y G/TBT/N/COL/191 del 19 y 20 de marzo de 2013 (MSPS, 2013).

#### **4.5. PROTOCOLO DE CARTAGENA**

Sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica: Adoptado el 29 de enero de 2000 como un acuerdo suplementario del convenio sobre la diversidad biológica y entró en vigor el 11 de septiembre de 2003. De conformidad con el principio de precaución, el protocolo de Cartagena tiene por objeto garantizar que el movimiento transfronterizo de organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna se haga en condiciones seguras para la conservación de la biodiversidad y la salud humana (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica 2000).

## 5. ANTECEDENTES

Varios estudios han reportado la prevalencia de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) indica que más de 1,4 millones de personas en el mundo contraen infecciones en el hospital. En los países desarrollados, la prevalencia de pacientes hospitalizados que adquieren, al menos, una infección asociada a la atención en salud se encuentra entre 3,5 y 12 %, mientras que en los países en desarrollo varía entre 5,7 y 19,1 %, alcanzando en algunos de estos últimos países una proporción incluso mayor a 25 % de pacientes afectados (Villalobos A *et al.*, 2014).

De acuerdo a un informe de 2015 sobre el estado de los antibióticos en el mundo, los patrones de resistencia difieren según el país y reflejan el uso de antibióticos y patrones de enfermedades. En los últimos años Estados Unidos, Europa, Canadá y Sudáfrica han reportado una disminución de las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), mientras que en África subsahariana, Australia, América Latina (90%) y la India (47%) se ha reportado el aumento en las infecciones por MRSA (Chaudhary A, 2016).

En Paraguay Abente y colaboradores, realizaron un estudio observacional descriptivo para determinar la frecuencia de SAMR y del factor de virulencia leucocidina de Panton Valentine (PVL-Panton Valentine leukocidin), así como el perfil de resistencia antimicrobiana acompañante a la meticilina resistencia en *S. aureus* aislados de infecciones de piel y partes blandas de pacientes ambulatorios, el gen *mecA* y *luk-PV* fueron detectados por la técnica de PCR. De los 70 aislados de *S. aureus* estudiados, el 54,3% (38/70) fue SAMR tanto por método fenotípico como molecular (Abente S *et al.*, 2016).

Fernández y colaboradores identificaron 79 cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente en pacientes ingresados a un hospital, realizaron pruebas de susceptibilidad por el método de Kirby-Bauer, utilizando discos de cefoxitina para detectar resistencia a la meticilina. Encontraron que un 75 % procedía de las muestras de los servicios quirúrgicos, y el 50.6 % fue resistente a meticilina (Fernández A *et al.*, 2015).

En Argentina *Staphylococcus aureus* meticilina resistente fue aislado de abscesos de mama en una maternidad pública encontrando que *Staphylococcus aureus* (SA) fue el responsable de 82,3 a 95,0% de los abscesos según los años; la resistencia a oxacilina de las cepas de SA superó el 60%. Las cepas aisladas de SA meticilino resistentes (SAMR) fueron sensibles a eritromicina clindamicina, gentamicina, rifampicina, ciprofloxacina y trimetoprima-sulfametoxazol (Boccaccio C *et al.*, 2014).

Según Carmona y colaboradores la concentración mínima inhibitoria (CMI) a vancomicina de *S. aureus* ha ido aumentando, apareciendo cepas con susceptibilidad intermedia (CMI 4-8 mg/L) y heteroresistencia, asociadas con un mayor riesgo de fracaso terapéutico al emplear vancomicina (Carmona F. *et al.*, 2016).

Un estudio multicéntrico de prevalencia de estafilococos realizado en Colombia en el año 2014, se demostró la prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en un 27,6%, indicando que la resistencia a la meticilina se ha estabilizado en la última década. Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) también presentaron resistencia a ciprofloxacino y a eritromicina, tanto las cepas sensibles como resistentes a la meticilina son uniformemente sensibles a cotrimoxazol, rifampicina, vancomicina, linezolid y daptomicina. En los últimos años se ha presentado un cambio epidemiológico de las infecciones por *Staphylococcus aureus*, ya que ha pasado de ser un microorganismo principalmente nosocomial, a aumentar su prevalencia en la comunidad, debido a la diseminación de clones hospitalarios en la comunidad (SARM relacionado con la atención sanitaria), pero también a la diseminación de diferentes clones comunitarios y de clones asociados al ganado (Cercenado E *et al.*, 2015).

En un estudio para determinar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente adquirido en la comunidad CA- SARM en una Institución Hospitalaria en Cartagena, Colombia analizaron los datos de 115 pacientes mayores de 18 años La prevalencia de infecciones por CA-MRSA fue del 62,61%. El 100% de CA-MRSA fue multirresistente, donde existían cepas resistentes hasta a ocho clases de antibióticos (Lujan *et al.*, 2013). En una población de escolares identificaron 36 cepas de *S. aureus*; 25 %, oxacilino-resistentes; 66,7 %, oxacilino-sensibles y 8,3 %, con sensibilidad intermedia. El 67 % de cepas SARM aisladas fueron sensibles a todos los antibióticos probados. Una cepa (SARM-Ant4) presentó resistencia a tres antibióticos con mecanismos de acción diferentes (Castro R *et al.*, 2010).

Debido a la alta prevalencia de este patógeno se requieren métodos de control. En este trabajo se exploró la actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre SAMR. La efectividad antimicrobiana de los aceites ha sido reportada en varios estudios. Medeiros *et al* 2014, en su estudio titulado "Effect of *Lippia organoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*", lograron modificar la actividad de un fármaco con *Lippia organoides* contra una cepa de SARM por el método de microdilución. Pudieron verificar un efecto potenciador entre este aceite y los aminoglucósidos probados, también

lograron reducir la CMI a 248 y 78  $\mu\text{m}/\text{ml}$  al ser asociado el aceite esencial con los aminoglucósidos lo cual puede utilizarse como quimioterapia antibiótica contra las enfermedades causadas por este microorganismo (Medeiros *et al* 2014).

Marques y colaboradores en el 2017 en su estudio: “Visible light enhances the antimicrobial effect of some essential oils”, evaluó la luz azul y roja para la mejora de la actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales sobre cepas estándar están iluminadas *in vitro*. Utilizaron cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* la cual se irradiaron con luz visible monocromática de diodos emisores de luz en presencia de 5% y 0,5% de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), clavo (*Eugenia caryophyllata*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Los niveles microbianos fueron medidos por conteo de placas en los medios de cultivo. Este estudio demostró que la luz azul principalmente realza la actividad antimicrobiana innata de los aceites esenciales, especialmente los fenoles, y podría ofrecer una manera muy eficiente y natural para combatir los microorganismos en varias industrias y aplicaciones médicas (infecciones cutáneas y orales, textiles médicas, productos alimenticios y superficies de frutas (Marques C. *et al.*, 2017)



## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. CARACTERIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE

La cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente utilizada en este trabajo fue donada por la profesora Fanny Herrera. Esta cepa fue aislada a partir de queso doble crema fresco artesanal, fue caracterizada fenotípicamente, genotípicamente mediante PCR, en donde se analizó la presencia de los genes: *mecA*, *coa*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* y *tst*, que codifican, respectivamente: resistencia a la meticilina, coagulasa, enterotoxinas A a la E y la toxina del síndrome del shock tóxico. (Herrera F *et al.*, 2015).

#### 6.1.1. CEPAS BACTERIANAS CONTROL

Se adquirieron para este estudio dos cepas bacterianas control de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* provenientes del Cepario de la Universidad de Pamplona.

#### 6.1.2. PREPARACIÓN DE CULTIVOS

Se inoculó cada uno de los microorganismos en Caldo Tripticasa de Soya y se incubaron a 37 °C por 18 h a 150 rpm. A partir de estos cultivos se prepararon los cultivos de trabajo, que fueron ajustados a una concentración de Mcfarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Esto se realizó con el fin de obtener cultivos jóvenes de cada uno de los microorganismos.

### 6.2. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.

Los aceites esenciales fueron obtenidos de plantas, estos fueron provistos por la empresa **PROMITEC** “*Soluciones Biotecnológicas Naturales que brindan bienestar y salud*”, ubicada en la ciudad de Bucaramanga, a la cual el laboratorio NANOSOST le ofrece asesorías técnico-científicas. En la Tabla 1 se observan las plantas utilizadas para la obtención de cada uno de los aceites.

| Nombre vulgar | Nombre científico          | Componentes principales     | Tipo de Actividad  | USOS/EFFECTOS   |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|--|---|
| Orégano       | <i>Lippia organoides</i>   | Timol y carvacrol           | General  | Condimentos, sedantes y tónicas nervioso, contra resfrió toses y asma, asimismo tiene efecto diurético, desinfectante.  |
| Prontoalivio  | <i>Lippia alba</i>         | Piperitona Geranial, neral  | General  | Planta ornamental. Utilizado como sedante, para la diabetes, diaforética, emenagoga, trastornos digestivos y antiespasmódico.   |
| Eucalipto     | <i>Eucalyptus globulus</i> | Cineol, Taninos Polifenoles | Bacterias, virus, <i>E. coli</i> , <i>Sporothrix spp</i> | Planta ornamental por su follaje aromático y hermosas flores, usadas para condimentar las comidas. Medicinalmente tiene propiedades somáticas, sedativas, antidepresivas y analgésicas. |

**Tabla 1.** Características de los Aceites Esenciales obtenidos de plantas.

### 6.2.1. EVALUACIÓN DE LOS AGENTES INHIBITORIOS

Se evaluaron los efectos inhibitorios de los aceites esenciales (*Lippia Organoides*, *Lippia alba* y *Eucalyptus globulus labill*) y los antibióticos (Ciprofalxina, Gentamicina y Eritromicina) mediante ensayos con sensidiscos.

### 6.2.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS

Se empleó el método reportado por Cruz A *et al.*, (2010) con algunas modificaciones. Se prepararon placas de Petri (60 x 15 mm) con agar tripticasa de soja (TSA) y se realizó una siembra masiva con 100µL de *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente a una concentración de Mcfarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) por triplicado. El mismo procedimiento se realizó con, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Posteriormente se colocó un disco sensitivo en el centro de la placa y se le depositó 10µL de cada uno de los AE (*Lippia organoides*, *Lippia alba* y *Eucalyptus globulus*) a una concentración de 100%. Se incubó a 37°C y se le realizó seguimiento de la inhibición del crecimiento alrededor del sensidisco durante 24 a 96 horas.

### 6.2.3. DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD Y/O RESISTENCIA DE SARM FRENTE A LOS ACEITES ESENCIALES

Se determinó la susceptibilidad y/o resistencia empleando los valores reportados por Ponce A *et al.*, (2003). La resistencia o susceptibilidad fue expresada según la siguiente tabla:

| SUSCEPTIBILIDAD (s)/RESISTENCIA ® | DIÁMETRO HALO DE INHIBICIÓN |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Resistente                        | <8 mm                       |
| Sensible (+)                      | 9-14 mm                     |
| Sensible (++)                     | 15-19 mm                    |
| Sensible (+++)                    | 20 mm                       |

**Tabla 2.** Rangos de resistencia o susceptibilidad (Fuente: Ponce A *et al.*, 2003)

### 6.2.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIOTICOS

Se empleó el método reportado por Cruz A *et al.*, (2010) con algunas modificaciones. Se prepararon placas de Petri (60 x 15 mm) con agar tripticasa de soja (TSA) y se realizó una siembra masiva con 100µL de *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente a una concentración de Mcfarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) por triplicado. El mismo procedimiento se realizó con, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Se colocó un disco sensitivo de antibióticos (Gentamicina 10 µg, Eritromicina 15 µg y Ciproflaxina 5 µg) en el centro de la placa. Se incubó a 37°C y se le realizó seguimiento de la inhibición del crecimiento alrededor del sensidisco durante 24 a 96 horas.

### 6.2.5. ESTANDARES DE INTERPRETACION DE LA RESISTENCIA O SUSCEPTIBILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS FRENTE A ANTIBIOTICOS

**Tabla 3.** Estándares de diámetro de halo establecidos para *Staphylococcus aureus* frente a diferentes grupos de antibióticos según la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2016). Las zonas de diámetro en milímetros (mm) son determinadas por los parámetros: Susceptible (S), Intermedio (I) y Resistente (R).

| Grupo            | Agente Antimicrobiano | Contenido del disco | Zona de Diámetro (mm) |       |     |
|------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-------|-----|
|                  |                       |                     | S                     | I     | R   |
| Aminoglucosidos  | Gentamicina           | 10 µg               | ≥15                   | 13-14 | ≤12 |
| Macrolidos       | Eritromicina          | 15 µg               | ≥23                   | 14-22 | ≤13 |
| Fluoroquinolonas | Ciproflaxina          | 5 µg                | ≥21                   | 16-20 | ≤15 |

**Tabla 4.** Estándares de diámetro de halo establecidos para *Staphylococcus aureus* frente a diferentes grupos de antibióticos según la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2016). Las zonas de diámetro en milímetros (mm) son determinadas por los parámetros: Susceptible (S), Intermedio (I) y Resistente (R).

| Grupo            | Agente Antimicrobiano | Contenido del disco | Zona de Diámetro (mm) |         |     |
|------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------|-----|
|                  |                       |                     | S                     | I       | R   |
| Aminoglucosidos  | Gentamicina           | 10 µg               | ≥15                   | 13 -14  | ≤12 |
| Macrolidos       | Eritromicina          | 15 µg               | ≥13                   | -       | ≤12 |
| Fluoroquinolonas | Ciproflaxina          | 5 µg                | ≥21                   | 16 - 20 | ≤15 |

### 6.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se realizó un ensayo preliminar de cada uno de los aceites esenciales *Lippia organoides*, *Lippia alba* y *Eucalyptus globulus* con concentración de 5%, 2,5% y 1% frente a cada bacteria, *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, esto con el fin de determinar rangos de concentraciones de inhibición aproximado

#### 6.3.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA DE ACEITES ESENCIALES

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de los aceites esenciales: *Lippia organoides*, *Lippia alba* y *Eucalyptus globulus* fue determinada por el método de microdilución en Caldo TS (Trypticasa de Soya) propuesto por (Albuquerque Q et al., 2006; Abate G et al., 1998) con algunas modificaciones. A cada pozo se le adicionó 25 µl de la suspensión bacteriana (*Staphylococcus aureus* Meticilina resistente, *Staphylococcus aureus* y

*Escherichia coli*) a una concentración McFarland 0,5 más 25µl de aceites esenciales con diferentes concentraciones (ver **Tabla 5**). Además se adicionó 50µl de caldo TSB y 10µl de CTT (Cloruro Trifenil Tetrazolio). El volumen final de cada pozo fue de 110µl. Los controles positivos fueron preparados con la suspensión bacteriana, el antimicrobiano y el colorante de contraste. Para el caso del control negativo se adiciono Caldo Tripticasa de Soya más colorante.

| Concentraciones AE en cada pozo (%) | P1  | P2  | P3  | P4   | P5   | P6   | P7   | P8   | P9    | P10  | P11  | P12 |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|-------|------|------|-----|
| <i>Lippia origanoides</i>           | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,08 | 0,06 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,008 | -    | -    | -   |
| <i>Lippia alba</i>                  | 2,2 | 2,0 | 1,0 | 0,8  | 0,6  | 0,4  | 0,2  | 0,08 | 0,06  | 0,04 | 0,02 | -   |
| <i>Eucalyptus globulus</i>          | 4,6 | 4,2 | 3,8 | 3,6  | 3,4  | 2,8  | 2,6  | 2,4  | 2,2   | 2,0  | 0,8  | 0,6 |

**Tabla 5.** Representación esquemática del ensayo de pozos usando diferentes concentraciones de los aceites esenciales (**P:** Pozo).

Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. La CIM se determinó como la concentración más baja a la cual no se observó viabilidad celular después de 24 h de incubación.

**Nota:** La viabilidad celular se determinó por cambio de coloración en el pozo de Amarillo a rojo debido a la reacción del Cloruro Trifenil Tetrazolio (CTT), evidenciando la actividad metabólica de células viables (Abate et al., 1998). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

### 6.3.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MÍNIMA BACTERICIDA DE ACEITES ESENCIALES

Para determinar la CMB se empleó la metodología de Horna Q., *et al* (2005) con algunas modificaciones. Se extrajo 100 µL de los pozos en los cuales no se observó crecimiento visible de la bacteria (inhibición de crecimiento). Esta suspensión se inoculó en placas Petri con Agar TS debidamente rotuladas con la concentración correspondiente. Se incubó durante 24 horas a 37 °C. La concentración mínima bactericida fue tomada como aquella capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano o eliminar al 99,9% de bacterias, comparándolo con el control positivo.

#### **6.4. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE *Staphylococcus aureus* *Meticilina Resistente***

Se empleó el microscopio de barrido electrónico marca Zeiss para obtener imágenes de ***Staphylococcus aureus Meticilina Resistente*** antes y después de haber sido tratado con los aceites esenciales. La muestra fue secada hasta punto crítico y posteriormente metalizada con oro. Para la obtención de las imágenes se trabajó en bajo vacío. Este procedimiento se llevó a cabo en el Instituto de Geofísica de la Universidad Javeriana, en cooperación con el grupo de investigación en Nanociencia y Nanotecnología.

#### **6.5. ANALISIS ESTADISTICO**

Se empleó la prueba estadística ANOVA para evaluar las diferencias entre los valores y la prueba Tukey.

## 7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

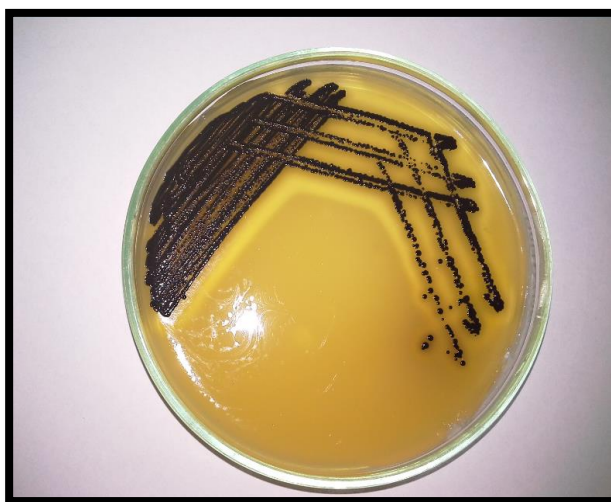
| Tiempo<br>Actividad  | MARZO |   |   |   | ABRIL |   |   |   | MAYO |   |   |   | JUNIO |   |   |   |
|--|-------|---|---|---|-------|---|---|---|------|---|---|---|-------|---|---|---|
|  | 1     | 2 | 3 | 4 | 1     | 2 | 3 | 4 | 1    | 2 | 3 | 4 | 1     | 2 | 3 | 4 |
| Revisión bibliográfica y estructuración del anteproyecto   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |
| Presentación del primer avance   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |
| Reactivación y caracterización microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Meticilina resistente</i> |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |
| Ensayos de inhibición Pozo-CMI-CMB   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |
| Caracterización bacterias por Microscopía Electrónica  |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |
| Socialización resultados Feria de los Microorganismos  |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |
| Presentación del segundo avance grupo NANOSOST   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |
| Escritura, entrega y sustentación trabajo final  |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. CARACTERIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE

La cepa *Staphylococcus aureus* fue donada por la profesora Fanny Herrera, docente e investigador del Grupo de Microbiología y Biotecnología GIMBIO, de la Universidad de Pamplona. Dicho microorganismo fue aislado a partir de queso fresco artesanal en donde se determinó su resistencia a la meticilina a partir de análisis moleculares (PCR). La resistencia de *S. aureus* a la meticilina está conferida por el gen *mecA*, que codifica una proteína variante de unión a la penicilina (PBP), llamada PBP2a (Herrera F *et al.*, 2015).

En este estudio se realizaron siembras confirmativas en Agar Baird Parker. Este medio es selectivo para la detección de *Staphylococcus aureus*. Su composición consta de piruvato sódico el cual ayuda a recuperar las bacterias lesionadas; su poder selectivo se debe a la presencia de telurito, cloruro de litio y glicina. La característica más relevantes de *Staphylococcus aureus* es la presencia de un aspecto negro, debido a la reducción del telurito (Forsythe S, 2000), con un halo transparente que revela la actividad lipolítica del microorganismo sobre la yema de huevo (Zendejas G *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Crecimiento característico de *Staphylococcus aureus* en Agar Baird Parker (Fuente: Cruz K, 2017)



## 8.2. EVALUACIÓN DE LOS AGENTES INHIBITORIOS

### 8.2.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS

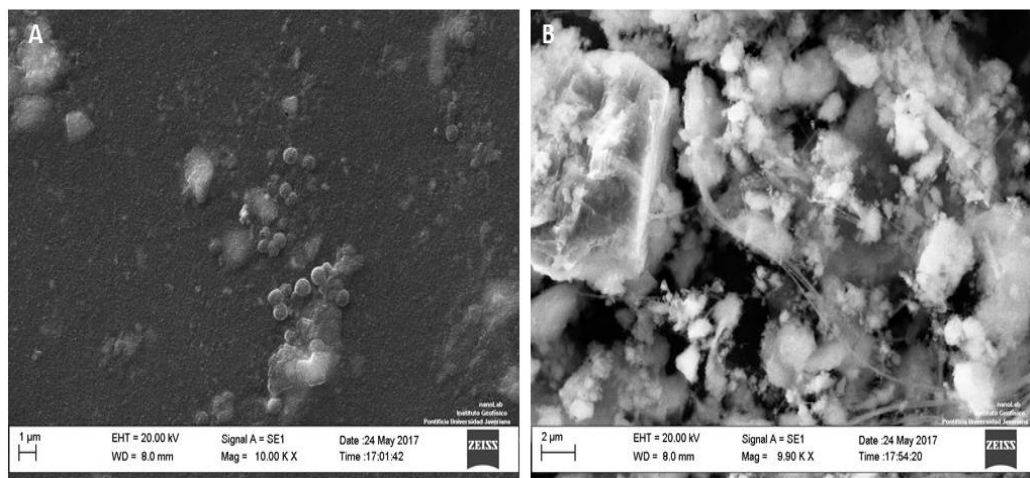
Los ensayos de inhibición en placa de Petri empleando como agente inhibidor los aceites esenciales mostraron los siguientes resultados:

| Microorganismo  | Agente inhibidor           | Resultado (mm) | Promedio | Resistencia o susceptibilidad |
|---|----------------------------|----------------|----------|-------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente (SARM) | <i>Lippia origanoides</i>  | 19,80          | 19,67    | Sensible (++)                 |
|   |                            | 19,48          |          |                               |
|   |                            | 19,73          |          |                               |
|   | <i>Lippia alba</i>         | 18,72          | 18,98    | Sensible (++)                 |
|   |                            | 19,21          |          |                               |
|   |                            | 19,02          |          |                               |
|   | <i>Eucalyptus globulus</i> | 3,32           | 1,10     | Resistente                    |
|   |                            | 0,0            |          |                               |
|   |                            | 0,0            |          |                               |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                              | <i>Lippia origanoides</i>  | 19,03          | 18,80    | Sensible (++)                 |
|   |                            | 18,18          |          |                               |
|   |                            | 19,11          |          |                               |
|   | <i>Lippia alba</i>         | 19,80          | 18,37    | Sensible (++)                 |
|   |                            | 16,95          |          |                               |
|   |                            | 18,38          |          |                               |
|   | <i>Eucalyptus globulus</i> | 10,32          | 8,51     | Resistente                    |
|   |                            | 0,0            |          |                               |
|   |                            | 15,22          |          |                               |
| <i>Escherichia coli</i>                                   | <i>Lippia origanoides</i>  | 19,04          | 19,03    | Sensible (++)                 |
|   |                            | 19,02          |          |                               |
|   |                            | 19,03          |          |                               |
|   | <i>Lippia alba</i>         | 13,41          | 10,94    | Sensible (+)                  |
|   |                            | 13,22          |          |                               |
|   |                            | 6,19           |          |                               |
|   | <i>Eucalyptus globulus</i> | 1,84           | 2,37     | Resistente                    |
|   |                            | 2,88           |          |                               |
|   |                            | 2,39           |          |                               |

**Tabla 6.** Resultados de los ensayos de actividad inhibitoria de los extractos de Aceites esenciales (*Lippia origanoides*, *Lippia alba* y *Eucalyptus globulus*) a una concentración del 100% frente a SARM, *S. aureus* y *E.coli*.

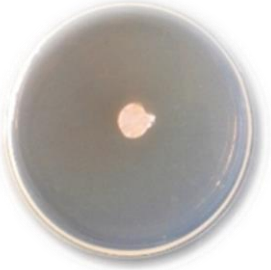
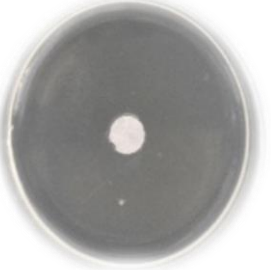


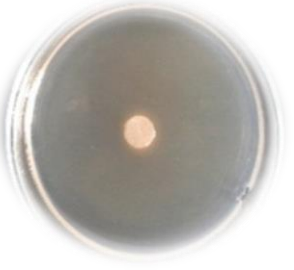

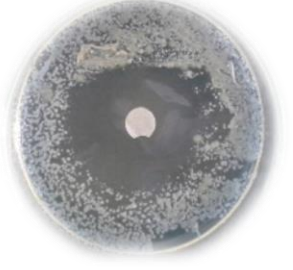
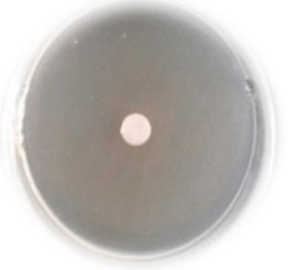
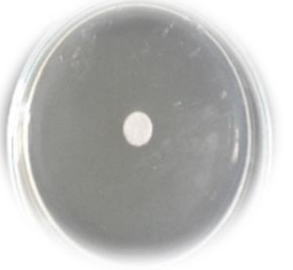

En la Tabla 3, se pueden observar las mediciones de los halos de inhibición y el promedio de cada uno de los aceites esenciales frente a cada bacteria. Según los rangos de susceptibilidad reportados por Ponce A. *et al.*, (2003) (Tabla 2). Igualmente en la Tabla 4, se puede observar el efecto inhibitorio de los ensayos de cada uno de los aceites esenciales mediante discos sensitivos en placa frente a cada uno de los microorganismos estudiados. El aceite esencial de *Lippia origanoides* obtuvo mejor desempeño antimicrobiano, siendo *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (SARM) sensible (++) , *Staphylococcus aureus* sensible (++) y *Escherichia coli* sensible (++) . Dentro

de las actividades biológicas del orégano silvestre se han reportado efectos antimicrobianos, anti parasíticos, estrogénicos, antigenotóxicos, insecticidas y antioxidantes. Existen diversos reportes de la acción biocida del aceite esencial de *Lippia organoides* especialmente sobre bacterias, levaduras y mohos que causan enfermedades en los seres humanos (Olivera *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los aceites esenciales obtenidos a partir de *Lippia organoides* son ricos en compuestos hidrófobos como monoterpenos. La composición química de *Lippia organoides* fue ensayado por Medeiros H *et al.*, (2014) en donde verificó que sus compuestos mayoritarios eran los monoterpenos Carvacrol (37,3%), Timol (22,4%) y  $\gamma$ -Terpinene (10,9%). Estos compuestos son altamente lipófilos que son capaces de acumularse en el plasma de la membrana bacteriana, causando la pérdida de su integridad, aumentando su permeabilidad principalmente a los iones  $K^+$  y  $H^+$ , pérdida de contenido citoplásmico, disipación de la fuerza motriz del protón, la lisis y la muerte celular (Medeiros H. *et al.*, 2014). El efecto antibacteriano de los aceites esenciales fue visualizado a través de Microscopía electrónica (SEM). Se puede evidenciar en la Figura 3 que el aceite esencial de *Lippia organoides* produce lisis celular ocasionando la pérdida de la integridad celular y su morfología y agrupación característica.



**Figura 3.** Microscopía de barrido electrónica de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente: **A.** Sin tratamiento **B.** Después de haber sometida a *Lippia organoides*.

Por otro lado el aceite esencial de *Lippia alba* obtuvo un efecto frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (SARM) sensible (++), *Staphylococcus aureus* sensible (++) y un efecto sensible (+) frente a *Escherichia coli*.

| Microorganismo     | 1. <i>Lippia origanoides</i>  | 2. <i>Lippia alba</i>  | 3. <i>Eucalyptus globulus</i>  | 4. CONTROL (+)  |
|--------------------|---|--|--|---|
| A. SAMR            | (++)<br>   | (++)<br>  | R<br>   |  |
| B. <i>S.aureus</i> | (++)<br>   | (++)<br>  | R<br>   |   |
| C. <i>E.coli</i>   | (++)<br> | (+)<br> | R<br> |   |

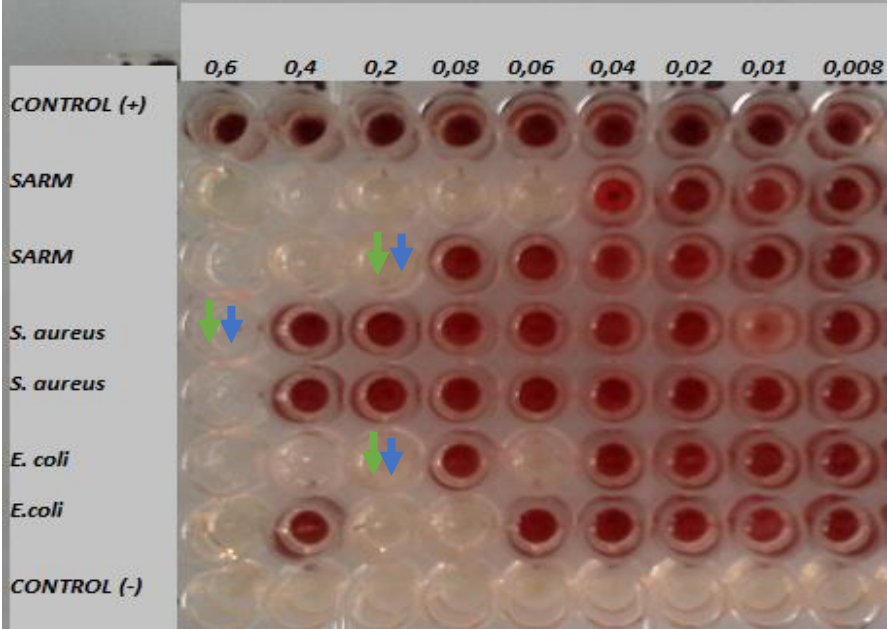
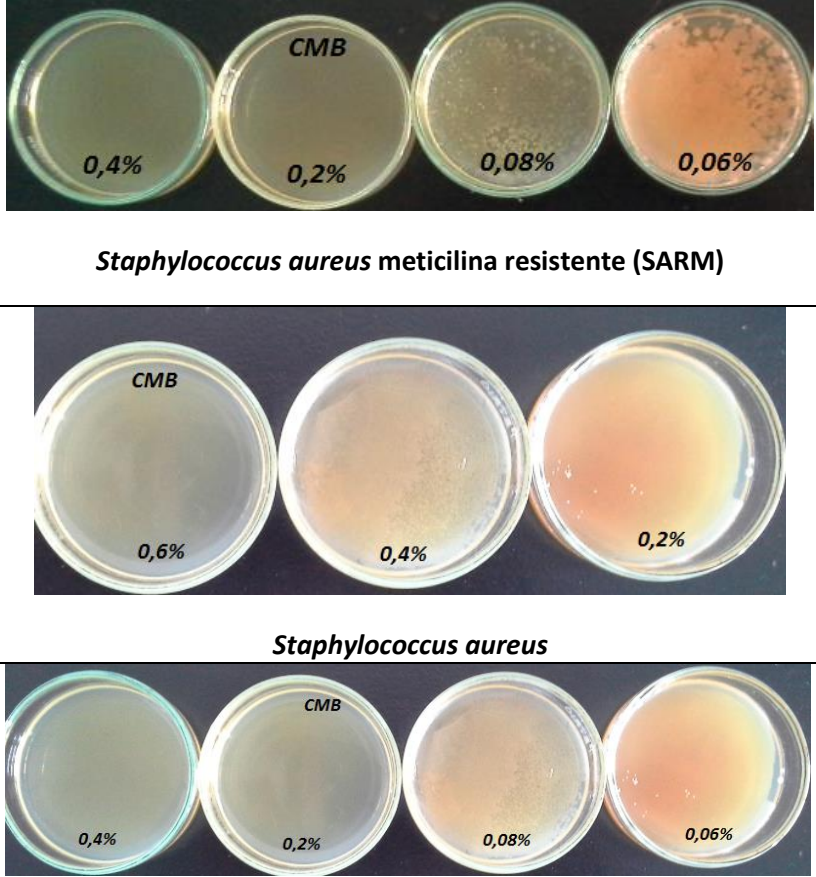
**Tabla 7.** Efecto Inhibitorio de los Aceites esenciales sobre A) SARM, B) *S. aureus*, C) *E.coli* vs 1) *Lippia origanoides*, 2) *Lippia alba*, 3) *Eucalyptus globulus*, 4) Control positivo.

Henao S. *et al.*, (2011) evaluaron la actividad antibacteriana de *Lippia alba*, mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de las cepas de *C. albicans* (ATCC 14053), *S. aureus* (ATCC 6538) y *E. coli* (ATCC 25992). En su estudio que los extractos clorofórmicos, acetónicos, etanólicos de la raíz de *Lippia alba* mostraron actividad antimicrobiana invitro empleando la técnica de disco de papel contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans*, *Monilia sitophila*, lo cual es similar al método utilizado en este estudio. El extracto etanólico de *Lippia alba* sirve como antibacteriano y antimicótico. Los aceites esenciales de *Lippia alba*, mostraron actividad antimicótica contra *Aspergillus fumigatus* y *Candida krusei*. Además, recientemente se ha demostrado efecto inhibitorio sobre virus patógenos humanos de alta prevalencia en América latina como son el virus de la fiebre amarilla y virus del dengue (Henao S *et al.*, 2011).

El efecto inhibitorio de *Eucalyptus globulus* según los rangos establecidos por Ponce A *et al.*, (2003) fueron: resistente (< 8mm) frente a *Staphylococcus aureus* metilicina resistente SARM y *Escherichia coli*. En cuanto a *Staphylococcus aureus* presento un efecto sensible (+). Yáñez X. y Cuadro O., (2012) evaluaron dos especies de aceites esenciales entre ellos *Eucalyptus globulus* y dos métodos de extracción de aceite, esto con el fin de determinar cuál es el más adecuado para obtener un efecto antibacteriano que garantizara la eliminación de las bacterias de interés alimentario. En ese estudio procesaron hojas de Eucalipto seleccionadas en tres zonas del municipio de Pamplona y obtuvieron el aceite esencial por dos métodos de extracción: Arrastre con vapor (AV) e hidrodestilación asistida por radiación de microondas (HDMO), ellos evaluaron el efecto antibacterial de los aceites de las especies *E. globulus* y *E. camaldulensis* en donde encontraron actividad frente a las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*.

### **8.2.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA USANDO ACEITES ESENCIALES**

La concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de cada uno de los aceites esenciales *Lippia organoides* (Tabla 8), *Lippia alba* (Tabla 9) y *Eucalyptus globulus* (Tabla 10) frente a *Staphylococcus aureus* metilicina resistente SARM, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se realizó en placas de 96 pozos ELISA (CMI) evaluando diferentes concentraciones mínimas de cada uno de los aceites. Para determinar la concentración mínima bactericida se realizó siembra en superficie en Agar TS de las CMI donde se evidencio ausencia de crecimiento bacteriano. Luego de incubadas las placas ELISA a 37°C /24h, se pudo observar la cambio de color

| Aceite esencial                  | Concentración mínima inhibitoria (CMI)   | Concentración mínima bactericida (CMB)   |
|----------------------------------|--|--|
| <p><i>Lippia origanoides</i></p> |  <p>0,6 0,4 0,2 0,08 0,06 0,04 0,02 0,01 0,008</p> <p>CONTROL (+)</p> <p>SARM</p> <p>SARM</p> <p><i>S. aureus</i></p> <p><i>S. aureus</i></p> <p><i>E. coli</i></p> <p><i>E. coli</i></p> <p>CONTROL (-)</p> <p>↓ CMI</p> <p>↓ CMB</p> <p>Cada flecha indica la ubicación de la CMI y CMB.</p> |  <p>0,4% CMB 0,2% 0,08% 0,06%</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente (SARM)</p> <p>CMB 0,6% 0,4% 0,2%</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>0,4% CMB 0,2% 0,08% 0,06%</p> <p><i>Escherichia coli</i></p> |

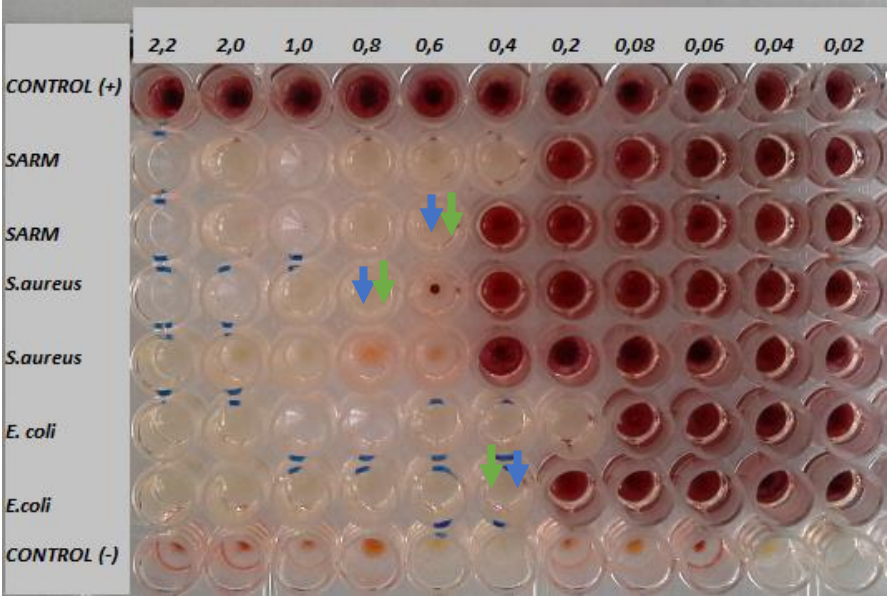
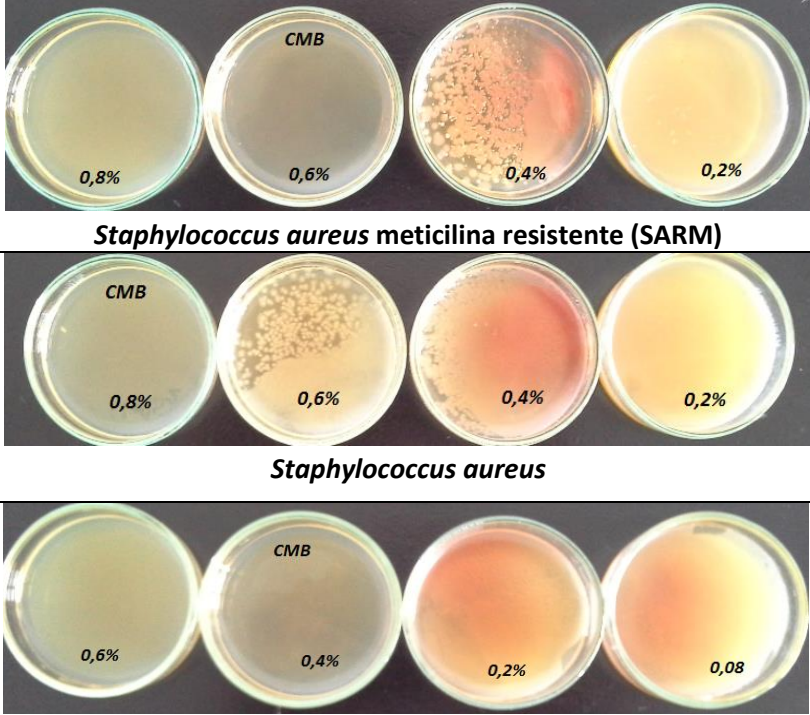
**Tabla 8.** Concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas de *Lippia origanoides* frente a *Staphylococcus aureus* metilina resistente (SARM), *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

de los pozos debido al colorante de contraste empleado, el cual evidencia la actividad metabólica de las bacterias. En la **Tabla 8** se puede observar el efecto antibacteriano del aceite esencial *Lippia organoides*, las concentraciones mínimas inhibitorias se establecieron a partir de 0,6% a 0,008% frente a las bacterias. Se empleó para cada bacteria una concentración de McFarland 0,5. Se obtuvo la CMI para *Staphylococcus aureus metilina resistente* (SARM) a una concentración de 0,2% de AE y su CMB en 0,2%, ya que no se evidenció crecimiento a partir de esa concentración. En cuanto a *Staphylococcus aureus* se obtuvo la CMI en 0,6% y su CMB en 0,6%, por último en *Escherichia coli* la CMI se obtuvo a una concentración de 0,2% y una CMB en 0,2%.

Las plantas del género *Lippia* (*Verbenaceae*) han sido utilizadas para propósitos medicinales en muchos países, varias actividades biológicas tales como antibacteriana, antiparasitaria, antiviral y antimicótica han sido establecidas tanto para los extractos como para los aceites (Pascual M *et al.*, 2001). El mecanismo de acción de los aceites frente a los microorganismos Gram negativos es la desintegración de la membrana externa de este grupo de bacterias, liberando los lipopolisacáridos, e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP. Según Ramírez L. *et al.*, (2012) las diferentes concentraciones evaluadas de los aceites presentan algún grado de actividad inhibitoria frente a las cepas de *Salmonella* y *E. coli*; generalmente, los aceites esenciales que poseen propiedades antibacterianas fuertes contra agentes patógenos alimenticios, contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el carvacrol y timol (Ramírez L *et al.*, 2012). Parece razonable que su mecanismo de acción pueda ser similar al de otros fenoles; estos mecanismos incluyen la alteración de la membrana citoplásmica, perturbación de la fuerza motriz de protones (PMF), el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación de contenidos celulares (Stashenko E. *et al.*, 2004).

Según Ramírez L *et al.*, (2009) en su estudio obtuvo una CMI de *Lippia organoides* con valores bajos (256 ppm) frente a *Escherichia coli*. En el presente estudio se obtuvo un porcentaje de 0,2% y los valores de la CMI coincidieron con los CMB, igualmente en el estudio de Ramírez L. y colaboradores, esto demuestra la acción bactericida de estos aceites a las diferentes concentraciones. Las actividades inhibitorias presentadas frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos puede deberse a la presencia de timol y carvacrol. No obstante existen evidencias que los componentes minoritarios juegan un papel crítico en la actividad antibacteriana, posiblemente por producir un efecto sinérgico con otros componentes (Marino M *et al.*, 2001). La actividad antimicrobiana del carvacrol y el timol ha sido



| Aceite esencial           | Concentración mínima inhibitoria (CMI)  | Concentración mínima bactericida (CMB)   |
|---------------------------|---|--|
| <b><i>Lippia alba</i></b> |  <p> <span style="color: blue;">↓</span> CMI    Cada flecha indica la ubicación de la CMI y CMB.<br/> <span style="color: green;">↓</span> CMB </p> |  <p> <b><i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (SARM)</b><br/> <b><i>Staphylococcus aureus</i></b><br/> <b><i>Escherichia coli</i></b> </p> |

**Tabla 9.** Concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas de *Lippia alba* frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (SARM), *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

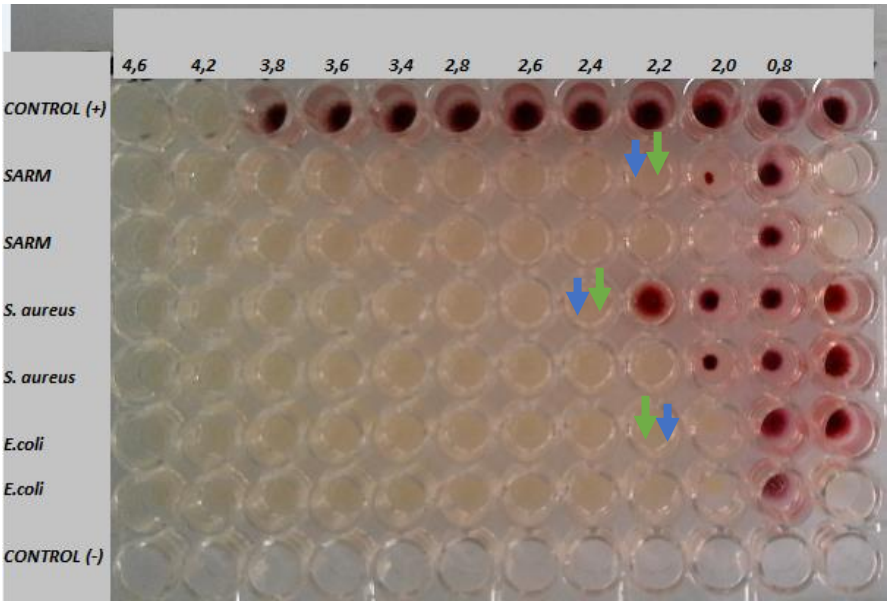
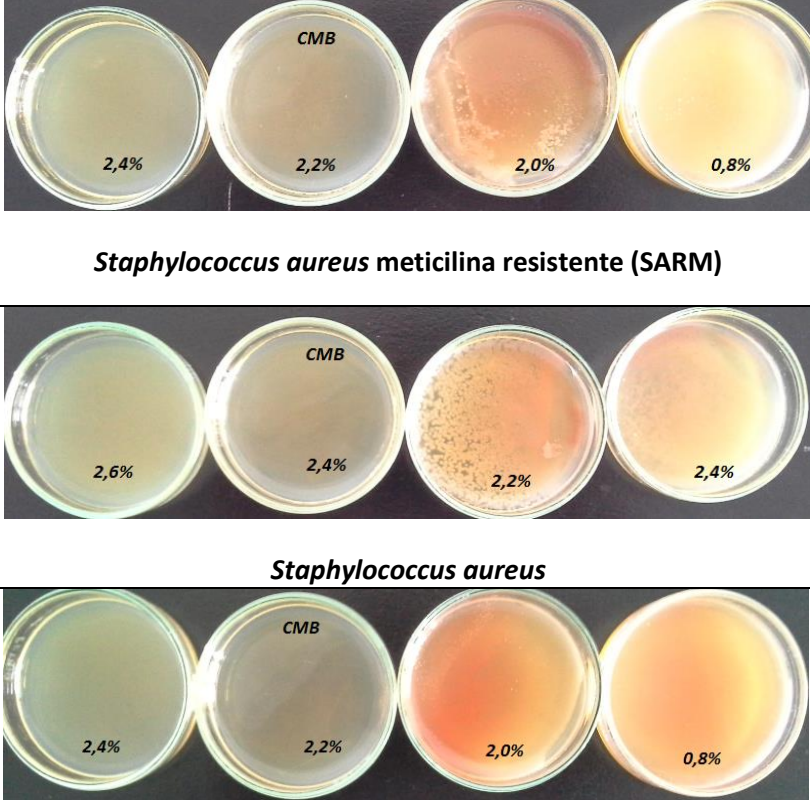
demostrada, ambos compuestos parece que afectan la permeabilidad de la membrana celular (Salgueiro L. *et al.*, 2003).

En la **Tabla 9** se puede observar el efecto antibacteriano del aceite esencial *Lippia alba*, las concentraciones mínimas inhibitorias se establecieron a partir de 2,2% a 0,02% frente a las bacterias. Se estableció para cada bacteria una concentración de Mcfarland 0,5 y se obtuvo la CMI para *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (SARM) a una concentración de 0,6% de AE y su CMB en 0,6%, ya que no se evidenció crecimiento a partir de esa concentración. En cuanto a *Staphylococcus aureus* se obtuvo la CMI en 0,8% y su CMB en 0,8%, por último en *Escherichia coli* la CMI se obtuvo a una concentración de 0,4% y una CMB en 0,4%. Henao S *et al.*, (2011) encontró en su estudio una concentración mínima bactericida (CMB) de 0,5 mg/ml de *Lippia alba* frente a *Helicobacter pylori* y se observó que entre mayor es el tiempo de exposición del inóculo bacteriano al extracto acuoso mayor será la actividad bactericida. Se pudo observar según los resultados que el mejor efecto antibacteriano de este aceite fue frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (CMI: 0,6% y CMB: 0,6%) en comparación con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

En los resultados obtenidos para *Eucalyptus globulus* (Tabla 7) se puede observar el efecto antibacteriano, las concentraciones mínimas inhibitorias se establecieron a partir de 4,6% a 0,8% frente a las bacterias, se obtuvo la CMI para *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (SARM) a una concentración de 2,2% de AE y su CMB en 2,2%, ya que no se evidenció crecimiento a partir de esa concentración. En cuanto a *Staphylococcus aureus* se obtuvo la CMI en 2,4% y su CMB en 2,4%, por último en *Escherichia coli* la CMI se obtuvo a una concentración de 2,2% y una CMB en 2,2%.

Chávez A. (2014) y colaboradores encontraron en su estudio que la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de *Eucalyptus globulus* fue de 16 mg/ml para *Escherichia coli*, mientras que para *Staphylococcus aureus* fue 32 mg/ml. Asimismo, el extracto acuoso liofilizado de *Eucalyptus globulus* frente a *Escherichia coli* tuvo una Concentración Bactericida Mínima de 128 mg/ml, mientras que frente a *Staphylococcus aureus* tuvo una C.B.M. de 256 mg/ml (Chávez A *et al.*, 2014). Graveson R, 2012 encontró que el extracto acuoso de hojas de *Eucalyptus globulus* mostró actividad antimicrobiana invitro contra *Escherichia coli* (0.07 mg/ml), *Staphylococcus aureus* (0.09 mg/ml y 0.4 mg/ml), *Bacillus subtilis* (0.8 mg/ml) y *Enterococcus faecalis* (1,3mg/ml). Medizzine, (2012) muestra que la planta de eucalipto tiene acción inhibitoria del crecimiento de algunos gérmenes *in vitro* como algunos causantes de infecciones respiratorias. Con respecto al *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente, el eucalipto posee un



| Aceite esencial                   | Concentración mínima inhibitoria (CMI)   | Concentración mínima bactericida (CMB)  |
|-----------------------------------|--|---|
| <b><i>Eucalyptus globulus</i></b> |  <p> <span style="color: blue;">↓</span> CMI    Cada flecha indica la ubicación de la CMI y CMB.<br/> <span style="color: green;">↓</span> CMB </p> |  <p> <b><i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente (SARM)</b><br/> MIC: 2,2%    CMB: 2,2% </p> <p> <b><i>Staphylococcus aureus</i></b><br/> MIC: 2,4%    CMB: 2,4% </p> <p> <b><i>Escherichia coli</i></b><br/> MIC: 2,0%    CMB: 2,4% </p> |

**Tabla 10.** Concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas de *Eucalyptus globulus* frente a *Staphylococcus aureus* metilina resistente (SARM), *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

cierto grado de actividad inhibitoria. En el presente estudio se pudo evidenciar la acción inhibitoria de *Eucalyptus globulus* frente a SARM, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

### 8.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS

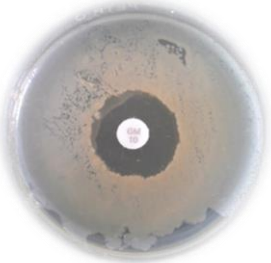
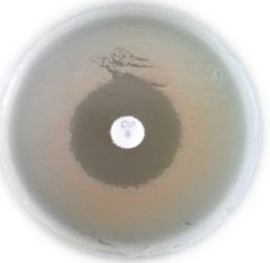
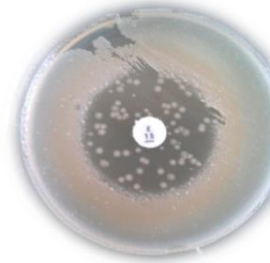

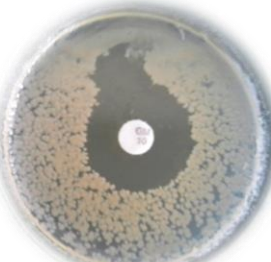
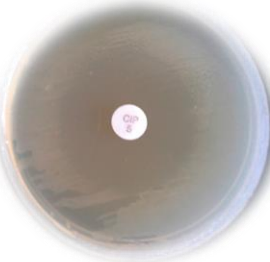
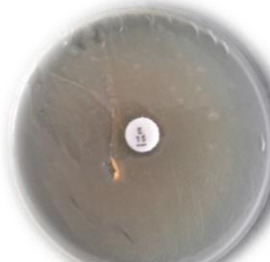
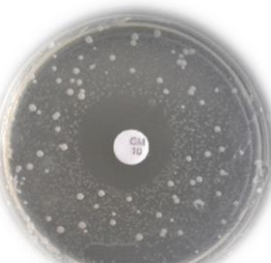
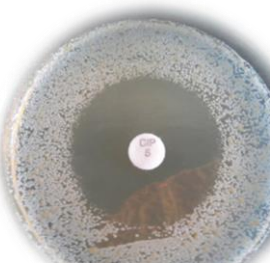
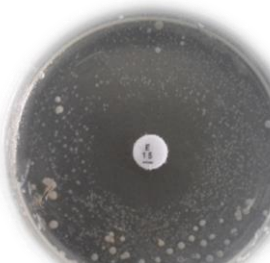
| Microorganismo   | Agente inhibidor    | Resultado (mm) | Promedio     | Zona de Diámetro |   |   |
|--|---------------------|----------------|--------------|------------------|---|---|
|  |                     |                |              | S                | I | R |
| <b><i>Staphylococcus aureus</i><br/>Meticilina Resistente (SARM)</b> | <b>Gentamicina</b>  | 4,85           | <b>3,08</b>  |                  |   | X |
|  |                     | 2,34           |              |                  |   |   |
|  |                     | 2,06           |              |                  |   |   |
|  | <b>Ciproflaxina</b> | 6,32           | <b>5,86</b>  |                  |   | X |
|  |                     | 5,02           |              |                  |   |   |
|  |                     | 6,25           |              |                  |   |   |
|  | <b>Eritromicina</b> | 9,29           | <b>7,48</b>  |                  |   | X |
|  |                     | 7,09           |              |                  |   |   |
|  |                     | 6,07           |              |                  |   |   |
| <b><i>Staphylococcus aureus</i></b>                                  | <b>Gentamicina</b>  | 3,47           | <b>2,92</b>  |                  |   | X |
|  |                     | 3,85           |              |                  |   |   |
|  |                     | 1,45           |              |                  |   |   |
|  | <b>Ciproflaxina</b> | 7,13           | <b>6,51</b>  |                  |   | X |
|  |                     | 6,54           |              |                  |   |   |
|  |                     | 5,87           |              |                  |   |   |
|  | <b>Eritromicina</b> | 0,0            | <b>3,63</b>  |                  |   | X |
|  |                     | 0,0            |              |                  |   |   |
|  |                     | 10,90          |              |                  |   |   |
| <b><i>Escherichia coli</i></b>                                       | <b>Gentamicina</b>  | 4,84           | <b>3,38</b>  |                  |   | X |
|  |                     | 1,54           |              |                  |   |   |
|  |                     | 3,76           |              |                  |   |   |
|  | <b>Ciproflaxina</b> | 13,97          | <b>10,21</b> |                  |   | X |
|  |                     | 6,45           |              |                  |   |   |
|  |                     | -              |              |                  |   |   |
|  | <b>Eritromicina</b> | 0,28           | <b>5,59</b>  |                  |   | X |
|  |                     | 10,90          |              |                  |   |   |
|  |                     | -              |              |                  |   |   |

**Tabla 11.** Resultados de los ensayos de actividad inhibitoria antibi6ticos (*Gentamicina*, *Ciproflaxina* y *Eritromicina*) frente a SARM, *S. aureus* y *E.coli*.

Según la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) las zonas de diámetro en milímetros (mm) obtenidas fueron interpretadas por los siguientes parámetros: Susceptible (S), Intermedio (I) y Resistente (R) (CLSI, 2016). En la **Tabla 11**, se puede observar que SARM, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* presentaron resistencia a la Gentamicina. Este antibi6tico pertenece al grupo de los aminoglucosidos. Según Ardanuy *et al.*, (2011) los fenotipos más

frecuentes de resistencia a los aminoglucosidos que se pueden encontrar en pruebas invitro son el de resistencia a la Gentamicina, esto se debe a la producción de enzimas modificadoras de aminoglucosidos, gracias a la producción de la enzima bifuncional AAC (6')-APH (2''); en *Staphylococcus aureus* la tasa de resistencia a la Gentamicina fue del 8,6%, en *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente fue del 20%, esto indica la alta distribución de esta enzima en nuestro medio. Esta enzima combina la actividad acetiltransferasa con la actividad fosfotransferasa y está codificada por el gen *aac (6')-aph (2'')*. La presencia de esta enzima implica resistencia a casi todos los aminoglucósidos.

En cuanto a los ensayos de inhibición con Ciproflaxina observados en la Tabla 11 las bacterias SARM, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* presentaron resistencia de acuerdo a los parámetros establecidos por la CLSI (CLSI, 2016). Las fluoroquinolonas inhiben la síntesis de ADN, la inhibición ocurre por la interacción del antibiótico con el complejo formado por la unión del ADN a las dianas de las quinolonas, la ADN-girasa y la topoisomerasa IV. Estas dos enzimas están estructuralmente relacionadas y constan de dos pares de subunidades diferentes, las subunidades *GyrA* y *GyrB* en el caso de la ADN-girasa, y las subunidades *ParC* y *ParE* en el caso de la topoisomerasa IV. En su mayoría, la resistencia a quinolonas en bacterias gramnegativas se produce por mutaciones cromosómicas (Drlica y Zhao., 1997; Hooper, 1998; Martínez., *et al* 1998). En *Escherichia coli* la modificación de la diana es determinada por mutaciones en *gyrA* o *parC* (genes que codifican para la subunidad A de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente), y en menor medida en *gyrB* o *parE* (genes que codifican para la subunidad B de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente) (Helling *et al.*, 2002).

| Microorganismo | 1. Gentamicina   | 2. Ciproflaxina   | 3. Eritromicina  | 4. CONTROL (+)  |
|----------------|--|---|--|---|
| A. SARM        | RESISTENTE<br>  | RESISTENTE<br>  | RESISTENTE<br>  |  |
| B. S.aureus    | RESISTENTE<br>  | RESISTENTE<br>  | RESISTENTE<br>  |   |
| C. E.coli      | RESISTENTE<br> | RESISTENTE<br> | RESISTENTE<br> |   |

**Tabla 12.** Efecto Inhibitorio de los Antibióticos obre A) SARM B) *S. aureus* C) *E.coli* vs 1) Gentamicina 2) Ciproflaxina 3) Eritromicina 4) Control positivo.

En *Escherichia coli* como en *Staphylococcus aureus* se ha demostrado que diferentes niveles de resistencia a quinolonas dependen de si las alteraciones ocurren en la diana primaria, la secundaria, o en ambas. Un factor muy importante para la resistencia a fluoroquinolonas se debe a mutaciones en bombas de transporte activo que expulsan compuesto tóxico debido a su expresión o sobreexpresión provocando resistencia a diferentes grupos de antibióticos al mismo tiempo (Ribera *et al.*, 2002). El gen *norA* codifica una bomba que contribuye a resistencia en *S. aureus*, y *acrAB* codifica en *E. coli* un sistema de expulsión multidroga que asociado al producto de *tolC* modula la resistencia a quinolonas en esta especie. También se ha demostrado que la sobreexpresión de *NorA*, por una mutación en el promotor, provoca un aumento de 2 a 4 veces la concentración inhibitoria mínima (CIM) de ciprofloxacino (Helling *et al.*, 2002).

En la **Tabla 12** se pueden observar los ensayos de disco sensitivo en Agar TS. Se obtuvieron halos de inhibición de los antibióticos probados frente a SARM, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición realizados con Eritromicina fueron interpretados según los estándares establecidos por la CLSI, los microorganismos ensayados presentaron resistencia *Staphylococcus aureus* (3,63 mm), SARM (7,48mm) y *Escherichia coli* (5,59 mm). Según estudios se ha demostrado que en los estafilococos, la resistencia a los macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina, midecamicina) puede asociarse a diferentes fenotipos de sensibilidad o de resistencia a las lincosamidas (clindamicina). La resistencia a los macrólidos y a la clindamicina es más frecuente entre cepas de ECN que en *S. aureus*. Según un reporte realizado en el 2006 del Sexto Estudio Nacional de estafilococos, los porcentajes de resistencia de *S. aureus* a la eritromicina y a la clindamicina fueron del 37% y del 19,9%. Los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos del grupo MLSB que subyacen bajo 4 fenotipos de resistencia poseen un efecto de: 1) Modificación de la diana (ARNr 23S) por la acción de metilasas codificadas principalmente por genes *erm* (erythromycin ribosome methylase, *ermA*, *ermB*, *ermC*, entre otros) y en raras ocasiones por el gen *cfr*; 2) expulsión activa del antimicrobiano relacionado con diferentes genes de codificación plasmídica del tipo *msrA*; 3) inactivación del antimicrobiano (genes de tipo *lnu*); 4) modificación de la diana por mutación del ARNr 23S y/o de proteínas ribosómicas (Ardunay *et al.*, 2011).

#### 8.4. ANALISIS ESTADISTICO

##### 8.4.1. ANÁLISIS DE VARIANZA APLICADA A LOS TRATAMIENTOS EMPLEADOS PARA LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINA RESISTENTE

En el presente trabajo, se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) a los tratamientos utilizados para la inhibición de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente, para ello se realizaron tres repeticiones de las pruebas con sensidiscos cada una por triplicado, lo que nos da un total de nueve datos en cada tratamiento, tanto para cada uno de los Aceites esenciales como para cada antibiótico empleado. Se aplicó un nivel de significancia del 95% (p-valor < 0,05) para probar la existencia de diferencias significativas en los resultados obtenidos. En caso de encontrar diferencias significativas en los resultados, se aplicó una prueba de múltiples rangos mediante el test HSD de Tukey para separar los grupos.

| Grupos                     | Cuenta | Suma  | Promedio    | Varianza    |
|----------------------------|--------|-------|-------------|-------------|
| <i>Lippia Origanoides</i>  | 9      | 172,4 | 19,15555556 | 0,332052778 |
| <i>Lippia alba</i>         | 9      | 144   | 16          | 20,75       |
| <i>Eucalyptus globulus</i> | 9      | 35    | 3,888888889 | 26,86111111 |
| Gentamicina                | 9      | 27,8  | 3,088888889 | 2,012836111 |
| Ciproflaxina               | 9      | 57,01 | 6,334444444 | 12,70307778 |
| Eritromicina               | 9      | 44,35 | 4,927777778 | 24,33501944 |

**Tabla 13.** Resumen de valores de Análisis de Varianza por un factor.

En la Tabla 13 se pueden observar los valores obtenidos en el análisis, se observan los valores de las sumas de datos, promedio de datos y varianza de cada grupo, en este caso cada grupo son los tratamientos empleados para la inhibición de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente. Cada tratamiento corresponde a los Aceites esenciales (*Lippia origanoides*, *Lippia alba* y *Eucalyptus globulus*) y antibióticos (Gentamicina, Ciproflaxina y Eritromicina).

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>    | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos                     | 2131,445593              | 5                         | 426,2891185                      | 29,40124437 | 0,000000000000016   | 2,408514119                 |
| Dentro de los grupos             | 695,9527778              | 48                        | 14,4990162                       |             |                     |                             |
| Total                            | 2827,39837               | 53                        |                                  |             |                     |                             |

**Tabla 14.** Resultados del Análisis de Varianza aplicado a cada uno de los grupos.

Se plantea la siguiente pregunta con el fin de establecer una hipótesis nula y una hipótesis alternativa:

**¿Existen diferencias estadísticamente significativas en el promedio del diámetro de halo de inhibición entre los tratamientos empleados?**

Para la prueba estadística de Análisis de varianza plantea que la hipótesis nula es aquella donde todas las medias son iguales, por lo tanto:

**Hipótesis nula:** El promedio del diámetro de halo inhibición en los seis grupos de tratamientos es igual, con el 95% de confiabilidad.

La hipótesis alterna es aquella donde una de las medias es diferente, por lo tanto:

**Hipótesis alternativa:** En al menos un grupo de tratamiento existe diferencia en el promedio del diámetro de halo de inhibición, con 95% de confiabilidad.

La prueba estadística de Análisis de Varianza se realizó en Excel mediante la función Análisis de Varianza de un factor. Con los resultados obtenidos en la Tabla 14 se tuvieron en cuenta el valor F y valor P (Probabilidad), el cual nos muestra que el valor F es de 29,40 y el valor P de 0,000000000000016. Teniendo en cuenta el valor de significancia de 0,05 se rechaza la **HIPÓTESIS NULA:** El promedio del diámetro de halo inhibición en los seis grupos de tratamientos es igual, con el 95% de confiabilidad, debido a que el valor de P es menor que el valor de significancia 0,05.

Debido a que la hipótesis nula es rechazada, se debe identificar la **HIPÓTESIS ALTERNA:** En al menos un grupo de tratamiento existe diferencia en el promedio del diámetro de halo de inhibición, con 95% de confiabilidad. En este caso debido a las diferencias significativas en los resultados, se aplicó una prueba de múltiples rangos mediante el test HSD de Tukey para separar los grupos. Para aplicar esta prueba se tuvieron en cuenta los valores de Suma de cuadrados y grados de libertad observados en la Tabla 14.



Se estableció el valor de HSD (Diferencia honestamente significativa), este valor se calculó con el valor alfa obtenido de la tabla de Tukey según los grados de libertad obtenidos junto con el valor MSe (14,5) y valor n (9). El valor alfa de la prueba de Tukey fue de 4,16. Al hallar el valor HSD que fue de 5,3 se restaron los promedios de los diámetros de halo de inhibición entre cada grupo de tratamientos empleados y se compararon con el valor HSD. Aquellos valores mayores a HSD presentaron diferencia.

| Tratamientos                   | <i>Lippia<br/>origanoides</i> | <i>Lippia alba</i> | <i>Eucalyptus<br/>globulus</i> | Gentamicina | Ciproflaxina | Eritromicina |
|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| <i>Lippia<br/>origanoides</i>  |                               | 3                  | 15                             | 16          | 13           | 14           |
| <i>Lippia alba</i>             |                               |                    | 12                             | 13          | 10           | 11           |
| <i>Eucalyptus<br/>globulus</i> |                               |                    |                                | 1           | 2            | 1            |
| Gentamicina                    |                               |                    |                                |             | 3            | 2            |
| Ciproflaxina                   |                               |                    |                                |             |              | 1            |
| Eritromicina                   |                               |                    |                                |             |              |              |

**Tabla 15.** Prueba Tukey, establece las diferencias significativas entre los grupos de tratamientos.

Según la Tabla 15 se observan las diferencias de *Lippia origanoides* con los tratamientos de *Eucalyptus globulus*, Gentamicina, Ciproflaxina y Eritromicina. También las diferencias entre *Lippia alba* con los tratamientos de *Eucalyptus globulus*, Gentamicina, Ciproflaxina y Eritromicina. Mediante estos resultados se puede interpretar la efectividad que tienen los tratamientos *Lippia origanoides* y *Lippia alba* en la inhibición de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente en comparación con los otros tratamientos empleados, la cual fueron corroborados con los parametros establecidos para cada tratamiento, en el caso de los Aceites esenciales los parametros de Resistencia y susceptibilidad establecidos por Ponce A. *et al* (2003) y los parametros establecidos por la CLSI para cada uno de los antibióticos empleados frente a *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente. Con estos resultados se acepta la hipótesis alternativa ya que existen diferencias entre los tratamientos empleados para la inhibición de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente.



## 9. CONCLUSIONES

A través de este estudio se evaluó el efecto antibacteriano de los aceites esenciales obtenidos de plantas (*Lippia organoides*, *Lippia alba* y *Eucalyptus globulus*) y antibióticos (Gentamicina, Ciproflaxina y Eritromicina) sobre *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente (SAMR).

Se pudo establecer que el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales es mayor que el de los antibióticos probados frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente SAMR.

De los aceites ensayados *Lippia organoides* presentó mayor efecto inhibitorio en comparación con *Lippia alba* y *Eucalyptus globulus* frente a *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente SARM, con una CMI y CMB de 0,2%. Por tanto, se propone la utilización de este aceite como método de tratamiento efectivo para eliminar este patógeno multirresistente.

## 10. RECOMENDACIONES

Analizar los efectos citotóxicos de las concentraciones mínimas inhibitorias de los aceites esenciales de *Lippia organoides*, *Lippia alba* y *Eucalyptus globulus* obtenidas en este estudio

## 11. BIBLIOGRAFIA

Abate G, Mshana RN, Miorner H. (1998). Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4, 5-dimethyl-2-yl) - 2, 5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2: 1011-1016.

Abente S., Carpinelli L., Guillén R., Rodríguez F., Fariña N., Laspina F., López Y. (2016). Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud; 14(2): 8-16.

Alkiza M., Arriola E., Basterretxea M., Díaz I., Esparza M., García-Arenzana J. (2004). Guía de actuación ante *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en centros gerontológicos, socio sanitarios y unidades de media-larga estancia. Rev Esp Geriatr Gerontol.39:329-41

Arango, O., Bolaños, F., Villota, O., Hurtado, A, y Toro, I. (2012). Optimización del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de oregano silvestre obtenido por arrastre con vapor. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. 10(2), pp. 217-226.

Ardanuy C., Cercenado E., Morosini M., Torres C. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram positivos. Procedimientos en Microbiología Clínica.

Bartlett AH, Foster TJ, Hayashida A, Park PW. (2008). A toxin facilitates the generation of chemokine gradients and stimulates neutrophil homing in *Staphylococcus aureus* pneumonia. J Infec Dis; 198; 1529-1535.

Barrios M. (2012). Características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de las infecciones por *Staphylococcus aureus* adquirido en la comunidad en pediatría. Universidad Complutense de Madrid, España.

Bermejo V, Spadaccini L, Elbert G, Duarte A, Erbin M, Cahn P. (2012). Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios. Medicina (B Aires); 72 (4): 283-6.

Bocchini CE, Hulten KG, Mason Jr EO. (2006). Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory responses and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. Pediatrics; 117(2):433-40.

Boccaccio C., Verdaguer V., Botto L., Cervetto M., Cetani S., Paladino S., Conti R., Lanzillota A., Herrera R., Amarante D. (2014). Aislamiento de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente en abscesos de mama en una maternidad pública. MEDICINA (Buenos Aires); 74: 210-215.

Boyle-Vavra S, Daum R. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón–Valentine leukocidin. Laboratory Investigation ; 87:3-9.

Bueno J., Martínez J., Stashenko E. and Ribon W. (2009). Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. Biomedica. 1(1), pp, 51-60.

Camacho G., Cortés L. F., Pabón S. (2014). Factores de riesgo para infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente comunitario en la fundación hospital de la misericordia entre 2011 a 2013. Rev.Medica.Sanitas 17 (3): 110-118.

Camele, Ippolito et al. (2012). “In Vitro Control of Post-Harvest Fruit Rot Fungi by Some Plant Essential Oil Components.” International Journal of Molecular Sciences 13(2):2290–2300.

Carmona F., Rúa M., Del Pozo J. L. (2016). Aproximación terapéutica dirigida de las infecciones por *Staphylococcus aureus*. Aspectos clínicos de la prescripción. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona. Rev Esp Quimioter; 29(Suppl. 1): 15-20.

Carricajo A, Vermesch R, Aubert G. 2001. In vitro activity of cefpirome and vancomycin in combination against gentamicin- susceptible and gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect; 7:218–20.

Castro R., Villafañe-Ferrer L., Álvarez E., Martínez De Arco M., Rambaut C., Vitola G. (2010). *Staphylococcus aureus* meticilina resistente en niños escolares de Cartagena. Rev. Salud Pública. 12 (3): 454-463.

Cervantes E., García R., Salazar P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México (UNAM). Rev Latinoam Patol Clin Med Lab; 61 (1): 28-40.

Cercenado E., (2016). Epidemiología de la infección por Grampositivos resistentes. Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón y Departamento de Medicina. Facultad de Medicina, Universidad Complutense. Madrid

Cercenado E., Cuevas O., Vindel A., Román F., Marín M., Bouza E. y Grupo Español para el Estudio de *Staphylococcus*. (2014) Situación actual de la resistencia de los estafilococos en España: octavo estudio nacional de prevalencia. En: abstracts del XIX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2015). National Healthcare Safety Network. Disponible en: [http://www.cdc.gov/nhsn/faqs/FAQ\\_general.html](http://www.cdc.gov/nhsn/faqs/FAQ_general.html).

Chaudhary A. (2016). A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*; 6(6):552–556.

Chávez A., Rodríguez I. (2014). Actividad antiabacteriana in vitro de los extractos acuosos liofilizados de hojas de *Eucalyptus globulus Labill* Y cortezas de *Cinnamomun zeilanicum* blume. Universidad Nacional De La Amazonía Peruana Facultad De Farmacia Y Bioquímica.

Chambers HF, De leo FR. (2000). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Forsythe SJ. *Alimentos seguros: Microbiología*. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA S. A. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7:629–41. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2200>.

Chen SY, Liao CH, Wang JL, Chiang WC, Mai MS, Chie WC. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) staphylococcal cassette chromosome mec genotype effects outcomes of patients with healthcare-associated MRSA bacteremia independently of vancomycin minimum inhibitory concentration. *Clin Infect Dis*,55(10):1329–37.

CLSI. (2016). Performance standards for Antimicrobial susceptibility testing, 26<sup>th</sup> international supplements. CLSI Document M100-S. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Crossley KB, Jefferson KK, Archer G, Foulter VG.(2009). *Staphylococci in human disease*. 2nd Edition. Wiley-Blackwell.

Cruz A., Rodríguez N., Rodríguez C. (2010). IN VITRO EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* and *Silybum marianum*. *Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient*. 13 (2): 117-124.

Curado, M., Oliveira, C., Jesús, J., Santos, S., Seraphin, J., Ferri, P., *Phytochemistry* (2006), 67, 2363–2369.

De Leo FR, Diep BA, Otto M. (2009). Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin North Am*; 23: 17-34

De Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. (2007). Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptative power. *Curr Opin Microbiol*; 10: 1-8.

Deresinski S. (2009). Vancomycin in combination with other antibiotics for the treatment of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Infect Dis.*; 49(7):1072-9.

Deresinski S. (2005) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolutionary, Epidemiologic and Therapeutic Odyssey. *Clin Infec Dis*; 40:562-73.

Deresinski S. (2007). Counterpoint: Vancomycin and *Staphylococcus aureus*—an antibiotic enters obsolescence. *Clin Infect Dis*; 44:1543–8.

Diep BA, Otto M. (2008). The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol*; 16(8):361-9.

Dinges MM, Orwen PM, Schlievet PM. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*; 13: 16-34.

Dombrowski JC, Winston LG. (2008). Clinical failure of appropriately treated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect.* 57:110-5.

Drlica K, Zhao X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*; 61:377-92. 5.

Fernández A., Trueba B., Toledo N., Casal A. (2015). Resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina en aislamientos nosocomiales en un hospital provincial. *Gaceta Medica Espirituana*, Vol. 17, No.3 ISSN 1608-8921.

Fernández S, de Vedia L, López Furst MJ, Gardella N, Di Gregorio S, Ganaha MV. 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. *Infect Gen Evol.* 14:401-5.

Fowler VC, Miró JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E. 2005. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA*; 293:3012-21.,

Fu J, Ye X, Chen C, Chen S. The efficacy and safety of linezolid and glycopeptides in the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. PLoS One. 2013;8(3):e58240.

Garnica M, Nouer SA, Pellegrino FL, Moreira BM, Maiolino A, Nucci M. (2013). Ciprofloxacin prophylaxis in high risk neutropenic patients: effects on outcomes, antimicrobial therapy and resistance. BMC Infect Dis.;13(1):356

García C., Martínez A., Ortega J., Castro F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. Química Viva. 9(2), pp 86-96.

Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S. (2005). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. J Clin Invest 2005; 115:3117–27.

Gómez L., Núñez D., Perozo A., Bermúdez J., Marín M. (2016). Multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* in a Maracaibo's hospital, Venezuela. Kasmera 44(1): 53 – 65.

Golan Y. (2015). Empiric therapy for hospital-acquired, Gram-negative complicated intra-abdominal infection and complicated urinary tract infections: a systematic literature review of current and emerging treatment options. BMC infectious diseases;15:313.

Graveson R.(2003) Farmacopea Vegetal Caribeña [serie en internet]. 2003; [2012 junio 28]; [alrededor de 1 página]. Disponible en: [http://www.Eucalipto\\_eucaliptus %20 spp.pdf- adobe reader](http://www.Eucalipto_eucaliptus %20 spp.pdf- adobe reader)>

Grundmann H, Aires-De-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public health threat. Lancet; 368:874-85.

Hassani, Abbas et al. (2012). Evaluation of Plant Essential Oils for Control of Postharvest Brown and Gray Mold Rots on Apricot.” Journal of Food Safety 32(1):94–101.

Helling RB, Janes BK, Kimball H, Tran T, Bundesmann M, Check P. 2002. Toxic waste disposal in Escherichia coli. J Bacteriol; 184:3699-703.

Henao S., Martínez J., Pacheco N., Marín J. (2011). Actividad bactericida de extractos acuosos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown contra *Helicobacter pylori*. Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología.

Herrera F., Santos J. (2015). Presencia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes en queso doble crema artesanal. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 18(1): 29-37.

Herrera M., Artunduaga J., Ortiz C., Torres G. (2017). Síntesis de nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con antibióticos y su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Biomédica; 37:11-21.

Hernández I, Toraño G, González M, González I. 2003. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina: detección de portadores entre niños hospitalizados y niños sanos de la comunidad. Rev Cubana Med Trop; 55(3): 153-161.

Hooper DC. (1998). Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. Clin Infect Dis; 27(Suppl 1 : ) S54-S63. 6.

Horna Q., Díaz M., Taboada W., Tamariz J. (2005). Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration of ciprofloxacin in uropathogens isolated at Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Rev Med Hered 16 (1).

Howden BP., Davies JK., Johnson PDR., Stinear TP., Grayson ML. (2010). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev; 23:99-139.

Jung YJ, Koh Y, Hong SB, Chung JW, Ho Choi S, Kim NJ. (2010). Effect of vancomycin plus rifampicin in the treatment of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. Crit Care Med; 38(1):175-80.

Kalembe D. and Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry. 10(10), pp 813-829.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. (2000). A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother; 44(6):1549-55.

Klevens R., Morrison M., Nadle J., Petit S., Gershman K., Ray S., Craig A. (2007). Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 298 1763-1771.

Kloss WE, Schleir KH, Goirtz F.1992. The genus *Staphylococcus*. In: Balows A, Truper HG, Dwoekin M, eds. The Prokaryotes, 2nd Ed. New York, Springer-Verlag.



Kloss We, Bamerman TL. 1995. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murra PR, Baron EJ, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington DC: ASM PressM.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet; 357: 1225-1240.

Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y. (2007). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science; 315(5815):1130-33.

Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ. 2011. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. Clin Infect Dis; 52 (3):18-55.

López Furst MJ, de Vedia L, Fernández S, Gardella N, Ganaha C, Prieto S. (2013). Prospective multicenter study of community-associated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Buenos Aires, Argentina. PLoS ONE; 8(11).

Lujan A. M., Sierra F., Uribe R. J., Benavides M., Calle L. F. (2013). *Staphylococcus Aureus* meticilina resistente adquirido en la comunidad en la ciudad de Cartagena. Universidad de Cartagena.

Marino M., Bersani C., Comi G.(2001). Int J Food Microbiol 67(3): 187-95. Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martínez J.R. J. (2004). Chromatogr. A 1025:93-103.

Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet; 351:797-9.

Marqués C., Codony F., Agustí G., Laheraa C. (2017). Visible light enhances the antimicrobial effect of some essential oils María Soledad. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 17.180–184.

Medeiros H., De Lima I., Coelho K., Reis L., Almeida R., Cavalcantidos B., Melo H., Lira A., Freire M., Lopes A., Dantas A. (2014). Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. European Journal of Integrative Medicine 6. 560–564.

Medizzine. Portal hispano de medicina y medicamentos. Disponible en: <http://www.medizzine.com/plantas/eucalipto.php>.

Montoya I., Mira M., Álvarez I., Cofré J., Cohen J., Donoso G., Torres J. (2009). Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Rev Chil Pediatr., 80 (1): 48-53.

Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS. (2009). The arginine catabolic mobile element is not associated with enhanced virulence in experimental invasive disease caused by the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genetic background. Infect Immun; 77:2650.

(MSPS) Ministerio de Salud y Protección Social. (2013). RESOLUCIÓN 2674 DE 2013 (Julio 22).

(MSPS) Ministerio de Salud y Protección Social. (2005). RESOLUCIÓN 5107 DE 2005.

(MSPS) Ministerio de Salud y Protección Social. (2004). DECRETO 3553 DE 2004.

(MSPS) Ministerio de Salud y Protección Social. (1995). DECRETO NÚMERO 677 DE 1995 (abril 26).

O'leary, N., Denham, S., Salimena, F, and Mulgura, M. (2011). Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (*Verbenaceae*) using the phylogenetic species concept. Botanical Journal of the Linnean Society. 170(1), pp 197- 219.

Oliveira D., Leitao, Bizzo; H., Lopes D., Alviano, D. Alviano C.,Leitao, S. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K, Food Chemistry, 101, pp 236-240.

Olivero J., Guette J., and Stashenko E. (2009). Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oil isolated from plants of the genus *Lippia* and Piper collected in Colombia. Boletín latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 8 (5), pp 419-427.

Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sa´ nchez, D., Villar, A., J. Ethnopharmacol. (2001), 76, 73–99.

Pascual M.E., Slowing K., Carretero E., Sanchez M.D., Villar A. (2001) Journal of Ethnopharmacology 76: 201-214.

Peris, S. y Asensio, J. (2002). Organic acids plus botanicals. Feed International. 3, pp17-19.

Ponce, A. G., R. Fritz, C. Del Valle, and S. I. Roura. (2003). "Antimicrobial Activity of Essential Oils on the Native Microflora of Organic Swiss Chard." *LWT - Food Science and Technology* 36(7):679–84.

Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanita`, Rome, Italy. *Pathogens and Global Health* Vol. 109 N° 7.

Ramírez LS, Marín D. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos utilizando métodos de difusión en agar y dilución en pozo. *Scientia et Technica*.12 (50): 152-157.

Requena M, De Passos A, Rondón R, Tedesco A, Padrón D, Pérez y J. Mata. (2005). *Staphylococcus aureus*: Portadores nasales en estudiantes de enfermería. Escuela de Ciencias de la Salud. Universidad de Oriente – Edo. Bolívar. Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Sucre XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología "Dr.

Ribera A, Doménech-Sánchez A, Ruiz J, Benedi VJ, Jiménez de Anta MT, Vila J. (2002). Mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiological unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Microb Drug Resist*; 8:245-51.

Rincón S., Panesso D., Diaz L., Carvajal L., Reyes J., Munita J., Arias C. (2014). Resistance to "last resort" antibiotics in Gram-positive cocci: The post-vancomycin. University of Texas Medical School at Houston, Houston, TX, USA. *Biomédica*. 34(0 1): 191–208.

Roche FM, Massey R, Peacock SJ. (2003). Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology*; 149: 643-654.

Ruhe JJ, Menon A. (2007). Tetracyclines as an oral treatment option for patients with community onset skin and soft tissue infections caused by methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 51(9):3298-303.

Sánchez M., Hernández O., Velásquez L., Rivas D., Marín A., González L., Duque C. (2013). Caracterización del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de tres grupos poblacionales de la ciudad de Medellín. *Infectio*. 17(2):66–72.

Sánchez, P. (2011). "Encapsulación de aceite esencial de clavo para su aplicación en la industria alimentaria." Universidad Católica San Antonio, Murcia-España.

Salgueiro L.R., Cavaleiro C., Gonçalves M.J.,A.(2003). P.D.C. Planta Med. 69(1): 80-83.

Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica (2000). Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.

Senatore, F., Rigano D. (2001). Essential oil of two *Lippia spp* (*Verbenaceae*) growing wild in Guatemala, Flavour Fragr. 16; (3), 169- 171.

Sondi I, Sondi S. (2004). B: Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci, 275:177-182.

Sreedharan S., Oran M., Jensen B., Peterson L., Fisher M. (1990). DNA Gyrase gyrA Mutations in Ciprofloxacin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*: Close Similarity with Quinolone Resistance Mutations in *Escherichia coli*. Journal of bacteriology, Dec., p. 7260-7262.

Stashenko E., Martínez J., Ruiz C., Arias G., Duran C., Salgar W., Cala M. (2010). *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Sep. Sci.* 33, 93–103.

Stashenko, E., Ruiz, C., Muñoz, A., Castañeda, M., Martínez, J. R. (2008). *Nat. Prod. Commun.* 3, 563–566.

Tamariz J., Cruz J., Atencia A., Figueroa J., Horna G., Guerra H. (2009). Resistencia a clindamicina inducida por eritromicina en *Staphylococcus aureus* aislados de tres hospitales de Lima, Perú. *Acta Med Per* 26(1)

Thembo K., Vismer H., Nyazema N., Gelderblom W., Katerere D.(2010). Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. *Journal of applied microbiology.*109 (1), pp 1479- 1486.

Tintino S., Oliveira-Tintino C., Campina F., Costa M., Cruz R., Pereira R., Andrade J., Sousa E., J.P. Siqueira J., Coutinho H., Leal-Balbino T., Balbino V. ( 2017). Cholesterol and ergosterol affect the activity of *Staphylococcus aureus* antibiotic efflux pumps. *Microbial Pathogenesis* 104 (2017) 133-136.

Tobeña M, Coll F, García C, Bartolomé R, Moraga F. (2009). Fascitis necrosante por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad productor de leucocidina de Panton-Valentine. *An Pediatr (Barc)*; 70(4):374–8.

Tsuji BT, Rybak MJ. (2005). Short-course gentamicin in combination with daptomycin or vancomycin against *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacodynamics model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother.*; 49:2735–45.

Vicuña G., Stashenko E., Fuertes J. (2009). Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin- induced DNA damage. *Fitoterapia.* 81, pp 343-349.

Villalobos A., Barrero L., Rivera S., Ovalle M., Valera D. (2014). Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia, *Biomédica*, Vol. 34.

Vivoni A, Meurer MB. (2005). Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution-A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 100: 693-98.

Wang R, Braughton KR, Kretschmer D. (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med*; 13:1510–14.

Wardenburg JB, Bae T, Otto M, Deleo FR, Schneewind O. (2007). Poring over pores: alphahemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med*; 13:1405–6.

Watts A, Ke D, Wang Q, Pillay A. (2005). *Staphylococcus aureus* Strain that express serotype 5 or serotype 8 capsular polisaccharides differs in virulence. *Infect Immun*; 73: 3502-3511.

WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. (2015). Disponible en: [http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist\\_OMS\\_estrategia\\_mundial\\_resumen.pdf](http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_resumen.pdf).

Wunderink R,G, Rello J, Cammarata SK, Croos-Dabrera RV, Kollef MH. (2003). Linezolid vs vancomycin: analysis of two double-blind studies of patiente with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia. *Chest*; 124:1789-97.

Wunderink RG. (2013). How Important is Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* as a Cause of Community-Acquired Pneumonia and What is Best Antimicrobial Therapy Infect Dis Clin North Am;27(1):177-88.

Yáñez X., Cuadro O. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). Grupo de Investigación en Productos Verdes (GPV), Universidad de Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. (1):52-61.

Zendejas G., Avalos H., Soto M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, México. Rev Biomed; 25:129-143.

## 12. ANEXOS

**Anexo 1.** Registro fotográfico de la participación en la Feria de los Microorganismos 2017, organizada por el Departamento de Microbiología (Pamplona, Norte de Santander).



