
IDENTIFICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y SU EFECTO EN *Staphylococcus aureus*

Helena Pérez Cantero

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutora académica: Dra. Dania García Sánchez (Departamento de Ciencias
Médicas Básicas, danial.garcias@urv.cat)



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, Julio 2020

Jo, "Helena Pérez Cantero", amb DNI "48137364-C", sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 10 de juliol de 2020

(signatura)

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Helena". The signature is stylized with a large, sweeping initial 'H' and a long, horizontal stroke extending to the right.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	1
Abreviaturas	2
1 Introducción	3
1.1 Relevancia clínica de las infecciones nosocomiales	3
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.3 Antibióticos y mecanismos de resistencia en <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.3.1 Resistencia a la penicilina.....	9
1.3.2 Resistencia a la metilina	9
1.3.3 Resistencia a las quinolonas.....	10
1.3.4 Resistencia a la vancomicina	11
1.3.5 Resistencia a otros antibióticos.....	12
1.4 Aceites esenciales	12
2 Interés, hipótesis y objetivos de trabajo	15
3 Metodología y plan de trabajo	15
4 Resultados y discusión.....	17
4.1 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	19
4.1.1 Método de dilución en caldo	19
4.1.2 Método de dilución en agar	21
4.2 Composición de los aceites esenciales y actividad frente <i>Staphylococcus aureus</i>	21
4.3 Acción de los aceites esenciales frente los mecanismos de resistencia y virulencia..	24
4.3.1 Permeabilidad y disrupción de la membrana celular.....	25
4.3.2 Inhibición bombas de flujo.....	26
4.3.3 Inhibición de la formación del biofilm y quorum sensing	27
4.4 Combinación de aceites esenciales y antibióticos	27
4.4.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la combinación aceites esenciales y antibióticos	28
4.4.2 Combinación de aceites esenciales y antibióticos frente <i>Staphylococcus aureus</i> ..	30
4.5 Combinación aceites esenciales con nanomateriales o nanoencapsulación.....	31

4.6	Desafíos para el uso clínico de los aceites esenciales	32
5	Conclusiones	34
6	Bibliografía	35
7	Autoevaluación	41
8	Agradecimientos	41
9	Anexos	42
9.1	Anexo 1. Selección bibliográfica de aceites esenciales con efecto antibacteriano frente <i>Staphylococcus aureus</i>	42
9.2	Anexo 2. Selección bibliográfica de aceites esenciales combinados con antibióticos y su efecto frente <i>Staphylococcus aureus</i>	45

RESUMEN

El incremento de la resistencia a los antibióticos es una problemática actual de gran repercusión clínica y de enorme impacto económico, con una marcada incidencia en las infecciones nosocomiales. A consecuencia del prolongado e indiscriminado uso de antibióticos, han surgido nuevos tipos de resistencia en una gran multitud de especies microbianas, entre las cuales de mayor impacto se encuentra *Staphylococcus aureus*.

Debido a la baja efectividad de los antibióticos actuales y a la ausencia de nuevas formulaciones efectivas, es de imperiosa necesidad encontrar nuevos fármacos antimicrobianos que puedan sustituir los antibióticos inefectivos. En este sentido uno de los principales campos de investigación se focaliza en la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana a partir de aceites esenciales de origen vegetal que puedan constituir una alternativa a los antibióticos comerciales.

Motivado por esta realidad, en este trabajo se propone realizar una revisión sobre el efecto de diferentes aceites esenciales sobre *S. aureus* y los principales avances en este campo. Se conoce una gran variedad de especies vegetales cuyos aceites esenciales han demostrado actividad antimicrobiana frente ciertas cepas de *S. aureus*, pero se conoce poco sobre los mecanismos de acción de estas sustancias sobre la célula bacteriana. En este trabajo se resumen los principales mecanismos de acción postulados y se muestra lo que se conoce en cuanto a su composición. Se ofrece además una comparación de los resultados prometedores obtenidos *in vitro* frente *S. aureus* de los aceites esenciales con acción antimicrobiana.

Entre las principales actividades de los aceites esenciales se encuentra el efecto antimicrobiano sobre *S. aureus* o su acción moduladora sobre los antibióticos cuando ambos productos actúan de forma sinérgica, es decir potenciando su efecto. No obstante, los aceites esenciales presentan ciertas debilidades que impiden su consideración efectiva como terapia clínica alternativa, es por ello por lo que también se incluye una revisión sobre las principales alternativas para mejorar la estabilidad química de estos compuestos y propiciar su liberación controlada, mediante la encapsulación con nanomateriales.

Keywords: Essential oils, antimicrobial, *Staphylococcus aureus*, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), synergism.

ABREVIATURAS

- ❖ **CLSI** - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- ❖ **ECDC** - *European Centre for Disease Prevention and Control*
- ❖ **ADN** - *Ácido desoxirribonucleico*
- ❖ **ATCC** - *American Type Culture Collection*
- ❖ **ATP** - *Adenosine triphosphate*
- ❖ **CA-MRSA** - *Community-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
- ❖ **EPINE** - *Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España*
- ❖ **EUCAST** - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- ❖ **FDA** - *Food and Drug Administration*
- ❖ **FIC** - *Fractional Inhibitory Concentration*
- ❖ **GRAS** - *Generally Recognized As Safe*
- ❖ **HA-MRSA** - *Health-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*
- ❖ **hVISA** - *hetero Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus*
- ❖ **MDR** - *Multidrug resistant*
- ❖ **MEP** - *2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate*
- ❖ **MFS** - *Major Facilitator Superfamily*
- ❖ **MIC** - *Minimum Inhibitory Concentration*
- ❖ **MRSA** - *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*
- ❖ **NCTC** - *National Collection of Type Cultures*
- ❖ **OMS** - *Organización Mundial de la Salud*
- ❖ **PBP** - *Penicillin-Binding Proteins*
- ❖ **RT-PCR** - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
- ❖ **SEMPSPH** - *Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene*
- ❖ **VISA** - *Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus*
- ❖ **VRSA** - *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus*

1 INTRODUCCIÓN

1.1 RELEVANCIA CLÍNICA DE LAS INFECCIONES NOSOCOMIALES

Las infecciones nosocomiales son infecciones adquiridas durante el periodo de ingreso en un hospital, que no se encontraban presentes antes del ingreso del paciente. Según los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 1,4 millones de pacientes en el mundo contraen infecciones nosocomiales durante su permanencia en hospitales y se estima que entre el 5 y el 10% del total de pacientes ingresados contraen una o más infecciones. En España alrededor del 8% de los pacientes hospitalizados sufren infecciones de este tipo, lo que repercute en el tiempo de estancia hospitalaria y la prolongación de este período tiene como consecuencia el incremento de los costes sanitarios, la morbilidad y la mortalidad (1).

Según Flores y col. (1), entre los principales factores que influyen en el desarrollo de una infección nosocomial se encuentran:

- ❖ **Capacidad patogénica del agente microbiano.** Es la capacidad del microorganismo para provocar una infección mediante sus mecanismos de virulencia, su concentración en el ambiente y su resistencia a los tratamientos terapéuticos.
- ❖ **Vulnerabilidad del paciente.** Este factor está relacionado con las características intrínsecas del paciente como la edad, el procedimiento quirúrgico al que fuese sometido, posibles patologías subyacentes, su estado inmunitario, entre otras.
- ❖ **Factores ambientales.** Estos factores se vinculan con el reservorio, la fuente y el vehículo de transmisión del patógeno. Influyen, por tanto, en el estado de equilibrio/disbiosis de la microbiota del paciente, y entre ellos se encuentran las condiciones de salubridad en fómites hospitalarios, así como el estado del personal sanitario en contacto con el paciente.
- ❖ **Resistencia de los patógenos a los fármacos.** Se define como la presencia de agentes infecciosos que carecen de tratamiento específico efectivo, para los cuales los fármacos disponibles o de elección resultan ineficaces.

A partir de programas de vigilancia epidemiológica impulsados por autoridades sanitarias globales, es posible obtener datos que ayudan a la comprensión e intervención necesarias para el control y disminución de las infecciones nosocomiales. En España, estos datos son recogidos dentro del programa Estudio de Prevalencia de Infección Nosocomial (EPINE) realizado por la Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene (SEMPSPH) (1,2).

Tal como se observa en la Figura 1, los patógenos microbianos más frecuentes en infecciones nosocomiales, según los datos del informe EPINE 2019, son las especies bacterianas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (2).



Figura 1. Frecuencia relativa (expresada en porcentaje) de microorganismos aislados en infecciones asociadas a la asistencia sanitaria. Datos extraídos del informe EPINE-EPPS 2019 (2).

1.2 *Staphylococcus aureus*

En la actualidad, *Staphylococcus aureus* es una de las principales bacterias responsables de infecciones nosocomiales y comunitarias. Puede causar afectaciones leves en la piel u otros tejidos blandos, o infecciones más graves como endocarditis infecciosa, osteomielitis, infección pleuropulmonar, bacteriemia y neumonía mortal (3,4).

Esta especie fue descubierta por el médico Alexander Ogston en 1880 en las llagas ulcerosas de sus pacientes (3). Taxonómicamente, *S. aureus* pertenece al filo de las Firmicutes caracterizado por ser un coco Gram positivo de aproximadamente 0,8 μm de diámetro y que forma agrupaciones en racimos (bacterias estafilococáceas) tal como se muestra en la Figura 2. El crecimiento óptimo de esta especie es a 37°C y pH 7,4, unas condiciones que son semejantes a las del cuerpo humano (3), por ello es común encontrar *S. aureus* colonizando la piel y las fosas nasales en aproximadamente el 30% de los humanos sin que se produzca sintomatología, aunque pueda causar infecciones oportunistas en otras zonas del cuerpo humano (4,5).

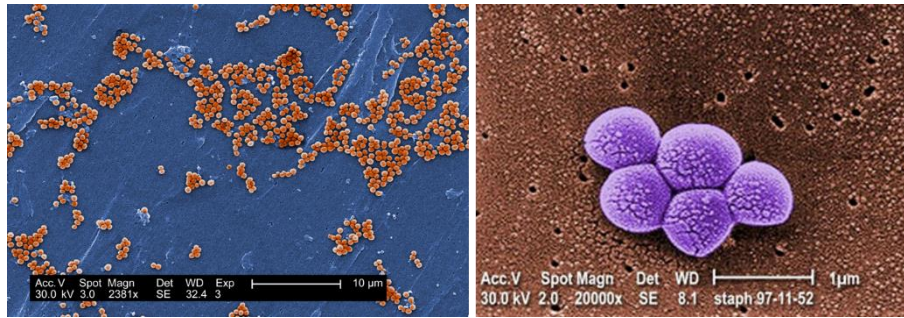


Figura 2. Imágenes de *S. aureus* tomadas por microscopía electrónica de barrido, donde se puede observar la morfología y agrupación de las colonias. Las imágenes han sido coloreadas digitalmente. Extraídas de *Public Health Image Library – CDC* (6).

1.3 ANTIBIÓTICOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *Staphylococcus aureus*

Los mecanismos de acción de los principales antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* son: la interferencia en la biosíntesis de la pared celular (como por ejemplo la penicilina, la metilicina, la vancomicina), la inhibición de la síntesis proteica en la unidad 30S o 50S (como por ejemplo las tetraciclinas, el cloranfenicol o las oxazolidinonas) o la interferencia en la biosíntesis de ácidos nucleicos (como por ejemplo las quinolonas) (7).

La resistencia antibiótica se define como la capacidad de un microorganismo a tolerar la acción de uno o más agentes antimicrobianos (5). Es justamente por esta característica que es necesario establecer los puntos de corte clínico (*breakpoint*) que permiten anticipar tratamientos efectivos para los pacientes y que además son útiles para categorizar las cepas bacterianas en susceptibles o resistentes a determinados antibióticos. Los *breakpoints* son obtenidos a partir de datos proporcionados por organismos competentes reconocidos como el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) o el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (7). Los datos sobre los que se basan los puntos de corte vienen determinados por los valores de la concentración inhibitoria mínima (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) del antibiótico para cada cepa. Los valores de MIC se definen como la concentración más baja del antibiótico o agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento visible del microorganismo (8,9). Con el fin de caracterizar la sensibilidad de una cepa bacteriana frente a un antibiótico se compara la concentración mínima inhibitoria (MIC) del antibiótico con el *breakpoint* definido para ese antibiótico de uso clínico (7). Si la MIC es menor o igual al *breakpoint*, la bacteria se considera sensible al antibiótico, si por el contrario la MIC es mayor a este valor, la bacteria se considera con sensibilidad intermedia o resistente al antibiótico (7). En la Tabla 1 se muestran los principales antibióticos de uso terapéutico contra *S. aureus* y sus puntos de corte clínico.

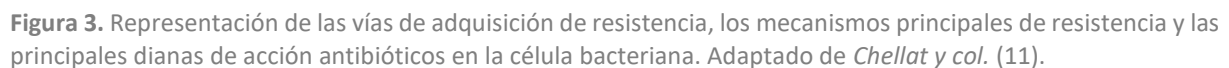
Tabla 1. Ejemplos de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* y sus *clinical breakpoints*. Datos extraídos del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* 2020 (10).

Antibiótico	Clase	Breakpoint (mg/L)	
		Sensible	Resistente
Ceftaroline	Cefalosporina	≤ 1	> 2
Dalbavancin	Lipoglucopeptido	≤ 0.125	> 0.125
Daptomicina	Lipopeptido	≤ 1	> 1
Delafoxacina	Fluoroquinolona	≤ 0.25	> 0.25
Linezolid	Oxazolidinona	≤ 4	> 4
Meticilina	β-lactámico	-	-
Oritavancin	Lipoglucopeptido	≤ 0.125	> 0.125
Penicilina	β-lactámico	-	-
Rifampicina	Otros	≤ 0.06	> 0.5
Tedizolid	Oxazolidinona	≤ 0.5	> 0.5
Telavancin	Lipoglucopeptido	≤ 0.125	> 0.125
Tigecycline	Tetraciclina	≤ 0.5	> 0.5
Vancomicina	Glucopéptido	≤ 2	> 2

Las terapias disponibles en ocasiones son ineficientes debido a la aparición de cepas multi-resistentes. La evolución de las cepas resistentes es un fenómeno natural que se produce por la presión de selección del antibiótico sobre la población de microorganismos. Como se muestra en la Figura 3, existen cinco objetivos principales para los antibióticos, y la resistencia a los antibióticos puede adquirirse esencialmente a través de cuatro vías diferentes y expresarse por cuatro mecanismos diferentes (11).

Uno de los mecanismos más probables para la adquisición de multi-resistencia antibiótica en *S. aureus* proviene de la incorporación de material genético móvil a través de la transferencia horizontal. Esta nueva información genética supone para la cepa ventajas evolutivas frente a otras ya que implicaría la adquisición de nuevos mecanismos de protección contra los posibles compuestos inhibitorios de otros competidores en el ambiente. Entre otros mecanismos de adquisición genética se encuentran la transferencia vertical, por la aparición de mutaciones que se transfieren de una generación a otra; conjugación por plásmidos y elementos móviles genéticos (integrones y transposones), o por transducción a través de bacteriófagos. De esta forma, la resistencia se podría transmitir a otra especie u otros géneros bacterianos (11).

Los mecanismos de resistencia de los antibióticos se encuentran agrupados en categorías según como su modificación impide la acción del fármaco: alteración de los sitios de unión moleculares de los fármacos por lo que se impide la entrada en el interior celular, aumento de la expresión de las bombas de eyección capaces de transportar el antibiótico al exterior celular, producción de enzimas que catalizan la hidrólisis de los antibióticos o la modificación de la diana de acción del fármaco siendo este incapaz de llevar a cabo su acción efectora (3,7).



A partir del aislamiento de cepas de *S. aureus* procedentes de diferentes tipos de infecciones y su posterior caracterización en cuanto a la susceptibilidad a la meticilina, se ha podido llegar a saber el grado de incidencia de las cepas resistentes a este antibiótico (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* o MRSA) respecto a las cepas convencionales y sensibles. En Europa el porcentaje ponderado de las infecciones por MRSA en el 2018 representó el 16,4 % del total de los casos de infección por *S. aureus*, aunque estos porcentajes son significativamente variables dependiendo de los países. Por ejemplo, la menor incidencia se observó en Islandia y Noruega (menor al 1%), mientras que el mayor

número de casos se encontró en Rumanía (43,0 %). En España esta incidencia estuvo muy por encima de la media europea, representando un 24,2 % de los casos (5).

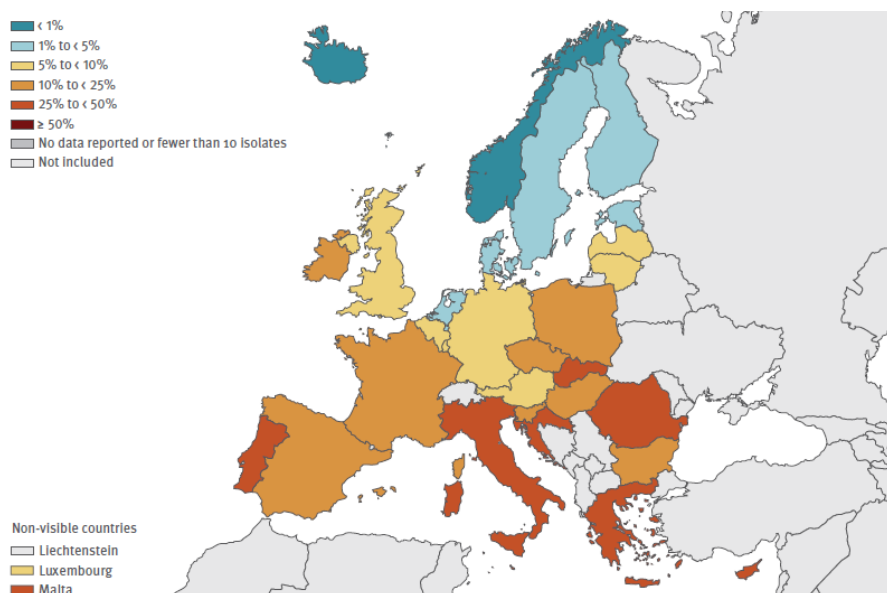


Figura 4. Porcentajes de aislados de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina en 2018 en territorio europeo. Imagen extraída de *Ecdc - Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018* (5).

Por otra parte, además de las cepas resistentes a la meticilina, en la actualidad se reportan cepas con resistencias a otros antibióticos β -lactámicos (fluoroquinolonas y rifampicina) o con resistencia combinada para al menos 3 antibióticos diferentes. Como se muestra en la Tabla 2, la resistencia a dos grupos de agentes antimicrobianos es más común que la resistencia a un único antibiótico, siendo el grupo más prevalente el de la resistencia combinada a la meticilina y las fluoroquinolonas.

Tabla 2. Número total de aislados patogénicos y porcentajes de resistencia por fenotipo en países europeos 2018. Adaptado de *“Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018”* (5).

Patrón de resistencia	Número de aislados	Porcentaje total (%)
Resistencia a 1 grupo antimicrobiano (Total)	4495	8,3
Meticilina	1353	2,5
Fluoroquinolonas	2927	5,4
Rifampicina	215	0,4
Resistencia a 2 grupos antimicrobianos (Total)	5705	10,5
Meticilina + fluoroquinolonas	5643	10,4
Otras combinaciones	62	0,1
Resistencia a 3 grupos antimicrobianos (Total)	254	0,5
Meticilina + fluoroquinolonas + rifampicina	254	0,5
Susceptibles (Total)	43681	80,7

1.3.1 Resistencia a la penicilina

Desde el descubrimiento de la penicilina G, esta es utilizada como un antibiótico potente contra bacterias Gram-positivas, sobre todo contra infecciones por estafilococos (12). Para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* son utilizados los antibióticos del grupo de los β -lactámicos (penicilina, meticilina, cefalosporinas, carbapenemas, etc.). Este grupo de moléculas son agentes bactericidas que tienen como diana una proteína de unión a la penicilina (*Penicillin Binding Protein* o PBP). Las proteínas PBP son enzimas que intervienen en la formación de la pared de peptidoglicano tanto de las bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Estos antibióticos forman uniones covalentes con el PBP, lo que provoca la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, provocando así la muerte celular. Cada especie bacteriana tiene su propio conjunto de PBP que puede variar entre tres a ocho enzimas por especie y es por ello que existen diferentes grados de sensibilidad a los β -lactámicos (12,13).

A pesar de su gran potencial, la resistencia a la penicilina fue descrita por el propio Fleming al evidenciar la presencia de colonias bacterianas (*Escherichia coli*) no inhibidas en sus experimentos (13). Poco tiempo después este fenómeno fue descrito en *S. aureus* y tan solo dos décadas después de la introducción de este antibiótico, más del 80% de los aislados de esta especie presentaban resistencia a la penicilina. Numerosos estudios han evidenciado que las cepas de *S. aureus* resistentes poseen enzimas penicilinasas, metabolitos secundarios cuya síntesis se activa en presencia de betalactámicos (13), y tienen actividad β -lactamasa que provoca la ruptura del anillo β -lactámico de la estructura de la penicilina e inactiva la acción del antibiótico (12). Estas enzimas están codificadas por el gen *blaZ*, localizado en un plásmido que se transfiere eficientemente por transducción o conjugación (13). La aparición y propagación de la resistencia por efecto de la penicilinasa en *S. aureus* supuso la primera ola de resistencia en la década de 1960 y a principios del siglo XXI más del 90% de los aislados de estafilococos producían penicilinasa, independientemente de su origen comunitario u hospitalario (12).

1.3.2 Resistencia a la meticilina

Para poder tratar las cepas resistentes a penicilina, se introdujo en 1961 la meticilina, una penicilina semisintética estable ante las penicilinasas. A pesar del gran avance, en menos de un año se reportaron las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (*Methicilin resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), cosa que dio lugar a un aumento de infecciones por MRSA en hospitales, provocando la segunda ola de resistencia de *S. aureus* a los betalactámicos (12).

Staphylococcus aureus adquiere resistencia a la meticilina y otros β -lactámicos a través de la expresión de los genes exógenos (adquiridos por transferencia horizontal) *mecA* o *mecC* a partir de un elemento genético móvil de 21–60 KB del cassette de estafilococos (SCCmecA). Estos genes codifican una

variante de la proteína de unión a la penicilina PBP2' (PBP2a) con baja afinidad por los betalactámicos y capaz de sustituir la función de las demás proteínas de unión a los antibióticos, impidiendo así la unión y la inhibición de la síntesis de la pared celular por parte de los antibióticos β -lactámicos (5,12).

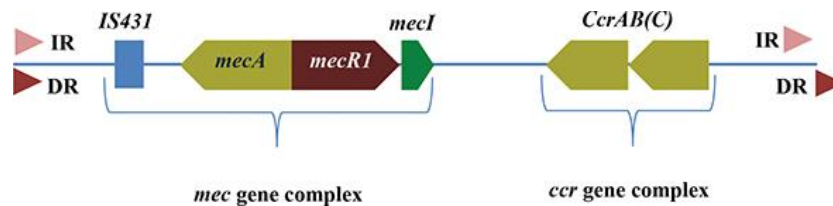


Figura 5. Estructura básica del SCCmec. El complejo del gen *mec* codifica la PBP2a (gen *mecA*) y los reguladores de resistencia (*mecI* y *mecR1*). El complejo del gen *ccr* codifica la integración y escisión del elemento SCC. El cassette se encuentra flanqueado por secuencias nucleotídicas características, repeticiones invertidas (IR) y repeticiones directas (DR), en ambos extremos. Extraído de Gnanamani y col. (12).

La tercera ola de resistencia a los betalactámicos en *S. aureus* se produjo cuando las infecciones por MRSA no se limitaban a centros hospitalarios y se aislaban de casos comunitarios en los años 90. Esto dio lugar a la distinción entre infecciones MRSA comunitarias (*community-associated* MRSA, CA-MRSA) y hospitalarias (*health-associated* MRSA, HA-MRSA) ya que tanto genéticamente como fenotípicamente eran distintas (12).

1.3.3 Resistencia a las quinolonas

Las quinolonas son antibióticos utilizados en el tratamiento de bacterias Gram-negativas, aunque las quinolonas de tercera (levofloxacina) y de cuarta generación (moxifloxacina y gemifloxacina) muestran también actividad frente bacterias Gram-positivas. Las quinolonas ejercen su acción antibacteriana inhibiendo las topoisomerasas bacterianas (topoisomerasa IV y ADN Girasa) esenciales para aliviar el superenrollamiento del ADN y la separación de las cadenas de ADN en la replicación (12).

La resistencia a las quinolonas en *S. aureus* surge por mutaciones puntuales en la subunidad GrlA de la topoisomerasa IV y en la subunidad GyrA de la girasa. Otro mecanismo adicional de aparición de resistencias a las quinolonas en *S. aureus* es por expresión de las bombas de eyección NorA (12). La resistencia a las quinolonas en esta especie se asocia principalmente con la resistencia a la meticilina, relacionado con su uso intrahospitalario. Esto podría deberse a una mayor prevalencia de HA-MRSA en este entorno, lo que resulta en la selección y propagación de la resistencia a las quinolonas. Debido al alto nivel de resistencia a estos antibióticos entre las cepas HA-MRSA, las quinolonas de tercera y cuarta generación no han sido consideradas para el tratamiento del MRSA (12).

1.3.4 Resistencia a la vancomicina

La vancomicina es un antibiótico del grupo de los glicopéptidos, aislado de *Streptomyces orientalis* en 1952. Su uso clínico fue aprobado en 1958, pero no considerado para el tratamiento de infecciones por *S. aureus*, debido a la aparición simultánea de la metilina y otras penicilinas consideradas menos tóxicas. No fue hasta 1980 cuando, debido a la aparición de HA-MRSA, la vancomicina empezó a usarse de forma normalizada para el tratamiento de infecciones por estafilococos (12). La actividad antibacteriana de la vancomicina está mediada por su unión al residuo C-terminal D-Ala-D-Ala del precursor del peptidoglicano, y la formación de un complejo no covalente, por lo que impide el uso del precursor de peptidoglicano en la síntesis de la pared celular bacteriana (12).

Las cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina (*Vancomycin resistant Staphylococcus aureus*, VRSA) portan copias del transposón Tn1546 adquirido de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina. El transposón codifica la deshidrogenasa VanH y la ligasa VanA. La deshidrogenasa reduce el piruvato a D-Lac y la ligasa cataliza la formación de un enlace éster entre D-Ala y D-Lac, dando lugar a un depsipéptido que sustituye al dipéptido D-Ala-D-Ala en la síntesis de peptidoglicano, y en consecuencia disminuye la afinidad de la molécula por la vancomicina (12).

Los puntos de corte para vancomicina se establecieron para MIC mayores a 8mg/L (*breakpoint*), se considera que cepas de *S. aureus* que superan estos valores son resistentes a la vancomicina (12). En este contexto, la aparición de resistencia en *S. aureus* frente a la vancomicina se reportó por primera vez en 1997, en una cepa de pared celular más gruesa y con resistencia reducida se le denominó VISA (*vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*, VISA). Posteriormente, hubo más informes de infecciones clínicas por cepas MRSA con una sensibilidad disminuida a la vancomicina con un rango de MIC de 4–8 mg/L a las que se nombraron hetero VISA (hVISA) (12).

La base genética de la aparición de cepas VISA parece compleja, pero se han identificado mecanismos basados en mutaciones de los genes involucrados en el control de la biosíntesis de la pared celular bacteriana y/o mutaciones en el gen ribosómico *rpoB*. La aparición y el aumento de la incidencia de hVISA y VISA han limitado el uso terapéutico de la vancomicina en el tratamiento de las infecciones por MRSA intrahospitalarias. Sin embargo, se cree que mediante una optimización de dosis y administración del fármaco, se puede llegar a preservar la utilidad clínica de la vancomicina (12).

En 2002 se publicó el primer informe de una cepa de *S. aureus* con MIC para la vancomicina >128 mg/L; esta cepa mostraba además resistencia a la metilina y era portadora del gen *vanA*, responsable de la resistencia a la vancomicina (12).

1.3.5 Resistencia a otros antibióticos

Otros antibióticos ensayados en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* son las sulfonamidas, las tetraciclinas, los aminoglucósidos, el cloranfenicol y la clindamicina. Dado que las cepas de HA-MRSA suelen presentar un fenotipo de multi-resistencia (*multi-drug resistance*, MDR), se dejaron de utilizar debido su ineffectividad frente a estas cepas. Asimismo, se informó sobre la resistencia a las sulfonamidas y la trimetoprima, las tetraciclinas, los aminoglucósidos, el cloranfenicol y la clindamicina, que se presentaban en *S. aureus*, especialmente en cepas MRSA (12).

Tabla 3. Otros antibióticos para el tratamiento de *S. aureus* y los principales mecanismos de resistencias. Adaptado de Gnanamani y col. y Watkins y col. (12,14).

Fármaco	Clase	Modo de acción	Mecanismo de resistencia
Linezolid	Oxazolidinona	Inhibición de la síntesis proteica	Mutaciones puntuales en genes codificantes de ARNr 23S
Daptomycin	Lipopéptidos	Despolarización de la membrana celular	Mutación en <i>mprF</i>
Tigecycline	Tetraciclina	Inhibición de la síntesis proteica	Genes <i>tet(A)</i> y <i>otr</i>
Ceftaroline	Cefalosporina	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Mutación PBP2a
Telavancin	Lipoglucopéptidos	Inhibición de la síntesis de la pared y despolarización de la membrana celular	Modificación de la diana
Tedizolid	Oxazolidinona	Inhibición de la síntesis proteica	Mutaciones puntuales en genes codificantes de ARNr 23S
Dalbavancin	Lipoglucopéptidos	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Modificación de la diana
Oritavancin	Lipoglucopéptidos	Inhibición de la síntesis de la pared y despolarización de la membrana celular	Modificación de la diana

1.4 ACEITES ESENCIALES

Dada la problemática expuesta anteriormente sobre la efectividad de los fármacos antimicrobianos, en la actualidad se buscan soluciones innovadoras que incluyan nuevos productos para el tratamiento eficaz de las infecciones bacterianas y que no impliquen el uso de antibióticos. Las plantas constituyen una fuente aparentemente inagotable de productos con actividad biológica debido a la gran diversidad de metabolitos secundarios, entre ellos los que presentan actividad antimicrobiana (15). En consecuencia, una de las principales líneas de trabajo para superar el fenómeno de la multi-resistencia a los antibióticos convencionales es el estudio de los metabolitos secundarios vegetales.

Los aceites esenciales son extractos vegetales que contienen una gran cantidad de metabolitos secundarios volátiles, sintetizados por plantas angiospermas y que confieren a las especies productoras un olor o sabor característicos. Estos compuestos son sintetizados en el citoplasma a partir de 3 vías del metabolismo secundario vegetal: la vía del ácido malónico, la vía del ácido mevalónico, y la vía del metil-d-eritritol-4-fosfato (MEP). Una vez sintetizados son almacenados en complejos secretorios, como glándulas, cavidades y conductos de resina presentes en hojas, tallos, flores, frutos, cortezas y raíces (16). A consecuencia de las rutas metabólicas de las cuales provienen, los

componentes de los aceites esenciales poseen una alta diversidad estructural que les capacitan para interactuar con una amplia variedad de dianas. Los aceites esenciales se han utilizado tradicionalmente como productos medicinales por su actividad antiinflamatoria, insecticida, antioxidante, sedante, digestiva, etc; además de sus aplicaciones más extendidas en cosmética y alimentación debido a sus propiedades aromatizantes y preservantes, que los han convertido en ingredientes tradicionales y esenciales en perfumería o como apreciados condimentos culinarios (8,16,17).

Químicamente, los aceites esenciales son mezclas complejas de entre 20 y 60 componentes pertenecientes a las familias de los terpenos, terpenoides, compuestos aromáticos, y compuestos alifáticos en distintas concentraciones (8,15–17). Debido a la naturaleza de estos componentes, los aceites esenciales son lipofílicos y solubles en solventes orgánicos por su naturaleza hidrofóbica, su bajo peso molecular y su menor densidad que el agua (18). Las concentraciones de sus componentes son variables dependiendo de una gran variedad de factores, aunque en general contienen 2 o 3 componentes mayoritarios que suponen entre el 20 y 70 % de la concentración total respecto a los otros componentes que se encuentran en cantidades inferiores (8). Por ejemplo, el aceite esencial de plantas pertenecientes a la especie *Oraginum* contienen un 30% de carvacol y un 27% de timol como componentes principales. Estos componentes determinan las propiedades biológicas del extracto, aunque pertenezcan a grupos de origen biosintético distinto. Los terpenoides, los fenilpropanoides y los derivados de hidrocarburos alifáticos de cadena corta son los principales componentes de los aceites esenciales, como los que se encuentran representados en la Figura 6 (18).

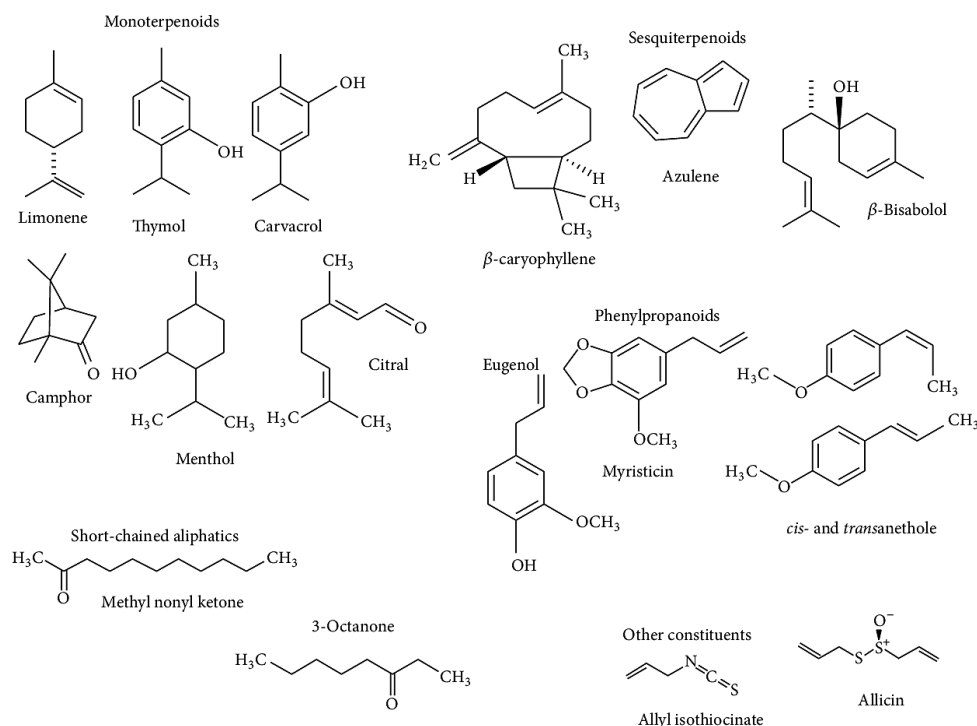


Figura 6. Estructuras representativas de los principales componentes de los aceites esenciales. Extraído de *Bilia y col.* (18).

Los aceites esenciales suelen obtenerse por diferentes métodos de destilación (siendo el más frecuente la destilación por arrastre de vapor), métodos de prensado, fermentación, trituración, extracción o hidrólisis (15,16). Debido a la gran variabilidad química de los aceites esenciales, su obtención depende del método de extracción seleccionado (16), aunque no es el único factor que condiciona la diversidad en la composición del extracto, ya que existen otros factores que influyen su constitución final como las condiciones ambientales, la composición del suelo, el método de cultivo, la temporada de recogida, el almacenamiento o el procesamiento (15).

El aislamiento de cada uno de los componentes de los aceites esenciales se realiza por cromatografía, siendo la más utilizada la cromatografía de gas unida a espectrometría de masas. De esta forma, se puede identificar cada componente del extracto y determinar en qué proporción se encuentra cada uno de ellos, a la vez que permite aislar los metabolitos de interés de la mezcla para su utilización individual (15). Considerando la gran variedad en los componentes de los aceites esenciales, su actividad antimicrobiana no puede ser atribuible a un único mecanismo de acción (15). Es por ello que, para poder establecer la relación entre sus componentes y el efecto antimicrobiano específico, así como elucidar su mecanismo de acción, es necesario estudiar y comparar gran variedad de aceites vegetales.

En los diferentes estudios consultados para realizar esta memoria bibliográfica se describen gran diversidad de mecanismos de acción relacionados con el efecto intrínseco de los aceites esenciales: alteración de la membrana citoplasmática, interrupción del flujo de electrones, alteración del transporte activo, coagulación del contenido celular, perturbaciones en el gradiente de pH y en el potencial eléctrico de la fuerza motriz de los protones. Los aceites esenciales con altas fracciones en compuestos fenólicos son los más potentes como antimicrobianos y pueden causar perturbaciones estructurales y funcionales en la membrana celular del microorganismo o actuar sobre las proteínas de membrana (15). Otro factor a tener en cuenta es la naturaleza hidrófoba de los componentes de los aceites esenciales, por lo que pueden interactuar con los lípidos de membranas celulares y hacerlas más permeables hasta provocar la muerte celular por pérdida de iones u otros componentes celulares (8).

2 INTERÉS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

El interés en el estudio de los aceites esenciales como tratamiento terapéutico ante *S. aureus* surge a partir del gran número de evidencias adquiridas sobre la incidencia de infecciones nosocomiales y la aparición de resistencia a un gran número de los antibióticos de elección en los tratamientos actuales.

Debido a la gran variedad de aceites esenciales y de sus mecanismos efectores de antibiosis sobre las distintas especies bacterianas, este trabajo se centrará en el efecto de los aceites esenciales sobre *S. aureus*, una de las especies más patógenas y virulentas que no solo presenta una elevada prevalencia en infecciones de asistencia sanitaria, sino también un gran número de cepas multi-resistentes.

La hipótesis en la que se centra este trabajo es que los aceites esenciales pueden constituir una nueva fuente de productos terapéuticos contra *S. aureus* con mejor acción que los antibióticos disponibles.

Es por ello por lo que se plantea una revisión de los resultados obtenidos por los diferentes autores en este campo, para encontrar los principales aceites esenciales con efecto antimicrobiano frente *S. aureus*. Para ello el objetivo principal es hacer una recopilación de los últimos estudios sobre la actividad de diferentes aceites esenciales y en segundo lugar una selección de aquellos candidatos que hayan demostrado un efecto igual o mejor que los tratamientos disponibles. A su vez, también se estudiará sobre diferentes formas de formulación de los aceites esenciales en conjunto a antibióticos o nanomateriales.

3 METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

La búsqueda se realizó en las principales bases de datos científicas (*Web of Science* y *PubMed*) durante los meses de marzo y junio de 2020. En ella, se buscó información en artículos de investigación, artículos de revisión e informes de entidades y órganos competentes de ámbito europeo (EUCAST o ECDC) y mundial (CLSI).

La búsqueda fue acotada a una sola especie microbiana, *S. aureus*, debido a que es una de las infecciones nosocomiales más recurrentes, con variedades resistente a la meticilina (MRSA) consideradas una de las más peligrosas.

Los filtros utilizados incluían "essential oil" o "*Staphylococcus aureus*" como términos principales y los filtros adicionales "antimicrobial", "antibacterial", "infection", "combination", "synergy", "antibiotic", "encapsulation" y "nanosystems".

Criterios de inclusión. Las publicaciones se incluyeron por las siguientes razones:

1. Estudios *in vitro* para *Staphylococcus aureus*.
2. Estudios *in vitro* mediante el ensayo de microdilución.
3. Estudios composición de aceites esenciales.
4. Estudios de efectos sinérgicos de antibióticos y aceites esenciales.
5. Estudios de combinación de aceites esenciales y nanomateriales.
6. Estudios de ensayos *in vivo* con aceites esenciales.
7. Estudios con procedimientos uniformes a partir de directrices para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de dilución, proporcionadas por CLSI o EUCAST.

Criterios de exclusión.

1. Publicaciones anteriores a los últimos 5 años (a excepción publicaciones de gran relevancia).
2. Técnica *in vitro* alternativa (ensayos de difusión u otros).
3. Estudios de aceites esenciales antivirales.
4. Estudios de aceites esenciales antifúngicos.
5. Estudios de aceites esenciales en otras especies bacterianas.
6. Estudios de aceites esenciales en preservación alimentaria.

En la búsqueda bibliográfica en *PubMed* sobre los principales aceites esenciales con efecto antimicrobiano en *S. aureus* ensayados mediante el método de microdilución en los últimos 5 años, surgen 80 resultados donde se proponen los aceites esenciales de diferentes especies vegetales. Mediante una lectura crítica se seleccionan aquellos artículos que se ajustan a los criterios de inclusión y se eliminan aquellos que no se ajustan a la base de la búsqueda bibliográfica por los criterios de exclusión. Después de este análisis, los artículos que no se adaptaban completamente a la temática fueron eliminados de la selección bibliográfica. Con los artículos de interés restantes se realiza el Anexo 1 recogiendo los datos de especie vegetal de la cual se extrae el aceite esencial, cepa de *S. aureus* en la que se ensaya y los valores MIC que presenta el aceite esencial. Entre los resultados recogidos, se escogen aquellos que presenten valores de relevancia clínica y se procede al análisis de sus componentes y/o posibles métodos de acción en *S. aureus*. A su vez también se realiza una búsqueda de combinaciones sinérgicas entre aceites esenciales y antibióticos para el estudio de la potenciación del efecto antimicrobiano de los antibióticos por parte de los aceites esenciales. El algoritmo de búsqueda bibliográfica utilizado para la realización de este trabajo se encuentra representado en la Figura 7.

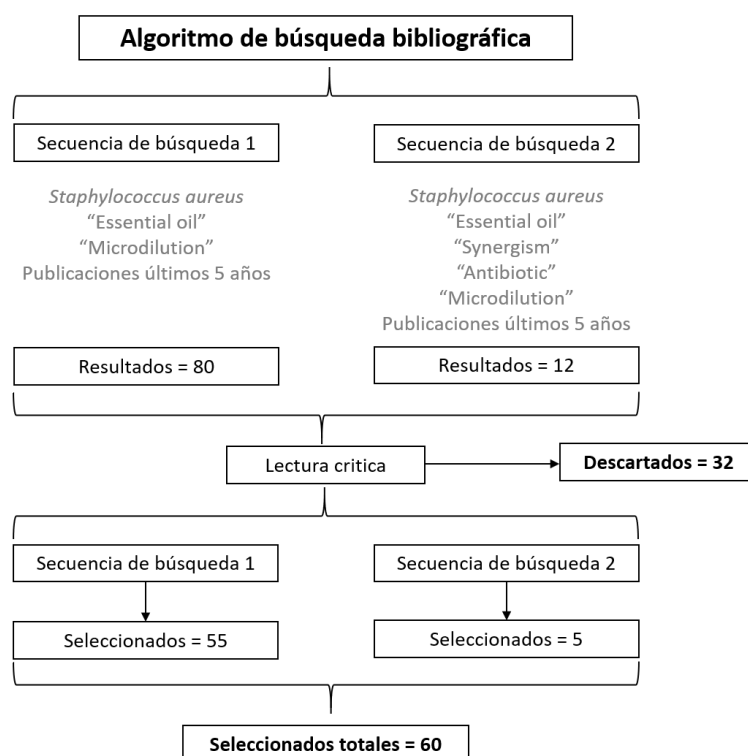


Figura 7. Algoritmo de búsqueda utilizado para la realización de la revisión bibliográfica.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La búsqueda general sobre el tema en *Web of Science* y *Journal Citations report* permitió realizar un análisis de las publicaciones relacionadas con autores, fechas de publicación, principales revistas en el ámbito o regiones del mundo donde más se investiga el efecto de los aceites esenciales en *S. aureus*, entre otros parámetros.

Mediante los parámetros “essential oil”, “*Staphylococcus aureus*” y “microdilution method” en *Web of Science* se observa que la gran mayoría de artículos publicados se presentaron entre los años 2016-2019. Al limitar la búsqueda las publicaciones en los últimos 5 años, entre los autores más destacados en el ámbito se encuentra Henrique Douglas Coutinho, con 36 publicaciones relacionadas a los aceites esenciales y *S. aureus*, y un total de 6183 citas de sus publicaciones a lo largo de su carrera. Las principales revistas científicas que destacan por sus publicaciones sobre los efectos de los aceites esenciales en *S. aureus* son revistas pertenecientes tanto al ámbito de la microbiología como al ámbito de los productos naturales de interés farmacológico. Entre ellas destacamos *Industrial crops and products* que posee aproximadamente el 7% de publicaciones entre 2015 y 2020 con un factor de impacto de 4.191, y *Microbial pathogenesis* con un 5% aproximado de publicaciones y un factor de impacto de 2.581. Las principales revistas con publicaciones en este campo se encuentran representadas en la Tabla 4, donde se muestra el porcentaje de las publicaciones y los factores de impacto de cada una de las revistas representadas.

Tabla 4. Principales revistas con publicaciones relacionados a los aceites esenciales y *S. aureus*, el porcentaje de publicaciones que poseen sobre el ámbito en los últimos 5 años y sus factores de impacto pertenecientes al año 2018. Extraído y adaptado del análisis de publicaciones en *Web of Science* y *Journal Citations Report*.

Revistas destacadas en publicaciones	Publicaciones últimos 5 años (%)	Factor de impacto 2018
<i>Industrial crops and products</i>	6.977	4.191
<i>Microbial pathogenesis</i>	5.116	2.581
<i>Natural product communications</i>	4.186	0.554
<i>Molecules</i>	3.721	3.060
<i>BMC complementary and alternative medicine</i>	2.791	2.479
<i>Chemistry and biodiversity</i>	2.791	1.449
<i>Pharmaceutical biology</i>	2.791	2.492
<i>Journal of essential oil bearing plants</i>	2.326	0.688
<i>Journal of essential oil research</i>	2.326	1.233
<i>PLoS one</i>	1.860	2.776

Entre los principales países liderando este tipo de investigaciones se encuentran Brasil, Irán, Turquía, Serbia y la República Popular China, entre ellos cinco acumulando el 60% de publicaciones aproximadamente. En la Tabla 5 y la Figura 8 se encuentran representados los países según su porcentaje de publicaciones.

Tabla 5. Países con los porcentajes de publicaciones sobre el efecto de los aceites esenciales en *S. aureus* más altos.

Países	% de publicaciones
Brasil	27.44
Irán	10.69
Turquía	10.69
Serbia	6.04
China	4.18
Francia	3.72
República Checa	3.25
Sudáfrica	3.25
Inglaterra	2.79
Italia	2.79
Rumanía	2.79

Países y regiones con más publicaciones en el ámbito

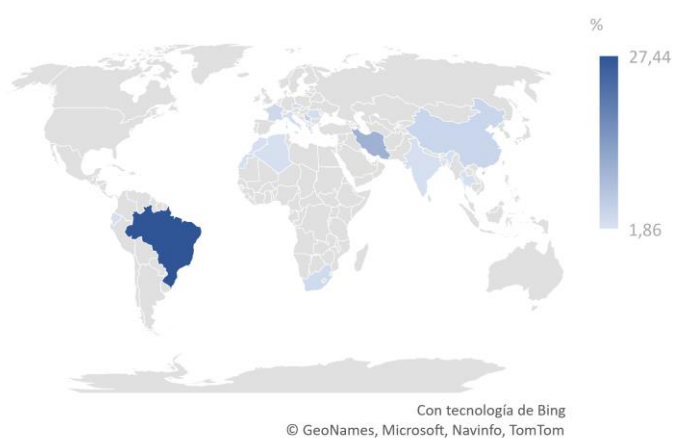


Figura 8. Representación de países con publicaciones sobre el efecto de los aceites esenciales en *S. aureus*. En azul oscuro se encuentran países con el mayor número de publicaciones y en azul claro países con porcentajes de publicación menores.

4.1 EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales candidatos deben ser sometidos a rigurosas pruebas para evaluar su actividad antimicrobiana frente a los microorganismos de interés. Para la evaluación del efecto antimicrobiano se busca el valor de la concentración mínima inhibitoria (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC), que hace referencia a la concentración más baja del agente antimicrobiano ensayado que inhibe completamente el crecimiento visible del microorganismo y se expresa en unidades de $\mu\text{g/mL}$ o mg/L (8,9). Existen diversos ensayos *in vitro* para evaluar o detectar la actividad del extracto o del aceite esencial. Los métodos pueden ser agrupados según su fundamento en métodos de difusión, métodos de dilución, métodos de citofluorometría de flujo, métodos de bioluminiscencia, *time-kill test* y métodos de cromatografía (9).

Sin embargo, los métodos más conocidos, básicos y apropiados para la determinación del valor MIC son los métodos de dilución en caldo o agar, ya que estos bioensayos ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano ensayado de forma rápida y visual (8,9). Otros tipos de ensayo, como las pruebas *time-kill test* o métodos de citofluorometría de flujo proporcionan información sobre la naturaleza del efecto inhibitorio (bactericida o bacteriostático) en función del tiempo o de la concentración y el daño infligido al microorganismo (9). Estos métodos no son ampliamente utilizados debido a la necesidad de equipamiento especializado o evaluaciones adicionales para la reproducibilidad y estandarización, a pesar de que pueden proporcionar resultados para la comprensión del impacto en la viabilidad y el daño celular infligido al microorganismo (9).

La comparación de resultados puede resultar complicada debido al uso de técnicas no estandarizadas, a la preparación y tamaño del inóculo, medio de crecimiento, condiciones de incubación o la determinación de los puntos finales (9). Para realizar un procedimiento uniforme se siguen las directrices para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de dilución, proporcionadas por los organismos reconocidos CLSI y EUCAST.

4.1.1 Método de dilución en caldo

La dilución en caldo es uno de los métodos cuantitativos de prueba de sensibilidad a antimicrobianos. El procedimiento implica la preparación de diluciones dobles del agente antimicrobiano en un medio de crecimiento líquido en tubos de volumen mínimo de 2mL (macrodilución) o en placa de microtitulación de 96 pocillos (microdilución). Cada tubo o pocillo es inoculado con el microorganismo de interés en el mismo medio después de ajustar la suspensión microbiana a una escala de 0.5 McFarland o inóculo preestablecido. Los tubos o la placa de microtitulación inoculados se incuban en condiciones de crecimiento óptimas al microorganismo de estudio (9).

Las principales desventajas de la aproximación de macrodilución son los posibles errores de manipulación en la preparación de las soluciones antimicrobianas para cada prueba, la gran cantidad de reactivos y espacio requeridos, y la gran cantidad de trabajo tedioso y manual. Por lo tanto, con la miniaturización de la prueba en placas de microtitulación de 96 pocillos se solventan las principales desventajas de la macrodilución (9). En referencia a las ventajas que presenta el método de la microdilución, la principal y más significativa respecto al ensayo con aceites esenciales es que se supera la problemática de su volatilidad intrínseca. Mediante la técnica de la microdilución los aceites esenciales tienen menos tendencia a la evaporación debido a que se encuentran incorporados en el caldo de cultivo (19).

Para la determinación de MICs, los dispositivos de visualización pueden facilitar la lectura de pruebas de microdilución y el registro de resultados con una alta capacidad de discernir la presencia de crecimiento en los pocillos (9). Los resultados suelen leerse visualmente con la ayuda de un colorante indicador o medición de la densidad óptica, pero este último no es recomendable ya que la propia coloración del aceite esencial puede interferir la lectura (19).

Tal como se muestra en la Figura 9, los resultados en un ensayo de microdilución pueden ser muy variables y deben ser interpretados correctamente:

- ❖ Cuando el crecimiento ocurre en todas las diluciones que contienen el agente antimicrobiano excepto aquellas de concentraciones más altas, el valor MIC se registra como la concentración mayor donde se observa crecimiento (caso A).
- ❖ Cuando el crecimiento ocurre en todas las diluciones que contienen el agente antimicrobiano, el valor MIC se registra como mayor a la concentración más alta (caso B).
- ❖ El valor MIC se registra como menor o igual a la concentración más baja cuando no se produce ningún crecimiento en ninguna de las concentraciones probada (caso C).
- ❖ Crecimiento puntual en pozos aislados indica contaminación y la prueba debe ser repetida (casos D y F).
- ❖ La ausencia de crecimiento en un pozo dentro de una serie de pozos con crecimiento es un pozo que no ha sido inoculado, debe ser ignorado y la prueba debe ser repetida (caso E).
- ❖ Crecimiento en pozos estériles de control indican contaminación y la prueba debe ser repetida (caso G).
- ❖ Cuando no se observa crecimiento en el control, indica que el microorganismo no ha crecido en las condiciones aplicadas y la prueba debe ser repetida (caso H).

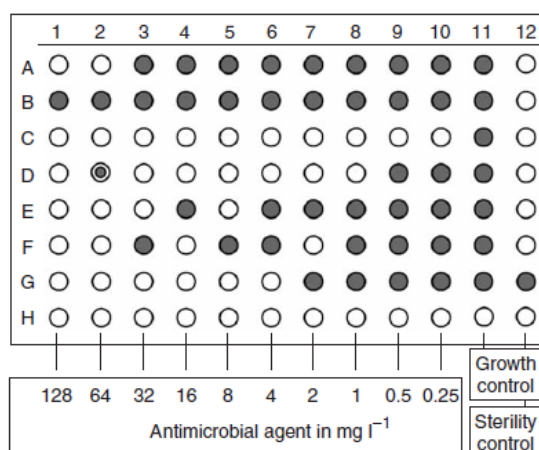


Figura 9. Interpretación del crecimiento en las placas de microdilución. Adaptado de *Wiegand y col.* (20).

4.1.2 Método de dilución en agar

El método de dilución de agar se basa en la incorporación de concentraciones variables del aceite esencial disuelto en medio de agar en diluciones dobles seriadas, seguido de la inoculación del agente microbiano en la superficie de la placa de agar. El punto final MIC se registra como la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento en condiciones de incubación adecuadas (9).

Esta técnica es adecuada para pruebas de susceptibilidad tanto antibacterianas como antifúngicas. Si se ensayan múltiples aislamientos contra un solo compuesto, o si el compuesto (o extracto) probado enmascara la detección de crecimiento microbiano en el medio líquido con su coloración, a menudo se prefiere el método de dilución en agar a la dilución en caldo para la determinación de MIC (9).

Generalmente, este método se utiliza como herramienta previa de selección: en base a los resultados obtenidos, se profundiza en el análisis utilizando el método de microdilución. Aunque los resultados siguen siendo comparables con los obtenidos en el método de microdilución, se trata de un método más largo y tedioso (19).

4.2 COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES Y ACTIVIDAD FRENTE *Staphylococcus aureus*

A partir de una búsqueda bibliográfica en PubMed, se encuentran 80 artículos en los que se expone la actividad antimicrobiana inherente de una gran variedad de aceites esenciales. Tras una primera lectura comprensiva de los resultados que se exponen en cada uno de ellos, se recogen las MICs de los aceites esenciales en la Tabla 8 que figura en el Anexo 1. Entre ellos, se destacan los que figuran en la Tabla 7:

Tabla 6. Selección de aceites esenciales por orden alfabético con efecto antimicrobiano frente *S. aureus*. Datos extraídos de las referencias de la tabla.

Aceite esencial	Cepa <i>S. aureus</i>	MIC (µg/mL)	Referencia
<i>Bocageopsis multiflora</i>	ATCC 6538	0.00019	(21)
<i>Ephedranthus amazonicus</i>	ATCC 6538	0.00009	(21)
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	ATCC 29213	0.0003	(22)
<i>Guatteria blepharophylla</i>	ATCC 6538	0.00005	(21)
<i>Heracleum ternatum</i>	ATCC 6538	0.00052 - 0.0024	(23)
<i>Heracleum verticillatum</i>	ATCC 6538	0.00014 - 0.0043	(23)
<i>Lippia alba</i>	ATCC 6538	0.0005-0.001	(24)
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	ATCC 25923	0.00011	(25)
<i>Plectranthus amboinicus</i>	ATCC 6538	0.00025	(26)
<i>Succisa pratensis</i>	NCTC 4163	0.00086	(27)

Los aceites esenciales seleccionados son los que demuestran valores de MIC más bajos en los ensayos. Dado que el efecto antimicrobiano es dependiente de la concentración de agente, el aceite esencial con mayor potencia de efecto será aquel que necesite una concentración más baja para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, por lo que es de gran importancia un estudio de sus características y composiciones.

Moreira y sus colaboradores (21) analizaron los aceites esenciales de 4 especies de la familia *Annonaceae* procedente del Amazonas brasileño y determinaron si presentaban efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. aureus* (21). Las especies vegetales de la familia *Annonaceae* son utilizadas en la cultura tradicional del Amazonas como remedios tradicionales por lo que podrían constituir una fuente de productos antimicrobianos naturales (21). De las cuatro aceites esenciales analizados, tres de ellos (*B. multiflora*, *E. amazonicus* y *G. blepharophylla*) presentaron valores de MIC comprendidos entre 0.05 y 0.19 mg/mL, que se puede traducir en un efecto potente contra la cepa de *S. aureus* ensayada (21). El análisis de la composición de estos aceites esenciales mediante cromatografía de gases determinó que los tres aceites contenían altas proporciones de sesquiterpenos (terpenos de 15 carbonos) y monoterpenos oxigenados (21). De forma individual, el aceite esencial de *B. multiflora*, mostró que sus componentes principales eran spathulenol (20.3%) y β -bisaboleno (11.9%) (21). En cambio *E. amazonicus* contenía altos porcentajes de spathulenol (16.9%), epóxido di-humuleno (16.3%) y óxido de cariofileno (11.5%), y el aceite esencial de *G. blepharophylla* poseía un alto porcentaje de óxido de cariofileno (55.7%) (21). Los resultados obtenidos por Moreira, llevaron a pensar que los aceites esenciales con un alto contenido en sesquiterpenos eran potentes debido a su alta capacidad de penetrar las barreras celulares de *S. aureus* (21). A pesar de estos resultados, en comparación al control positivo con clorhexidina digluconato (MIC = 0.006 mg/mL), los aceites esenciales presentaron valores MIC mayores (21). Esto es debido a que la clorhexidina es una molécula hidrofóbica y lipofílica, por lo que puede interactuar con los fosfolípidos y lipopolisacáridos de la membrana y penetrar de forma rápida la pared celular (21).

De forma similar, Nahar estudió el aceite esencial procedente de *G. pfeifferi* procedente del cuerpo frutífero de este basidiomiceto predominante en el este asiático (22). La composición de este aceite esencial mostró la presencia de ocho compuestos entre los cuales predominaban 1-Octen-3-ol (amilo vinilo carbinol, 73.6%) y su derivado 1-octen-3-ol acetate (acetato de amilo y vinilo carbinol, 12.4%) (22). Este estudio es el primero en presentar el aceite esencial de *G. pfeifferi* por lo que no se conocen detalles sobre su posible método de acción en *S. aureus*.

El género *Heracleum* L. (*Apiaceae*) constituye otra fuente de componentes antimicrobianos con sus especies predominantes en el hemisferio norte (23). Entre los miembros de este género se encuentran *H. ternatum* y *H. verticillatum* estudiados por Ušjak y sus colaboradores (23). La variación entre los valores MIC de cada una de estas especies es debido a la diferente fuente de extracción del aceite (hojas, flores o raíces) siendo el valor MIC más bajo en el aceite extraído de raíces (23). Al analizar la composición de los aceites esenciales extraídos de las raíces, los autores encontraron una alta predominancia de monoterpenos y sesquiterpenos en ambas especies, siendo los componentes mayoritarios β -pineno (47,3%) y el (Z)- β -ocimeno (15,6%) en *H. ternatum*, y el β -pineno (23,5%), limoneno (19,2%) y el sesquiterpeno intermedeol (10,9%) en *H. verticillatum* (23).

El aceite esencial de *Lippia alba* también demostró una acción inhibitoria sobre el crecimiento de *S. aureus* con valores MIC comprendidos entre 0.5 y 1 mg/mL dependiendo del quimiotipo estudiado (24). El estudio de su composición mostró una alta predominancia de monoterpenos entre los cuales se encontraban el citral y el neral, con unos porcentajes de del 31.6% y 25.5%, respectivamente (24). Al estudiar de forma individual el efecto inhibitorio del citral, este resultó en un valor de MIC de 0.5 mg/mL, por lo que la actividad antibacteriana de *L. alba* se asocia fuertemente a la presencia y predominancia de este compuesto en el aceite esencial (24).

Rebouças de Araújo y sus colaboradores caracterizaron el aceite esencial de *M. urundeuva* por cromatografía de gases, la cual identificó el α -pineno (87.85%) como constituyente mayoritario, seguido por *trans*-cariofileno (1.57%), limoneno (1.49%) y β -pineno (1.42%) (25). Este aceite esencial se encuentra constituido de forma predominante por monoterpenos, que representan el 93.51% del aceite esencial (25). A pesar de la alta predominancia en α -pineno, no se conoce si la acción antimicrobiana de este aceite es atribuible a este compuesto o si los terpenos con menor presencia promueven el efecto, debido a que los autores encontraron que el aceite esencial extraído de las hojas de *M. urundeuva* muestra diferentes proporciones pero resultados similares (25).

Otro aceite estudiado ampliamente es el proveniente de las especies *Plectranthus*. Entre ellos se destaca el aceite esencial de *P. amboinicus* que presenta un valor MIC de 0.25mg/mL (26). La caracterización llevada a cabo por Vasconcelos mostró que este aceite esencial se encontraba

constituido por carvacrol (88.17%) de forma mayoritaria, con la presencia de otros compuestos en forma de traza como el p-cimeno o el óxido de cariofileno. El carvacrol ha sido ampliamente estudiado de forma individual como agente antimicrobiano, pero en este estudio se demuestra que el p-cimeno potencia el efecto antimicrobiano de carvacrol sobre *S. aureus* (26).

Por último, a destacar se encuentra el aceite esencial extraído de las flores de *S. pratensis* que en su estudio mostró un valor MIC de 0.86 mg/mL (27). Entre los constituyentes mayoritarios de este aceite se encontraban el ácido hexadecanoico (16.1%), el 8-octadecen-1-ol acetato (9.86%), el linolenato de metilo (8.58%), el pentacosano (6.63%) y el heptacosano (5.50%) (27). A pesar de que el aceite esencial extraído de las flores de esta especie presentaba menos constituyentes que el extraído de las hojas (50 constituyentes frente 80), la actividad antimicrobiana era mayor, ya que la MIC del aceite de las hojas era mayor a 3.44 mg/mL (27). Los autores concluyeron que la mayor actividad del aceite de flores era debido a las altas concentraciones que presentaban los constituyentes respecto a los del aceite esencial de hojas; el contenido de hidrocarburos alifáticos saturados (pentacosano, o heptacosano) era dos veces mayor (27). Las diferencias en la actividad podrían verse influenciadas por la presencia de ácidos grasos (ácido hexadecanoico) y sus derivados (éster metílico 9,12,15-ácido octadecatrienoico) en concentraciones elevadas (27).

4.3 ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES FRENTE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA Y VIRULENCIA

Después de la extracción del aceite esencial a partir de la fuente vegetal, es necesario una identificación de los componentes mayoritarios del extracto. La evaluación del potencial antimicrobiano se realiza tanto a partir del extracto como de los componentes que lo forman de forma individual para conocer cuál es el componente con mayor actividad antimicrobiana (28).

A pesar de conocer gran cantidad de aceites esenciales que presentan capacidad de inhibición del crecimiento de *S. aureus*, los mecanismos efectores de cada uno de ellos son aún desconocidos. Es por ello por lo que en *S. aureus* se ha observado que el potencial antimicrobiano puede ser debido a 3 mecanismos efectores: Alteración de la permeabilidad o disrupción de la membrana, inhibición de bombas de flujo o inhibición de la formación del biofilm y quorum sensing (28). Estos mecanismos se encuentran representados en la Figura 10.

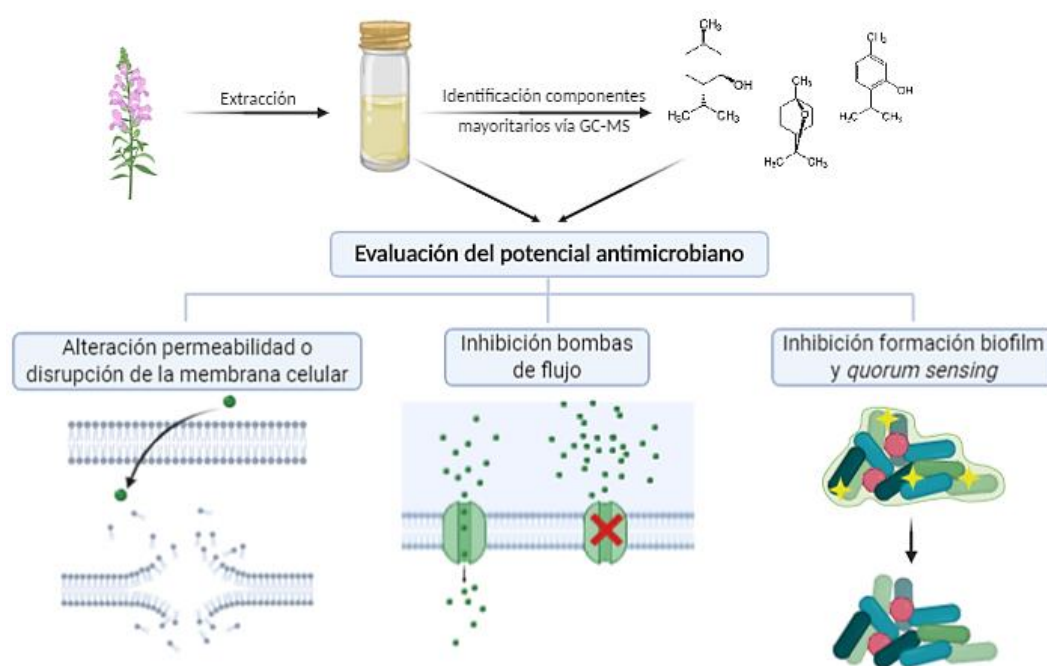


Figura 10. Proceso de evaluación de actividades antimicrobianas mediadas por los aceites esenciales contra patógenos como *S. aureus* y ejemplos de sus modos de acción. Adaptado de Yu y col. (28).

4.3.1 Permeabilidad y disrupción de la membrana celular

La integridad de la envoltura celular externa es imprescindible para la supervivencia bacteriana, ya que protege el material citoplasmático interno del entorno externo, por lo que una perturbación en su estructura puede resultar en un efecto fatal en la célula bacteriana (28). Una característica importante de los aceites esenciales y sus componentes es la hidrofobia, que les permite separar los lípidos presentes en la membrana celular de las bacterias y las mitocondrias, haciéndolos más permeables al perturbar las membranas de estructuras celulares (membrana celular o mitocondrias) (8,28).

Los aceites esenciales con un alto porcentaje de compuestos fenólicos pueden penetrar los fosfolípidos de la membrana celular e interactuar con los dominios de proteínas para bloquear su función regular. Debido a la naturaleza lipofílica, los aceites esenciales afectan la proporción y los aspectos estructurales de los ácidos grasos insaturados en el mismo (28). Esto eventualmente resulta en la muerte de la célula bacteriana debido a la fuga de moléculas y iones críticos (8,28). La acción de los aceites esenciales sobre la integridad de la membrana celular modifica la permeabilidad de la membrana, lo que conduce a la fuga del contenido celular como las proteínas, los azúcares reductores, el ATP y el ADN, al tiempo que inhibe la generación de energía (ATP) y las enzimas relacionadas, lo que conduce a la destrucción de la célula y a la fuga de electrolitos. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se atribuye, por lo tanto, a una cascada de reacciones que involucran a toda la célula bacteriana (8,28).

La pared celular representa la primera barrera microbiana que un agente antimicrobiano se encuentra para llevar a cabo su acción terapéutica (28). Las bacterias Gram-positivas (como *S. aureus*) son más susceptibles a los agentes antimicrobianos con diana a las membranas celulares debido a su organización de membrana más simple (28). Las bacterias Gram-positivas están rodeadas por una capa gruesa de peptidoglucano con densidad insuficiente para resistir el paso de las pequeñas moléculas que conforman los aceites esenciales por lo que el acceso a la membrana celular está asegurado (28). En bacterias Gram-negativas la acción de aceites esenciales en la perturbación de la membrana se encuentra dificultada por la presencia de una membrana rígida compleja rica en lipopolisacáridos que limita la difusión de compuestos hidrófobos a través de ella (28).

4.3.2 Inhibición bombas de flujo

Otro mecanismo de acción de algunos aceites esenciales es la modulación de la resistencia a fármacos por inhibición de las bombas de flujo. Algunos compuestos modulan la resistencia a las drogas atacando los mecanismos de efluentes en varias especies de bacterias Gram-negativas (8).

Para que un antibiótico sea efectivo, este debe encontrarse en el interior citoplasmático de *S. aureus* a una concentración determinada (17,28). Los antibióticos pueden ser transportados mediante bombas de flujo a través de la membrana celular y una sobreexpresión de bombas de flujo en la membrana resultaría en el efecto contrario al terapéutico (17). Las bombas son elementos altamente conservados en el genoma bacteriano; las bombas de flujo que aportan a la bacteria resistencia antibiótica son variantes de las bombas de membrana y son capaces de extruir una amplia gama de compuestos, incluyendo las últimas clases de antibióticos sintéticos (17).

Los terpenos, uno de los mayores constituyentes de los aceites esenciales, pueden actuar sobre las bombas de flujo mediante un cambio en el estado de fluidez de la membrana citoplasmática (29). La bomba de flujo *norA* (familia MFS, *Major facilitator superfamily*) es una de las bombas bien estudiadas en *Staphylococcus*, y es responsable del flujo de salida de los antibióticos de la clase de fluoroquinolonas (28). De la misma forma, Limaverde realizó un estudio con el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* en combinación con bromuro de etidio, donde demostraba una inhibición de la bomba de flujo TetK (30). Las bombas de flujo son el único mecanismo de *S. aureus* para reducir la toxicidad del bromuro de etidio, y por lo tanto una reducción en la MIC demuestra que el aceite esencial de *C. ambrosioides* es una opción eficaz en la inhibición de bombas de flujo (30).

4.3.3 Inhibición de la formación del biofilm y quorum sensing

El quorum sensing es el proceso de comunicación entre los microorganismos por el cual las bacterias pueden mediar su concentración y modular la expresión génica en respuesta a la densidad de población, lo que conduce a la secreción de factores de virulencia, formación de biopelículas y competencia (28). El quorum sensing participa en la patogenicidad microbiana y la resistencia a los antibióticos, ya que es responsable de la motilidad y los patrones de *swarming*, la formación de biofilm y la resistencia al estrés basada en la señalización de las moléculas (17).

Los mecanismos de resistencia mediados por la presencia del biofilm pueden atribuirse a factores como la reducción de la penetración de los antibióticos a través de la matriz del biofilm, la presencia de células de crecimiento lento en el biofilm, una población bacteriana heterogénea con la presencia de subpoblaciones fenotípicas con diferentes niveles de resistencia y la presencia persistente de células (31).

Sharifi y sus colaboradores (32) estudiaron los aceites esenciales de *Thymus daenensis* y *Satureja hortensis* como aproximación para la eliminación de biofilm y anti-quorum de *S. aureus*. Ninguno de los dos demostraron actividad antibacteriana, pero en el estudio de la expresión génica mediante una RT-PCR mostró que los aceites esenciales regulaban los niveles de expresión de *hld* que codifica una molécula efectora involucrada en el quorum sensing (32). Noumi (31) demostró el potencial del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* y su componente principal terpinen-4-ol frente a cepas MRSA. Los resultados mostraron una reducción significativa de la formación de biofilm mediante una inhibición de la adhesión, destrucción de la matriz extracelular y bacterias formadoras del biofilm (31).

4.4 COMBINACIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y ANTIBIÓTICOS

Debido a la falta de nuevas formulaciones de antibióticos efectivos contra determinadas cepas bacterianas es de gran necesidad el desarrollo de nuevas alternativas, entre las que se encuentran los aceites esenciales. A partir del estudio de los efectos antibacterianos de los aceites esenciales se hipotetizó sobre la capacidad de estos productos para actuar como moduladores o adyuvantes de los antibióticos y aumentar su eficacia (8).

En ensayos iniciales de acción antimicrobiana de aceites esenciales, algunos de ellos no mostraron resultados suficientemente eficientes para ser considerados como una nueva fuente de antimicrobianos (8). Una reformulación mediante la adición de aceites esenciales a antibióticos ha demostrado que los aceites esenciales pueden inducir efectos positivos como la reducción de la MIC del antibiótico o la disminución de la dosis efectiva frente a la cepa microbiana (8). Los aceites esenciales

y sus componentes forman parte del grupo de fitoquímicos que al combinarse, pueden dar lugar a tres efectos; efecto sinérgico, efecto aditivo o efecto antagónico (8,33).

La sinergia se obtiene cuando la actividad antimicrobiana de dos compuestos combinados es mayor que la suma de los efectos antimicrobianos de las sustancias individuales (8,33). Las interacciones sinérgicas podrían aumentar la eficacia o reducir las dosis efectivas, lo que a su vez podría reducir la probabilidad de que se produzcan efectos adversos y la probabilidad de que se desarrolle una resistencia adaptativa a la combinaciones (33). Los mecanismos por los que los compuestos pueden actuar de forma sinérgica se cree que son por acciones simultáneas o secuenciales sobre el objetivo, efectos farmacocinéticos o fisicoquímicos favorables y la inhibición de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en las bacterias (33). Se pueden producir efectos sinérgicos si los componentes de un extracto afectan a diferentes objetivos o interactúan entre sí para mejorar la solubilidad y, de ese modo, aumentar la biodisponibilidad de una y varias sustancias de un extracto. Además, cuando los antibióticos se combinan con un agente que antagoniza los mecanismos de resistencia bacteriana, pueden producir sinergia (8). El efecto aditivo se produce cuando la combinación de antimicrobianos es igual a la suma del efecto antimicrobiano de los compuestos individuales (8).

Por último, el antagonismo se produce cuando hay una reducción de la eficacia antimicrobiana cuando los compuestos se encuentran combinados respecto al efecto antimicrobiano de los componentes individuales (8,33). El antagonismo se puede producir cuando los fármacos tienen el mismo mecanismo de acción, se combinan agentes bactericidas y bacteriostáticos, las interacciones químicas producen productos menos eficaces o la farmacocinética/fisicoquímica es desfavorable (33).

4.4.1 Evaluación *in vitro* del efecto de la combinación aceites esenciales y antibióticos

Mediante el *Checkerboard method* se puede analizar la combinación entre 2 componentes y determinar el efecto que se produce entre ambas (sinergismo, antagonismo o adición) (34). En este método se utiliza un panel de las combinaciones antimicrobianas a diferentes concentraciones tanto en macrocultivo (en tubos de 2mL de volumen) o microcultivo (en placa de 96 pocillos de 100 µl de volumen) (34). El más utilizado por los autores es el realizado en una microplaca de 96 cultivos por la facilidad de testar una gran rango de concentraciones a la vez (35).

En este ensayo, se inocula cada pocillo con una concentración diferente del compuesto a ensayar, las concentraciones las cuales se encuentran de forma seriadas y en un rango entre al menos 1/16 y 8 veces la MIC de los compuestos (previamente se realiza un ensayo con los componentes individuales para evaluar la MIC individual) (34).

El *checkerboard method* es utilizado como método de screening para conocer en que concentraciones de los compuestos se produce la inhibición del crecimiento. De forma vertical se encuentra la misma concentración del compuesto A y de forma horizontal el compuesto B (35). Mediante esta disposición se crea un patrón que permite evaluar visualmente los resultados, tal como se observa en la Figura 11.

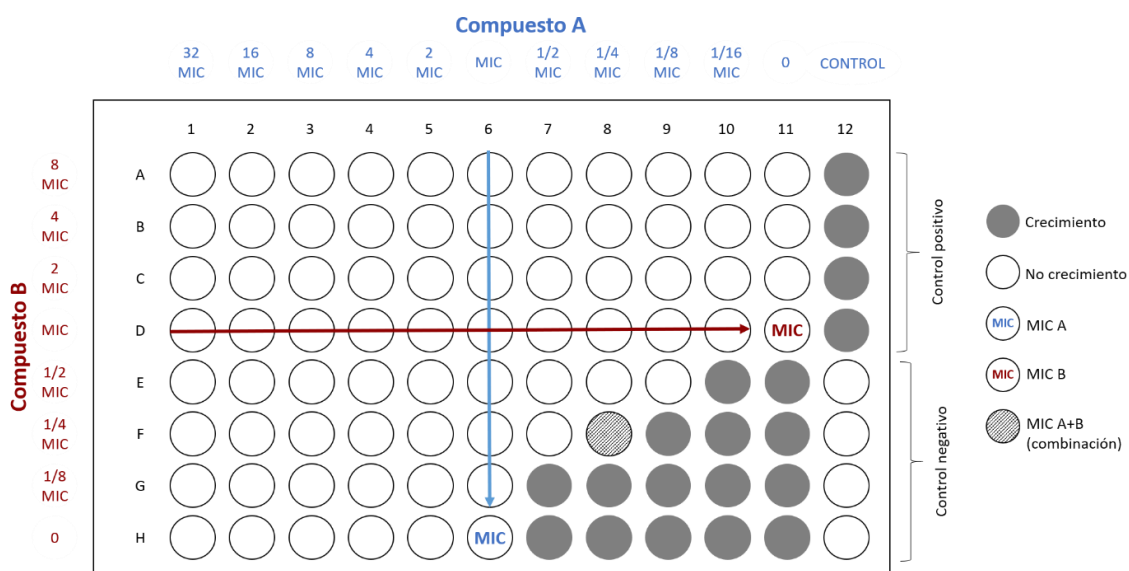


Figura 11. Ejemplo de ensayo mediante *checkerboard assay* con dos compuestos.

El amplio rango de concentraciones de la MIC es necesario debido a que la MIC puede verse reducida o aumentada en combinación al segundo compuesto (34). Para el análisis del efecto antimicrobiano combinado se utiliza el índice de la concentración de inhibición fraccional (*Fractional Inhibitory Concentration*, FIC) a partir de los valores MIC de los compuestos combinados entre el valor MIC del componente individual (8):

$$FIC A = \frac{MIC A + B}{MIC A} \quad FIC B = \frac{MIC B + A}{MIC B} \quad FIC = FIC A + FIC B$$

Teóricamente, un índice FIC cercano a uno indica interacciones aditivas, mientras que por debajo de uno implica interacciones sinérgicas, y por encima de uno indica interacciones antagónicas (8). Sin embargo, algunos autores han considerado una nueva clasificación en la que los valores de FIC < 0,5 se consideran sinérgicos si el índice FIC es < 0,5, si se encuentra en 0,5 y 4 se considera aditivo y antagónico si el índice FIC es > 4 (8).

4.4.2 Combinación de aceites esenciales y antibióticos frente *Staphylococcus aureus*

Se han estudiado 4 tipos de mecanismos de sinergia en referencia a los aceites esenciales (8):

- ❖ Sinergia entre diferentes aceites esenciales (8).
- ❖ Sinergia entre los componentes de aceites esenciales (8).
- ❖ Sinergia entre componentes/constituyentes de los aceites esenciales y antibióticos (8).
- ❖ Sinergia entre aceites esenciales y antibióticos (8).

Entre los efectos sinérgicos más estudiados se encuentra la combinación sinérgica entre aceites esenciales y antibióticos, de los cuales se encuentra una selección bibliográfica de los principales aceites esenciales y antibióticos y el efecto de sus combinaciones en la Tabla 9 del Anexo 2. En este campo, Vitanza estudió la combinación del aceite esencial de *Satureja montana* con gentamicina, un antibiótico utilizado contra las infecciones por *S. aureus*. El aceite esencial de *S. montana* de forma individual ya era efectivo (MIC = 0.78 µg/mL) pero en combinación con gentamicina (MIC = 0.5 µg/mL) el resultado era de adición y sinergia. Los resultados comprendían valores FIC entre 0.25 (sinergia) y 0.62 (adición) (36). A su vez, también observaron los cambios morfológicos producidos sobre *S. aureus* por parte de la combinación por microscopia electrónica de barrido (Figura 12).

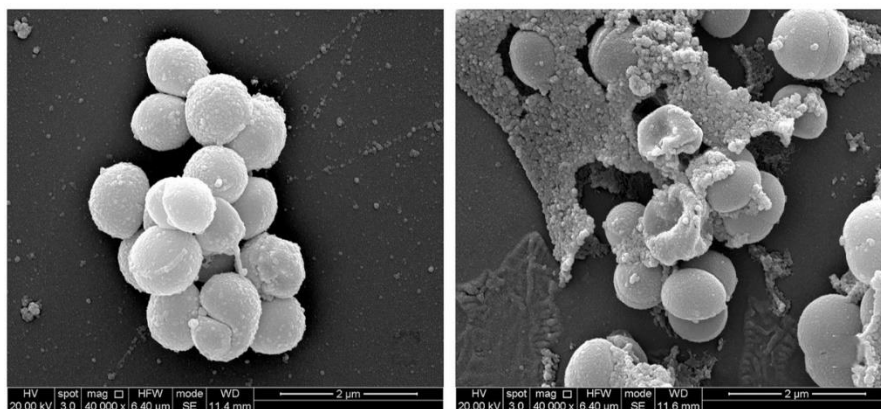


Figura 12. Imágenes de *S. aureus* tomadas por microscopia electrónica de barrido, donde se puede observar en la izquierda imágenes de colonias no tratadas con el aceite esencial de *S. montana* y a la derecha las colonias tratadas. Se aprecia un cambio en la morfología de *S. aureus* por hundimiento y malformación de la superficie celular. Imágenes extraídas de Vitanza y col. (36).

En un estudio con el aceite esencial de *Ocimum gratissimum*, Melo y Azevedo encontraron un efecto aditivo en la combinación de *O. gratissimum* y oxalacina (FIC = 0.516) y en la combinación de *O. gratissimum* y ciprofloxacina (FIC = 0.562) (37). En un estudio con el aceite esencial de *Ocimum basilicum*, Silva observó un aumento de la actividad antimicrobiana en combinación con imipenem (FIC = 0.0625) (38). No obstante, al combinar el mismo aceite esencial con ciprofloxacina el efecto fue el contrario y dio lugar a un efecto de antagonismo (FIC = 4.25) (38).

Por último, Aelenei y sus colaboradores demostraron que el aceite esencial de *Coriandrum sativum* en combinación con una gran selección de antibióticos para el tratamiento contra *S. aureus* mostró efectos positivos en la reducción de la MIC, como en el caso de la combinación con amoxicilina o gentamicina que se produjo una reducción de la MIC del antibiótico de hasta 16 veces, la cual paso de 256 µg/mL a 16 µg/mL en ambos casos. En todas las combinaciones estudiados de este aceite esencial, todos los efectos fueron clasificados entre sinérgicos y aditivos (39).

En los estudios de combinación de aceites esenciales se ha visto una disminución de los valores MIC del antibiótico después de la combinación con el aceite esencial por lo que se necesita una concentración menor del antibiótico para que este resulte eficaz frente a *S. aureus*.

4.5 COMBINACIÓN ACEITES ESENCIALES CON NANOMATERIALES O NANOENCAPSULACIÓN

Por la naturaleza de los aceites esenciales, al ser un conjunto de componentes altamente volátiles y lipofílicos, son compuestos vulnerables a los fenómenos de conversión o degradación (28). Entre los factores clave para conseguir propiedades terapéuticas eficientes se encuentra la estabilidad y selectividad dosis-dependiente del aceite esencial, la cual puede verse afectada durante la administración y biodistribución (28).

Los estudios recientes proponen el uso de nanomateriales contra infecciones microbianas con presencia de resistencia antibiótica, entre los que se encuentran la plata, el oro y los nanotubos de cobre, hierro, zinc, quitosano y carbono. Otra forma de utilizar los nanomateriales sería mediante una acción sinérgica con los aceites esenciales de forma que la encapsulación de estos compuestos en el interior de la nanocapsula pudiera modular la eficacia del aceite esencial (28).

La nano-encapsulación es el proceso mediante el cual se rodean gotas del aceite esencial bioactivo con un revestimiento o mediante la incrustación en una matriz homogénea o heterogénea. Los aceites esenciales, al ser sustancias volátiles, son altamente sensibles al oxígeno, la luz, la humedad y la temperatura. La encapsulación del aceite esencial permite evitar los procesos de deterioro ya que protege al aceite esencial de los factores externos que pueden afectar a su estabilidad (8). Mediante la encapsulación se protege al aceite esencial de forma que aumenta la estabilidad química y la solubilidad, disminuye la evaporación y la degradación de los componentes activos es mínima (8). La encapsulación de aceites esenciales también favorece la entrega selectiva y liberación controlada, y aumenta su biodisponibilidad y eficacia contra los patógenos resistentes a los medicamentos (8,28). Estos sistemas también aumentan la bioeficacia debido a su capacidad de ser absorbido por las células y penetrar a través de membranas y barreras biológicas (32).

El principal inconveniente que presentan los sistemas basados en nanoencapsulación es que su preparación contienen uno o más pasos, tales como aumento de temperatura, evaporación de solventes o homogenizaciones a altas presiones las cuales pueden afectar la estabilidad de los componentes del aceite esencial (32).

En la actualidad hay una gran variedad de formulaciones en los sistemas de encapsulación basados en nanoestructuras los cuales se pueden diferenciar en dos grandes grupos según su base biológica: Sistemas nanoestructurados basados en lípidos y sistemas nanoestructurados basados en polímeros (32). Los sistemas nanoestructurados basados en lípidos, como las nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas, los liposomas y las nanocapsulas lipídicas, están formados por componentes lipídicos, que generalmente son biodegradables y se consideran seguros para usos farmacéuticos. En cambio, los sistemas nanoestructurados basados en polímeros pueden ser naturales, semisintéticos o sintéticos (32). Otra estrategia para la encapsulación considerada en los últimos años son los complejos moleculares basados en complejos de inclusión con ciclodextrinas (40).

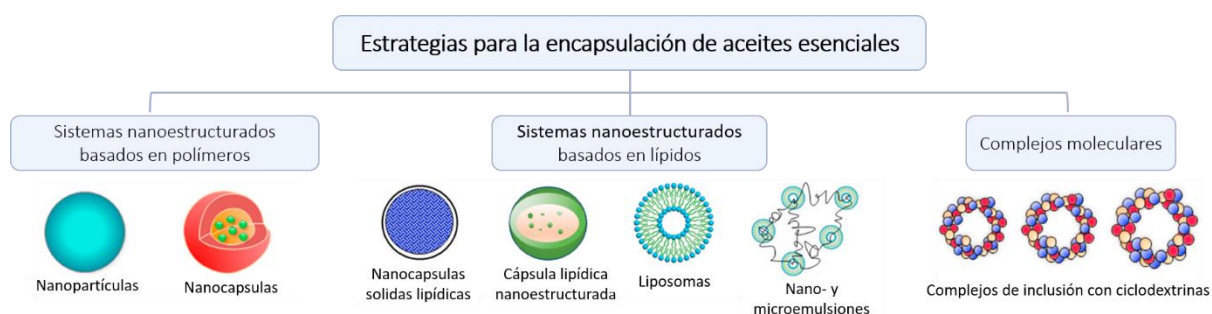


Figura 13. Estrategias para la nanoencapsulación de aceites esenciales. Adaptado de Rai y col. (40)

4.6 DESAFÍOS PARA EL USO CLÍNICO DE LOS ACEITES ESENCIALES

Tal como se ha demostrado en este trabajo, existen gran variedad de estudios donde se informa el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales contra *S. aureus* y sus variantes multirresistentes a los antibióticos. La sensibilidad de determinadas cepas resistentes a antibióticos frente a los aceites esenciales es evaluada mediante ensayos *in vitro*, en los cuales la información no es completa ya que no se obtiene información sobre el potencial *in vivo*. Las investigaciones con ensayos *in vivo* con modelos animales son utilizadas para confirmar el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales en modelos animales, pero estas no tienen una incidencia tan alta como los ensayos *in vitro* (28).

En estos ensayos, los modelos animales se someten a la infección microbiana inducida mediante la administración de inóculo de patógenos y se evalúa la eficacia del aceite esencial examinando la supervivencia y recuperación del modelo animal. Los estudios de aceites esenciales *in vivo* se realizan

con la utilización de diferentes modelos animales, incluidos ratones y bagres plateados (28). En una búsqueda en PubMed de estudios sobre los efectos de aceites esenciales en modelos *in vivo* en los últimos 5 años solo se encuentran 18 resultados comparados con los 80 que se encuentran sobre estudios *in vitro*.

Souza dos Santos y sus colaboradores investigaron los efectos del aceite esencial de *Syagrus coronata* en larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *S. aureus* y observaron variaciones en la tasa de supervivencia de los diferentes grupos de tratamiento (41). La supervivencia de los insectos infectados y tratados con altas concentraciones del aceite esencial de *S. coronata* (31.2 mg/Kg) mostraban una tasa de supervivencia mayor que los infectados tratados con PBS (control) o tratados con una concentración menor de aceite esencial (15.6 mg/Kg) (41). A parte de demostrar que el aceite esencial de *S. coronata* no mostró toxicidad para este insecto, la carga bacteriana en la hemolinfa se redujo cerca de la mitad en el grupo tratado respecto al grupo control (41). Dai informó sobre la eficacia del aceite esencial de *Amomum subulatum* (también conocido como Caoguo o *Fructus Tsaoko*) cuando se administró por vía intramuscular a ratones inoculados con *S. aureus* (42). La supervivencia de los ratones fue del 100 %, 90 % y 30 %, cuando se administraron dosis altas, medias y bajas de aceite esencial respectivamente (42). La actividad antimicrobiana del aceite esencial era dosis-dependiente y podía proteger a todos los ratones de la infección por *S. aureus* cuando la concentración de aceite esencial era superior a 0,92 g/kg·d (42). Ferro y sus colaboradores observaron como el cinamaldehído, componente mayoritario de la canela (*Cinnamomum cassia*), inhibía los factores de virulencia de *S. aureus* y protegía de la infección al modelo animal de *G. mellonella* (43). El estudio demostró que en las larvas de *G. mellonella* la supervivencia del grupo tratado con el aceite esencial aumentaba y la carga bacteriana en la hemolinfa se reducía en dosis equivalentes a 25-50 mg/kg (43).

De todos los aceites esenciales conocidos, 300 de ellos son considerados como seguros para los humanos (*generally recognized as safe*, GRAS) por la FDA. A su vez, se los ha categorizado como antimicrobianos “verdes” debido a su bajo coste, bioactividad, biocompatibilidad, potencial de reversión de la resistencia microbiana, no toxicidad para células eucariotas y seguros para el medioambiente. Es por ello por lo que se consideran como una fuente de antimicrobianos y una solución eficaz para hacer frente a la resistencia antimicrobiana, especialmente en *S. aureus* (28).

5 CONCLUSIONES

Las especies vegetales han demostrado ser una fuente aparentemente inagotable de productos de interés industrial y biotecnológico por su gran variedad de metabolitos secundarios. Los aceites esenciales extraídos de las plantas han supuesto una fuente innovadora de compuestos con aparente efecto antimicrobiano y es por ello por lo que cada vez existe una mayor incidencia de estudios que exponen los resultados de ensayos con aceites esenciales. Después de la revisión bibliográfica realizada se ha podido llegar a las siguientes conclusiones:

- ❖ Los aceites esenciales poseen un potencial antimicrobiano relevante por lo que deberían ser considerados en futuras investigaciones tanto de forma conjunta como de sus componentes individuales.
- ❖ Los aceites esenciales han pueden ser parte de una estrategia novedosa de potenciar el efecto de los antibióticos ya existentes por acciones sinérgicas o aditivas entre ambos compuestos.
- ❖ La combinación de los aceites esenciales con nanomateriales puede propiciar la estabilidad y propiciar la acción de estos productos

Finalmente, cabe destacar que a pesar de todos los resultados obtenidos en los que se presentan una gran variedad de aceites esenciales con actividad antimicrobiana frente *S. aureus*, aún se conoce poco sobre los mecanismos de acción. Serán necesarias futuras investigaciones para poder confirmar el potencial de estos compuestos como agentes antimicrobianos *in vivo*.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Flores Cabeza E, Sánchez Sánchez M, Añón Elizalde JM, Gutiérrez Melón C. Healthcare-related (nosocomial) infections. *Med.* 2018 Apr 1;12(52):3076–84.
2. ESTUDIO EPINE-EPPS nº 30: 2019 Informe España [Internet]. [cited 2020 May 4]. Available from: <https://epine.es/api/documento-publico/2019 EPINE Informe España 27112019.pdf/reports-esp>
3. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. Vol. 10, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020. p. 107.
4. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603–61.
5. Ecdc. SURVEILLANCE REPORT. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 [Internet]. 2018 [cited 2020 May 5]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>
6. Quick Search - Public Health Image Library(PHIL) [Internet]. [cited 2020 May 23]. Available from: <https://phil.cdc.gov/QuickSearch.aspx?key=true>
7. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):430–49.
8. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines.* 2017 Aug 8;4(3):58.
9. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Vol. 6, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Xi'an Jiaotong University; 2016. p. 71–9.
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2020;0–77.
11. Chellat MF, Raguž L, Riedl R. Targeting Antibiotic Resistance. Vol. 55, *Angewandte Chemie - International Edition*. Wiley-VCH Verlag; 2016. p. 6600–26.
12. Gnanamani A, Hariharan P, Paul-Satyaseela M. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. In: *Frontiers in Staphylococcus aureus*. InTech; 2017.
13. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Vol. 10, *British journal of experimental pathology*. Wiley-Blackwell; 1929.
14. Watkins RR, Holubar M, David MZ. Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Newer Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(12).
15. Sakkas H, Papadopoulou C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. Vol. 27, *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Korean Society for Microbiolog and Biotechnology; 2017. p. 429–38.
16. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? Vol. 24, *Molecules*. MDPI AG; 2019.
17. Yap PSX, Yiap BC, Ping HC, Lim SHE. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *Open Microbiol J.* 2014 Mar 7;8(1):6–14.
18. Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014.
19. Orchard A, Van Vuuren S. Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases.

- Evidence-based Complement Altern Med. 2017;2017.
20. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008;3(2):163–75.
 21. JM A, JMVM DL, R F, MOM M, M DPL. Chemical Composition and Bactericidal Activity of the Essential Oils of Four Species of Annonaceae Growing in Brazilian Amazon. *Nat Prod Commun.* 2017;12(4).
 22. Al-Fatimi M, Wurster M, Lindequist U. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Volatile Oil of *Ganoderma pfeifferi* Bres. *Medicines.* 2016 Apr 28;3(2):10.
 23. Ušjak LJ, Petrovic SD, Drobac MM, Sokovic MD, Stanojkovic TP, ciric AD, et al. Chemical Composition, Antimicrobial and Cytotoxic Activity of *Heracleum verticillatum* Pančić and *H. ternatum* Velen. (Apiaceae) Essential Oils. *Chem Biodivers.* 2016 Apr 1;13(4):466–76.
 24. Porfírio EM, Melo HM, Pereira AMG, Cavalcante TTA, Gomes GA, de Carvalho MG, et al. In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Lippia alba* Essential Oil, Citral, and Carvone against *Staphylococcus aureus*. *ScientificWorldJournal.* 2017;2017:4962707.
 25. Rebouças de Araújo ÍD, Coriolano de Aquino N, Vêras de Aguiar Guerra AC, Ferreira de Almeida Júnior R, Mendonça Araújo R, Fernandes de Araújo Júnior R, et al. Chemical composition and evaluation of the antibacterial and Cytotoxic activities of the essential oil from the leaves of *Myracrodruon urundeuva*. *BMC Complement Altern Med.* 2017 Aug 22;17(1).
 26. Vasconcelos SECB, Melo HM, Cavalcante TTA, Júnior FEAC, de Carvalho MG, Menezes FGR, et al. *Plectranthus amboinicus* essential oil and carvacrol bioactive against planktonic and biofilm of oxacillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Altern Med.* 2017 Sep 16;17(1).
 27. Witkowska-Banaszczak E, Długaszewska J. Essential oils and hydrophilic extracts from the leaves and flowers of *Succisa pratensis* Moench. and their biological activity. *J Pharm Pharmacol.* 2017 Nov 1;69(11):1531–9.
 28. Yu Z, Tang J, Khare T, Kumar V. The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue? Vol. 140, *Fitoterapia.* Elsevier B.V.; 2020. p. 104433.
 29. de Moraes Oliveira-Tintino CD, Tintino SR, Limaverde PW, Figueredo FG, Campina FF, da Cunha FAB, et al. Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. *Food Chem.* 2018 Oct 1;262:72–7.
 30. Limaverde PW, Campina FF, da Cunha FAB, Crispim FD, Figueredo FG, Lima LF, et al. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food Chem Toxicol.* 2017 Nov 1;109(Pt 2):957–61.
 31. Noumi E, Merghni A, Alreshidi MM, Haddad O, Akmadar G, De Martino L, et al. *Chromobacterium violaceum* and *pseudomonas aeruginosa* pao1: Models for evaluating anti-quorum sensing activity of *melaleuca alternifolia* essential oil and its main component terpinen-4-ol. *Molecules.* 2018 Oct 17;23(10).
 32. Sharifi A, Mohammadzadeh A, Zahraei Salehi T, Mahmoodi P. Antibacterial, antibiofilm and anti-quorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. *J Appl Microbiol.* 2018 Feb 1;124(2):379–88.
 33. Owen L, Laird K. Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. Vol. 44, *Critical Reviews in Microbiology.* Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 414–35.
 34. Laishram S, Pragasaam A, Bakthavatchalam Y, Veeraraghavan B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. Vol. 35, *Indian Journal of Medical Microbiology.* Wolters Kluwer Medknow Publications; 2017. p. 445–68.
 35. Molchanova N, Hansen PR, Franzyk H. Advances in development of antimicrobial peptidomimetics as potential drugs. Vol. 22, *Molecules.* MDPI AG; 2017.
 36. Vitanza L, Maccelli A, Marazzato M, Scazzocchio F, Comanducci A, Fornarini S, et al. *Satureja montana* L.

- essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microb Pathog*. 2019 Jan 1;126:323–31.
37. Melo RS, Azevedo ÁMA, Pereira AMG, Rocha RR, Cavalcante RMB, Matos MNC, et al. Chemical composition and antimicrobial effectiveness of *ocimum gratissimum* L. essential oil against multidrug-resistant isolates of *staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Molecules*. 2019 Oct 26;24(21).
 38. Silva VA, Da Sousa JP, De Luna Freire Pessôa H, De Freitas AFR, Coutinho HDM, Alves LBN, et al. *Ocimum basilicum*: Antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. *Pharm Biol*. 2016 May 3;54(5):863–7.
 39. Aelenei P, Rimbu CM, Guguianu E, Dimitriu G, Aprotosoiaie AC, Brebu M, et al. Coriander essential oil and linalool - interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Lett Appl Microbiol*. 2019 Feb 1;68(2):156–64.
 40. Rai M, Paralikar P, Jogee P, Agarkar G, Ingle AP, Derita M, et al. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. Vol. 519, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V.; 2017. p. 67–78.
 41. Souza dos Santos B, Bezerra Filho CM, Alves do Nascimento Junior JA, Brust FR, Bezerra-Silva PC, Lino da Rocha SK, et al. Anti-staphylococcal activity of *Syagrus coronata* essential oil: Biofilm eradication and in vivo action on *Galleria mellonella* infection model. *Microb Pathog*. 2019 Jun 1;131:150–7.
 42. Dai M, Peng C, Sun F. Anti-infectious efficacy of essential oil from *Caoguo* (*Fructus Tsaoko*). *J Tradit Chinese Med = Chung i tsa chih ying wen pan*. 2016 Dec 1;36(6):799–804.
 43. Ferro TAF, Araújo JMM, Pinto BL do. S, dos Santos JS, Souza EB, da Silva BLR, et al. Cinnamaldehyde inhibits *staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. *Front Microbiol*. 2016;7(DEC).
 44. Martins RL, Simões RC, De Menezes Rabelo É, Farias ALF, Rodrigues ABL, Da Silva Ramos R, et al. Chemical composition, an antioxidant, cytotoxic and microbiological activity of the essential oil from the leaves of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. *PLoS One*. 2016 Dec 1;11(12).
 45. Oukerrou MA, Tilaoui M, Mouse HA, Leoufoudi I, Jaafari A, Zyad A. Chemical Composition and Cytotoxic and Antibacterial Activities of the Essential Oil of *Aloysia citriodora* Palau Grown in Morocco. *Adv Pharmacol Sci*. 2017;2017.
 46. Zuccolotto T, Bressan J, Lourenço AVF, Bruginski E, Veiga A, Marinho JVN, et al. Chemical, Antioxidant, and Antimicrobial Evaluation of Essential Oils and an Anatomical Study of the Aerial Parts from *Baccharis* Species (Asteraceae). *Chem Biodivers*. 2019 Apr 1;16(4).
 47. Freitas PR, de Araújo ACJ, dos Santos Barbosa CR, Muniz DF, Rocha JE, de Araújo Neto JB, et al. Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. *Microb Pathog*. 2020 Aug 1;145:104223.
 48. Salazar GJT, de Sousa JP, Lima CNF, Lemos ICS, da Silva ARP, de Freitas TS, et al. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. *Ind Crops Prod*. 2018 Oct 15;122:591–5.
 49. Terezinha de Oliveira C, Lameiro de Noronha Sales Maia BH, Portes Ferriani A, Aparecida Queiroz Santos V, Antônio Alves da Cunha M, Dias Teixeira S. Chemical Characterization, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Potential of Essential Oil from the Leaves of *Baccharis oreophila* Malme. *Chem Biodivers*. 2019 Feb 1;16(2).
 50. Bay M, Souza de Oliveira JV, Sales Junior PA, Fonseca Murta SM, Rogério dos Santos A, dos Santos Bastos I, et al. In Vitro Trypanocidal and Antibacterial Activities of Essential Oils from Four Species of the Family Annonaceae. *Chem Biodivers*. 2019 Nov 1;16(11).
 51. Yagi S, Babiker R, Tzanova T, Schohn H. Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 Aug 1;9(8):763–70.

52. Vieira M, Bessa LJ, Martins MR, Arantes S, Teixeira APS, Mendes Â, et al. Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. *Chem Biodivers*. 2017 Jun 1;14(6).
53. Talei G-R, Mohammadi M, Bahmani M, Kopaei M. Synergistic effect of *Carum copticum* and *Mentha piperita* essential oils with ciprofloxacin, vancomycin, and gentamicin on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Int J Pharm Investig*. 2017;7(2):82.
54. Aelenei P, Rumbu CM, Guguianu E, Dimitriu G, Aprotosoiaie AC, Brebu M, et al. Coriander essential oil and linalool – interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Lett Appl Microbiol*. 2019 Feb 1;68(2):156–64.
55. Leite TR, da Silva MAP, Dos Santos ACB, Coutinho HDM, Duarte AE, da Costa JGM. Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of *croton limae*. *Pharm Biol*. 2017;55(1):2015–9.
56. Monteiro-Neto V, de Souza CD, Gonzaga LF, da Silveira BC, Sousa NCF, Pontes JP, et al. Cuminaldehyde potentiates the antimicrobial actions of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2020 May 14;15(5):e0232987.
57. Wongkattiya N, Sanguansermisri P, Fraser IH, Sanguansermisri D. Antibacterial activity of cuminaldehyde on food-borne pathogens, the bioactive component of essential oil from *cuminum cyminum* L. collected in Thailand. *J Complement Integr Med*. 2019 Dec 1;16(4).
58. Hashim GM, Almasaudi SB, Azhar E, Al Jaouni SK, Harakeh S. Biological activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil. *Saudi J Biol Sci*. 2017 Nov 1;24(7):1458–64.
59. Miladinović DL, Ilić BS, Kocić BD, Marković MS, Miladinović LC. In vitro trials of *Dittrichia graveolens* essential oil combined with antibiotics. *Nat Prod Commun*. 2016;11(6):865–8.
60. Caputo L, Smeriglio A, Trombetta D, Cornara L, Trevena G, Valussi M, et al. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils of *Leptospermum petersonii* and *Eucalyptus gunnii*. *Front Microbiol*. 2020 Apr 15;11:409.
61. Pereira NLF, Aquino PEA, Júnior JGAS, Cristo JS, Vieira Filho MA, Moura FF, et al. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2017 Sep 1;174:144–9.
62. A G, G S, A G, A S, M A, L S. Cytotoxic Effect and TLC Bioautography-Guided Approach to Detect Health Properties of Amazonian *Hedyosmum Sprucei* Essential Oil. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016.
63. Khoury M, El Beyrouthy M, Ouaini N, Eparvier V, Stien D. *Hirtellina lobelii* DC. essential oil, its constituents, its combination with antimicrobial drugs and its mode of action. *Fitoterapia*. 2019 Mar 1;133:130–6.
64. Andrade TA, Freitas TS, Araújo FO, Menezes PP, Dória GAA, Rabelo AS, et al. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of *Hyptis martiusii* Benth essential oil in β -cyclodextrin. *Biomed Pharmacother*. 2017 May 1;89:201–7.
65. Řebíčková K, Bajer T, Šilha D, Houdková M, Ventura K, Bajerová P. Chemical composition and determination of the antibacterial activity of essential oils in liquid and vapor phases extracted from two different southeast asian herbs-*houltuynia cordata* (saururaceae) and *persicaria odorata* (polygonaceae). *Molecules*. 2020 May 1;25(10).
66. S de R, A V, S van V. The In Vitro Antimicrobial Effects of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination With Conventional Antimicrobial Agents. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016.
67. Merghni A, Marzouki H, Hentati H, Aouni M, Mastouri M. Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. *Curr Res Transl Med*. 2016;64(1):29–34.

68. Mancarz GFF, Laba LC, Morais Silva TA, Pazzim M de S, de Souza D, Prado MRM, et al. Chemical composition and biological activity of Liquidambar styraciflua L. leaf essential oil. *Ind Crops Prod.* 2019 Oct 5;138:111446.
69. Muntean D, Licker M, Alexa E, Popescu I, Jianu C, Buda V, et al. Evaluation of essential oil obtained from *Mentha piperita* L. against multidrug-resistant strains. *Infect Drug Resist.* 2019;12:2905–14.
70. Alexopoulos A, Kimbaris AC, Plessas S, Mantzourani I, Voidarou C, Pagonopoulou O, et al. Combined Action of Piperitenone Epoxide and Antibiotics Against Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2019 Nov 19;10.
71. Tošić S, Stojičić D, Slavkowska V, Mihailov-Krstev T, Zlatković B, Budimir S, et al. Phytochemical composition and biological activities of native and in vitro-propagated *Micromeria croatica* (Pers.) Schott (Lamiaceae). *Planta.* 2019 May 1;249(5):1365–77.
72. Neta MCS, Vittorazzi C, Guimarães AC, Martins JDL, Fronza M, Endringer DC, et al. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. *Pharm Biol.* 2017 Jan 1;55(1):190–7.
73. Yamani HA, Pang EC, Mantri N, Deighton MA. Antimicrobial activity of Tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) essential oil and their major constituents against three species of bacteria. *Front Microbiol.* 2016;7(MAY).
74. Almeida RS, Freitas PR, Araújo ACJ, Menezes IRA, Santos EL, Tintino SR, et al. GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorífera* and *Safole*: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. *Antibiotics.* 2020 May 12;9(5):247.
75. Matebie WA, Zhang W, Xie G. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from *Phytolacca dodecandra* Collected in Ethiopia. *Molecules.* 2019 Jan 18;24(2).
76. El Mokni R, Majdoub S, Chaieb I, Jlassi I, Joshi RK, Hammami S. Chromatographic analysis, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oil of *Phlomis floccosa* D. Don. *Biomed Chromatogr.* 2019 Oct 24;33(10).
77. Silva ACA, Diodato JS, Castro JW, Matias EFF, Silva LE, do Amaral W, et al. Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blue led lights in the enhancement of the antibiotic activity of drugs against mdr bacterial strains. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2019 Oct 1;199.
78. Pereira Carneiro JN, da Cruz RP, da Silva JCP, Rocha JE, de Freitas TS, Sales DL, et al. *Piper diospyrifolium* Kunth.: Chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities. *Microb Pathog.* 2019 Nov 1;136.
79. Carneiro JNP, da Cruz RP, Campina FF, Costa M do S, dos Santos ATL, Sales DL, et al. GC/MS analysis and antimicrobial activity of the *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. essential oil. *Food Chem Toxicol.* 2020 Jan 1;135.
80. Duarte AE, De Menezes IRA, Morais Braga MFB, Leite NF, Barros LM, Waczuk EP, et al. Antimicrobial activity and modulatory effect of essential oil from the leaf of *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer on some antimicrobial drugs. *Molecules.* 2016 Jun 1;21(6).
81. Bogavac MA, Karaman MA, Sudi JJ, Radovanović BB, Janjušević LN, Četković NB, et al. Antimicrobial Potential of *Rosmarinus officinalis* Commercial Essential Oil in the Treatment of Vaginal Infections in Pregnant Women. *Nat Prod Commun.* 2017 Jan;12(1):127–30.
82. Fahed L, Stien D, Ouaini N, Eparvier V, El Beyrouthy M. Chemical Diversity and Antimicrobial Activity of *Salvia multicaulis* Vahl Essential Oils. *Chem Biodivers.* 2016 May 1;13(5):591–5.
83. Aghbash BN, Pouresmaeil M, Dehghan G, Nojaded MS, Mobaiyen H, Maggi F. Chemical Composition, Antibacterial and Radical Scavenging Activity of Essential Oils from *Satureja macrantha* C.A.Mey. At different growth stages. *Foods.* 2020 Apr 1;9(4).
84. Demirci F, Karaca N, Tekin M, Demirci B. Anti-inflammatory and antibacterial evaluation of *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* essential oil against rhinosinusitis pathogens. *Microb Pathog.*

2018 Sep 1;122:117–21.

85. Grădinaru AC, Trifan A, Șpac A, Brebu M, Miron A, Aprotosoiaie AC. Antibacterial activity of traditional spices against lower respiratory tract pathogens: combinatorial effects of *Trachyspermum ammi* essential oil with conventional antibiotics. *Lett Appl Microbiol*. 2018 Nov 1;67(5):449–57.
86. David A, Wang F, Sun X, Li H, Lin J, Li P, et al. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash Essential Oil Extracted by Carbon Dioxide Expanded Ethanol. *Molecules*. 2019 May 17;24(10).
87. Dekic MS, Radulovic NS, Rand Strok Signelovic VN, Stojanovic-Radic ZZ, Veljkovic BP. Essential Oils and Diethyl Ether Extracts of Serbian *Xeranthemum cylindraceum* and *X. annum*: Chemical Composition, Antimicrobial Activity, and Chemotaxonomic Implications. *Chem Biodivers*. 2015 Sep 1;12(9):1378–97.
88. Sheikholeslami S, Mousavi SE, Ahmadi Ashtiani HR, Hosseini Doust SR, Rezayat SM. Antibacterial activity of silver nanoparticles and their combination with *zataria multiflora* essential oil and methanol extract. *Jundishapur J Microbiol*. 2016 Oct 1;9(10).

7 AUTOEVALUACIÓN

Este trabajo se planteó desde un inicio como una memoria escrita de los resultados obtenidos durante la estancia de prácticas externas. Debido a la situación excepcional en la que nos encontramos, se tuvo que plantear una versión alternativa y se adaptó a un trabajo sobre la bibliografía existente de un tema similar al inicial. A pesar de las adversidades que se han presentado durante el desarrollo del trabajo, se ha podido adaptar en todo momento a la situación y sacar adelante un trabajo que cumpliera con los criterios y expectativas esperados.

Aunque en un principio este no fue el planteamiento o el resultado esperado del trabajo, me siento orgullosa de haber podido realizar un trabajo sobre la aplicación de productos naturales en el campo de la microbiología, ya que estas siempre han sido dos temáticas que me ha interesado en gran medida durante el transcurso de la carrera y con este trabajo los he podido desarrollar de forma más específica y aplicada al campo clínico.

Durante los 4 años que he pasado en la universidad he podido adquirir gran cantidad de conocimientos que su puesta en práctica me ha ayudado a la realización de este trabajo. Entre los conocimientos que he considerado más valiosos y favorecedores han sido los adquiridos en relación con la búsqueda de información y literatura científica. Al realizar un trabajo de base bibliográfica, me ha permitido poder desarrollar más la investigación de la literatura existente y poner en práctica los conocimientos críticos adquiridos para poder seleccionar, interpretar y entender la literatura útil para poder realizar esta memoria.

8 AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer y dedicar esta memoria a todas las personas que me han acompañado y apoyado durante estos 4 años de paso por la universidad y sobre todo durante la realización de esta memoria.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Dania García Sánchez por su compromiso y su dedicación a la hora de guiarme y aconsejarme en todo lo posible para efectuar este trabajo.

A mis compañeros y amigos por ser una fuente de ánimo y soporte. Muchas gracias a todos por haber sido la mejor ayuda posible en todo momento y ser excepcionales.

Y, por último y sobre todo agradecer a mi familia, especialmente a mi madre y a mi hermana, por el apoyo brindado todos estos años. Sin su motivación y empuje no habría sido capaz de superar todas las adversidades que se han presentado, en especial estos últimos meses.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1. SELECCIÓN BIBLIOGRÁFICA DE ACEITES ESENCIALES CON EFECTO ANTIBACTERIANO FRENTE *Staphylococcus aureus*

Tabla 7. Aceites esenciales con actividad antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* y sus valores MIC. Adaptado de las referencias presentes en la tabla.

Aceite esencial	Cepa	MIC	MIC (µg/mL)	Ref.
<i>Aeollanthus suaveolens</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	100 mg/mL	0.1	(44)
<i>Aloysia citriodora</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	2.84 - 8.37 mg/mL	0.00248-0.00837	(45)
<i>Baccharis burchellii</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	>1000 µg/mL	>1000	(46)
<i>Baccharis coridifolia</i>	<i>S. aureus</i> 10 ^a	512 µg/mL	512	(47)
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	102 µg/mL	102	(48)
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	<i>S. aureus</i> 10 ^a	512 µg/mL	512	(48)
<i>Baccharis oreophila</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	1250 µg/mL	1250	(49)
<i>Baccharis organensis</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	>1000 µg/mL	>1000	(46)
<i>Bocageopsis multiflora</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0.19 mg/mL	0.00019	(21)
<i>Bocageopsis multiflora</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 33591) ^b	4.68 µg/mL	4.68	(50)
<i>Boswellia papyrifera</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	32 µg/mL	32	(51)
<i>Calamintha nepeta</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	20 mg/mL	0.02	(52)
<i>Carum copticum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	0.17 µg/mL	0.17	(53)
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	<i>S. aureus</i> 1199B	≥1024 µg/mL	≥1024	(29)
<i>Coriandrum sativum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 33591) ^b	5.44 µg/mL	5.44	(54)
<i>Coriandrum sativum</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	5.44 µg/mL	5.44	(54)
<i>Coriandrum sativum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	5.44 µg/mL	5.44	(54)
<i>Croton limae</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	512 µg/mL	512	(55)
<i>Croton zambesicus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	16 µg/mL	16	(56)
<i>Cuminum cyminum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	12 mg/mL	0.012	(56)
<i>Cuminum cyminum</i>	<i>S. aureus</i> (DMST 8840)	128 mg/mL	0.128	(57)
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	16 µg/mL	16	(56)
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	2.3 µg/mL	2.3	(58)
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 33591) ^b	4.69 µg/mL	4.69	(58)
<i>Cyper rotundus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	16 µg/mL	16	(56)
<i>Dittrichia graveolens</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	1138.8 µg/mL	1138.8	(59)
<i>Dittrichia graveolens</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	4555.2 µg/mL	4555.2	(59)
<i>Dittrichia viscosa</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	15 mg/mL	0.015	(52)
<i>Ephedranthus amazonicus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0.09 mg/mL	0.00009	(21)
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	20 mg/mL	0.02	(52)
<i>Eucalyptus gunnii</i>	<i>S. aureus</i> DSM	0.5 µg/mL	0.5	(60)
<i>Eugenia jambolana</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	128 µg/mL	128	(61)
<i>Eugenia jambolana</i>	<i>S. aureus</i> (SA358) ^a	128 µg/mL	128	(61)
<i>Foeniculum vulgare</i> (semillas)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	25 mg/mL	0.025	(52)
<i>Foeniculum vulgare</i> (hojas)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	20 mg/mL	0.02	(52)
<i>Fusaea longifolia</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 33591) ^b	37.5 µg/mL	37.5	(50)
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	0.3 mg/mL	0.0003	(22)
<i>Guatteria blepharophylla</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0.05 mg/mL	0.00005	(21)
<i>Hedyosmum sprucei</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 29230)	1000 µg/mL	1000	(62)
<i>Heracleum ternatum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0.52 - 2.40 mg/mL	0.00052 - 0.0024	(23)

<i>Heracleum verticillatum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0.14 - 4.30 mg/mL	0.00014 - 0.0043	(23)
<i>Hirtellina lobelii</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	32 µg/mL	32	(63)
<i>Hirtellina lobelii</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 33591) ^b	128 µg/mL	128	(63)
<i>Hyptis martiusii</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	32 µg/mL	32	(64)
<i>Hyptis martiusii</i>	<i>S. aureus</i> 10 ^a	≥1024 µg/mL	≥1024	(64)
<i>Houttuynia cordata</i>	<i>S. aureus</i> (CCM 4223)	1024 µg/mL	1024	(65)
<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	2 mg/mL	0.002	(66)
<i>Laurus nobilis</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	31.25 mg/mL	0.03125	(67)
<i>Liquidambar styraciflua</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	31.2 µg/mL	31.2	(68)
<i>Leptospermum petersonii</i>	<i>S. aureus</i> DSM	1.0 µg/mL	1.0	(60)
<i>Lippia alba</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0.5 - 1 mg/mL	0.0005-0.001	(24)
<i>Mentha piperita</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	5 mg/mL	0.005	(69)
<i>Mentha piperita</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 ^b	20 mg/mL	0.02	(69)
<i>Mentha pulegium</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	15 mg/mL	0.015	(52)
<i>Mentha spicata</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	64 µg/mL	64	(70)
<i>Micromeria croatica</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	10.13 mg/mL	0.01013	(71)
<i>Murraya paniculata</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	1 mg/mL	0.001	(72)
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	0.11 mg/mL	0.00011	(25)
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	1024 µg/mL	1024	(38)
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>S. aureus</i> (M-177)	1024 µg/mL	1024	(38)
<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	1000 µg/mL	1000	(37)
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	2.5 µg/mL	2.5	(73)
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	<i>S. aureus</i> NCTC 6571 ^b	2.25 µg/mL	2.25	(73)
<i>Ocotea odorifera</i>	<i>S. aureus</i> 10	512 µg/mL	512	(74)
<i>Persicaria odorata</i>	<i>S. aureus</i> (CCM 4223)	>1024 µg/mL	>1024	(65)
<i>Phytolacca dodecandra</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	>128 µg/mL	>128	(75)
<i>Phlomis floccosa</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	1250 µg/mL	1250	(76)
<i>Piper aduncum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	≥1024 µg/mL	≥1024	(77)
<i>Piper aduncum</i>	<i>S. aureus</i> 10	≥1024 µg/mL	≥1024	(77)
<i>Piper arboreum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	512 µg/mL	512	(77)
<i>Piper arboreum</i>	<i>S. aureus</i> 10	512 µg/mL	512	(77)
<i>Piper gaudichaudianum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	≥1024 µg/mL	≥1024	(77)
<i>Piper gaudichaudianum</i>	<i>S. aureus</i> 10	≥1024 µg/mL	≥1024	(77)
<i>Piper diospyrifolium</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	≥1024 µg/mL	≥1024	(78)
<i>Piper diospyrifolium</i>	<i>S. aureus</i> 10	≥1024 µg/mL	≥1024	(78)
<i>Piper mikanianum</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	≥1024 µg/mL	≥1024	(79)
<i>Piper mikanianum</i>	<i>S. aureus</i> 10	≥1024 µg/mL	≥1024	(79)
<i>Plectranthus amboinicus</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	0.25 mg/mL	0.00025	(26)
<i>Plectranthus amboinicus</i>	OVRSA ^c	0.5 mg/mL	0.0005	(26)
<i>Rhaphiodon echinus</i>	<i>S. aureus</i> (SA358) ^a	≥ 1024 µg/mL	≥ 1024	(80)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	20 mg/mL	0.02	(52)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>S. aureus</i> ^d	25 mg/mL	0.025	(81)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>S. aureus</i> ^d	6.2 mg/mL	0.0062	(81)
<i>Salvia multicaulis</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	128 µg/mL	128	(82)
<i>Salvia multicaulis</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 33591) ^b	128 µg/mL	128	(82)
<i>Satureja macrantha</i> (vegetativo)	<i>S. aureus</i> (ATCC 23922)	10 µg/mL	10	(83)
<i>Satureja macrantha</i> (floral)	<i>S. aureus</i> (ATCC 23922)	5 µg/mL	5	(83)
<i>Satureja macrantha</i> (frutal)	<i>S. aureus</i> (ATCC 23922)	10 µg/mL	10	(83)
<i>Succisa pratensis</i> (hojas)	<i>S. aureus</i> NCTC 4163	>3.44 mg/mL	>0.00344	(27)

<i>Succisa pratensis</i> (flores)	<i>S. aureus</i> NCTC 4163	0.86 mg/mL	0.00086	(27)
<i>Thymus mastichina</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	20 mg/mL	0.02	(52)
<i>Thymus sipyleus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1026	160 µg/mL	160	(84)
<i>Thymus sipyleus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 700699 ^b	310 µg/mL	310	(84)
<i>Trachyspermum ammi</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	4 mg/mL	0.0041	(85)
<i>Trachyspermum ammi</i>	<i>S. aureus</i> MRSA 37	8 mg/mL	0.008	(85)
<i>Trachyspermum ammi</i>	<i>S. aureus</i> MRSA 4185	8 mg/mL	0.008	(85)
<i>Vetiveria zizanioides</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	39 µg/mL	39	(86)
<i>Xeranthemum cylindraceum</i>	<i>S. aureus</i> ^d	30 µg/mL	30	(87)
<i>Xeranthemum annum</i>	<i>S. aureus</i> ^d	30 µg/mL	30	(87)
<i>Xylopiia aromatica</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	1.20 mg/mL	0.0012	(21)
<i>Zataria multiflora</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	3.125 mg/mL	0.003125	(88)
<i>Zataria multiflora</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 33591) ^b	3.125 mg/mL	0.003125	(88)

^a Cepa *S. aureus* MDR

^b Cepa *S. aureus* MRSA

^c Cepa *S. aureus* resistente a oxacilina y vancomicina

^d Cepa *S. aureus* aislada de caso clínico

9.2 ANEXO 2. SELECCIÓN BIBLIOGRÁFICA DE ACEITES ESENCIALES COMBINADOS CON ANTIBIÓTICOS Y SU EFECTO FRENTE *Staphylococcus aureus*

Tabla 8. Aceites esenciales combinados con antibióticos y el efecto de su combinación en la actividad antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus*. Adaptado de las referencias presentes en la tabla.

Combinación	Cepa <i>S. aureus</i>	MIC aceite esencial (µg/mL)	MIC antibiótico (µg/mL)	MIC aceite esencial combinado (µg/mL)	MIC antibiótico combinado (µg/mL)	FIC	Efecto	Ref.
<i>Coriandrum sativum</i> + Oxalacina	ATCC 33591	5.44	512	1.36	64	0.38	Sinérgico	(39)
<i>C. sativum</i> + Amoxicilina	ATCC 33591	5.44	256	1.36	16	0.31	Sinérgico	(39)
<i>C. sativum</i> + Gentamicina	ATCC 33591	5.44	8	0.68	1	0.25	Sinérgico	(39)
<i>C. sativum</i> + Tetraciclina	ATCC 33591	5.44	128	1.36	16	0.38	Sinérgico	(39)
<i>C. sativum</i> + Oxalacina	ATCC 43300	5.44	64	2.72	8	0.63	Aditivo	(39)
<i>C. sativum</i> + Amoxicilina	ATCC 43300	5.44	64	1.36	16	0.50	Sinérgico	(39)
<i>C. sativum</i> + Gentamicina	ATCC 43300	5.44	256	1.36	16	0.31	Sinérgico	(39)
<i>C. sativum</i> + Tetraciclina	ATCC 43300	5.44	1	2.72	0.02	0.52	Aditivo	(39)
<i>C. sativum</i> + Amoxicilina	ATCC 6538	5.44	0.25	2.72	0.004	0.52	Aditivo	(39)
<i>C. sativum</i> + Eritromicina	ATCC 6538	5.44	0.33	2.72	0.02	0.56	Aditivo	(39)
<i>C. sativum</i> + Gentamicina	ATCC 6538	5.44	0.13	1.36	0.03	0.50	Sinérgico	(39)
<i>C. sativum</i> + Ciprofloxacina	ATCC 6538	5.44	0.50	2.72	0.06	0.63	Aditivo	(39)
<i>C. sativum</i> + Tetraciclina	ATCC 6538	5.44	0.50	1.36	0.13	0.50	Sinérgico	(39)
<i>C. sativum</i> + Clindamicina	ATCC 6538	5.44	0.78	2.72	0.006	0.51	Aditivo	(39)
<i>Hirtellina lobelii</i> + Vancomicina	ATCC 29213	32	1	1	0.5	0.50	Sinérgico	(63)
<i>Ocimum basilicum</i> + Imipenem	ATCC 6538	1024	4	32	0.125	0.0625	Sinérgico	(38)
<i>O. basilicum</i> + Ciprofloxacina	ATCC 6538	1024	2	4096	0.5	4.25	Antagónico	(38)
<i>Ocimum gratissimum</i> + Oxalacina	5B	2000	2000	1000	31025	0.516	Aditivo	(37)
<i>O. gratissimum</i> + Ciprofloxacina	5B	2000	62.5	1000	3.90	0.562	Aditivo	(37)
<i>Satureja montana</i> + Gentamicina	ATCC 25923	0.78	0.5	0.06	0.1	0.25	Sinérgico	(36)