

# **PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**

## **“EVALUACIÓN DEL USO DE FITOQUÍMICOS PARA EL TRATAMIENTO DE BACTERIAS MULTIRRESISTENTES”**

**Vázquez, Nicolás Martín – LU: 1021518**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Moreno de Contartese, Silvia. Fundación Instituto Leloir, Instituto de  
Investigaciones Bioquímicas Buenos Aires (I.I.B.A.- CONICET); CEBBAD,  
Universidad Maimonides.**

Co-Tutor:

**Cardozo, Julián. Universidad Argentina de la Empresa**

**Diciembre 1, 2017**



**UADE**

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

## **Agradecimientos**

**Agradezco inmensamente y de una manera muy especial a todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo:**

**A mi familia**

**A mi novia**

**A mis amigos**

**A mi tutora y co-tutor de este trabajo,  
Dra. Silvia Moreno y Lic. Julián Cardozo.**

**A mis compañeros de laboratorio,  
Dra. Estela Galván y Dr. Guillermo Juárez.**

**A dos grandes docentes de la carrera,  
Dr. Federico Prada y Dr. Leandro Julián Martínez Tosar.**

**Al personal de la Fundación Instituto Leloir, de la Universidad Maimónides, del Servicio de Microbiología y del grupo de Medicina Integradora del Hospital de Pediatría J.P. Garrahan.**

**A la Universidad Argentina de la Empresa.**

## Resumen

El tratamiento de las bacterias multirresistentes a antibióticos de uso común en la clínica humana representa uno de los mayores desafíos para la salud pública mundial en la actualidad. Los fitoquímicos que presentan actividad antimicrobiana, en general derivados de plantas medicinales, son una potencial estrategia para combatir las bacterias resistentes a múltiples antibióticos (MDR, del inglés multi-drug resistant). Si bien se conocía que el diterpeno principal de hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero) el ácido carnósico y el monoterpeno volátil 1,8-cineol que es uno de los componentes principales de sus aceites esenciales presentaban efectos antimicrobianos, en este trabajo se investigó si los mismos eran capaces o no de inhibir cepas nosocomiales multirresistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes (MDR-Kp). Se estudió la actividad antibacteriana mediante la técnica de dilución en medio líquido en placas de 96 pocillos. Se evaluó el efecto antibiofilm mediante tinción con cristal violeta y análisis por microscopia confocal. Los resultados mostraron que el ácido carnósico exhibió actividad antibacteriana contra todos los aislados clínicos de SARM ensayados en estado planctónico y que presentaban entre 4 a 9 resistencias a antibióticos. Demostramos en este trabajo que la combinación del diterpeno con gentamicina no solo disminuyó las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de ambos compuestos entre 4 a 5 veces, sino que notablemente fue capaz de potenciar la acción bactericida de la gentamicina entre 32 a 40 veces tanto en aislados clínicos de SARM susceptibles como sobre 2 aislados altamente resistentes a la gentamicina. Además, los resultados obtenidos en este trabajo permitieron caracterizar la actividad antibiofilm (disminución del biofilm preformado) del 1,8-cineol sobre aislados nosocomiales de MDR-Kp. Todos los resultados obtenidos aquí soportan la idea que los fitoquímicos de romero estudiados exhiben un alto potencial para la prevención/tratamiento de infecciones asociadas a bacterias multirresistentes, en particular asociadas con SARM y MDR-Kp.

## Abstract

The treatment of multiresistant bacteria with antibiotics commonly used in the human clinic represents one of the greatest challenges at this time for public health worldwide. Phytochemicals that present antimicrobial activity, in general obtained from medicinal plants, are a potential strategy to combat multidrug-resistant bacteria (MDR). Although it is well known that carnosic acid, main diterpene of leaves of *Rosmarinus officinalis* (rosemary), and 1,8-cineole, monoterpene component of its essential oils had antimicrobial effects, in this work, we evaluated the possibility that they were also effective against nosocomial strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and MDR-*Klebsiella pneumoniae* (MDR-Kp). The antibacterial activity was studied by broth microdilution technique in 96-well plates. On the other hand, the antibiofilm effect (stablish biofilm) was evaluated by crystal violet staining and confocal microscopy analysis. The results showed that carnosic acid exhibited a good antibacterial activity against all the clinical isolates of MRSA growing in planktonic state tested, which presented between 4 to 9 antibiotic resistance, In this work it was also demonstrated that the combination of carnosic acid with gentamicin not only decreased the minimum inhibitory concentrations (MICs) of both compounds by 4 to 5 times, but notably it was able to improve the bactericidal potency of gentamicin by 32 to 40 times against both gentamicin-susceptible and also against gentamicin-resistant MRSA clinical isolates. In addition, other results obtained allowed to demonstrate the antibiofilm activity (decrease in the preformed biofilm) of 1,8-cineole against MDR-Kp. All results obtained here support the idea that rosemary phytochemicals studied here showed a high potential for the prevention / treatment of infections associated with multiresistant bacteria, particularly associated with MRSA and MDR-Kp.

## Abreviaturas

**MDR:** del inglés “multi-drug resistant”

**SARM:** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

**MDR-Kp:** del inglés “multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*”

**CIM:** concentración inhibitoria mínima

**MIC:** del inglés “minimal inhibitory concentration”

**R. officinalis:** *Rosmarinus officinalis*

**ESKAPE:** *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*

**K. pneumoniae:** *Klebsiella pneumoniae*

**S. aureus:** *Staphylococcus aureus*

**E. coli:** *Escherichia coli*

**PDR:** del inglés pan-drug-resistant

**R:** del inglés resistant o resistente

**XDR:** del inglés extensively drug-resistant

**OXA:** oxaciclina

**FOX:** cefoxitina

**ERY:** eritromicina

**CLY:** clindamicina

**GEN:** gentamicina

**CIP:** ciprofloxacina

**LVX:** levofloxacina

**LZD:** linezolid

**RIF:** rifampicina

**I:** intermedio

**S:** susceptible

**SAM:** ampicilina-sulbactam

**TZP:** piperacilina-tazobactam

**CEF:** cefalotina

**CTX:** cefotaxima

**CDZ:** ceftazidima

**CFPM:** cefepima

**IMI:** imipenem

**MER:** meropenem

**AMK:** amikacina

**NAL:** ácido nalidíxico

**NTF:** nitrofurantoína

**COLI:** colistina

**TMP/SMX:** trimetoprima-sulfametoxazol

**ne:** no ensayado

**MH:** Mueller-Hinton

**ml:** mililitro

**μl:** microlitro

**ufc:** unidades formadoras de colonias

**°C:** grados Celsius

**RPM:** revolución/es por minuto

---

**nm:** nanómetros

**A<sub>Control</sub>:** absorbancia del control

**A<sub>Muestra</sub>:** absorbancia de la muestra

**CBM:** concentración bactericida mínima

**TSB:** del inglés “trypticase soy broth”

**ELISA:** del inglés “enzyme-linked immunosorbent assay”

**CFI:** concentración fraccionaria inhibitoria

**ICFI:** índice de concentraciones fraccionarias inhibitorias

**CFB:** concentración fraccionaria bactericida

**ICFB:** índice de concentraciones fraccionarias bactericidas

**NaCl:** cloruro de sodio

**DO:** densidad óptica

**GFP:** del inglés “green fluorescent protein”

**AC:** ácido carnósico

**hs:** horas

***E. faecalis:*** *Enterococcus faecalis*

**Redox:** reducción-oxidación

## Tabla de contenidos

<b>Resumen</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	4
<b>Abreviaturas</b> .....	5
<b>1. Introducción</b> .....	10
1.1. Generalidades .....	11
1.2. Bacterias multirresistentes a antibióticos .....	11
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	16
1.5. Biofilm bacterianos .....	16
1.6. Evolución de los antibióticos de uso común .....	19
1.7. Fitoquímicos antimicrobianos .....	21
1.8. Interacción de antibióticos de uso común y fitoquímicos .....	21
1.9. Actividad antibiofilm .....	23
<b>2. Antecedentes</b> .....	24
<b>3. Objetivos</b> .....	28
3.1. Objetivo general .....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
<b>4. Materiales y Métodos</b> .....	30
4.1. Cepas bacterianas utilizadas.....	31
4.2. Metabolitos secundarios de plantas.....	32
4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana.....	33
4.4. Interacción de fitoquímicos con antibióticos de uso en clínica.....	33

---



---

4.5. Producción de biofilm bacteriano.....	34
4.6. Evaluación de actividad antibiofilm.....	35
4.7. Estudio de eficacia bactericida sobre biofilm bacteriano.....	35
4.8. Estudio sobre la estructura del biofilm bacteriano .....	36
<b>5. Resultados .....</b>	<b>38</b>
5.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de fitoquímicos no-volátiles, presentes en <i>R. officinalis</i> sobre aislados clínicos de SARM.....	39
5.1.1. Eficacia del ácido carnósico contra aislados clínicos de SARM creciendo en suspensión.....	39
5.1.2. Eficacia de la gentamicina en combinación con el ácido carnósico contra aislados clínicos de SARM creciendo en suspensión.....	42
5.1.3. Potenciación de la ciprofloxacina por el ácido carnósico contra aislados clínicos de SARM .....	49
5.2. Evaluación de la actividad antibiofilm de fitoquímicos volátiles presente en <i>R. officinalis</i> sobre aislados clínicos multirresistentes de <i>K. pneumoniae</i> .....	50
5.2.1. Capacidad de formación de biofilm en aislados clínicos multirresistentes de <i>K. pneumoniae</i> .....	50
5.2.2. Actividad antibiofilm del 1,8-cineol sobre aislados clínicos multirresistentes de <i>K. pneumoniae</i> .....	52
5.2.3. Efecto del fitoquímico sobre la estructura del biofilm de <i>K. pneumoniae</i> .....	54
<b>6. Discusión .....</b>	<b>58</b>
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>63</b>
<b>8. Perspectivas .....</b>	<b>65</b>
<b>9. Bibliografía .....</b>	<b>67</b>

---

## **1. Introducción**

## 1.1. Generalidades

Los antibióticos, que han permitido salvar millones de vidas, fueron perdiendo eficacia en el combate frente a las enfermedades infecciosas por la aparición y el sostenido aumento a través de los años de la resistencia bacteriana a la mayoría de los mismos que se usan hoy en día en la clínica. La dramática emergencia mundial quedó claramente demostrada por estudios epidemiológicos en donde el mal uso de antibióticos ha provocado la diseminación de cepas resistentes desencadenando un estado de crisis en el ámbito de la salud (Ventola, 2015). Es así que la resistencia bacteriana a la mayoría de los antibióticos de uso en la clínica actual representa una importante causa de morbilidad y mortalidad en humanos, así como ocasiona un aumento en los costos de internación. En dicho panorama, se estima que para el 2050 más de 10 millones de personas habrán fallecido a causa de infecciones asociadas con la resistencia a antibióticos, superando así las ocasionadas por cáncer (8,2 millones) y accidentes de tránsito (1,2 millones) (Premanandh *et al*, 2015).

El cuadro de situación se complica más cuando las farmacéuticas mostraron en los últimos años muy poco interés en el desarrollo de nuevos tipos de antibióticos por no visualizar un retorno económico acorde al costo invertido para introducir nuevos antibióticos al mercado. En general la industria farmacéutica se ha centrado en el desarrollo de derivados de antibióticos ya conocidos o en re-uso de antibióticos abandonados en el pasado por su alta toxicidad como es el caso de la colistina o las sulfas. En consecuencia, se cuenta actualmente con pocas alternativas terapéuticas para tratar infecciones bacterianas en general y bacterias multirresistentes en particular, aspecto que impulsa el interés por la investigación y el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos dentro del campo de los fitoquímicos. Los fitoquímicos antimicrobianos, hoy en día, presentan un alto potencial y competencia dentro de la farmacología actual para el tratamiento de bacterias multirresistentes.

## 1.2. Bacterias multirresistentes a antibióticos

Las bacterias resistentes a múltiples antibióticos son la consecuencia del uso desmedido y masivo de los antibióticos y su aparición se remonta a las primeras bacterias resistentes a la penicilina ocasionadas por mutaciones y sometidas a una presión selectiva positiva haciéndose inmunes a la droga. Este mismo patrón, junto a la transferencia horizontal de genes entre distintas especies bacterianas, fue repitiéndose una y otra vez con distintas drogas hasta llegar al día de hoy, donde una

---

bacteria con resistencia antibiótica no es solamente resistente a un solo antibiótico sino a muchos simultáneamente (Figura 1).

**Como la resistencia antibiotica ocurre**

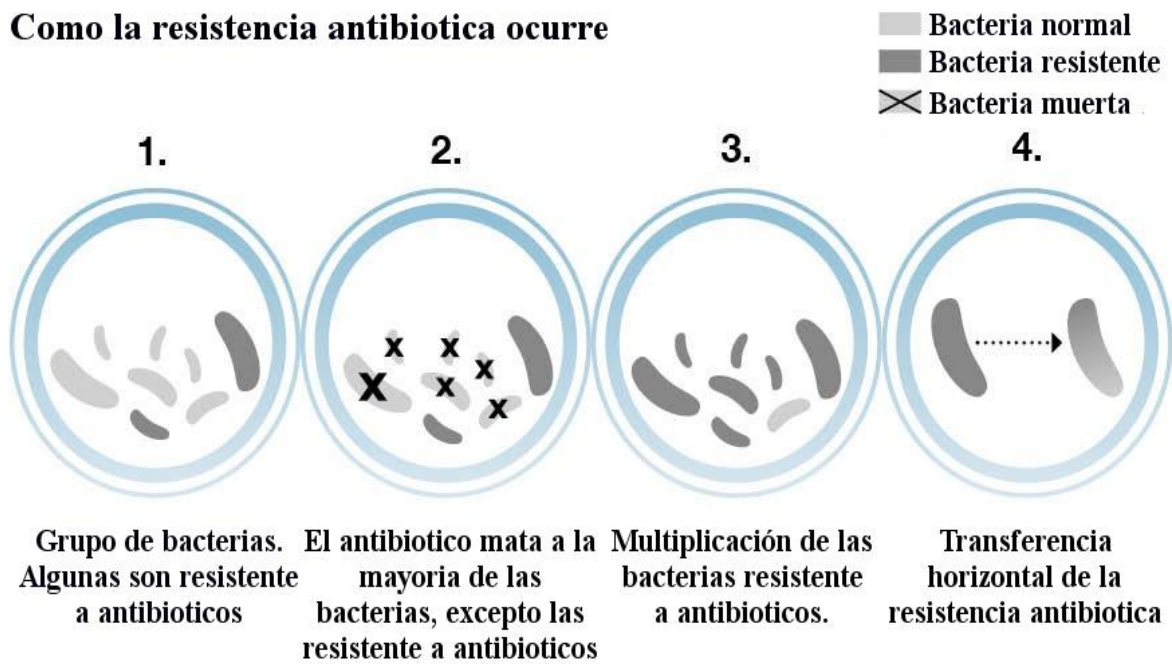


Figura 1. Generación de la resistencia antibiotica.  
 (GOBIERNO DEL REINO UNIDO, 2015)

Se han detectado seis grupos de bacterias multirresistentes a antibióticos las cuales muestran mayor prevalencia en el ámbito de la salud, las cuales fueron denominadas como ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella p.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter sp*) (Boucher *et al*, 2009).

En particular, *S. aureus* y *K. pneumoniae* son dos patógenos causantes de un amplio espectro de infecciones que provocan gran preocupación en el ámbito de la salud por la aparición de cepas multirresistentes a antibióticos (WHO, 2014).

### 1.3. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* es una bacteria Gram-positiva facultativa que se encuentra en general asintomática en la piel, sin embargo, es la responsable de infecciones en heridas y puede llegar a producir infecciones severas como endocarditis y bacteriemias que lleven a la muerte en particular en personas inmunosuprimidas. Existen limitadas opciones terapéuticas para tratar a los pacientes infectados con SARM, una de las fuentes más importantes a nivel mundial de infecciones asociadas con la atención en el ámbito de la salud provocando hospitalizaciones más prolongadas y alto nivel de mortalidad (WHO, 2014; Yilmaz *et al*, 2016) (Figura 2). Este patógeno además de la resistencia adquirida a los  $\beta$ -lactámicos ha adquirido resistencias a casi todas las clases de antibióticos de uso en la clínica actual como son los aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos y tetraciclinas (Vuong *et al*, 2016).

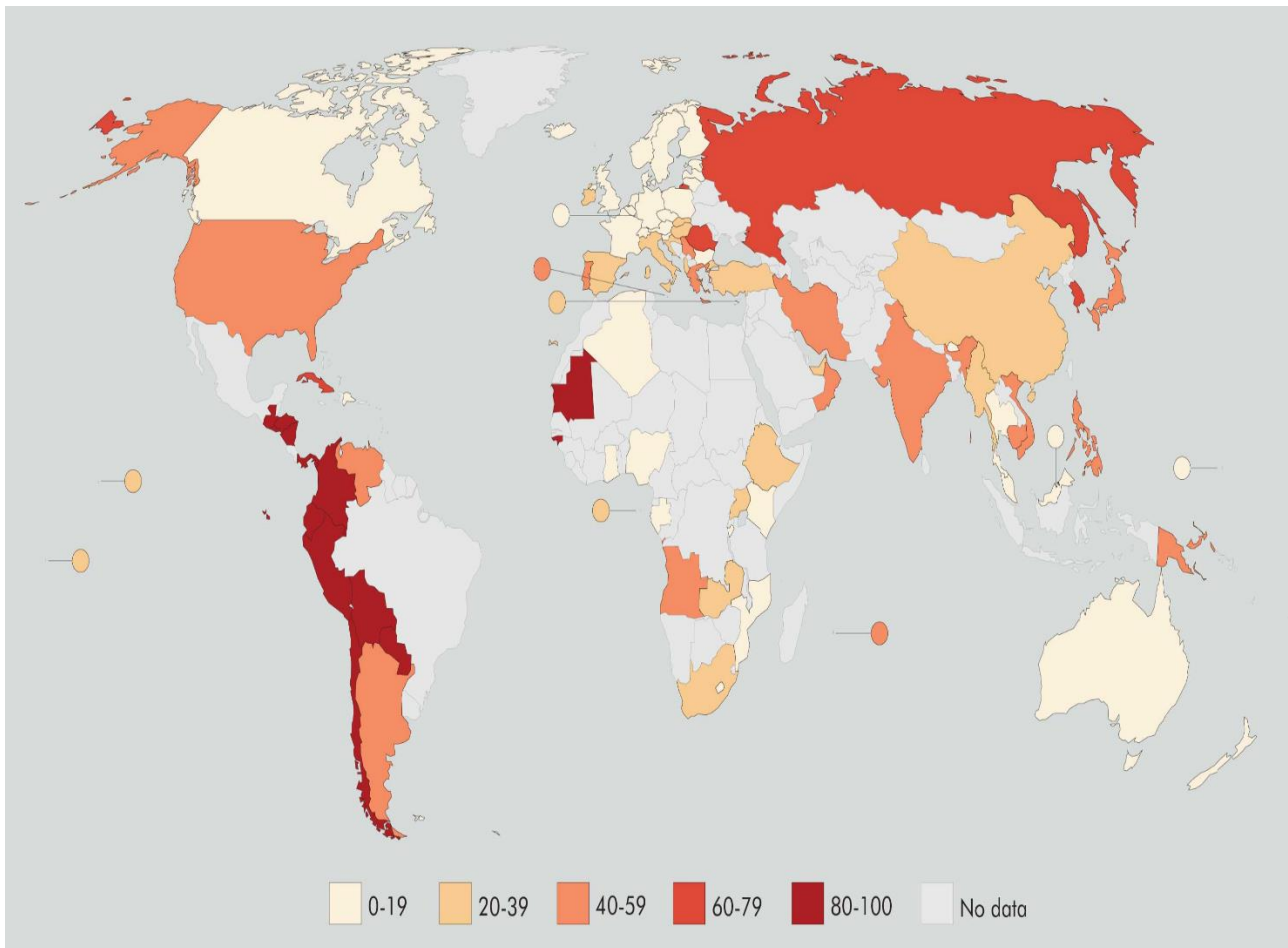


Figura 2. Incidencia a nivel mundial de SARM entre los años 2011 y 2014.  
(AMR CONTROL, 2017)

#### 1.4. *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* es una bacteria Gram-negativa asociada a infecciones pulmonares, del tracto urinario y bacteriemia, entre otras (Nordmann *et al*, 2009). En los últimos años se ha observado un dramático incremento de cepas de *K. pneumoniae* multirresistente a antibióticos, en particular a los carbapenémicos que son la última línea de defensa contra infecciones por bacterias Gram-negativas. Además, dicha bacteria presenta diversos mecanismos de patogenicidad como ser una alta capacidad para formar biofilm, lo cual posiciona a la mayoría de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* como una amenaza mundial para la salud pública causando un aumento de la mortalidad, la morbilidad y los costos de atención médica (WHO, 2014; Woodford *et al*, 2004).

#### 1.5. Biofilm bacteriano

La capacidad de formación de biofilm bacterianos que presentan una estructura muy compleja, se asocia en general con una mayor resistencia a los antibióticos con respecto al cultivo en suspensión ó planctónico (Patil y Patil, 2017). Los biofilms son considerados comunidades de microorganismos que crecen adheridas a distintos tipos de superficies en los cuales las células crecen embebidas en sustancias poliméricas extracelulares secretada por ellas mismas (Figura 3).

Además, los biofilms son un factor de riesgo en procedimientos médicos que implican la instalación de traqueales tubos o catéteres urinarios y la implantación de objetos extraños (reemplazos óseos artificiales, implantes mamarios por su capacidad para crecer en dichos soportes sólidos (Song *et al*, 2013; Flemming *et al*, 2016).

Tanto *K. pneumoniae* al igual que *S. aureus*, se las ha encontrado adheridas a dispositivos de uso médico (catéteres urinarios, tubos endotraqueales) creciendo en biofilms (McCarthy *et al*, 2015). En particular, *K. pneumoniae* asociada con *E. coli* y *S. aureus* se los ha reportado que forman comunidades creciendo en biofilms polimicrobianos en infecciones urinarias y respiratorias así como asociadas a dispositivos médicos (Galvan *et al*, 2016; Patil y Patil, 2017). Este hecho aumenta la complejidad de un tratamiento eficaz frente a enfermedades causadas por este tipo de bacterias (Dalecki *et al*, 2016).



Es así, que tanto la resistencia bacteriana a los antibióticos como el crecimiento en biofilm contribuyen al éxito en la proliferación de bacterias multirresistentes en ámbitos sanitarios.

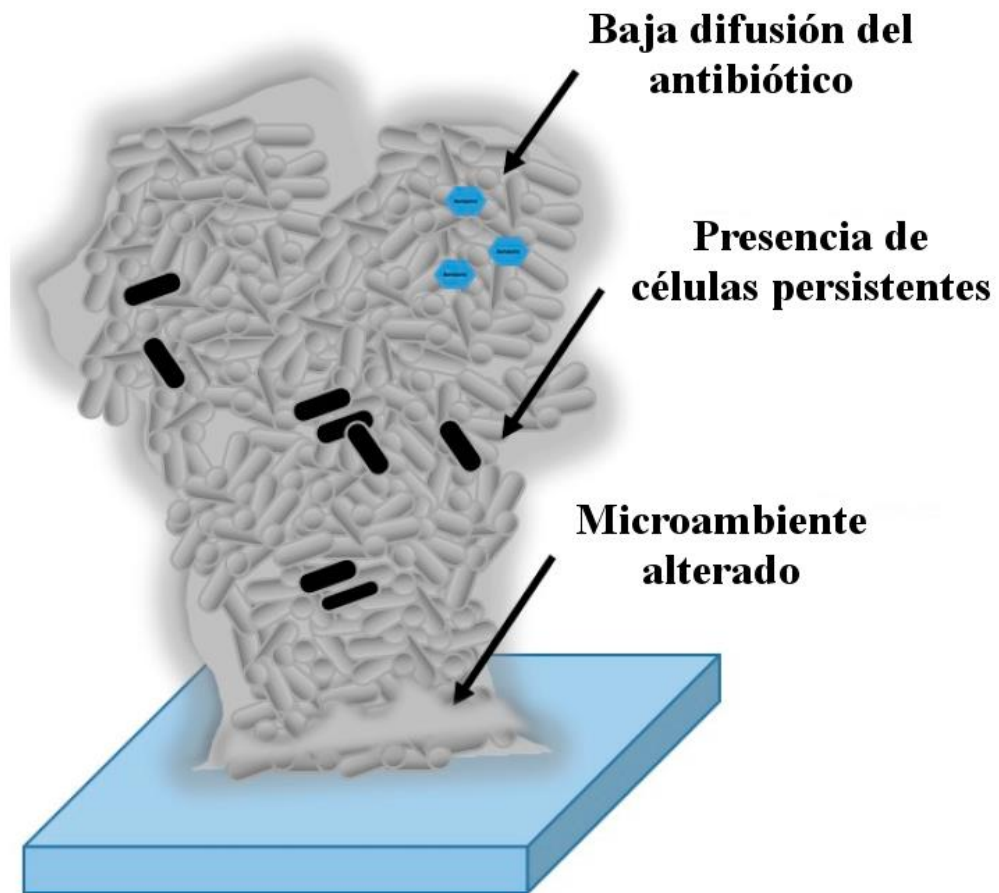


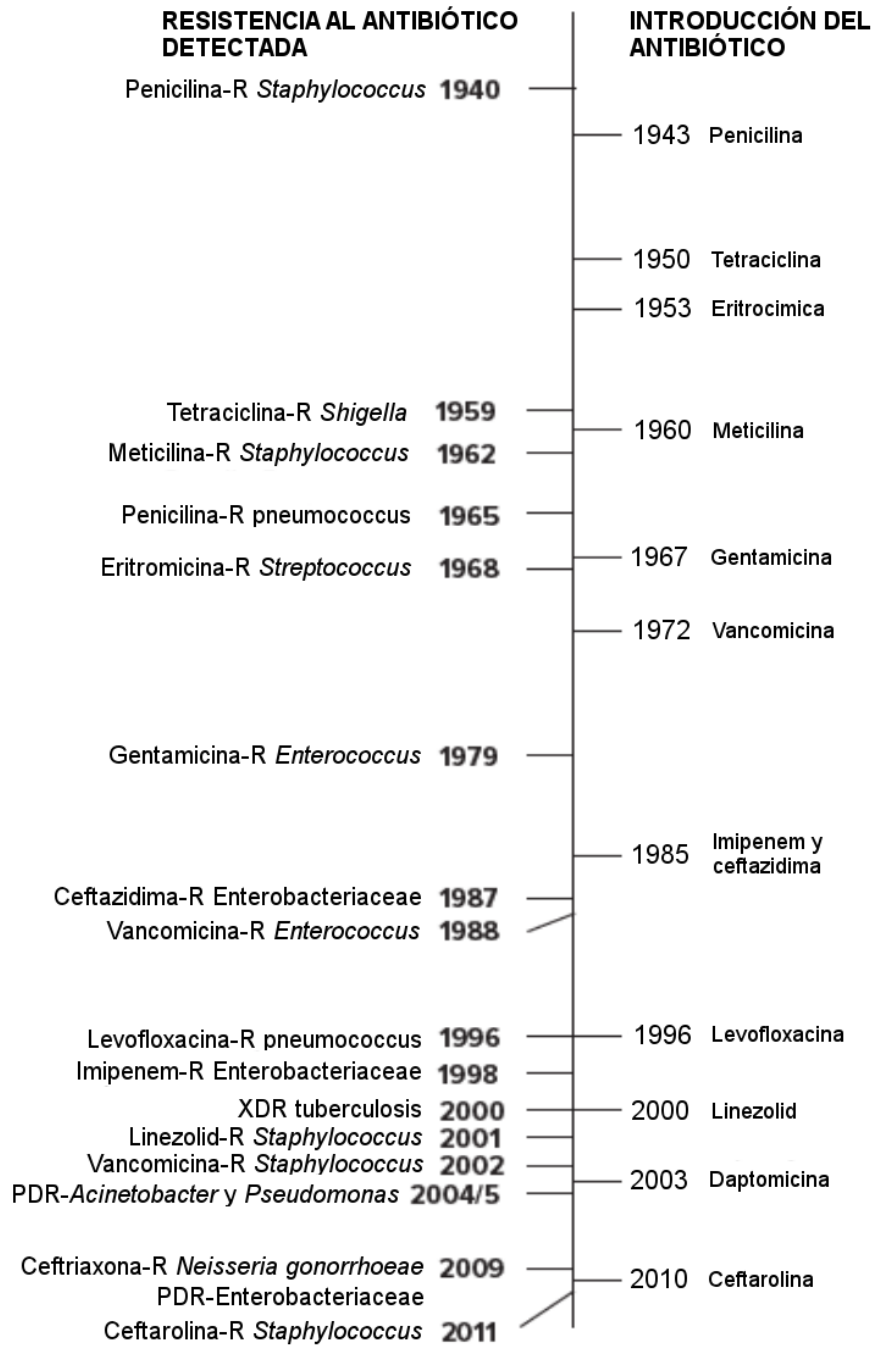
Figura 3. Estructura del biofilm y sus principales mecanismos de resistencia antibiótica.  
(Borges *et al*, 2016)

## 1.6. Evolución de los antibióticos de uso común

Las drogas antibacterianas presentan características particulares de índole físicas y químicas y presentan mecanismos de acción y espectro de actividades diferentes. Entre ellos, la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana ( $\beta$ -lactámicos), cambios en la permeabilidad y gradientes de concentración en membrana plasmática, inhibición de la síntesis proteica (aminoglucósidos como la gentamicina), inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (fluoroquinolonas como la ciprofloxacina) e interferencia ó bloqueo de caminos metabólicos (Sande *et al*, 1990).

En particular, la familia de los aminoglucósidos, se utiliza habitualmente para tratar infecciones graves causadas por *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp. y para la profilaxis especialmente contra la endocarditis en pacientes que tienen diferentes factores de riesgo para el tratamiento de organismos multirresistentes (McConeghy y LaPlante, 2010; Liu *et al*, 2011). Por otro lado, se han observado efectos adversos a altas dosis de gentamicina como ser nefrotoxicidad y ototoxicidad asociados con tratamientos estafilococcales (Cosgrove *et al*, 2009).

En la figura 4, línea de tiempo la aparición de la resistencia a los antibióticos, se observa claramente que unos pocos años son suficientes para la aparición de la resistencia bacteriana luego de la introducción de los diferentes antibióticos, hoy en día han aparecido bacterias resistentes a casi todas las clases de antibióticos disponibles (Figura 4). También se observa que desde finales de la década de 1960 hasta principios de los 80 la industria farmacéutica introdujo muchos antibióticos nuevos para resolver el problema de resistencia, pero luego el desarrollo y aparición de nuevos antibióticos comenzó a decaer. Como resultado actualmente y muchas décadas después de que los primeros pacientes fueron tratados con antibióticos, las infecciones bacterianas se han convertido en una principal amenaza para la salud mundial por las pocas estrategias efectivas que se disponen para combatirlas.



PDR (del inglés pan-drug-resistant); R (del inglés resistant); XDR (del inglés extensively drug-resistant).

Figura 4. Desarrollo de resistencia a los antibióticos - “Una línea de tiempo de eventos clave” - (Ventola, 2015).

## 1.7. Fitoquímicos antimicrobianos

La crisis en el sistema de salud anteriormente mencionado incentivó el interés por la búsqueda de nuevos compuestos procedentes de otras fuentes, como pueden ser los metabolitos secundarios vegetales, entre ellos los polifenoles de plantas medicinales que muestran actividad antimicrobiana *in vitro* (Moreno *et al*, 2006). Tal es así que en los últimos años se ha puesto atención en el estudio del potencial antimicrobiano de diversos compuestos naturales (Meziane-Cherif y Courvalin, 2014).

Es importante destacar también que se han enfocado estudios dentro del campo de la farmacología vegetal valuando ciertos fitoquímicos que evidencian acciones antimicrobianas contra bacterias multirresistentes (Abreu *et al*, 2012). De hecho, se menciona un gran potencial de los mismos en el campo de la infectología contra bacterias multirresistentes. En particular, se ha reportado actividad anti-SARM evidenciado por polifenoles de plantas medicinales, así también como acciones adyuvantes sobre antibióticos comunes (Bhatti *et al*, 2014; Boulanger *et al*, 2015; Rempe *et al*, 2015).

Se puede concluir que se conoce la capacidad antibacteriana de algunos compuestos de origen vegetal contra cepas susceptibles a antibióticos, sin embargo, se sabe muy poco sobre sus mecanismos de acción, posibles sinergias con otros compuestos y efectos sobre la viabilidad bacteriana en biofilms (actividad antibiofilm).

## 1.8. Interacción de antibióticos de uso común y fitoquímicos

Una estrategia para aumentar la eficacia antimicrobiana y extender la vida útil de antibióticos de uso en la clínica es utilizarlos en combinación para lograr efectos potenciadores y en el mejor de los casos en efectos antimicrobianos sinérgicos (Figura 5). Los mismos pueden ser debidos a una mejora en la solubilidad, la tasa de reabsorción, mayor biodisponibilidad ó a la modificación de los mecanismos de la resistencia bacteriana (Jayaraman *et al*, 2010).

Al respecto, muchos estudios se han centrado en las combinaciones entre los extractos y/o compuestos de plantas y antibióticos con el fin de evaluar la posibilidad de revertir las resistencias bacterianas a múltiples drogas (Abreu *et al*, 2012).

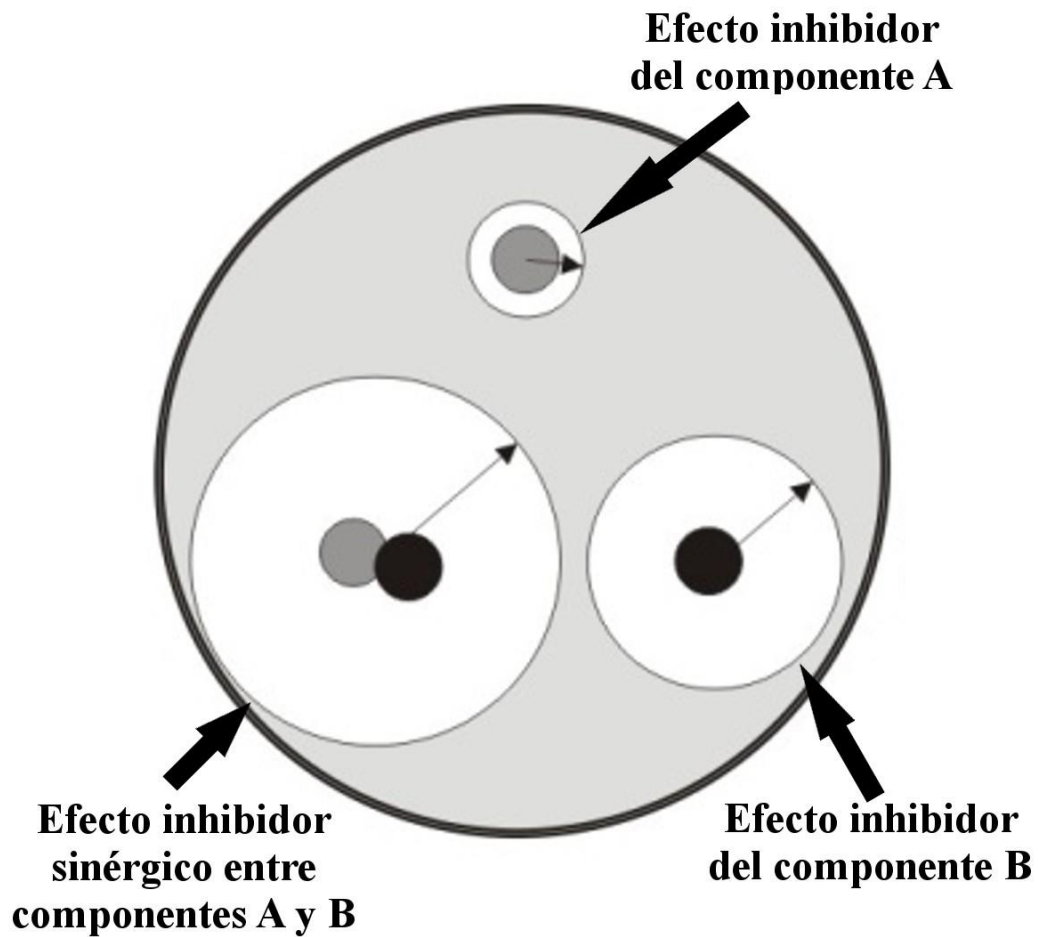


Figura 5. Interacción sinérgica entre antibióticos de uso común y fitoquímicos.  
(EÖTVÖS LORÁND UNIVERSITY, 2013)

## 1.9. Actividad antibiofilm

El desarrollo de antimicrobianos eficaces contra las bacterias con múltiples resistentes a antibióticos se ha centrado principalmente en bacterias creciendo de manera planctónica sin tener en cuenta otras formas de crecimiento bacteriano. Por esta razón, no hay duda de que son cruciales las nuevas fuentes de antimicrobianos y las estrategias que promueven la inhibición y/o erradicación de biofilms.

Durante la búsqueda de nuevos compuestos y enfoques alternativos para el tratamiento de las infecciones relacionadas con la formación de biofilm, es útil identificar los factores que alteran la formación o la estructura del biofilm, en función de las características físicas y biológicas. De esta manera, dirigir los tratamientos a las diferentes etapas del desarrollo del biofilm (por ejemplo, adhesión, motilidad, producción de sustancias poliméricas extracelulares, etc.) e inducir la inactivación y eliminación de biofilm mediante debilitamiento, dispersión o disrupción puede ser una estrategia prometedora como tratamiento antibiofilm (Simoes *et al*, 2009; Francolini y Donelli, 2010).

Recientemente, se reportó la actividad antibiofilm de fitoquímicos provenientes de aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales (tomillo, lavanda, geranio y árbol del té) y de metabolitos secundarios no volátiles derivados del ácido hidroxicinámico (ácido cafeico y ácido ferúlico) sobre biofilms de SARM (Kot *et al*, 2017).

## **2. Antecedentes**



Previamente en el laboratorio en el cual se desarrolló este trabajo, se identificaron compuestos antimicrobianos presentes en la planta *Rosmarinus officinalis* (romero) naturalizada en Argentina contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre ellas contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* (Moreno *et al*, 2006) (Tabla 1). Ambos patógenos causan un amplio espectro de enfermedades asociadas con una alta morbilidad y mortalidad, presentan fenotipos de multirresistencia a antibióticos (cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina, SARM y cepas de *K. pneumoniae* que expresan  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, y/o carbapenemasa) y son capaces de formar biofilms. Cómo se mencionó anteriormente tanto la resistencia a los antibióticos como la capacidad de formación de biofilms contribuyen al éxito de ambos patógenos en ámbitos sanitarios, aumentando la complejidad de un tratamiento eficaz.

Entre los fitoquímicos de interés presentes en *R. officinalis* se demostró que al ácido carnósico, principal antimicrobiano no volátil de hojas, potenció en forma sinérgica diversos antibióticos como gentamicina, ciprofloxacina, tetraciclina así también como butilderivados (butilhidroxitolueno y butilhidroxianisol) en la cepa de colección de *S. Aureus* ATCC 25923 (Romano *et al*, 2009; Moreno *et al*, 2012) (Tabla 2). Posteriormente se reportó el mecanismo de acción relacionado con el efecto potenciador sobre antibióticos de uso común, pues el compuesto fue capaz de modular el eflujo de bombas secundarias en cepas de colección de *S. aureus* y *Enterococcus faecalis* mediante la despolarización de la membrana bacteriana (Ojeda-Sana *et al*, 2013a) (Figura 6).

Se investigó también la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *R. officinalis*, cuyos principales componentes son  $\alpha$ -pineno, y el epoxi-monoterpeno 1,8-cineol (Ojeda-Sana *et al*, 2013b). Este trabajo evidenció la eficacia antimicrobiana del 1,8-cineol contra bacterias creciendo en forma planctónica Gram negativas como *K. pneumoniae* y *E. coli* (Tabla 3). Además, se observó que dicho monoterpeno fue capaz de permeabilizar la membrana plasmática.

Considerando que la presencia de bacterias con múltiple resistencia a antibióticos es elevada en el ámbito hospitalario, así como el uso frecuente de dispositivos de uso médico, la posible efectividad de compuestos naturales con actividad antimicrobiana y antibiofilm de metabolitos secundarios de plantas medicinales resulta una potencial y prometedora alternativa terapéutica. Entonces, en este trabajo se planteó profundizar la actividad antimicrobiana tanto del ácido carnósico

---

como del 1,8-cineol contra bacterias multirresistentes hospitalarias creciendo en cultivo planctónico y biofilm.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana del ácido carnósico frente a múltiples microorganismos.

NA = no activo.

Microorganismo	AC	
	CIM	CBM
<i>E. coli</i>	30	230
<i>K. pneumoniae</i>	30	NA
<i>P. mirabilis</i>	30	NA
<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i>	3	50
<i>S. aureus</i>	2	50
<i>B. megaterium</i>	15	60
<i>B. subtilis</i>	4	60
<i>E. faecalis</i>	–	–
<i>S. cerevisiae</i>	2	NA
<i>C. albicans</i>	2	NA
<i>P. pastoris</i>	2	–

Tabla 2. Actividad antibiótica del ácido carnósico en combinación con antibióticos de uso común contra la cepa de colección *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Antibióticos	Valores de las CIMs de antibióticos en combinación con la CIM del ácido carnósico (µg/ml)				Índice CIF
	0	1/8	1/4	1/2	
Tetraciclina	0,50	<u>0,06</u>	0,06	0,06	0,25
Tobramicina	0,50	<u>0,12</u>	0,12	0,06	0,37
Kanamicina	2,00	1,00	<u>0,50</u>	0,25	0,50
Vancomicina	2,00	<u>1,00</u>	1,00	0,50	0,62
Ciprofloxacina	0,50	<u>0,06</u>	0,12	0,12	0,25
Penicilina	0,06	-	<u>0,03</u>	0,03	0,75
Gentamicina	0,50	<u>0,06</u>	0,06	0,06	0,25

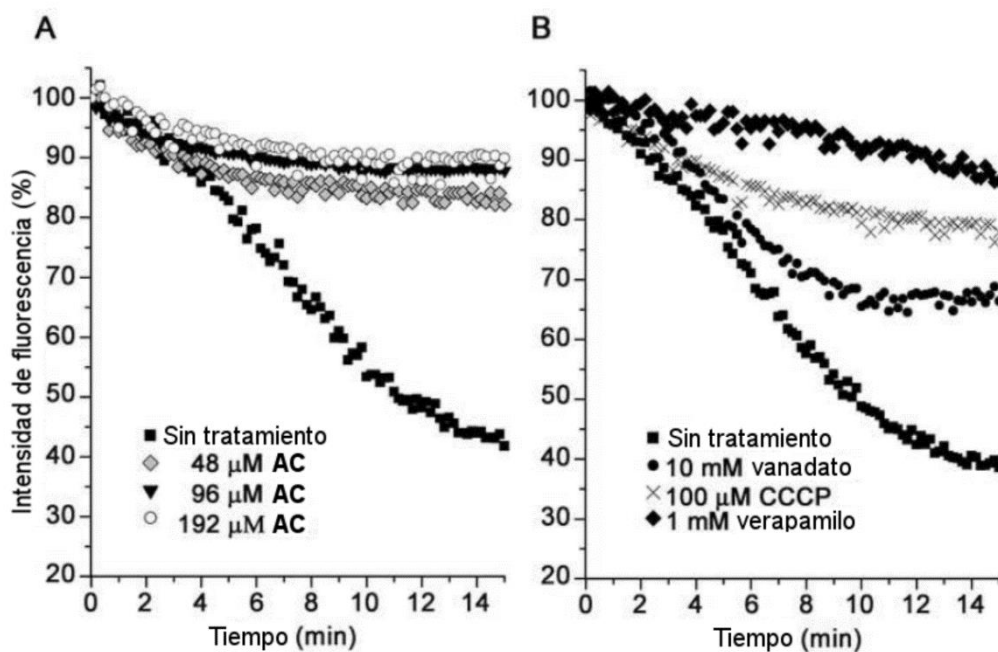


Figura 6. Efecto del ácido carnósico sobre el eflujo de bombas en *E. faecalis* (A) en comparación con bloqueadores de bombas conocidos (B).

Tabla 3. Valores de CIMs de aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* frente a distintas bacterias. n.a. = no activo.

Compuesto	CIM ( $\mu\text{L/mL}$ )			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
$\alpha$ -Pino	0,8	8,0	0,8	5,0
Alcanfor	0,4	8,8	n.t.	n.a.
Borneol	2,0	4,0	n.t.	n.a.
1,8-Cineol	n.a.	n.a.	8,0	20
Mirceno	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

### **3. Objetivos**

### 3.1. Objetivo general

El objetivo general del trabajo es ampliar el conocimiento sobre la eficacia antimicrobiana y antibiofilm de metabolitos secundarios presentes en aceites esenciales y/o en extractos no volátiles de plantas medicinales contra aislados clínicos de *S. aureus* y *K. pneumoniae* creciendo en suspensión y en biofilm. Un mayor entendimiento de los mecanismos de acción de los compuestos naturales bajo estudio será de utilidad para la prevención y/o tratamiento de infecciones asociadas a la atención sanitaria.

### 3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antimicrobiana de fitoquímicos no-volátiles, como el ácido carnósico, presentes en *R. officinalis* sobre aislados clínicos de SARM creciendo en suspensión.

- En base a datos anteriores que indican que el ácido carnósico podría funcionar como un inhibidor de bombas de eflujo potenciando la gentamicina en *S. aureus* ATCC 25923, se propone la hipótesis de trabajo que el fitoquímico pueda inhibir la expulsión de los antibióticos estudiados en cepas multirresistentes de SARM creciendo en suspensión y ejercer efectos sinérgicos. Entonces, otro objetivo es estudiar posibles sinergias de los fitoquímicos de interés en combinación con antibióticos de uso común como gentamicina y ciprofloxacina en aislados clínicos de SARM tanto sensibles como resistentes a dichos antibióticos.

- Evaluar la actividad antibiofilm de fitoquímicos presentes en *R. officinalis* sobre aislados clínicos multirresistentes de *K. pneumoniae*.

## **4. Materiales y Métodos**

#### 4.1. Cepas bacterianas utilizadas

Se utilizaron en este trabajo aislados clínicos de SARM obtenidos de bacteriemias de pacientes pediátricos identificados en el Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría “Juan H Garrahan” y cedidas gentilmente por Claudia Hernández, jefa del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría Garrahan y la Bioquímica Graciela Fiorilli. Se testearon también aislados clínicos de MDR-Kp que expresen  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y/o carbapenemasas, obtenidos del Hospital Garrahan y de pacientes del Hospital Gral. de Agudos “Dr. I. Pirovano” con infecciones microbianas asociadas al uso de catéteres urinarios o sondas para ventilación mecánica cedidos gentilmente por la Dra Estela Galván. Se utilizarán cepas de colección (*S. aureus* ATCC25923).

El perfil de resistencia a antibióticos de los aislados clínicos de SARM y MDR-Kp utilizados en este trabajo se muestra en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Resistencia cruzada a antibióticos de SARM.

Antibióticos	Aislados clínicos de SARM										
	GM 20	GM 42	GM 43	GM 134	GM 212	GM 36	GM 1977	GM 4	GM 17	GM 31	GM 34
OXA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
FOX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
ERY	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CLY	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GEN	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R
CIP	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
LVX	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	R
LZD	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
RIF	S	S	S	S	S	S	R	S	I	I	I

SARM, *S. aureus* meticilino-resistente; OXA, oxaciclina; FOX, cefoxitina; ERY, eritromicina; CLY, clindamicina; GEN, gentamicina; CIP, ciprofloxacina; LVX, levofloxacina; LZD, linezolid; RIF, rifampicina; R, resistente; I, intermedio; S, susceptible.

Tabla 5. Resistencia cruzada a antibióticos de aislados clínicos de MDR-Kp.

Antibióticos	Aislados clínicos de MDR-Kp			
	Kp013	KpGM1	KpGM2	KpGM3
SAM	R	R	R	R
TZP	R	R	R	R
CEF	R	R	R	R
CTX	R	R	R	R
CZD	R	R	R	R
CFPM	R	R	R	R
IMI	R	R	ne	R
MER	I	R	ne	R
AMK	R	R	R	R
GEN	R	R	R	R
CIP	R	R	R	R
NAL	R	ne	ne	ne
NTF	R	ne	ne	ne
COLI	R	S	S	R
TMP/SMX	R	ne	ne	ne

SAM, ampicilina-sulbactam; TZP, piperacilina-tazobactam; CEF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CDZ, ceftazidima; CFPM, cefepima; IMI, imipenem; MER, meropenem; AMK, amikacina; GEN, gentamicina; CIP, ciprofloxacina; NAL, ácido nalidíxico; NTF, nitrofurantoína; COLI, colistina; TMP/SMX, trimetoprima-sulfametoxazol. R, resistente; I, intermedio; S, susceptible; ne, no ensayado.

## 4.2. Metabolitos secundarios de plantas

Se ensayaron los compuestos comerciales: ácido carnósico obtenido de hojas de *R. officinalis* (Sigma-Aldrich, EEUU) y el monoterpeno 1,8-cineol (Treatt, Lakeland, Florida, USA).



### 4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante el ensayo de microdiluciones seriadas en medio líquido utilizando placas de 96 pocillos (Ojeda-Sana *et al*, 2013a). Brevemente, los niveles de actividad antimicrobiana se ensayaron utilizando diferentes concentraciones de los fitoquímicos de interés frente a los aislados clínicos. Los controles positivos consistieron en la solución bacteriana sin tratamiento y los negativos solo en medio Mueller-Hinton (MH). Luego, se llenaron las placas de 96 pocillos con un volumen máximo de 200 µl, con un inóculo inicial de  $5 \times 10^4$  ufc/ml en cada pocillo, se incubaron a 37°C con agitación (200 RPM) por 24 horas. SARM fue incubada en medio de cultivo MH (Difco MD, USA) y *K. pneumoniae* en medio mínimo M9 (Brooks y Keevil, 1997).

La actividad antibacteriana se expresó como porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano, donde  $A_{Control}$  es la absorbancia medida a 595 nm del cultivo bacteriano sin tratamiento (1).

$$\% \text{ inhibición de crecimiento} = 100 \times (A_{Control} - A_{Muestra}) / A_{Control}. \quad (1)$$

Se consideró la concentración inhibitoria mínima (CIM) como la menor concentración de los compuestos que inhibió el crecimiento visible luego de 16-24 horas en agitación a 200 RPM a 37°C (CLSI, 2009-2011).

Para la determinación de las concentraciones bactericidas mínimas (CBMs) se determinaron las unidades formadoras de colonias (ufc/ml) en placas con medio TSB (Britania Lab, Argentina) más agar. La CBM se definió como la concentración del compuesto que inhibió la viabilidad bacteriana en un 99,9% (reducción  $> 3 \log_{10}$  ufc/ml).

### 4.4. Interacción de fitoquímicos con antibióticos de uso en clínica

Se determinó la interacción entre los fitoquímico y antibióticos de uso en clínica mediante la técnica del “checkerboard” (White *et al*, 1996). Se combinaron dosis subinhibitorias de ambos compuestos de la mezcla binaria en una placa de 96 pocillos. Se colocó la placa en shaker a 37°C con agitación (200 RPM) por 24 horas. Transcurrido dicho tiempo se midió la absorbancia de las muestras

---

en un lector de ELISA a 595 nm. Para cada combinación (A + B) los datos experimentales se transformaron en concentraciones fraccionarias inhibitorias (CFI) (2) (3):

$$\text{CFI compuesto A} = \frac{\text{CIM compuesto A en combinación con B}}{\text{CIM compuesto A solo}} \quad (2)$$

$$\text{CFI compuesto B} = \frac{\text{CIM compuesto B en combinación con A}}{\text{CIM compuesto B solo}} \quad (3)$$

Se analizó el tipo de interacción mediante el cálculo del índice CFI (ICFI) para las combinaciones por la siguiente fórmula (4):

$$\text{Índice CFI} = \text{CFIA} + \text{CFIB} \quad (4)$$

El índice de concentraciones fraccionarias bactericidas (ICFB) se calculó de acuerdo con (Anantharaman *et al*, 2010) (5) (6) (7).

$$\text{CFB compuesto A} = \frac{\text{CBM compuesto A en combinación con B}}{\text{CBM compuesto A solo}} \quad (5)$$

$$\text{CFB compuesto B} = \frac{\text{CBM compuesto B en combinación con A}}{\text{CBM compuesto B solo}} \quad (6)$$

$$\text{Índice CFB} = \text{CFBA} + \text{CFBB} \quad (7)$$

Los resultados se interpretaron como interacciones sinérgicas cuando los ICFI o ICFB son  $\leq 0,5$ , aditivas cuando los ICFI o ICFB son  $> 0,5$  y  $< 4,0$ , y antagónicas cuando los ICFI o ICFB son  $\geq 4,0$  (Odds, 2003).

#### 4.5. Producción de biofilm bacteriano

Se determinó la producción de biofilm mediante la cuantificación de la biomasa de biofilm por tinción con cristal violeta al 0,01% en placas de poliestileno de 24 pocillos. El cultivo bacteriano se incubó con un inóculo inicial de  $5 \times 10^4$  ufc/ml en cada pocillo en medio mínimo M9 (*K. pneumoniae*) a 37°C. Se lavaron cuidadosamente los pocillos con 0,9% de NaCl para remover a las células planctónicas a las 3 horas de incubación. Posteriormente, se agregó medio fresco y se dejó incubar por otras 24 horas. Finalmente, se lavaron los pocillos con 0,9% de NaCl tres veces y se agregó el

crystal violeta. Luego de 15 min se agregó ácido acético al 30% para solubilizar el cristal violeta unido al biofilm. Se determinó la densidad óptica (DO) a 595 nm.

Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado y el experimento se repitió al menos tres veces. Se considero significativo el valor de DO de la muestra  $\geq$  a la de la DO del control negativo (medio solo).

#### **4.6. Evaluación de actividad antibiofilm**

La actividad antibiofilm de los compuestos vegetales se determinó mediante la cuantificación de la biomasa de biofilm remanente luego de 24 horas de tratamiento por tinción con cristal violeta (O'Toole y Kolter, 1998). Las bacterias se incubaron en los medios correspondientes en las microplacas a 37°C, se trataron con distintas concentraciones de los fitoquímicos durante 24 horas y se procedió como se mencionó en el ítem anterior. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Se calculó el porcentaje de biofilm remanente, considerando como 100% a la cantidad del biofilm correspondiente al biofilm bacteriano sin tratamiento.

#### **4.7. Estudio de eficacia bactericida sobre biofilm bacteriano**

El estudio de la CBM de un compuesto frente a una bacteria de interés creciendo en biofilm, se realiza a través del conteo de las ufc/ml, de las bacterias crecidas en biofilm, en placas con medio TSB agar.

En primera instancia se prepara una solución bacteriana compuesta por medio (medio M9 + glucosa) e inóculo bacteriano ( $5 \times 10^4$  ufc/ml). Esta solución es posteriormente utilizada para llenar una placa de 24 pocillos, con un volumen máximo por pocillo de 500  $\mu$ l, la cual se deja en estufa a 37°C sin agitación por 24 horas. Se lavan cuidadosamente los pocillos con 0,9% de NaCl para remover a las células planctónicas a las 3 horas de incubación. Posteriormente se agrega medio fresco y se deja incubar por 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas en estufa y formado el biofilm de la bacteria de interés, se reemplaza el medio por soluciones que contengan distintas concentraciones del compuesto a utilizar. La placa nuevamente es dejada por otras 24 horas en estufa a 37°C sin agitación. Transcurridas estas últimas 24 horas en estufa, se quita el sobrenadante de los pocillos y se procede a levantar los biofilm. Estos biofilm levantados, se diluyen las veces que sean necesarias con

---

el objetivo de disminuir las cantidades de bacterias y así facilitar los recuentos más adelante. Una vez terminadas las diluciones, se eligen algunas (las más adecuadas para contar las cantidades estipuladas de las bacterias crecidas en biofilm) y se siembran 10 µl por triplicado de las mismas en placas de Petri con agar y medio TSB. Las placas de Petri se dejan en la estufa a 37°C por 18 o más horas. Finalmente se procede al recuento de las unidades formadoras de colonias que crecieron en las placas.

El crecimiento bacteriano se expresó como  $\log_{10}$  ufc/ml.

La CBM se definió como la concentración del compuesto que no permitió el crecimiento de la bacteria en un 99,9% (reducción  $> 3 \log_{10}$  ufc/ml).

#### **4.8. Estudio sobre la estructura del biofilm bacteriano por microscopía confocal**

El efecto sobre la estructura del biofilm luego del tratamiento con compuestos vegetales se llevó a cabo a través de la cuantificación de la biomasa del biofilm y la altura del biofilm por análisis de microscopía confocal (Costerton *et al*, 1995). Para esto se utilizaron cepas de bacterias fluorescentes que poseen un plásmido con proteína verde fluorescente (GFP, del inglés green fluorescent protein). La preparación de las muestras se llevó a cabo a través de la incubación de la bacteria en microplacas de 24 pocillos con cubreobjetos (uno dentro de cada pocillo) a 37°C sin agitación por 24 horas. Se lavan cuidadosamente los pocillos y cubreobjetos con 0,9% de NaCl para remover a las células planctónicas a las 3 horas de incubación. Se agrega medio fresco y se continúa con la incubación por 24 horas. Posteriormente se trataron con distintas concentraciones de los fitoquímicos durante 24 horas más (controles positivos se renueva el medio solamente) y finalmente se procedió al fijado del biofilm en los cubreobjetos. Las muestras fueron observadas y fotografiadas por un microscopio confocal (Microscopio confocal Nikon C1/Eclipse Ti) y las imágenes obtenidas fueron analizadas a través del programa Comstat (plugin de ImageJ), obteniendo a partir del mismo la biomasa y altura de los biofilms. Cada ensayo se realizó por duplicado en días independientes. En el caso de microscopía CLSM, en cada ensayo se estudiaron las muestras por triplicado a

quintuplicado. En el análisis por microscopía LTSEM, en cada ensayo se estudió 1 disco (n=3). En cada disco se estudiaron al menos dos campos diferentes.

La biomasa del biofilm se expresó como  $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ , mientras que la altura del biofilm se expresó en  $\mu\text{m}$ .

Los ensayos fueron realizados por triplicado y el experimento se repitió al menos tres veces. Se considero significativa la diferencia si  $p < 0,05$  en comparación al control positivo con vehículo (etanol 0,5%) (prueba t de Student).

## **5. Resultados**

## 5.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de fitoquímicos no-volátiles, presentes en *R. officinalis* sobre aislados clínicos de SARM.

### 5.1.1. Eficacia del ácido carnósico contra aislados clínicos de SARM creciendo en suspensión.

Si bien los resultados previos del laboratorio evidenciaron la actividad antiestrofilococal del ácido carnósico frente a la cepa pan-susceptible ATCC25923 (CIM = 8 µg/ml), aún no se sabía si era capaz o no de inhibir el crecimiento de cepas multirresistentes de *S. aureus* (Moreno *et al*, 2006; Moreno *et al*, 2012). Por ello, se investigó la eficacia del fitoquímico mediante el ensayo de microdilución seriada en medio líquido contra aislados clínicos de SARM. Los resultados de la Tabla 6 muestran las CIM obtenidas luego del tratamiento con el fitoquímico sobre diferentes aislados clínicos que presentaban diferente número de resistencias a varios tipos de antibióticos usados en la clínica. Se observó que 16 µg/ml de ácido carnósico logró una inhibición del crecimiento bacteriano en un 100% en los aislados clínicos de SARM-GM 31 y SARM-GM 34 que poseen un alto número de resistencia a antibióticos (entre 8-9 resistencias). Los aislados que presentaban un número menor de resistencias (SARM-GM 20 y SARM-1977) fueron inhibidos por el agregado de 12 µg/ml y 32 µg/ml del fitoquímico, respectivamente. Por lo tanto, los resultados muestran que el número de resistencias presente en los aislados no cambia significativamente la eficacia antimicrobiana del ácido carnósico. Como las muestras ensayadas con el compuesto vegetal contenían una concentración final de 2% de etanol utilizado para disolver el componente natural, se realizó un control con este vehículo solo y no se observaron efectos antibacterianos significativos.

Tabla 6. Valores de CIM de ácido carnósico frente a aislados clínicos de SARM.

Aislados clínicos	Ácido carnósico CIM (µg/ml)
SARM-GM 20	12
SARM-GM 31	16
SARM-GM 34	16
SARM-1977	32
ATCC 25923	8

Los datos presentados demuestran que el ácido carnósico es eficiente para inhibir el crecimiento bacteriano de los aislados clínicos de SARM testeados; sin embargo, estos resultados no permiten determinar si este efecto es bactericida o bacteriostático. Con el objetivo de responder dicha cuestión, se evaluó el efecto del ácido carnósico mediante curva de muerte. Dada la similitud en la sensibilidad frente al fitoquímico de todos los aislados clínicos se eligió testear el aislado SARM-GM 34 ya que es el que presenta la mayor cantidad de resistencias a antibióticos.

La Figura 7 muestra que el ácido carnósico a 24 y 48  $\mu\text{g/ml}$  (concentraciones mayores a la CIM) ejerció una disminución total de las ufc/ml luego de 16 h y 4 horas de cultivo, respectivamente. Además, con 24  $\mu\text{g/ml}$  del fitoquímico se logró una disminución de 3 y 6  $\log_{10}$  ufc/ml a las 4 y 6 horas de cultivo, respectivamente.

Los resultados también muestran que se logró una disminución de 3 y 6  $\log_{10}$  ufc/ml ensayando el fitoquímico a la concentración de la CIM (16  $\mu\text{g/ml}$ ), efecto similar al encontrado con la concentración 24  $\mu\text{g/ml}$  para los tiempos 4 y 6 horas de cultivo, mientras que a mayor tiempo de tratamiento (16 y 24 horas) se observó una mayor disminución del crecimiento bacteriano (5  $\log_{10}$  ufc/ml). Cuando se ensayó una concentración subinhibitoria de 12  $\mu\text{g/ml}$ , se observó en general un efecto bacteriostático y un leve efecto bactericida a tiempos cortos de tratamiento.



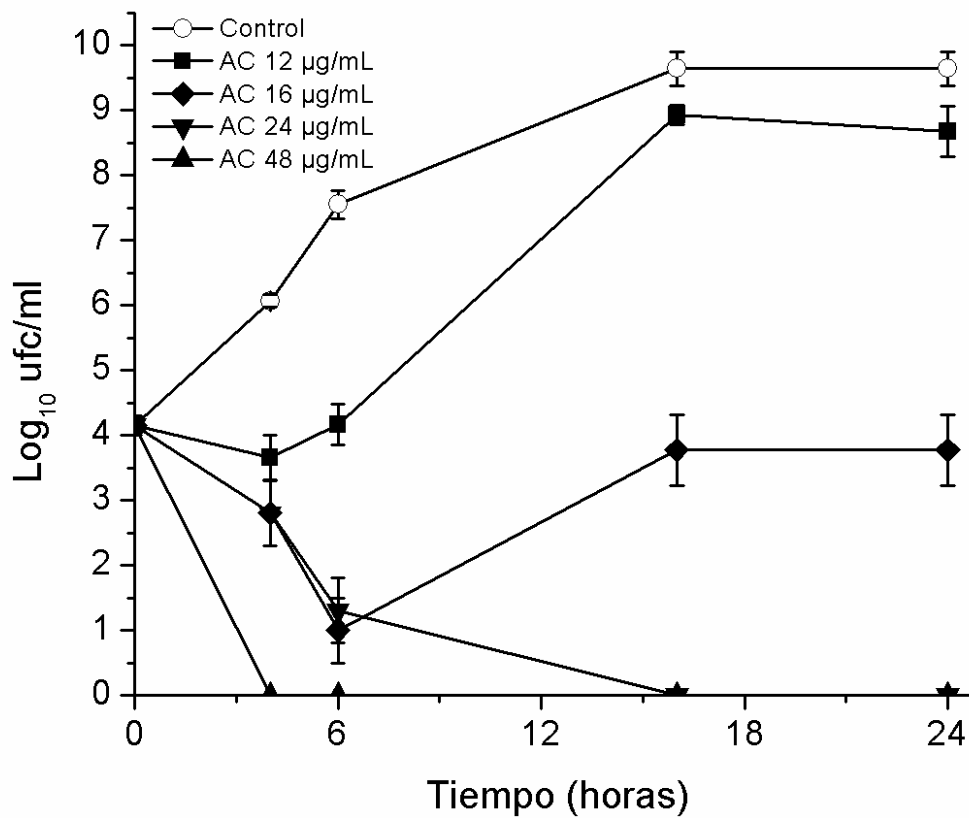


Figura 7. Curva de muerte de SARM-GM 34 en presencia de ácido carnósico (AC). Las concentraciones del compuesto evaluadas fueron las indicadas en la figura. El control correspondió al cultivo bacteriano sin tratamiento. Se realizaron tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar.

### 5.1.2. Eficacia de la gentamicina en combinación con el ácido carnósico contra aislados clínicos de SARM creciendo en suspensión.

Dado que el ácido carnósico fue eficaz para inhibir el crecimiento de los aislados clínicos de SARM, y que la gentamicina es utilizada en cremas tópicas contra infecciones estafilococales, resultó de interés investigar la posibilidad que el fitoquímico sea capaz de potenciar la eficacia antibacteriana de la gentamicina sobre aislados clínicos de SARM (resistentes a gentamicina SARM-GM 31 y SARM-GM 34 y sensible a gentamicina SARM-GM 20).

Para ello, inicialmente se determinó la CIM de la gentamicina. Las CIMs determinadas para el antibiótico de uso común contra el aislado sensible a la gentamicina (SARM-GM 20) y los aislados resistentes a gentamicina (SARM-GM 31 y SARM-GM 34) fueron 0,5 µg/ml, 24 µg/ml y 16 µg/ml, respectivamente (Tabla 7).

La Figura 8 muestra la inhibición del crecimiento de los aislados clínicos de SARM en respuesta al tratamiento con ácido carnósico y gentamicina solos ó en combinación. Se encontró que una concentración menor a la CIM del ácido carnósico (8 µg/ml) en combinación con 1/5 parte de la CIM de gentamicina (0,1 µg/ml) fue capaz de inhibir completamente el crecimiento del aislado clínico SARM-GM 20 (Figura 8A). Es importante notar que la combinación mencionada presentó una actividad antibacteriana similar ( $p > 0,05$ ) a la gentamicina sola ensayada a su valor de CIM (0,5 µg/ml). Los resultados experimentales logrados ensayando concentraciones subinhibitorias de gentamicina en combinación con ácido carnósico mostraron una actividad significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que los resultados teóricos esperados para la suma de ambos compuestos que interaccionaran en forma aditiva.

En forma similar se realizaron los experimentos sobre aislados clínicos de SARM resistentes a la gentamicina. Cuando el aislado clínico resistente a gentamicina SARM-GM 31 fue tratado con 8 µg/ml de ácido carnósico con una cantidad de gentamicina, que no tiene un efecto antibacteriano significativo (6 µg/ml), se alcanzó un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano (Figura 8B). Esta combinación no mostro diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con la actividad demostrada por la gentamicina sola (CIM de 24 µg/ml). En forma similar a lo mencionado arriba, los resultados sugieren interacciones aditivas entre el fitoquímico y la gentamicina.

---

Con el fin de confirmar que el ácido carnósico era capaz de potenciar en forma sinérgica a la gentamicina contra aislados de SARM resistentes a la gentamicina, se utilizó un segundo aislado clínico resistente (SARM-GM 34) (Figura 8C). Se obtuvieron resultados similares al obtenido con el aislado SARM-GM 31, ya que 4 µg/ml de gentamicina con 4 µg/ml de ácido carnósico logró una inhibición del 100% del crecimiento.

Los resultados experimentales sugieren, una vez más, la interacción sinérgica entre el ácido carnósico y la gentamicina. En base a estos resultados se observó que la CIM de gentamicina en combinación con ácido carnósico se redujo de 4 a 5 veces frente a los tres aislamientos clínicos de SARM probados, independientemente de su susceptibilidad a la gentamicina.

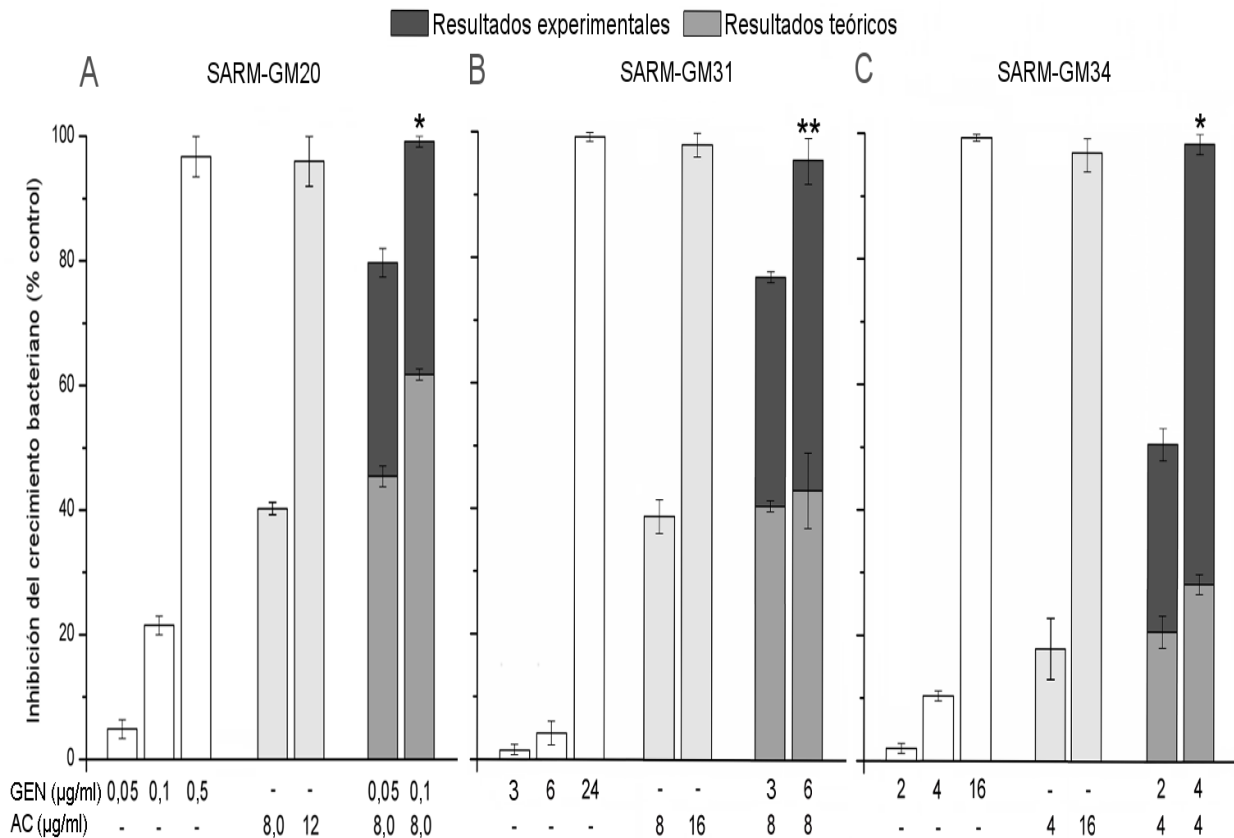


Figura 8. Actividad antibacteriana del ácido carnósico (AC) y la gentamicina (GEN) sola y en combinación frente a los asilados clínicos SARM-GM 20 (A), SARM-GM 31 (B) y SARM-GM 34 (C) después de 24 horas de incubación. Los valores del porcentaje de inhibición del crecimiento se expresan como la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar. en comparación con el cultivo bacteriano no tratado (control). No se detectaron diferencias significativas \*  $p > 0,05$  o \*\*  $p > 0,01$  en comparación con una inhibición del crecimiento del 100% por gentamicina (valor de la CIM) (ANOVA seguido del test de Tukey).

Además de la técnica basada en mediciones de absorbancia, para analizar si el ácido carnósico es capaz de actuar en sinergia con la gentamicina a nivel bactericida, se compararon los cambios en el recuento de las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml) después de 6 y 24 horas de tratamiento de ambos antimicrobianos solos y en combinación (Figura 9).

La Figura 9A muestra que 0,05 y 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina sola no presentan actividad antimicrobiana significativa, mientras que en combinación con 8 y 12  $\mu\text{g/ml}$  de ácido carnósico demostraron una inhibición total de la viabilidad bacteriana del aislado clínico susceptible a gentamicina SARM-GM 20 después de 24 horas de tratamiento. Es importante destacar que el agregado de 12  $\mu\text{g/ml}$  de ácido carnósico permitió un efecto bactericida de la gentamicina al menor tiempo probado (6 horas), además de una reducción a la mitad de la concentración del antibiótico en la mezcla con el fitoquímico (0,05  $\mu\text{g/ml}$ ).

La Figura 9A también muestra que la gentamicina por si sola a la concentración de la CIM (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) exhibió un efecto bacteriostático en comparación con el inóculo inicial, mientras que un efecto bactericida fue observado utilizando 4 veces la CIM (2  $\mu\text{g/ml}$ ). Similarmente, el ácido carnósico solo, presentó un efecto bacteriostático a la concentración de la CIM (12  $\mu\text{g/ml}$ ) y efecto bactericida utilizando 3 veces la concentración de la CIM (32  $\mu\text{g/ml}$ ).

Una inhibición total de la viabilidad bacteriana del aislado SARM-GM 31 resistente a gentamicina se encontró ensayando la combinación de 6  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina con 8  $\mu\text{g/ml}$  de ácido carnósico después de 24 horas, mientras que un pequeño crecimiento bacteriano se observó después de 6 horas de tratamiento. Es importante destacar que 12  $\mu\text{g/ml}$  de ácido carnósico en combinación con 6  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina, o incluso con la mitad del antibiótico (3  $\mu\text{g/ml}$ ), dio como resultado una inhibición total en la viabilidad bacteriana después de 6 h y 24 h de tratamiento. Por otro lado, gentamicina y ácido carnósico solos a sus respectivas CIM (24  $\mu\text{g/ml}$  y 16  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) no pudieron reducir completamente la viabilidad bacteriana y los efectos bactericidas (valores de CBMs) de gentamicina y ácido carnósico solos fueron obtenidos ensayando 98  $\mu\text{g/ml}$  y 48  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, frente al aislado clínico de SARM (Figura 9B).

Se obtuvieron resultados similares evaluando un segundo aislado de SARM resistente a gentamicina (SARM-GM 34) (Figura 9C). La actividad bactericida total se logró ensayando 2 y 4

---

$\mu\text{g/ml}$  de gentamicina en combinación con  $12 \mu\text{g/ml}$  de ácido carnósico después de 6 y 24 horas de tratamiento, respectivamente. Además, mientras que con  $4 \mu\text{g/ml}$  de gentamicina sola no se evidenció ninguna actividad antibacteriana, en combinación con  $4 \mu\text{g/ml}$  de ácido carnósico se encontró una clara actividad bacteriostática. Por otro lado, los efectos bactericidas (valores de CBMs) de gentamicina y ácido carnósico solos fueron obtenidos usando  $98 \mu\text{g/ml}$  y  $48 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

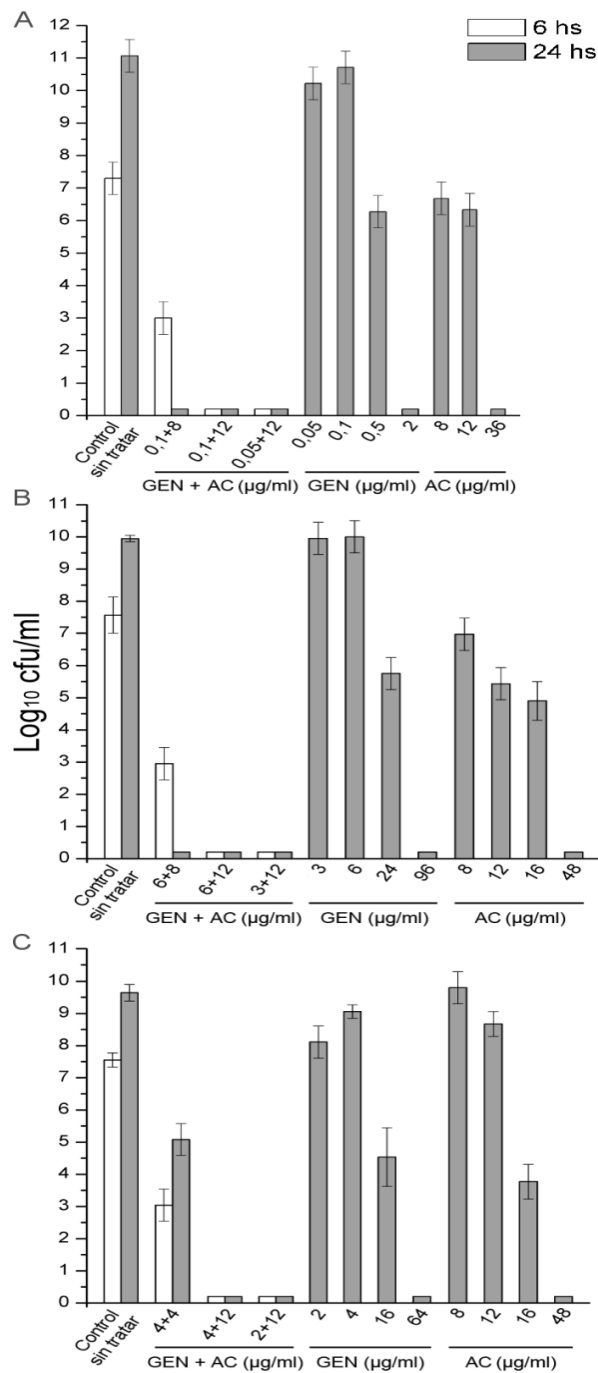


Figura 9. Cambios en la ufc/ml de los aislados clínicos SARM-GM20 susceptible a gentamicina (A), MRSA-GM31 resistente a gentamicina (B) y de MRSA-GM34 resistente a gentamicina (C), después de 6 o 24 horas (hs) de tratamiento con gentamicina (GEN) y ácido carnósico (AC) solos y en combinación. Se utilizó un inóculo inicial de  $10^5$  ufc/ml para cada cultivo bacteriano. Se realizaron tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar.

Los hallazgos anteriores indican que el ácido carnósico puede actuar sinérgicamente con gentamicina en los tres aislados clínicos de SARM ensayados.

Posteriormente para determinar el tipo de interacción entre el fitoquímico y el antibiótico común se calcularon los índices de concentraciones fraccionarias inhibitorias (ICFIs) e índices de concentraciones fraccionarias bactericidas (ICFBs) (Tabla 7). Un claro efecto sinérgico bactericida fue observado para la combinación de 4 µg/ml de gentamicina con 4 µg/ml de ácido carnósico contra el aislado clínico SARM-GM 34, pues el valor del ICFI calculado fue de 0,5, mientras que ICFIs de 0.53 y 0.75 se obtuvieron para las combinación de 0.1 µg/ml de ácido carnósico con 4 µg/ml de gentamicina y 8 µg/ml de gentamicina con 6 µg/ml de carnósico, respectivamente, contra MRSA-GM20 y MRSA-GM31. Dichos valores indican que dichas concentraciones ejercen efectos parcialmente sinérgicos.

Es importante destacar que un claro efecto sinérgico bactericida fue detectado para la combinación de gentamicina con el ácido carnósico frente a los tres aislados clínicos de SARM ensayados evidenciado por un valor de ICFBs entre 0,28-0,35 (Tabla X). Por lo tanto, nuestros hallazgos revelan que la CBM de gentamicina en combinación con ácido carnósico se puede reducir en 32-40 veces frente a los tres aislados clínicos de SARM ensayados, independientemente de su nivel de sensibilidad a la gentamicina.

Tabla 7. Concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs), concentraciones bactericidas mínimas (CBMs) e índices de concentraciones fraccionarias inhibidoras/bactericidas (ICFI/ ICFB) de gentamicina y ácido carnósico contra aislados clínicos de SARM.

SARM	CIM (µg/ml)			ICFI	CBM (µg/ml)			ICFB
	GEN	AC	GEN+AC		GEN	AC	GEN+AC	
Aislados clínicos	GEN	AC	GEN+AC		GEN	AC	GEN+AC	
SARM-GM20	0,5	12	0,1 + 4	0,53	2	36	0,05 + 12	0,35
SARM-GM31	24	16	6 + 8	0,75	96	48	3 + 12	0,28
SARM-GM34	16	16	4 + 4	0,50	64	48	2 + 12	0,28



### 5.1.3. Potenciación de la ciprofloxacina por el ácido carnósico contra aislados clínicos de SARM.

También investigamos la capacidad del ácido carnósico para potenciar la actividad de la ciprofloxacina contra el aislado clínico susceptible SARM-GM34 y el aislado SARM-GM20 resistente a la ciprofloxacina (Tabla 8). Se observó una reducción de 4 veces en la CIM para el aislado de SARM sensible a la ciprofloxacina. Además, el fitoquímico disminuyó 2 veces el valor de CIM de la ciprofloxacina en el aislado clínico de SARM resistente al antibiótico. Los ICFIs calculados (0,87-0,92) indicaron interacciones aditivas entre el ácido carnósico y la ciprofloxacina contra ambos aislados clínicos de SARM, tanto el susceptible como el resistente al antibiótico.

Tabla 8. Valores de CIM de ciprofloxacina y ácido carnósico solos y en combinación frente a aislados clínicos de SARM.

Aislados clínicos	CIM (µg/ml)			ICFI
	CIP	AC	CIP+AC	
SARM-GM20	0,5	12	0,12 + 8	0,92
SARM-GM34	16	16	8 + 6	0,87

## **5.2. Evaluación de la actividad antibiofilm de fitoquímicos volátiles presente en *R. officinalis* sobre aislados clínicos multirresistentes de *K. pneumoniae*.**

### **5.2.1. Capacidad de formación de biofilm en aislados clínicos multirresistentes de *K. pneumoniae*.**

En primer lugar, para poder evaluar la actividad antibiofilm de fitoquímicos sobre aislado multirresistente de *K. pneumoniae* se realizaron estudios previos para seleccionar cepas que fueran productores de biofilm. Para ello, se cuantificó la producción de biofilm en distintos aislados clínicos multirresistentes de *K. pneumoniae* mediante la determinación de la  $DO_{595}$  luego de la tinción con violeta cristal.

La Figura 10 muestra que los aislados clínicos multirresistentes de *K. pneumoniae* que producen carbapenemasas y que son resistentes a diversos antibióticos (Kp-GM3 y Kp-GM013) eran capaces de producir en forma significativa biofilm Kp010 y NNKp (rango  $OD_{595}$  de 0,26 a 0,4) en medio mínimo M9. Por otro lado, y como se ha reportado (Patil y Patil, 2017), los aislados sensibles a antibióticos sintetizan una mayor cantidad de biofilm ( $OD_{595}$  entre 2,4 y 4, respectivamente).

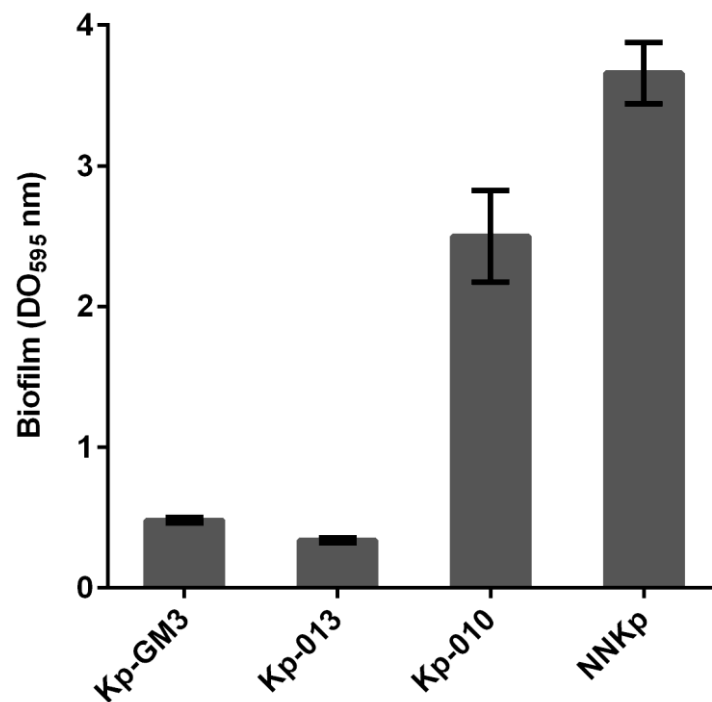


Figura 10. Producción de biofilm de aislados de *K. pneumoniae* multirresistentes KpGM3 y Kp013 a antibióticos y sensibles Kp-010 y NNKp. Se realizaron tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar.

### **5.2.2. Actividad antibiofilm del 1,8-cineol sobre aislados clínicos multirresistentes de *K. pneumoniae*.**

Para analizar un posible efecto antibiofilm de fitoquímicos de *R. officinalis*, se ensayó el monoterpeno 1,8-cineol y el diterpeno, ácido carnósico sobre el biofilm bacteriano preformado. Para ello, se permitió que las bacterias formaran biofilm durante 24 horas, se trataron luego con el fitoquímico durante otras 24 horas y luego se cuantificó el biofilm remanente por tinción con cristal violeta.

La Figura 11 muestra la actividad antibiofilm del 1,8-cineol evaluado. Se observó que el compuesto fue capaz de reducir la biomasa del biofilm preformado en todos los aislados ensayados. El fitoquímico a una baja concentración entre 0,003 y 0,006% fue capaz de reducir la biomasa de biofilm en los aislados clínicos en un 15-31%, mientras que disminuyó entre un 30-70% la biomasa del biofilm del aislado NNKp. Es importante destacar que a una concentración alta ensayada (4%) el 1,8-cineol exhibió un fuerte descenso en la biomasa del biofilm en aproximadamente un 55-80% después de 24 horas de tratamiento.

Por otro lado, cuando se analizó el ácido carnósico contra aislados de *K. pneumoniae* multirresistentes a antibióticos, la cantidad de biofilm no se vio afectada incluso con concentraciones tan altas como 400 µg/ml.

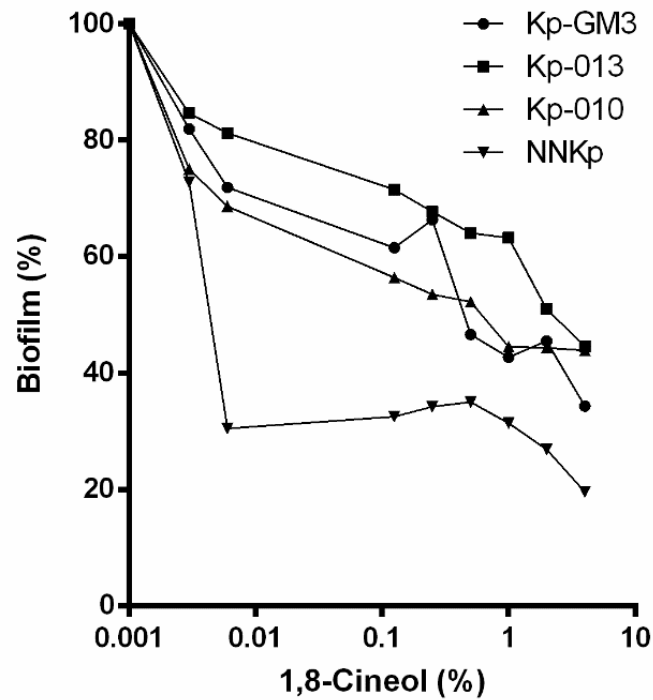


Figura 11. Actividad antibiofilm del 1,8-cineol. Porcentaje de biofilm remanente después de 24 horas de tratamiento con las concentraciones de 1,8-cineol indicadas en la figura.

El 100% corresponde a la cantidad de biofilm bacteriano cuantificado sin ningún tratamiento.

### **5.2.3. Efecto del fitoquímico sobre la estructura del biofilm de *K. pneumoniae* por microscopía confocal.**

Se investigó, además, el efecto del 1,8-cineol sobre la estructura del biofilm formado de la bacteria Kp-010. Para ello, se estudió la estructura del biofilm bacteriano sin tratamiento y luego del tratamiento con el fitoquímico mediante la técnica de Microscopía Confocal, CLSM (por sus siglas en inglés Confocal Laser Scanning Microscopy). Los experimentos se realizaron utilizando la variante de la misma bacteria conjugada con un plásmido que contenía la proteína verde fluorescente GFP, dicha bacteria ha sido denominada Kp-010 pHC60 GFP. La misma fue preparada y gentilmente cedida por la Dra. Estela Galván de la Universidad Maimónides (Farmacia y Bioquímica-CEBBAD).

Dicha bacteria fue tratada con 1% y 2% de 1,8-cineol durante 24 horas como se indicó en el Ítem 4.8 y se ensayó como controles del experimento la misma bacteria sin tratamiento alguno o con el vehículo solo (0,5% de etanol)

En la Figura 12A en ausencia del vehículo se puede apreciar la formación de una matriz estructural que se condice con la estructura normal de un biofilm bacteriano de tamaño correspondiente al desarrollo luego de 24 horas. El panel 12B muestra que en presencia del vehículo se observa un cierto efecto sobre la estructura del biofilm, aunque se distingue una estructuración tridimensional del mismo. La Figura 12C y 12D muestra un dramática efecto sobre la estructura del biofilm en las muestras tratadas con 1% y 2% de 1,8-cineol. Un análisis detallado de las muestras tratadas indica la presencia de una capa dispersa de bacterias adheridas a la superficie del cubreobjetos, en donde pueden reconocerse los bacilos en forma de huso correspondiente, luego del tratamiento con 2% del compuesto (Figura 12D). Además, a la menor concentración del compuesto ensayado, las células se organizan como células individuales y también como pequeños agregados multicelulares.

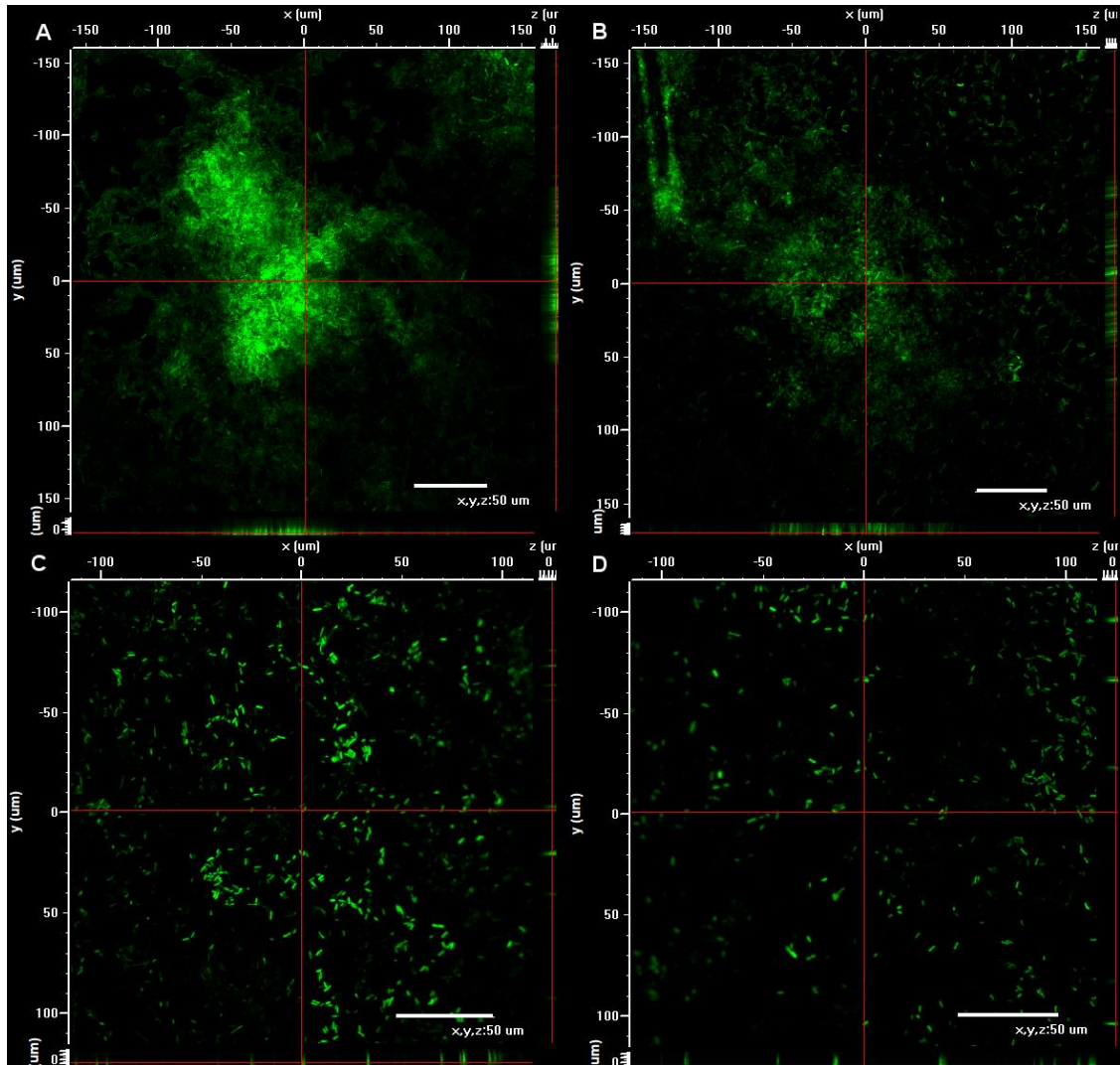


Figura 12. Estructura del biofilm en las muestras sin tratar o tratadas con 1,8-cineol. Panel B y A  
 tratadas con y sin vehículo (respectivamente). Paneles C y D tratadas con 1% y 2% de 1,8-cineol,  
 respectivamente, en donde se observa poca o nula formación de biofilm en las muestras

Para profundizar la observación anterior se procedió a la cuantificación de la biomasa de biofilm de todas las muestras. Se procedió entonces, como se describió en materiales y métodos, a calcular la biomasa del biofilm preformado en los controles sin tratamientos y se los comparó con las imágenes de los biofilms luego del tratamiento con el 1,8-cineol. Además, se calculó la altura alcanzada por los biofilms determinados en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

Se observó una reducción entre 8 y 15 veces de la biomasa cuantificada de la Kp-010 pHc60 GFP tratada con 2% de 1,8-cineol en comparación con la misma bacteria sin tratamiento, pero en presencia del vehículo (0,5% de etanol). Además, el fitoquímico al 1% de su concentración disminuyó entre 3 y 6 veces la biomasa cuantificada en el aislado de *Klebsiella pneumoniae* en comparación nuevamente contra la bacteria sin tratamiento y en presencia del vehículo (Figura 13).

Por otro parte, se analizó la altura de los biofilms formados en las distintas muestras. En este análisis se pudo apreciar una clara disminución de la altura en el tratado con 2% de 1,8-cineol (6,25  $\mu\text{m}$ ) respecto a los no tratados con el fitoquímico en presencia y ausencia del vehículo (8,5  $\mu\text{m}$  y 13  $\mu\text{m}$ , respectivamente). El tratado con 1% de 1,8-cineol presentó una menor disminución de la altura (8  $\mu\text{m}$ ) en comparación a la muestra tratada con una mayor cantidad del fitoquímico.



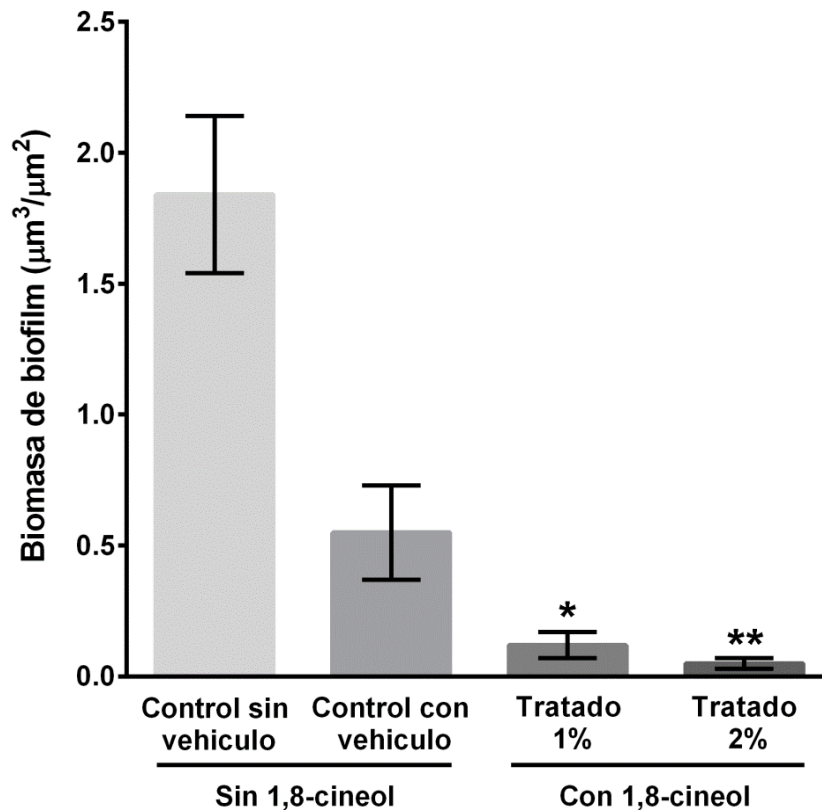


Figura 13. Cuantificación de biomasa de biofilm adherida al sustrato luego de 24 horas de tratamiento con 1,8-cineol. Los controles corresponden al biofilm formado por las muestras sin tratamiento con el fitoquímico, con y sin vehículo (0,5% de etanol). Se realizaron tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar. Se detectaron diferencias significativas \*  $p < 0,1$  o \*\*  $p < 0,05$  en comparación con la biomasa de biofilm adherida al sustrato del control con vehículo (Pruebas t de Student).

## 6. Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran por primera vez que el principal bioactivo de extractos de *R. officinalis*, el ácido carnósico, puede actuar en forma sinérgica con gentamicina frente a aislados clínicos de SARM tanto sensibles como resistentes a la gentamicina obtenidos de bacteriemias de pacientes pediátricos.

Es importante destacar que además de una clara potenciación entre 32 y 40 veces de la gentamicina por el fitoquímico, la combinación de ambos resultó en un dramático aumento en la capacidad bactericida de la gentamicina incluso sobre aislados clínicos de SARM resistentes a la gentamicina. Estos aislados presentaban una alta resistencia al antibiótico demostrada por un valor de sus CBMs mayores a 50 veces con respecto a los aislados de SARM susceptibles al antibiótico (95 vs 2  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente).

Se sabe que el uso de altas concentraciones de gentamicina puede producir efectos adversos asociados con toxicidad renal y bloqueo neuromuscular (McConeghy y LaPlante, 2010). Por este motivo, los resultados obtenidos son de alto interés en la clínica médica pues posibilitan el desarrollo de estrategias adyuvantes que incluyan la combinación de gentamicina con el ácido carnósico y así lograr la reducción en las dosis de gentamicina utilizadas contra infecciones estafilococales. Además, dicha alternativa también es ventajosa ya que puede retrasar la aparición de nuevas cepas resistentes a la gentamicina así logrando un impacto clínico importante, así como poder reducir costos hospitalarios. De hecho, actualmente se usa la gentamicina en combinación con vancomicina o penicilinas, en bajas dosis, aunque parecen también originar disfunciones renales significativas para el tratamiento de la bacteriemia por *S. aureus* y la endocarditis valvular nativa (Cosgrove *et al*, 2009).

En este trabajo se ha demostrado también que el ácido carnósico fue capaz de potenciar la ciprofloxacina, una de las fluoroquinolonas más comúnmente prescritas en formulaciones orales e intravenosas.

Se sabe que uno de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en *S. aureus* es la expulsión de antibióticos por bombas de eflujo que disminuyen la concentración intracelular del antibiótico (Liu *et al*, 2011; Handzlik *et al*, 2013). Trabajos anteriores demostraron que el ácido carnósico podía inhibir la expulsión de los antibióticos estudiados mediante la inhibición de bombas de eflujo secundarias por disipación del potencial de membrana en *S. aureus* (Ojeda-Sana *et al*, 2013a).

---

Además, se observó que el ácido carnósico no aumentaba la permeabilidad de la membrana de las cepas susceptibles de *S. aureus* y *E. faecalis* (Moreno *et al*, 2012; Ojeda-Sana *et al*, 2013a). Se podría pensar que el mismo mecanismo estaría ejerciendo el efecto potenciador de la gentamicina y la ciprofloxacina en los aislados de SARM.

Actualmente, se considera que la generación de fitofármacos como potenciadores de los antibióticos existentes podrían constituir una nueva alternativa eficaz y menos costosa en el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes (Bhatti *et al*, 2014). Se ha reportado la acción antiestafilocócica de diferentes compuestos redox vegetales activos con un historial de uso humano incluido el ácido carnósico contra la cepa de laboratorio pan-susceptible *S. aureus* SH1000, aunque dicho trabajo encontró actividad antimicrobiana a mayores concentraciones (128 µg/ml) que la observada en este trabajo (8 µg/ml contra *S. aureus* ATCC 25923) (Ooi *et al*, 2015). Con respecto a la potenciación de antibióticos un extracto crudo de *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) comúnmente denominado salvia y los compuestos puros purificados de los extractos, el ácido carnósico (8 µg/ml) o el carnosol (16 µg/ml), mostraron la potenciación de aminoglucósidos en enterococos resistentes a la vancomicina (Horiuchi *et al*, 2007). Otro estudio reportó que la incorporación de carnosol y ácido carnósico en el medio de crecimiento a una concentración de 10 µg/ml causó una potenciación de 16 a 32 veces la actividad de la eritromicina contra la cepa de *S. aureus* resistente a macrólidos que posee un mecanismo de resistencia mediado por el eflujo de la droga y una potenciación entre 2 a 4 veces sobre la actividad de la tetraciclina contra la cepa de *S. aureus* resistente a la tetraciclina que alberga las proteínas de eflujo de TetK (Oluwatuyi *et al*, 2004).

La efectividad a nivel clínico de los fármacos en general y de los agentes antimicrobianos en particular requieren de una alta eficacia asociada con una toxicidad selectiva hacia la bacteria en lugar del huésped. En tal contexto, previamente se demostraron acciones bactericidas *in vivo* de un extracto etanólico de *R. officinalis* conteniendo una alta concentración de ácido carnósico contra la cepa *S. aureus* ATTC 25923 en dos modelos de infección en piel de ratones (Barni *et al*, 2009). Además, el ácido carnósico, en concentraciones que exhibían un efecto antimicrobiano, no evidenció significativos efectos sobre la viabilidad en células de mamíferos ó efectos negativos sobre la

---

fisiología del nematode *Caenorhabditis elegans*. Todos los resultados mencionados avalan el alto potencial de ácido carnósico para ser utilizado en el campo de la infectología humana.

Otro resultado logrado en este trabajo es la demostración de la actividad antibiofilm del 1,8-cineol, uno de los principales monoterpenos presente en aceites esenciales obtenidos de hojas de *R. officinalis*. Se encontró que fue capaz de disminuir en gran proporción el biofilm preformado de aislados de *K. pneumoniae*. Mediante estudios de microscopia confocal se pudo observar una reducción entre 8 y 15 veces la biomasa y una significativa reducción en la altura del biofilm bacteriano en comparación con muestras no tratadas con el fitoquímico. Este resultado es importante puesto que las bacterias que residen dentro de biofilms maduros son altamente resistentes a muchas terapias tradicionales. Las células bacterianas pueden cambiar su proteoma para existir en un estado sésil con bajos niveles metabólicos y actividades celulares disminuidas (Brady *et al*, 2008). Como resultado de su baja actividad metabólica, los microorganismos en biofilms son mucho más difíciles de erradicar que los microorganismos planctónicos, utilizando agentes antimicrobianos convencionales (Davis *et al*, 2008). Se ha informado que algunos biofilms pueden persistir a concentraciones de antibióticos y agentes antimicrobianos de 100 a 1000 veces más altas que aquellas concentraciones que pueden inhibir a las células planctónicas (Donlan y Costerton, 2002; Wolcott y Ehrlich, 2008). Por lo tanto, la capacidad de formación de biofilm demuestra ser un importante mecanismo de patogenicidad bacteriana. En particular, los aislados clínicos de *K. pneumoniae* exhiben dicho mecanismo de patogenicidad, aspecto que dificultan los tratamientos para combatir infecciones relacionadas con dichas bacterias.

Otros estudios reportaron el uso de compuestos presentes en aceites esenciales como posibles agentes con actividades antibiofilm frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Malic *et al*, 2014). Se cree que los compuestos volátiles podrían difundir a través de la matriz de polisacáridos del biofilm maduro y desestabilizarlo debido a las fuertes actividades antimicrobianas intrínsecas (Nostro *et al*, 2007). Además, se ha reportado la actividad antiadherente por la alteración de las proteínas de superficie bacterianas debido a sus interacciones con dichos compuestos. Esto inhibirá la fase de unión inicial a la superficie abiótica evitando así la formación del biofilm (Nostro *et al*, 2007).

Si bien se deben realizar posteriores estudios sobre la actividad antibiofilm del 1,8-cineol los resultados obtenidos evidencian que el 1,8-cineol puede ejercer actividad antibiofilm frente a aislados

---

multirresistentes de *K. pneumoniae* sugiriendo un uso potencial del fitoquímico para la prevención y/o el tratamiento de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria en general y contra infecciones asociadas con *K. pneumoniae* en particular.

## 7. Conclusiones

❖ Nuestros hallazgos sugieren que el ácido carnósico y el 1,8-cineol son compuestos eficaces que podrían ser utilizados en la clínica humana contra infecciones causadas por bacterias multirresistentes asociadas a SARM y *Klebsiella pneumoniae*.

❖ El ácido carnósico es un buen candidato para la generación de nuevas formulaciones de medicamentos en combinación con gentamicina como una alternativa efectiva en la prevención/tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por SARM resistente a múltiples antibióticos. Las infecciones relacionadas con SARM son problemas graves debido a su resistencia contra muchos tipos de antimicrobianos y las combinaciones de ácido carnósico con gentamicina pueden conducir a tasas más bajas de morbilidad y mortalidad y el uso del diterpeno podría allanar el camino hacia posibles aplicaciones para superar la falta de efectividad de la gentamicina frente a aislados de SARM resistentes a la gentamicina.

❖ La actividad antibiofilm del 1,8-cineol asociada con la disgregación del biofilm formado por *K. pneumoniae*, revelada por primera vez en este trabajo, es de sumo interés porque podría ser utilizada en la prevención y/o el tratamiento de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria.



## **8. Perspectivas**

- ❖ Preparar mezclas galénicas que contengan ácido carnósico solo y en combinación con gentamicina para evaluar su eficacia *in vivo* contra aislados clínicos multirresistentes de *S. aureus*.
- ❖ Ensayar el 1,8-cineol (compuesto el cual mostró eficacia antibiofilm) sobre biofilms duales conteniendo *K. pneumoniae* y otros patógenos asociados al uso de sondas urinarias y/o endotraqueales (como *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, y *P. aeruginosa*).
- ❖ Estudiar posibles sinergias de los metabolitos secundarios de interés en combinación con otros antimicrobianos, como por ejemplo el 1,8-cineol en combinación con carbapenems (meropenem e imipenem), sobre *K. pneumoniae* creciendo en suspensión y en biofilm (monomicrobianos y duales).
- ❖ Investigar los mecanismos moleculares subyacentes a la actividad antibiofilm del 1,8-cineol sobre la adhesión, desarrollo y dispersión de biofilms de *K. pneumoniae* y *S. aureus*.

## 9. Bibliografía

Anantharaman, A., M. S. Rizvi and D. Sahal (2010). "Synergy with rifampin and kanamycin enhances potency, kill kinetics, and selectivity of de novo-designed antimicrobial peptides." Antimicrob Agents Chemother **54**(5): 1693-1699.

Abreu, A. C., A. J. McBain and M. Simoes (2012). "Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents." Nat Prod Rep **29**(9): 1007-1021.

AMR CONTROL [en línea]. © 2017. [consulta 22 nov 2017].  
<<http://resistancecontrol.info/>>.

Brooks, T. and C. W. Keevil (1997). "A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens." Letters in Applied Microbiology **24**(3): 203-206.

Brady, R. A., J. G. Leid, J. H. Calhoun, J. W. Costerton and M. E. Shirtliff (2008). "Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection." FEMS Immunol Med Microbiol **52**(1): 13-22.

Barni, M. V., A. Fontanals and S. Moreno (2009). "Study of the antibiotic efficacy of an ethanolic extract from *Rosmarinus officinalis* against *Staphylococcus aureus* in two skin infection models in mice." Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas **8**(3): 219-223.

Boucher, H. W., G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg and J. Bartlett (2009). "Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America." Clin Infect Dis **48**(1): 1-12.

Bhatti, H. N., S. S. Khan, A. Khan, M. Rani, V. U. Ahmad and M. I. Choudhary (2014). "Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities." Phytomedicine **21**(12): 1597-1626.

Boulangier, S., G. Mitchell, K. Bouarab, E. Marsault, A. Cantin, E. H. Frost, E. Deziel and F. Malouin (2015). "Bactericidal Effect of Tomatidine-Tobramycin Combination against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Is Enhanced by Interspecific Small-Molecule Interactions." Antimicrob Agents Chemother **59**(12): 7458-7464.

Borges, A., A. C. Abreu, C. Dias, M. J. Saavedra, F. Borges and M. Simoes (2016). "New Perspectives on the Use of Phytochemicals as an Emergent Strategy to Control Bacterial Infections Including Biofilms." Molecules **21**(7).

Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber and H. M. Lappin-Scott (1995). "Microbial biofilms." Annu Rev Microbiol **49**: 711-745.

Cosgrove, S. E., G. A. Vigliani, V. G. Fowler, Jr., E. Abrutyn, G. R. Corey, D. P. Levine, M. E. Rupp, H. F. Chambers, A. W. Karchmer and H. W. Boucher (2009). "Initial low-dose gentamicin for *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis is nephrotoxic." Clin Infect Dis **48**(6): 713-721.

CLSI, (2009-2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100, Wayne, PA .

---

Donlan, R. M. and J. W. Costerton (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clin Microbiol Rev **15**(2): 167-193.

Davis, S. C., C. Ricotti, A. Cazzaniga, E. Welsh, W. H. Eaglstein and P. M. Mertz (2008). "Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo." Wound Repair Regen **16**(1): 23-29.

Dalecki, A. G., C. L. Crawford and F. Wolschendorf (2016). "Targeting Biofilm Associated Staphylococcus aureus Using Resazurin Based Drug-susceptibility Assay." J Vis Exp(111).

EÖTVÖS LORÁND UNIVERSITY [en línea]. © 2013. [consulta 22 nov 2017].  
<[http://ttktamop.elte.hu/online-tananyagok/practical\\_microbiology/index.html/](http://ttktamop.elte.hu/online-tananyagok/practical_microbiology/index.html/)>.

Francolini, I. and G. Donelli (2010). "Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections." FEMS Immunol Med Microbiol **59**(3): 227-238.

Flemming, H. C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice and S. Kjelleberg (2016). "Biofilms: an emergent form of bacterial life." Nat Rev Microbiol **14**(9): 563-575.

GOBIERNO DEL REINO UNIDO [en línea]. © 2015. [consulta 22 nov 2017].  
<<https://www.gov.uk/government/publications/>>.

Galvan, E. M., C. Mateyca and L. Ielpi (2016). "Role of interspecies interactions in dual-species biofilms developed in vitro by uropathogens isolated from polymicrobial urinary catheter-associated bacteriuria." Biofouling **32**(9): 1067-1077.

Horiuchi, K., S. Shiota, T. Kuroda, T. Hatano, T. Yoshida and T. Tsuchiya (2007). "Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*." Biol Pharm Bull **30**(2): 287-290.

Handzlik, J., A. Matys and K. Kieć-Kononowicz (2013). "Recent Advances in Multi-Drug Resistance (MDR) Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive Bacteria *S. aureus*." Antibiotics **2**(1): 28-45.

Jayaraman, P., M. K. Sakharkar, C. S. Lim, T. H. Tang and K. R. Sakharkar (2010). "Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro." Int J Biol Sci **6**(6): 556-568.

Kot, B., K. Wierzchowska, A. Gruzewska and D. Lohinau (2017). "The effects of selected phytochemicals on biofilm formed by five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Nat Prod Res: 1-4.

Liu, C., A. Bayer, S. E. Cosgrove, R. S. Daum, S. K. Fridkin, R. J. Gorwitz, S. L. Kaplan, A. W. Karchmer, D. P. Levine, B. E. Murray, J. R. M, D. A. Talan and H. F. Chambers (2011). "Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary." Clin Infect Dis **52**(3): 285-292.

Moreno, S., T. Scheyer, C. S. Romano and A. A. Vojnov (2006). "Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition." Free Radic Res **40**(2): 223-231.

---

McConeghy, K. W. and K. L. LaPlante (2010). "In vitro activity of tigecycline in combination with gentamicin against biofilm-forming *Staphylococcus aureus*." *Diagn Microbiol Infect Dis* **68**(1): 1-6.

Moreno, S., A. Ojeda, M. Gaya, M. a. Veronica Barni, O. Castro and C. Van Baren (2012). Rosemary Compounds as Nutraceutical Health Products, *Food Additive*, Prof. Yehia El-Samragy (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/30883.

Malic, S., R. P. Jordan, M. G. Waters, D. J. Stickler and D. W. Williams (2014). "Biocide activity against urinary catheter pathogens." *Antimicrob Agents Chemother* **58**(2): 1192-1194.

Meziane-Cherif, D. and P. Courvalin (2014). "Antibiotic resistance: to the rescue of old drugs." *Nature* **510**(7506): 477-478.

McCarthy, H., J. K. Rudkin, N. S. Black, L. Gallagher, E. O'Neill and J. P. O'Gara (2015). "Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*." *Front Cell Infect Microbiol* **5**: 1.

Nostro, A., A. Sudano Roccaro, G. Bisignano, A. Marino, M. A. Cannatelli, F. C. Pizzimenti, P. L. Cioni, F. Procopio and A. R. Blanco (2007). "Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *J Med Microbiol* **56**(Pt 4): 519-523.

Nordmann, P., G. Cuzon and T. Naas (2009). "The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria." *Lancet Infect Dis* **9**(4): 228-236.

O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998). "Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis." *Mol Microbiol* **28**(3): 449-461.

Odds, F. C. (2003). "Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them." *J Antimicrob Chemother* **52**(1): 1.

Oluwatuyi, M., G. W. Kaatz and S. Gibbons (2004). "Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*." *Phytochemistry* **65**(24): 3249-3254.

Ojeda-Sana, A. M., V. Repetto and S. Moreno (2013). "Carnosic acid is an efflux pumps modulator by dissipation of the membrane potential in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*." *World J Microbiol Biotechnol* **29**(1): 137-144. (a)

Ojeda-Sana, A. M., C. M. van Baren, M. A. Elechosa, M. A. Juárez and S. Moreno (2013). "New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components." *Food Control* **31**(1): 189-195. (b)

Ooi, N., E. A. Eady, J. H. Cove and A. J. O'Neill (2015). "Redox-active compounds with a history of human use: antistaphylococcal action and potential for repurposing as topical antibiofilm agents." *J Antimicrob Chemother* **70**(2): 479-488.

Premanandh, J., B. S. Samara and A. N. Mazen (2015). "Race Against Antimicrobial Resistance Requires Coordinated Action - An Overview." *Front Microbiol* **6**: 1536.

---

Patil, H. V. and V. C. Patil (2017). "Incidence, bacteriology, and clinical outcome of ventilator-associated pneumonia at tertiary care hospital." J Nat Sci Biol Med **8**(1): 46-55.

Romano, C. S., K. Abadi, V. Repetto, A. A. Vojnov and S. Moreno (2009). "Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives." Food Chemistry **115**(2): 456-461.

Rempe, C. S., K. P. Burris, H. L. Woo, B. Goodrich, D. K. Gosnell, T. J. Tschaplinski and C. N. Stewart, Jr. (2015). "Computational Ranking of Yerba Mate Small Molecules Based on Their Predicted Contribution to Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*." PLoS One **10**(5): e0123925.

Sande M., Kapusnik-Uner J. y Mandell G. (1990). Antimicrobial Agents: General Considerations, p. 1018-1019. In: Goodman Gilman, A., T. W. Rall, A. S. Nies & P. Taylor. (Ed.), Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8va Ed. Pergamon Press, New York, USA.

Simoës, M., L. C. Simoës and M. J. Vieira (2009). "Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments." Water Res **43**(1): 229-237.

Song, Z., L. Borgwardt, N. Hoiby, H. Wu, T. S. Sorensen and A. Borgwardt (2013). "Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: the possible role of bacterial biofilms." Orthop Rev (Pavia) **5**(2): 65-71.

Ventola, C. L. (2015). "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats." P t **40**(4): 277-283.

Vuong, C., A. J. Yeh, G. Y. Cheung and M. Otto (2016). "Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Expert Opin Investig Drugs **25**(1): 73-93.

White, R. L., D. S. Burgess, M. Manduru and J. A. Bosso (1996). "Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test." Antimicrob Agents Chemother **40**(8): 1914-1918.

Woodford, N., P. M. Tierno, Jr., K. Young, L. Tysall, M. F. Palepou, E. Ward, R. E. Painter, D. F. Suber, D. Shungu, L. L. Silver, K. Inglima, J. Kornblum and D. M. Livermore (2004). "Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center." Antimicrob Agents Chemother **48**(12): 4793-4799.

Wolcott, R. D. and G. D. Ehrlich (2008). "Biofilms and chronic infections." Jama **299**(22): 2682-2684.

World Health Organization (WHO), (2014). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, 2014 Summary. Geneva. Switzerland.

Yilmaz, M., N. Elaldi, Balkan, II, F. Arslan, A. A. Batirel, M. Z. Bakici, M. G. Gozel, S. Alkan, A. D. Celik, M. A. Yetkin, H. Bodur, M. Sinirtas, H. Akalin, F. A. Altay, I. Sencan, E. Azak, S. Gundes, B. Ceylan, R. Ozturk, H. Leblebicioglu, H. Vahaboglu and A. Mert (2016). "Mortality predictors of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a prospective multicenter study." Ann Clin Microbiol Antimicrob **15**: 7.

---