



Evaluación de alternativas fitoterapéuticas para el control de la mastitis bovina por *Staphylococcus aureus*

Evaluation of phytotherapeutic alternatives for the control of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*

Buldain Daniel^{1,2} | Gortari Castillo Lihuel^{1,2} | di Filippo Julia² | Islan Germán³

¹Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos - LEFYT-, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

²CONICET. Argentina.

³Laboratorio de Nanobiomateriales, CINDEFI, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata-CONICET (CCT La Plata), La Plata, Argentina.

ID Autores:

Buldain Daniel: <https://orcid.org/0000-0002-7772-2453>

Gortari Castillo Lihuel: <https://orcid.org/0000-0001-8958-0459>

di Filippo Julia: <https://orcid.org/0009-0000-6139-5884>

Islan Germán: <https://orcid.org/0000-0002-3275-1349>

Autor para correspondencia:

Correo electrónico: dbuldain@fcv.unlp.edu.ar (Daniel Buldain)

Resumen

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un problema mundial que requiere de nuevas alternativas de control. El aceite esencial (AE) de *Melaleuca armillaris* ha demostrado ser eficaz in vitro frente a *S. aureus*. Por otro lado, la aplicación de la nanotecnología permite incorporar moléculas a nanoestructuras, favoreciendo su protección, su liberación controlada y reduciendo la toxicidad. En este estudio, evaluamos la actividad AM del AE de *M. armillaris* libre, en combinación con cloxacilina, eritromicina, rifaximina y AE de *Laurus nobilis*; y encapsulado en transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) frente a *S. aureus* productor de biofilm. Se analizó la citotoxicidad del AE libre y nanoencapsulado sobre leucocitos polimorfonucleares (PMNs). El AE de *M. armillaris* resultó ser un fuerte AM frente a *S. aureus* productor de biofilm, y presentó sinergia en combinación con los antibióticos (ABs) mencionados y con el AE de *L. nobilis*. La encapsulación de este AE en las NLC permitió mantener su efecto AM y disminuyó el efecto citotóxico del extracto vegetal. Hallazgo sumamente importante para futuras evaluaciones de la actividad intracelular del AE en PMNs, en donde sobrevive el *S. aureus*, ya que nos permite pensar en potenciales aplicaciones en el control de infecciones de difícil resolución disminuyendo el uso de AMs y contribuyendo a la disminución de la diseminación de RAM como riesgo en el contexto de "Una Salud".

Palabras clave: Aceites esenciales, Antimicrobianos, Nanopartículas, Mastitis Bovina, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) is a global problem that requires new control alternatives. *Melaleuca armillaris* essential oil (EO) has been shown to be effective in vitro against *S. aureus*. On the other hand, the application of nanotechnology allows the incorporation of molecules into nanostructures, favoring their protection, controlled release and reducing toxicity. In this study, we evaluated the AM activity of free *M. armillaris* EO, in combination with cloxacillin, erythromycin, rifaximin and *Laurus nobilis* EO; and encapsulated in nanostructured lipid carriers (NLC) against biofilm-producing *S. aureus*. The cytotoxicity of free and nanoencapsulated EO on polymorphonuclear leukocytes (PMNs) was analyzed. The EO of *M. armillaris* was found to be a strong AM against biofilm-producing *S. aureus*, and showed synergy in combination with the aforementioned antibiotics (ABs) and with the EO of *L. nobilis*. The encapsulation of this EO in NLCs allowed maintaining its AM effect and decreased the cytotoxic effect of the plant extract. This finding is extremely important for future evaluations of the intracellular activity of the EO in PMNs, where *S. aureus* survives, since it allows us to think about potential applications in the control of infections that are difficult to resolve, reducing the use of AMs and contributing to the decrease in the dissemination of AMR as a risk in the context of "One Health".

Keywords: Essential oils, Antimicrobials, Nanoparticles, Bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*.

1. Introducción

La creciente amenaza de la resistencia antimicrobiana (RAM) ha aumentado drásticamente el fracaso terapéutico y fomenta la exploración de nuevas alternativas para hacerle frente¹. En el mundo mueren aproximadamente 700.000 personas por año debido a infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos (AMs), se estima que este número llegará a alcanzar hacia el año 2050 cerca de 10 millones de muertes por año². A esto debe sumarse la dificultad existente para el desarrollo de nuevas moléculas y el elevado costo que implica para la industria farmacéutica^{3,4}. En Argentina, en el año 2015, se puso en marcha la Estrategia Argentina para el Control de la RAM (Res. 591/2015) de manera conjunta entre el Ministerio de Salud y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, que tiene como uno de los objetivos centrales “Promover la innovación en antimicrobianos”.

S. aureus es uno de los principales patógenos contagiosos responsable de ocasionar mastitis subclínica bovina, puede adaptarse, sobrevivir y crecer en la piel de la glándula mamaria y en las lesiones de los pezones, por lo que el principal reservorio son las ubres infectadas⁵. A su vez, las malas prácticas de manejo en el tambo, la falta de higiene de los establecimientos, los animales y el personal colaboran en la diseminación de este microorganismo. El uso de desinfectantes de pezones es una práctica de la rutina de ordeño que permite reducir el número de nuevas infecciones intramamarias (IIM) en bovinos. Esta práctica es ampliamente aceptada como parte fundamental de un programa exitoso de control de mastitis⁶. Por otro lado, se cree que la supervivencia intracelular de este microorganismo contribuye a su recurrencia⁷. Esta bacteria es importante para la salud pública por su virulencia y por el riesgo potencial de transferencia de determinantes genéticos de RAM entre animales, humanos y el medio ambiente¹, a tal punto que ha sido incluido en los programas de vigilancia y seguimiento de la resistencia a los agentes antimicrobianos como **bacteria patógena zoonótica emergente** (OIE, capítulo 6.7 del Código Sanitario para los animales terrestres).

Las dificultades para desarrollar nuevas moléculas antibióticas (AB) incitan a explotar diferentes estrategias dentro de las ya existentes⁸. Los aceites esenciales de plantas (AE) son mezclas complejas de metabolitos secundarios que junto con los AB pueden tener efectos sinérgicos⁹. Los diferentes compuestos presentes en los extractos vegetales dificultan que las bacterias desarrollen mecanismos de resistencia simultáneos frente a cada uno de ellos^{10,11}. *Melaleuca armillaris* es una planta del género *Melaleuca* ampliamente cultivada, cuyo AE es rico en 1,8 cineol¹². Se encontró actividad inhibitoria, *in vitro*, frente a varias especies bacterianas, incluido *S. aureus*¹³. El rendimiento obtenido de esta especie vegetal por nuestro grupo (1.55%)^{14,15} y la rápida regeneración de su biomasa tras la

cosecha, hacen que su explotación sea económicamente viable y sostenible con un buen manejo. A esto debemos sumar la gran densidad de plantas que se puede cultivar por hectárea, una especie muy similar de *Melaleuca* (*M. alternifolia*), es cultivada industrialmente con densidades de 30000 plantas/Ha¹⁶, por lo que la cantidad de AE obtenida es muy importante. La terapia combinada, que asocia AB convencionales con compuestos naturales como los AEs, representa una estrategia prometedora para enfrentar la RAM¹⁷. Las combinaciones sinérgicas tienen mayor eficacia y menor toxicidad que sus componentes aislados. Diversos estudios que dan cuenta de la actividad sinérgica entre el AE y los AB^{14,18,19} sugieren que el aceite tiene potencial para usarse como adyuvante en la terapia antimicrobiana. De la misma forma, diferentes AEs pueden combinarse en busca de efectos sinérgicos.

Otro enfoque interesante para abordar el problema de la persistencia intracelular de *S. aureus* y la RAM asociados a las infecciones subclínicas y recurrentes de la mastitis bovina, es el desarrollo de nanoestructuras para el “delivery” de fármacos. Las nanopartículas penetran la membrana celular y los orgánulos subcelulares, se depositan en el sitio donde se ubica el microorganismo patógeno, permanecen a nivel intracelular por periodos prolongados y se liberan de su carga a través de los poros de las membranas de las mismas²⁰. De este modo se favorece la actividad farmacológica, una dosificación uniforme del agente activo, aumentar su biodisponibilidad, localizarlo en el sitio infectado, disminuir el tiempo de tratamiento y los efectos secundarios²¹. Las matrices de las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) presentan características interesantes desde el punto biológico como citocompatibilidad, biodegradabilidad y estabilidad; mientras que los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC), presentan mejoras en las propiedades fisicoquímicas de las SLN, incluyendo una mayor estabilidad de almacenamiento de fármacos y eficiencia de encapsulación, como también un mejor control del perfil cinético de liberación de fármacos²². Por todo esto, la encapsulación de AEs en nanopartículas resulta sumamente prometedora en el mejoramiento de la eficacia de la terapia antimicrobiana, puesto que favorecen la estabilidad de estos, facilitan el manejo, mejoran su seguridad reduciendo los efectos secundarios tóxicos que pudieran presentarse, permiten una liberación controlada, mejoran la hidrosolubilidad de compuestos hidrofóbicos, mejoran biodisponibilidad y por lo tanto aumentan la eficacia²³.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana del AE de *M. armillaris* frente a *S. aureus* mediante diferentes estrategias incluyendo la determinación de la actividad *in vitro* del AE solo, la combinación con antibióticos (eritromicina -ERI-, rifaximina -RIF- y cloxacilina -CLOX-) y AE de *L. nobilis*; encapsulado en nanopartículas tipo

NLC, y la evaluación del efecto antibiofilm, citotoxicidad en células polimorfonucleares (PMNs) y su eficacia en un modelo de pezones escindidos.

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención de AE de *M. armillaris* y su caracterización

Se recolectaron hojas y ramas herbáceas de plantas ubicadas en Coronel Brandsen, Buenos Aires, Argentina (latitud 35°06'18.9" S y longitud 58°10'57.0" O). Una alcuota se reservó para identificación y posterior almacenamiento en el herbario LPAG de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP²⁴. El AE se obtuvo por destilación por arrastre de vapor de agua. La composición del AE fue analizada por GC-MS-FID y se evaluaron parámetros de control de calidad²⁵: apariencia a 20 °C, olor, sabor, color, índice de refracción, densidad, pH, solubilidad en aceite mineral (1:1), agua (1:10) y etanol 70% (1:1). Los índices de acidez y de esterificación se determinaron siguiendo la Farmacopea Argentina VII Ed (2013)²⁶.

2.2. Evaluación de la concentración inhibitoria mínima y bactericida de cloxacilina, eritromicina, rifaximina y AE de *M. armillaris*

La CIM del AE y de los ABs se realizó por microdilución en caldo Mueller Hinton (CMH) utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos. Se añadió 0.5 % de Tween 80 para mejorar la disolución de AE. El pH del caldo se ajustó a 7.4, 6.5 y 5.0 mediante adición de ácido clorhídrico, emulando las condiciones de pH de los sitios a nivel extracelular e intracelular (citosol y fagolisosomal). El rango de concentraciones analizadas (doble dilución seriada) de AE fue 50-0.1 µL/mL, ERI 1024-0.007 µg/mL, CLOX 512-0.007 µg/mL y RIF 256-0.007 µg/mL. En todos los casos, cada pocillo se inoculó con una concentración bacteriana final de 5×10^5 UFC/mL y se incubó a 35 °C durante 18-24 h. La CIM se estableció como la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano. Cada determinación se hizo por triplicado. Los controles positivos y negativos contenían CMH con Tween 80 (0.5%). La CBM se realizó inoculando 25 µL de cada pocillo sin crecimiento bacteriano evidente (post-CIM) en placas de agar nutritivo, incubadas a 35 °C durante 18-24 h para efectuar el recuento de colonias. La CBM se estableció como la primera concentración que produce la muerte del 99.9% del inóculo inicial.

2.2.1. Evaluación del sinergismo entre el AE de *M. armillaris* y antibióticos

Una vez establecidas las CIMs, se llevó a cabo la técnica de tablero de damas²⁷ para las combinaciones de ABs y AE a pH 7.4, 6.5 y 5.0, con el fin de establecer la presencia o ausencia de interacción sinérgica entre ellos frente a *S. aureus*. El diseño de la microplaca constaba de una columna de dilución en serie en un factor de 2 de AB con una fila de dilución en serie en un factor de 2 de AE. Los pocillos adicionales contenían AB y AE combinados en diferentes proporciones que abarcaban todas las concentraciones evaluadas. Los inóculos

se dispensaron considerando una concentración final de 5×10^5 UFC/mL por pocillo. Las microplacas, realizadas por triplicado, se incubaron a 35°C durante 18-24 h. Los resultados se interpretaron considerando el índice de concentración fraccionaria inhibitoria (CFI), definido como la suma de los cocientes entre la CIM de los AMs solos y combinados con el AE:

$$\text{CFI} = \left[\frac{A}{\text{CIM}_a} \right] + \left[\frac{B}{\text{CIM}_b} \right] \quad [1]$$

donde (A): CIM AB en combinación con AE; (B): CIM AE en combinación con AB; (CIM)_a y (CIM)_b: CIM del AB y AE solos, respectivamente. Así, existe sinergismo si $\text{CFI} \leq 0.5$, sinergismo parcial o bajo (PS) si $0.5 < \text{CFI} < 1$, indiferencia o adición (I) si $1 \leq \text{CFI} < 2$, y antagonismo (A) si $\text{CFI} \geq 2$ ²⁷.

2.2.2. Determinación del índice de actividad antibacteriana E y su modelación matemática

Se realizaron curvas de muerte bacteriana exponiendo los aislados de *S. aureus* a diferentes concentraciones de los ABs solos y combinados con AE a pH 7.4, 6.5 y 5.0. Las concentraciones se seleccionaron en base a la CIM obtenida en cada caso. Para el AE, los ABs y las combinaciones AE-ABs se utilizaron concentraciones de 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM en todos los casos, excepto al evaluar cepas resistentes a ERI, donde las concentraciones fueron 0.5, 1, 2 y 4 veces la CIM a pH 7.4 y 0.5, 1 y 2 veces la CIM a pH 6.5 y 5.0, respectivamente, debido a que el elevado valor de CIM (particularmente en condiciones ácidas) para estas cepas dificultaba la solubilización del AB en los medios de cultivo.

Se preparó un tubo por cada condición a evaluar con un volumen final de 1 mL, integrado por CMH con Tween 80 al 0.5 % (pH 7.4, 6.5 y 5.0), AB e inóculo bacteriano (5×10^5 UFC/mL). Se incluyeron un control positivo (sin AB) y uno negativo (sin AB ni inóculo). Los tubos se incubaron a 35°C , tomando muestras a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h para efectuar conteo bacteriano en placa tras incubación a 35°C por 24 h. El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa. A partir de los datos obtenidos se evaluó el índice de actividad antibacteriana (E), definido como la diferencia en Log_{10} entre el recuento bacteriano (UFC/mL) al inicio ($n_{t=0}$) y al final del ensayo ($n_{t=24}$): $E = (n_{t=24}) - (n_{t=0})$. Se tomaron tres puntos de corte teóricos: efecto bacteriostático ($E = 0$), efecto bactericida ($E = -3$) y efecto de erradicación virtual de bacterias ($E = -4$)²⁸. Se graficó el índice E frente a la concentración de ABs a efectos de comparar lo ocurrido en presencia y ausencia de AE.

Los valores del índice E vs. concentración de AB se modelaron matemáticamente utilizando un modelo sigmoidal similar a un modelo de respuesta máxima^{29,30} (Ecuación 2).

$$E = E_0 - \left[\frac{E_{\max} C^\gamma}{C_{50}^\gamma + C^\gamma} \right] \quad [2]$$

donde E es el índice E (Log₁₀ UFC/mL) para una concentración C (µg/mL), E₀ es el índice E en ausencia del AB (Log₁₀ UFC/mL), E_{max} es la reducción máxima en Log₁₀ de E₀, C₅₀ (µg/mL) es la concentración que provoca el 50% de la reducción de la E_{max}, y γ es el coeficiente de sigmoidicidad. Los datos experimentales se ajustaron con el modelo de regresión no lineal de mínimos cuadrados utilizando el software Sigma Plot 12.0 (2011). La C₅₀ de los ABs solos se comparó con el mismo parámetro obtenido en las combinaciones con AE mediante la prueba t de Student para datos no apareados con un nivel de significación establecido en p < 0.05. Se evaluaron los mismos parámetros para el AE solo, considerando la variación de pH.

2.3. Evaluación del sinergismo entre los AEs de *M. armillaris* y *L. nobilis*

Con el fin de evaluar una combinación natural alternativa para el AE de *M. armillaris* se utilizó AE de *L. nobilis* como adyuvante. La CIM y CBM del AE de *L. nobilis* fueron establecidas siguiendo el mismo procedimiento mencionado para el AE de *M. armillaris*. A partir de los datos de CIM y CBM de los AEs se evaluó la existencia de sinergismo entre ambos (según se describió en el punto 2.2.1). Los AEs fueron combinados en un rango de 50-0.09 µL/mL para cada uno, frente a *S. aureus* (n= 4) aislados a campo. La interpretación de los resultados se realizó a través del cálculo del CFI.

2.3.1. Evaluación antimicrobiana de la mezcla AE de *M. armillaris* y AE de *L. nobilis* sobre pezones bovinos escindidos

En base a los resultados de CIM, CBM y de sinergismo entre los aceites se evaluó una solución al 0.6% v/v (6 µL/mL) de cada uno. Se elaboraron dos formulaciones con distintas cantidades de agua destilada y alcohol etílico. Las formulaciones incluyeron, además de los AEs, agua destilada (diluyente), glicerina (emoliente), Tween 20 (surfactante para formar la emulsión) y alcohol etílico (disolvente). En la tabla 1 se presentan las formulaciones ensayadas. Como control se utilizó cada una de las 2 formulaciones sin el agregado de los AEs. Se seleccionó la formulación con la mezcla de los AEs que presentó mayor actividad antimicrobiana en menor tiempo para evaluar su eficacia mediante la técnica de recuento bacteriano utilizando pezones escindidos, obtenidos de vacas en una planta faenadora. Se limpiaron los pezones, eliminando el exceso de piel y tejidos con agua y jabón blanco; se desinfectaron con alcohol al 70% y se almacenaron en bolsas de nylon a -45 °C hasta su utilización.

Tabla 1. Formulaciones a base de AE de *M. armillaris* combinado con AE de *L. nobilis* evaluadas frente a *S. aureus*. F: Formula.

Componente	F 1 (%)	F 2 (%)	CONTROL F 1 (%)	CONTROL F 2 (%)
Agua destilada	70.8	25.8	72	27
Tween 20	1	1	1	1
Glicerina	2	2	2	2
Etanol	25	70	25	70
AE <i>M. armillaris</i>	0.6	0.6	-	-
AE <i>L. nobilis</i>	0.6	0.6	-	-

Al momento del ensayo se prepararon 150 mL de inóculo de *S. aureus* ATCC 29213 al 0.5 de McFarland, ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL). Para evaluar el poder germicida de la formulación sanitizante se utilizaron 20 pezones divididos en 4 grupos de 5 unidades cada uno: G1, control sin tratamiento; G2, solución fisiológica estéril; G3, formulación con AEs al 0.6% de cada uno (1x); y G4, formulación con AEs al 1.2% de cada uno (2x). Tras descongelar los pezones, estos fueron colgados de una varilla horizontal^{31,32}, se sumergieron durante 10 seg. en solución fisiológica conteniendo el inóculo, y luego se dejaron escurrir 5 min. Posteriormente, los del G1 se limpiaron con un papel seco, y no se sumergieron en ninguna solución. A los del G2 se los sumergió en solución fisiológica, a los del G3 en la formulación 1x, y a los del G4 en la formulación 2x. La recuperación de bacterias sobrevivientes postratamiento se llevó a cabo mediante lavado con 10 mL de solución fisiológica estéril durante 20 seg. Las soluciones de lavado se diluyeron desde 1:10 hasta 1:100000; se sembraron 10 μ L de cada dilución por triplicado sobre placa de agar nutritivo. Tras incubación a 35 °C por 18-24 h, se realizó el recuento bacteriano en placa. Se realizó un análisis bayesiano de comparación de medias con un intervalo de confianza del 95% utilizando el programa estadístico Epidat 3.1.

2.4. Síntesis de nanopartículas cargadas con aceite esencial de *M. armillaris*

Se prepararon transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) conteniendo AE de *M. armillaris* mediante sonicación. Brevemente, 400 mg de miristil miristato se fundieron en un baño de agua a 60–70 °C y se mezclaron con 500 μ L de AE y 50 μ L de oleo croda. Después de 10 min, se añadió a la fase lipídica una solución acuosa caliente (10 mL) con 3.0 % (p/v) de Pluronic® F68. Inmediatamente, la mezcla se sonicó durante 10 min (70 % de amplitud) utilizando un procesador ultrasónico equipado con una punta de titanio de 6 mm. Luego, la

dispersión se enfrió a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C. Adicionalmente se prepararon nanopartículas vacías de la misma forma, pero sin agregado de AE.

2.4.1. Actividad antimicrobiana de nanopartículas cargadas con AE de *M. armillaris*

Se evaluó la CIM de las nanopartículas vacías y cargadas con el AE de *M. armillaris* por microdilución en caldo según procedimiento descrito anteriormente. Se utilizaron 3 cepas SARM y 4 cepas SASM. El rango de concentraciones de AE analizadas (dilución seriada a la mitad) fue 12.5-0.02 µL/mL. Cada pocillo se inoculó con una concentración bacteriana final de 5×10^5 UFC/mL y se incubaron las microplacas a 35 °C durante 18-24 h. La CIM se estableció mediante el agregado de colorante vital resazurina y considerando la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano. Cada determinación se realizó por triplicado. Se determinó la CBM según se detalló en 2.2.

2.4.2. Actividad antibiofilm del AE de *M. armillaris* libre y encapsulado

Previamente, se determinó la capacidad de formar biofilm de las cepas SARM y SASM bajo estudio. Las mismas se cultivaron en caldo tripticosa soya (TSB) suplementado con glucosa al 1% (p/v) durante 24 h a 37 °C. Posteriormente los caldos de cultivo se diluyeron a una concentración equivalente al 0.5 de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) en TSB suplementado con glucosa al 1% (p/v). Se inocularon 200 µL de caldo de cultivo diluido en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones estáticas. Tras la incubación se descartó el contenido de los pocillos y se lavaron con agua destilada, se secaron 30 min en estufa a 60 °C. Luego se agregaron, en cada pocillo, 125 µL de solución de cristal violeta al 0.1% p/v para luego incubar 10 min a temperatura ambiente. Se vació la placa, se lavó dos veces con agua para remover el exceso de cristal violeta. Finalmente, para eluir el colorante incorporado por las células, se agregaron 200 µL de etanol 96° por 15 min. El contenido de cada pocillo se trasvasó a otra microplaca para determinar la absorbancia por espectrofotometría a 595 nm. Se comparó la capacidad de formación de biofilm respecto del control. El valor de corte por DO (DOc) se define como el valor de la media de los controles negativos más 3 desviaciones estándar. Las cepas se clasificaron como no productoras de biofilm ($DO \leq DOc$); débiles ($DOc < DO \leq 2x DOc$); moderadas ($2x DOc < DO < 4x DOc$) y fuertes productoras de biofilm ($4x DOc < DO$).

2.4.3. Inhibición de la formación de biofilm

Se evaluó la capacidad de inhibir la formación de biofilms, tanto del AE libre, AE encapsulado en NLC y NLC vacías. Microplacas de 96 pocillos fondo plano fueron cargadas

con caldo TSB con glucosa 1% p/v, con inóculo bacteriano (1×10^8 UFC/mL) y la dilución correspondiente de NLC vacías y cargadas con AE; se incubaron estáticamente a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y cada pocillo fue lavado con PBS para eliminar las células planctónicas. El biofilm formado se tiñó con cristal violeta 0.1% p/v, y se lo solubilizó con etanol al 96 % para registrar su absorbancia a 595 nm. Se utilizaron controles positivos sin tratar (inóculo bacteriano y el medio de cultivo TSB con glucosa 1% p/v). El porcentaje de inhibición para cada tratamiento se calculó mediante la fórmula: $(1 - A_{595}/A_{595} \text{ del control sin tratar}) \times 100$. Se estableció la CIMB₅₀ frente al biofilm que se define como la concentración más baja que resultó en un 50 % de inhibición de la formación de biofilm.

2.4.4. Erradicación del biofilm formado

El efecto antibiofilm del AE de *M. armillaris* libre y encapsulado en NLC se determinó mediante la evaluación de la concentración mínima de erradicación de biofilm (CEMB₅₀). La CEMB₅₀ es la concentración más baja que erradica el 50% del biofilm preformado. Brevemente, se llevó a cabo la formación de los biofilms como se indicó anteriormente y fueron lavados con PBS estéril. Posteriormente se agregaron las diluciones de AE libre y encapsulado (preparadas en TSB con glucosa 1% p/v) en concentraciones correspondientes a 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 veces la CIM de las nanopartículas cargadas con AE y 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM de AE libre. Como control negativo se utilizaron pocillos cargados solamente con TSB más glucosa al 1% (p/v) estéril y como control positivo biofilms preformados con TSB con glucosa 1% p/v; se agregó también un control de nanopartículas vacías. Tras incubación a 37 °C durante 24 h en condiciones estáticas, se midió el efecto inhibitor con resazurina, tinción con cristal violeta y recuentos de UFC. Cada experimento se realizó por cuadruplicado.

2.4.5. Evaluación de la citotoxicidad del AE de *M. armillaris* encapsulado y libre frente a PMNs

Se aislaron PMNs a partir de sangre obtenida de bovinos sanos y que no recibieron tratamiento AB alguno durante los últimos 3 meses previos al ensayo. El protocolo fue aprobado por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP (47.3.15J). Los PMNs aislados se resuspendieron en medio RPMI 1640, hasta alcanzar una concentración de 5×10^6 células/mL. Para ello, en un tubo cónico de vidrio estéril, se colocaron 3 mL de histopaque 1077, luego se agregaron 3 mL de sangre bovina completa, heparinizada, cuidando de no mezclar la sangre con el reactivo. Se centrifugaron a 400 g durante 30 min, así las células de la serie granulocítica se ubican entre el histopaque 1077 y los glóbulos rojos (ubicados en el fondo del tubo), mientras que los linfocitos, otras células mononucleares y las plaquetas se ubican en la zona entre el plasma y el histopaque 1077.

Se extrajeron suavemente con una pipeta Pasteur estéril las capas superiores y luego se trasvasó a otro tubo cónico de vidrio para resuspenderlo en 5 volúmenes de PBS pH 7.4 estéril. Se centrifugó durante 15 min a 400 g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 mL de cloruro de amonio (0.85%), agitando lentamente por 10 min para lisar los eritrocitos. Posteriormente, fue centrifugado a 400 g por 15 min, se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 6 mL de PBS, para volver a centrifugar a 400 g por 10 min, y descartar el sobrenadante, finalmente se resuspendió en 4 mL de medio RPMI 1640.

Una vez aisladas las células, se efectuó el conteo celular y se evaluó la viabilidad de los PMNs utilizando una cámara de Neubauer. Las células aisladas fueron cultivadas en estufa a 37 °C en microaerofilia, corroborando la viabilidad cada 2 h durante 6 h. Para ello se colocaron 2 mL de suspensión celular (en RPMI 1640) en placas de 6 pocillos a una concentración de 5×10^5 PMNs/mL.

Posteriormente se expusieron las células al AE libre y encapsulado en diferentes concentraciones (las nanopartículas vacías fueron usadas como control). Para lograr la disolución del AE se adicionó 2.5 % v/v de DMSO al medio de cultivo. En el caso de las nanopartículas no fue necesario el agregado de DMSO para la solubilización. Las concentraciones de AE evaluadas estuvieron en el rango de 10-0.05 μ L/mL. Se evaluó la viabilidad de las células a las 0, 2, 4 y 6 h mediante la técnica de exclusión vital, descrita anteriormente. Para ello, a cada tiempo de muestreo una alícuota de 10 μ L fue colocada en la cámara de Neubauer junto con el azul tripán. Además de evaluar el AE libre y encapsulado, se agregó un control positivo conteniendo PMNs disueltos en RPMI 1640 para comparar lo que sucedía en presencia de nanopartículas cargadas y vacías; y un control con adición de DMSO 2.5 %v/v para el caso de AE solo. Se graficó el porcentaje de supervivencia de PMNs respecto de los controles positivos correspondientes.

3. Resultados

3.1. Caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana del AE

Se obtuvieron 550 mL de AE (rendimiento: 1.55% v/p - volumen/100 g de material fresco). En el anexo se muestran la composición (Tabla 1A) y los parámetros fisicoquímicos analizados (Tabla 2A) del AE.

La CIM del AE de *M. armillaris* a pH 7.4 para todas las cepas evaluadas estuvo entre 6.25 y 12.5 μ L/mL, observándose una ligera disminución al acidificar el medio. La CBM fue cercana a la CIM, con una relación CBM/CIM entre 1 y 4 indicando un efecto bactericida.

Al evaluar el índice E de actividad AB para el AE en función del pH del medio encontramos que a menor pH hay una ligera disminución de la concentración necesaria para lograr una misma reducción del inoculo inicial (Figura 1). Los parámetros farmacodinámicos obtenidos de la modelización matemática se presentan en la Tabla 2. Se observa, como punto destacado, la reducción de la concentración necesaria para disminuir en un 50% el recuento bacteriano (C_{50}) a medida que el pH baja ($p < 0.01$).

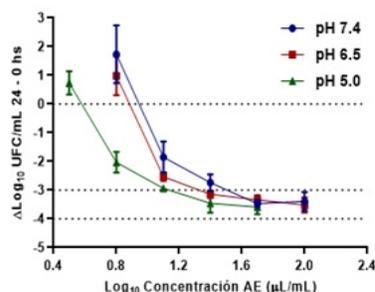


Figura 1. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E: $\Delta\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL } 24 - 0 \text{ h}$) del AE de *M. armillaris* a pH 7.4, 6.5, y 5.0 frente a *S. aureus*.

Tabla 2. Parámetros farmacodinámicos estimados por aplicación del modelo sigmoideal para evaluar el índice de actividad antibacteriana del AE frente a *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0.

Parámetro	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0
R	0.999	1.000	0.999
E_{max} ($\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$)	9.805	8.634	9.030
Y	2.130	2.130	0.995
C_{50} ($\mu\text{L/mL}$)	6.533 ^a	4.448 ^b	1.584 ^c
E_0 ($\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$)	5.526	5.131	5.045

Modelo sigmoideal. E_0 : Índice E en ausencia de AE, E_{max} : máxima reducción del recuento bacteriano, C_{50} : concentración de AE necesaria para alcanzar el 50% del efecto AB máximo, Y: coeficiente de sigmoidealidad. Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas ($p < 0.01$).

3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de cloxacilina, eritromicina y rifaximina con y sin AE de *M. armillaris*

Al evaluar la actividad de la CLOX encontramos que la CIM se ubicó entre 0.5 y 0.125 $\mu\text{g/mL}$, con una relación CBM/CIM < 4 (actividad bactericida), y disminución de estas concentraciones al bajar el pH del medio. Se observó un claro efecto sinérgico para la combinación AE/CLOX. Cuando enfrentamos la combinación AE/CLOX contra las cepas de *S. aureus*, hubo una gran disminución en la concentración de AB necesaria para inhibir el crecimiento incluso al acidificar el medio (Tabla 3). La actividad combinada AE/CLOX, también se evidenció en el efecto bactericida, establecido por el índice E. La disminución del inóculo inicial ($\text{Log}_{10}\text{ UFC/mL}$) en un factor de 3 en 24 h marcó la actividad bactericida observada tanto para la CLOX sola como para la mezcla, siendo necesaria menor concentración de CLOX para alcanzar un efecto cercano a la erradicación virtual ($E = -4$) en

presencia del AE. A su vez, con la modelización matemática del índice E vs. la concentración de AB (Figura 2, A, B y C), observamos que la C_{50} de CLOX también disminuyó, en forma muy significativa, respecto de la aplicación del AB solo ($p < 0.001$), y existió un efecto de adición con la acidificación (Tabla 4).

Tabla 3. Concentraciones Inhibitorias mínimas de CLOX, AE de *M. armillaris*, combinación de ambos y CFI correspondiente.

	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	CIM	CIM	CIM	CFI	CIM	CIM	CIM	CFI	CIM	CIM	CIM	CFI
	AE	CLOX	AE/CLOX		AE	CLOX	AE/CLOX		AE	CLOX	AE/CLOX	
<i>S. aureus</i>	$\mu\text{L}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$			$\mu\text{L}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$			$\mu\text{L}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$		
ATCC 29213	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.062	6.25/0.016	0.75	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
SA 13	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.016	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
SA 96	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.016	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
SA 139	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	0.125	12.5/0.016	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61

La RIF presentó elevada actividad antimicrobiana frente a las cepas analizadas. La CIM fue 0.032 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sin variar al modificar el pH con una CBM de 2 a 4 veces mayor. Combinando RIF con AE de *M. armillaris* se encontró un efecto sinérgico particularmente a pH 6.5 y 5.0, en todas las cepas ensayadas (Tabla 5). A pH 7.4 se obtuvieron combinaciones que presentaron sinergismo parcial, con CFI = 0.56. En este caso se logró disminuir 16 veces la CIM de RIF con una disminución a la mitad de la CIM de AE con respecto a cada compuesto aplicado solo. A pH 6.5, la disminución de la CIM del AB fue menor (4 veces para las cepas salvajes y ocho veces para la cepa de referencia). Sin embargo, la caída en la cantidad de AE necesaria para potenciar la actividad antimicrobiana del AB fue aquí más evidente ya que, para todas las cepas, la disminución fue 4 veces la CIM del AE. Finalmente, a pH 5.0, la CIM de RIF disminuyó 8 veces para todas las cepas. En este último caso, la disminución de la CIM del AE es mucho más evidente ya que vuelve a disminuir por un factor de 4. Por lo tanto, como resultado de la reducción significativa de las concentraciones inhibitorias a pH 5.0, tanto del AE como del AB, los valores de CFI obtenidos fueron de 0.38, lo que muestra una importante sinergia entre ellos. Así, RIF tiene un efecto potenciado por la combinación con el AE y la acidificación del medio de cultivo (Tabla 6).

Al analizar la disminución del inoculo bacteriano con el índice E es posible observar gráficamente cómo *S. aureus* se inhibe en mayor magnitud con menores concentraciones de RIF cuando está presente el AE (Figura 2, D, E y F). A pH 7.4 y 6.5, la RIF no fue capaz de producir por sí sola ningún efecto bactericida a las concentraciones analizadas, a diferencia de lo ocurrido a pH 5.0, mientras que su combinación con el AE de *M. armillaris* permitió lograr a concentraciones inferiores, efectos bactericidas cercanos a la erradicación virtual. Al aplicar el modelo sigmoideal a los datos del índice E vs. concentración de AB se observó

que la presencia de AE permite disminuir la C_{50} de la RIF, en forma extremadamente significativa, alrededor de 10 veces, aún al variar el pH ($p < 0.0001$) (Tabla 6).

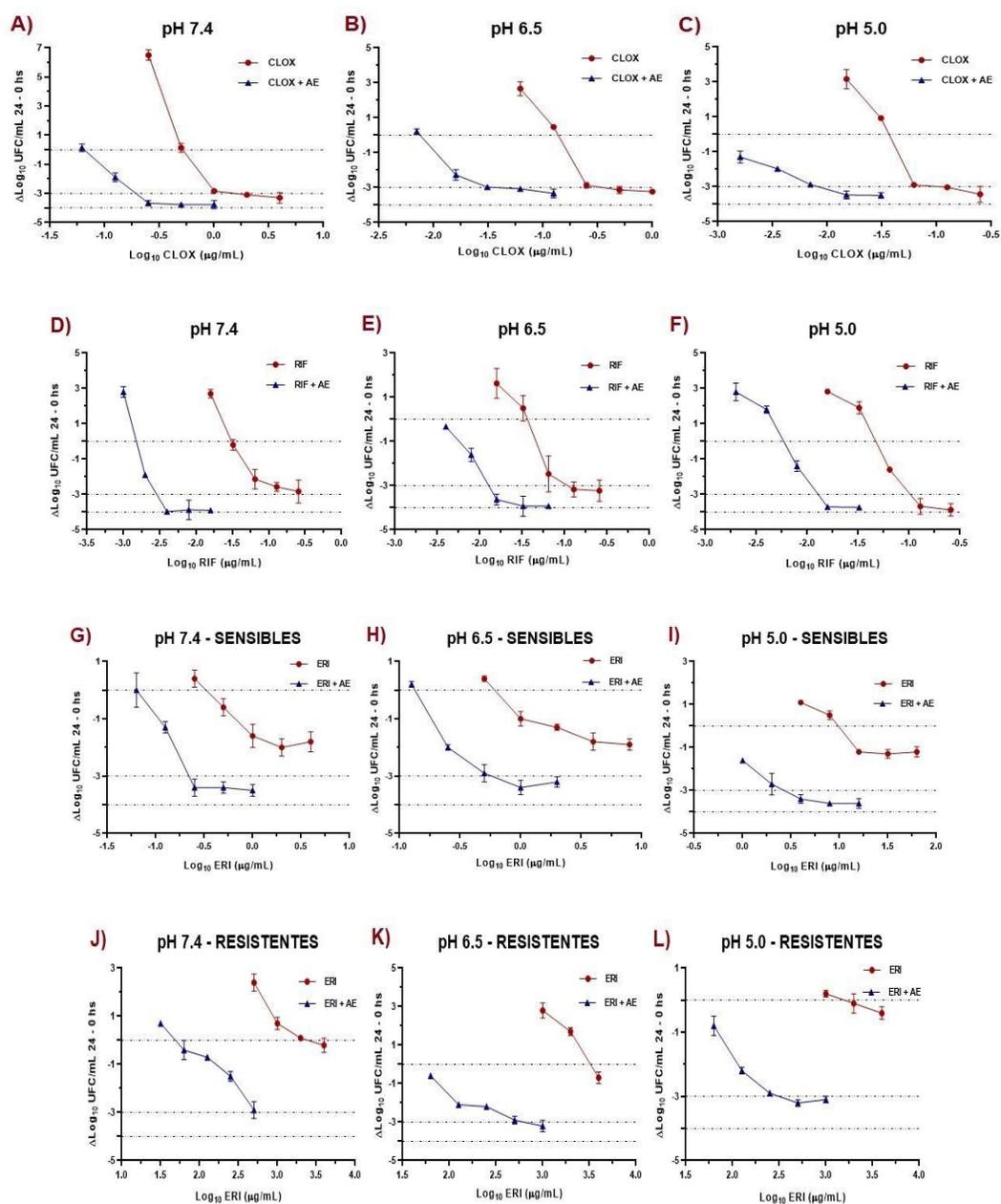


Figura 2. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E: $\Delta \text{Log UFC/ml } 24-0 \text{ h}$) de CLOX (A, B, C), RIF (D, E, F) y ERI (G, H, I: sensibles a ERI; J, K, L: resistentes a ERI) solas y combinadas con AE frente a *S. aureus* a pH 7.4, 6.5 y 5.0.

Tabla 4. Parámetros farmacodinámicos estimados por aplicación del modelo sigmoïdal para evaluar el índice de actividad antibacteriana para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a CLOX en presencia de AE.

Parámetro	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0
R	0.999	0.999	0.999
E _{max} (Log ₁₀ UFC/mL)	9.326	8.337	9.027
Y	1.746	2.374	0.752
C ₅₀ (µg/mL) cloxacilina	0.055 ^a	0.007 ^b	0.001 ^c
E ₀ (Log ₁₀ UFC/mL)	5.350	5.095	4.861

Modelo sigmoïdal. E₀: Índice E sin ABs, E_{max}: máxima reducción del recuento bacteriano, C₅₀: concentración de CLOX (en presencia de AE) necesaria para alcanzar el 50% del efecto AB máximo, Y: coeficiente de sigmoïdidad. Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de CIM. Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas (p <0.05).

Tabla 5. Concentraciones Inhibitorias mínimas de RIF, AE de *M. armillaris*, combinación de ambos y CFI correspondiente.

	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	CIM AE	CIM RIF	CIM AE/RIF	CFI	CIM AE	CIM RIF	CIM AE/RIF	CFI	CIM AE	CIM RIF	CIM AE/RIF	CFI
<i>S. aureus</i>	µL/mL	µg/mL			µL/mL	µg/mL			µL/mL	µg/mL		
ATCC 29213	12.5	0.032	6.25/0.002	0.56	12.5	0.032	6.25/0.004	0.62	6.25	0.032	3.1/0.004	0.38
SA 13	12.5	0.032	6.25/0.002	0.56	12.5	0.032	3.1/0.008	0.50	6.25	0.032	1.6/0.004	0.38
SA 96	12.5	0.032	6.25/0.002	0.56	12.5	0.032	3.1/0.008	0.50	6.25	0.032	1.6/0.004	0.38
SA 139	12.5	0.032	6.25/0.002	0.56	12.5	0.032	3.1/0.008	0.50	6.25	0.032	1.6/0.004	0.38

Tabla 6. Parámetros farmacodinámicos estimados mediante modelo sigmoïdal para evaluar el índice E para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a RIF en presencia de AE.

Parámetro	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0
R	0.999	0.996	0.995
E _{max} (Log ₁₀ UFC/mL)	9.953	9.450	8.487
Y	3.174	1.294	2.027
C ₅₀ (µg/mL) rifaximina	0.001 ^a	0.003 ^b	0.006 ^c
E ₀ (Log ₁₀ UFC/mL)	5.905	5.092	4.237

Modelo sigmoïdal. E₀: Índice E en ausencia de ABs, E_{max}: máxima reducción del recuento bacteriano, C₅₀: concentración de RIF (en presencia de AE) necesaria para alcanzar el 50% del efecto AB máximo, Y: coeficiente de sigmoïdidad. Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de CIM. Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas (p <0.0001).

En el caso de ERI los resultados de CIM se encuentran en la Tabla 7. La CIM se incrementó al bajar el pH. La relación CBM/CIM para cepas sensibles a pH 7.4 fue de aproximadamente 64, 256 a pH 6.5 y a pH 5.0 fue >a 32. Para las cepas resistentes a ERI, la CBM se estableció en >1024 µg/mL. A pH 7.4 los 3 aislados resistentes presentaron valores de CFI de 0.56, en los que la cantidad de AB necesaria para la inhibición disminuyó 16 veces (1024 vs 64 µg/mL) en presencia de 6.25 µL/mL de AE. A pH 6.5, el coeficiente CFI fue inferior a 0.65 y la CIM del AB disminuyó al menos 8 veces (>1024 a 128 µg/mL) pero en presencia de 3.1 µL/mL de esencia, es decir, el AE disminuyó su CIM a la mitad. Finalmente, a pH 5.0 la

situación fue muy similar a la observada a pH 6.5, ya que la CIM de ERI se redujo de >1024 a 128 µg/mL, con la diferencia de que la concentración de extracto vegetal fue aún menor (1.5 µL/mL).

Tabla 7. Concentraciones Inhibitorias mínimas de ERI, AE de *M. armillaris*, combinación de ambos y CFI correspondiente.

<i>S. aureus</i>	pH 7.4				pH 6.5				pH 5.0			
	CIM AE µL/mL	CIM ERI µg/mL	CIM AE/ERI	CFI	CIM AE µL/mL	CIM ERI µg/mL	CIM AE/ERI	CFI	CIM AE µL/mL	CIM ERI µg/mL	CIM AE/ERI	CFI
ATCC 29213	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
SA 13	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
SA 96	12.5	0.5	6.25/0.125	0.75	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
SA 139	12.5	0.5	6.25/125	0.75	12.5	1	3.1/0.25	0.5	6.25	8	3.1/2	0.75
SA 78A	12.5	1024	6.25/64	0.56	6.25	>1024	3.1/128	<0.62	3.1	>1024	1.5/128	<0.62
SA 79A	12.5	1024	6.25/64	0.56	6.25	>1024	3.1/128	<0.62	3.1	>1024	1.5/128	<0.62
SA 86B	12.5	1024	6.25/64	0.56	6.25	>1024	3.1/128	<0.62	3.1	>1024	1.5/128	<0.62

Se modelaron matemáticamente las curvas del efecto antibacteriano E vs. concentración ERI a los 3 pH evaluados (Figura 2, G a L), obteniendo diferentes parámetros farmacodinámicos (Tabla 8). Para todas las cepas, la C₅₀ de ERI aumenta con la acidez, en forma muy significativa a pH 5.0 (p<0.001). A su vez, la presencia de AE permite que la C₅₀ de ERI sea significativamente menor que cuando se usa sola a los 3 pH evaluados (p<0.0001), ya que a pH 7.4 disminuye de 543.167 a 189.503 µg/mL con 12.5 µL/mL de AE. Para aislamientos resistentes con 4 CIM a pH 6.5 y 2 CIM a pH 5.0 se logran efectos bactericidas. A pH 7.4 se requiere una mayor cantidad de ambos para lograr este efecto. Una explicación podría ser que las cepas resistentes a ERI parecen ser más sensibles a pH inferiores a 7.4, donde E_{max} es menor para el control sin ABs de cepas resistentes en comparación con las cepas sensibles.

Tabla 8. Parámetros farmacodinámicos estimados por aplicación del modelo sigmoidal del índice E antibacteriano para *S. aureus* a pH 7.4; 6.5 y 5.0 frente a ERI en presencia de AE.

Parámetro	Salvajes (13-96-139)			Salvajes (78A-79A-86B)		
	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0	pH 7.4	pH 6.5	pH 5.0
R	0.996	0.999	0.999	0.997	0.998	1.000
E _{max} (Log ₁₀ UFC/mL)	10.797	7.943	8.078	13.846	8.260	5.118
Y	1.273	1.996	1.614	0.399	1.186	1.872
C ₅₀ (µg/mL) eritromicina	0.041 ^a	0.112 ^a	0.534 ^b	189.503 ^c	33.592 ^d	61.150 ^e
E ₀ (Log ₁₀ UFC/mL)	6.868	4.598	4.344	5.337	4.969	1.892

Modelo sigmoidal. E₀: Índice E en ausencia de ABs, E_{max}: máxima reducción del recuento bacteriano, C₅₀: concentración de ERI (en presencia de AE) necesaria para alcanzar el 50% del efecto AB máximo, Y: coeficiente de sigmoidicidad. Las cepas salvajes fueron agrupadas por similitud de CIM. Diferentes letras minúsculas entre los pHs significan diferencias estadísticas (p<0.05). Los valores sin diferencias significativas tienen la letra similar (a, b, c, d, e).

3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los AEs de *L. nobilis* y *M. armillaris* combinados

Los resultados de CIM, CBM y sinergismo para los AEs de *M. armillaris* y *L. nobilis* frente a *S. aureus* se presentan en la Tabla 9. En función de los resultados obtenidos en las pruebas de sinergismo se seleccionó la mezcla de 6 µL/mL (0.6%) de cada AE para evaluar formulaciones tópicas sobre pezones bovinos. Se elaboraron dos formulaciones (F) variando el contenido de agua destilada y alcohol etílico. La F1 contenía 25% de etanol y 70.8% de agua destilada, mientras que la F2 tenía 25.8% de agua destilada y 70% de alcohol. Ambas tenían 2% de glicerina y 1% de Tween 20. Ambas formulaciones fueron enfrentadas a un inóculo de 10⁷ UFC/mL de *S. aureus* ATCC 29213. Tras 30 y 120 segundos de contacto no hubo desarrollo bacteriano con ninguna de las dos formulaciones. Pero el control sin AEs de la F2 (CF2) también inhibió el desarrollo de *S. aureus*.

Tabla 9. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) a pH 7.4 para las 4 cepas de *S. aureus* evaluadas frente a los AE de *M. armillaris* (MA AE) y *L. nobilis* (LN AE), y combinaciones de ambos con sus respectivas Concentraciones Fraccionarias Inhibitorias (CFI) y Concentraciones Bactericidas Fraccionarias (CFB).

Cepa	CIM				CBM			
	LN AE µL/mL	MA AE µL/mL	LN AE / MA AE	CFI	LN AE µL/mL	MA AE µL/mL	LN AE / MA AE	CFB
ATCC 29213	25.0	25.0	3.0/3.0	0.24	50.0	50.0	6.0/3.0	0.18
SA 13	12.5	12.5	3.0/1.5	0.36	25.0	25.0	6.0/1.5	0.30
SA 96	12.5	12.5	3.0/1.5	0.36	25.0	25.0	3.0/3.0	0.24
SA 139	12.5	12.5	1.5/3.0	0.36	25.0	25.0	3.0/3.0	0.24

La formulación seleccionada para continuar trabajando fue la F1, ya que presentó actividad bactericida por acción de los AEs y por su bajo contenido de alcohol etílico (25%). De este modo, la formulación a evaluar mediante la técnica de pezones escindidos fue: agua destilada (70.8%), Tween 20 (1%), glicerina (2%), etanol (25%), AE de *M. armillaris* (0.6%) y AE de *L. nobilis* (0.6%). Esta se aplicó tópicamente sobre pezones bovinos previamente desafiados con *S. aureus* ATCC 29213, cuyos recuentos bacterianos por tratamiento se grafican en la Figura 3.

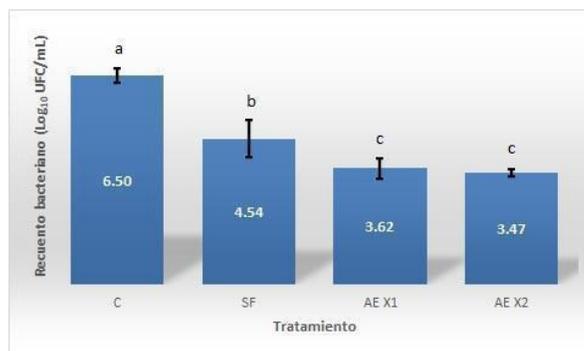


Figura 3. Recuento bacteriano obtenido luego de tratar los pezones bovinos con Solución Fisiológica (SF), formulación de AEs desarrollada (AE X1), y la formulación con el doble de la proporción de AEs (AE X2). AE X1 y AE X2 no presentaron diferencias significativas ($p= 0.066$), pero sí las tuvieron con el control y SF ($p<0.05$).

Para los pezones control (sin tratamiento) el Log₁₀ UFC/mL fue de 6.50 y con el uso de solución fisiológica este valor disminuyó a 4.54 UFC/mL, presentando diferencias significativas con el control sin tratamiento alguno ($p<0.05$). Al utilizar las formulaciones con AEs en concentraciones 1x y 2x el recuento de UFC/mL disminuyó a 3.62 y 3.47 respectivamente, siendo significativamente diferentes con el control y con el tratamiento de solución fisiológica ($p<0.05$). En cambio, entre las formulaciones con AEs 1x y 2x no existieron diferencias significativas en el recuento bacteriano ($p=0.066$).

3.4. Evaluación de citotoxicidad del AE libre y nanoencapsulado

El AE libre resultó ser citotóxico para los PMNs de manera inmediata a todas las concentraciones evaluadas. Solo una concentración de 0.05 μ L/mL de AE permitió mantener PMNs viables después de 6 h, pero con una disminución del 90% con respecto al recuento celular inicial (Figura 4), mientras que la encapsulación disminuyó considerablemente la citotoxicidad del AE.

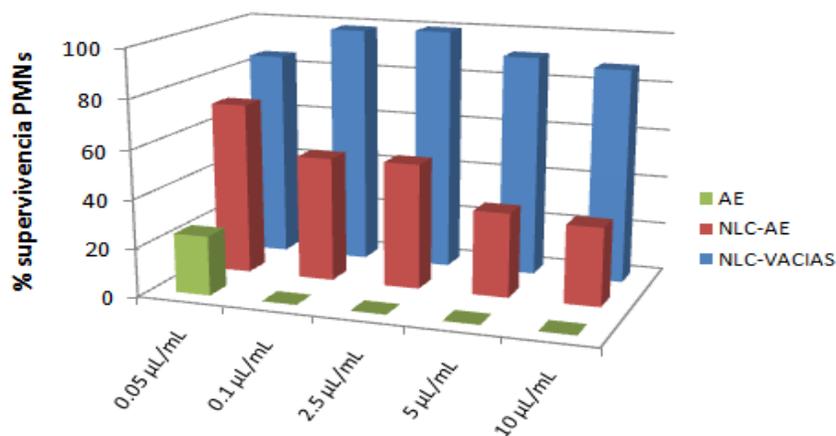


Figura 4. Porcentaje de supervivencia de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) expuestos al AE de *M. armillaris* (AE), NLC conteniendo AE (NLC AE) y NLC vacíos.

3.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana del AE nanoencapsulado

El AE libre y nanoencapsulado demostró una CIM de 6.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ frente a todas las cepas evaluadas; sin embargo, a concentraciones inferiores (0.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$) presentó efectos inhibitorios sobre la capacidad de estas cepas de formación de biofilms en aproximadamente un 90% con respecto al control no expuesto. Todas las cepas tenían un CIM₅₀ de 0.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para el AE nanoencapsulado y libre (Figura 5 A y B, respectivamente). Las nanopartículas vacías utilizadas como control tuvieron un efecto inhibitorio en la formación de biofilms, pero no en la inhibición del crecimiento bacteriano ni en la erradicación de biofilms. Por otro lado, el AE libre y encapsulado demostró eficacia para la erradicación de biofilms maduros (Tabla 10). En cambio, las NLC vacías fueron inactivas para erradicar biofilms.

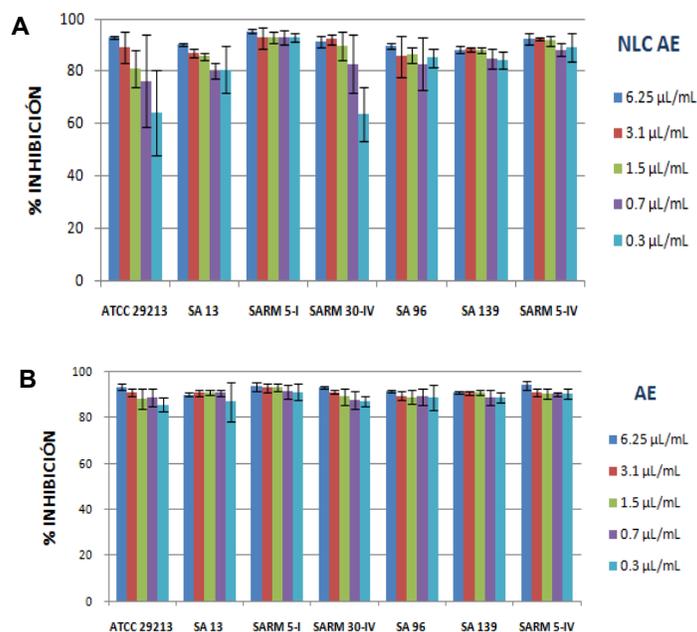


Figura 5. Porcentaje de inhibición de la formación de biofilm por acción de diferentes concentraciones de AE encapsulado en NLC (A) y de AE libre (B) respecto al control sin tratar.

Tabla 10. Actividad antimicrobiana de *M. armillaris* AE libre y encapsulado. CIM, CIM₅₀ y CEMB₅₀, se expresan en $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Tratamiento	CIM ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	CIM ₅₀ ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	CEMB ₅₀ ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
NLC AE	6.2	0.3	12.5
AE	12.5-6.2	0.3	6.2

4. Discusión

4.1. Características y actividad antimicrobiana del AE de *M. armillaris*

M. armillaris es una planta de estructura similar a la especie de *M. alternifolia*, de la cual es posible lograr plantaciones comerciales de 33000 plantas por hectárea^{33,34}. El rendimiento en AE obtenido de 1.55% permite pensar en una buena rentabilidad para la producción de formulados fitoterapéuticos. El 1,8 cineol fue el componente principal (72.3%) hallado, similar a lo obtenido por otros autores^{12, 35, 36}, siendo, en general, también el principal compuesto en el AE de las especies de *Eucalyptus*³⁷. Falci et al. (2015) estudiaron la composición y actividad antimicrobiana del AE de una especie de *Melaleuca* (no especificada) cultivada en Brasil, que contenía 70.8% de 1,8 cineol, 8.95% de terpineol y 8.25% de limoneno³⁸. Aunque no se especifica la especie de *Melaleuca*, se puede hacer un paralelismo con la composición del mencionado AE. Estos autores demostraron una importante actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* con valores de CIM entre 1 y 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y CBM entre 2 y 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Li et al. (2014) encontraron que la CIM del 1,8 cineol frente a *S. aureus* ATCC 25923 fue de 6.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ³⁹.

El alto contenido de 1,8 cineol puede ser uno de los factores que contribuyen a la actividad antibacteriana del AE. Se le ha atribuido como mecanismo de acción AB la permeabilización de las membranas en microorganismos como *S. aureus* debido a su gran hidrofobicidad^{40, 41}. Yáñez Rueda y Cuadro Mogollón (2012) encontraron una importante actividad de esta especie frente a *S. aureus* ATCC 29213 (CIM de 12.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en la que su composición era similar al AE de *M. armillaris* evaluado en este trabajo: 1,8 cineol (82.27%), limoneno (3.70%), α -pineno (3.16 %), terpineno-4-ol (1.4%), α -terpineol (1.2%), β -mirceno (1.12%) y α -terpineno (1.1%), entre otros⁴². Esto podría indicar un sinergismo entre estos componentes particularmente efectivo contra *S. aureus*. Analizando la CIM y CBM del AE encontramos que la relación CBM/CIM estuvo entre 1 y 4 (característico de los bactericidas⁴³) manteniéndose la relación al acidificar el medio de cultivo. El mecanismo de acción del AE de *M. armillaris* contra *S. aureus* aún no se ha investigado. Hayouni et al. (2008) estudiaron la actividad AM de esta especie contra *Lactobacillus*³⁵. Como el 1,8 cineol fue el principal componente encontrado (68.92%), los autores hipotetizaron que este compuesto podría desestabilizar la membrana citoplasmática de estas bacterias, como lo demostraron Li et al. (2014)³⁹. Hayouni et al. (2008) también involucraron a los componentes minoritarios encontrados (α -pineno, terpineno-4-ol, y α -terpineno, entre otros) como responsables de la acción antimicrobiana³⁵. Según estos autores, estas moléculas interactúan con la membrana celular, disolviéndose en la bicapa de fosfolípidos y desestabilizándola, aumentando la fluidez y por lo tanto, la permeabilidad pasiva.

La CIM y CBM son los parámetros farmacodinámicos más utilizados para cuantificar la actividad antibacteriana de un fármaco frente a un patógeno. Sin embargo, la evaluación temporal de diferentes concentraciones de un antimicrobiano frente a un microorganismo permite una mejor descripción de la magnitud de su efecto antibacteriano⁴⁴. Evaluando el efecto antibacteriano (índice E) del AE se observa que mejora su actividad AM a menor pH. La modelización mediante la aplicación de un modelo sigmoideal nos permitió obtener diferentes parámetros valiosos, como la concentración necesaria para alcanzar el 50% del efecto máximo (C_{50}). Este parámetro fue menor a menor pH frente a todas las cepas evaluadas, al igual que el E_{max} . Sin embargo, debemos considerar que el E_0 también es menor; debido a que *S. aureus* es levemente sensible a pH ácido. El menor efecto antibacteriano máximo a menor pH puede estar influenciado por una menor capacidad de crecimiento bacteriano, coincidiendo con lo demostrado por Weinrick et al. (2004)⁴⁵. A altas concentraciones, el efecto antibacteriano fue similar (y cercano a la virtual erradicación) para los tres pH, mientras que, a pH ácido, E_0 fue menor, lo que afectó el valor de E_{max} .

El AE de *M. armillaris* también fue activo frente a los biofilms producidos por *S. aureus*, favoreciendo tanto a la erradicación de biofilms preformados como la inhibición de la formación de biofilms. La actividad antibiofilm de AEs está ampliamente reportada, pero no donde se utilice AE de *M. armillaris*. Es de esperar que la antibiótico resistencia del *S. aureus* aumente como resultado de la formación de biofilms con respecto a cultivos en suspensión⁴⁶. En nuestro trabajo la CBM fue de 6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, similar a la CEMB_{50} .

4.2. Sinergismo entre el AE de *M. armillaris* y antibióticos

4.2.1. AE de *M. armillaris* y cloxacilina

Aún no existen trabajos publicados en los que se haya estudiado la interacción farmacológica entre el AE de *M. armillaris* y CLOX, aparte de los publicados por nuestro grupo¹⁴. En la bibliografía se encuentra mucha información acerca de la actividad antimicrobiana de otra especie de *Melaleuca*, *M. alternifolia*. El AE de esta planta ha sido investigado en busca de combinaciones sinérgicas, utilizando la técnica de tablero de damas frente a *S. aureus*. Sin embargo, los resultados obtenidos al combinar su AE con diferentes ABs como vancomicina⁴⁷, tobramicina⁴⁸ y ciprofloxacina⁴⁹ arrojaron un efecto de indiferencia o antagonismo. Chaves et al. (2018) observaron la presencia de un efecto sinérgico entre el AE de *Eucalyptus camaldulensis* y betalactámicos como cefalexina, amoxicilina y ampicilina frente a cepas SARM⁵⁰. Este AE presentó en su composición una concentración de 1,8 cineol, α -pineno y α -terpineol (76.93%, 7.15% y 2.39%, respectivamente) similar a nuestro AE de *M. armillaris* evaluado.

Se observó una disminución en el inoculo bacteriano inicial $-\text{Log}_{10}$ (UFC/mL)- en un factor de 3 en 24 horas tanto para el AB solo como en la mezcla. Sin embargo, la concentración del AB en presencia del AE fue claramente menor. En un estudio realizado por Nascimento et al. (2007) el AE de *Eremanthus erythropappus* se evaluó en combinación con ampicilina frente a *S. aureus*, logrando un efecto bactericida sinérgico después de 24 h⁵¹. Con la modelización del efecto antibacteriano se puede observar como la concentración necesaria para lograr el 50% (C_{50}) del efecto de caída del recuento bacteriano máximo (E_{max}) para CLOX disminuye en forma extremadamente significativa al acidificar el medio desde pH 7.4 a 6.5 y 5.0 ($p < 0.0001$). La disminución de la C_{50} de CLOX es mayor al adicionar al medio AE de *M. armillaris*, lo que nuevamente es potenciado en forma significativa a pH ácido ($p < 0.0001$).

En conclusión, fue posible reducir, *in vitro*, la concentración de CLOX necesaria para inhibir a las cepas de SASM y SARM mediante su combinación con AE. Considerando que CLOX es un AB del grupo de los betalactámicos con buena actividad frente a *S. aureus* y con amplio uso en medicina veterinaria, el AE aumenta el efecto antibacteriano de la misma incluso al pH intracelular ácido. Esto es un hallazgo muy importante para el tratamiento de infecciones intracelulares, en las que *S. aureus* se internaliza en los fagolisosomas, puesto que aumentaría la probabilidad de alcanzar el éxito terapéutico. El aumento de la susceptibilidad a los betalactámicos debido al pH ácido que prevalece en las vacuolas donde vive y prospera *S. aureus*, podría verse facilitado por la acción del AE de *M. armillaris*. El pH ácido provoca un cambio conformacional de la proteína diana de acción (PBP2a), aumentando la afinidad de su centro catalítico por el betalactámico^{44, 52}. Estos hallazgos se convierten en una valiosa alternativa para el tratamiento de infecciones estafilocócicas persistentes. El AE de *M. armillaris* es una buena opción a considerar en el diseño de futuras formulaciones para evaluar los efectos *in vivo*, a fin de maximizar la eficacia de los ABs actuales y futuros.

4.2.2. AE de *M. armillaris* y rifaximina

En la bibliografía no se encuentran datos sobre combinaciones de ansamicinas con AEs frente a *S. aureus*, existen algunos reportes de extractos naturales con este tipo de fármacos, por ejemplo, Liu et al. (2018) encontraron una fuerte actividad sinérgica entre rifampicina y miel manuka frente a cepas de *S. aureus* productoras de biofilm⁵³. Similar a lo hallado con las combinaciones CLOX/AE, para las mezclas RIF/AE se observó un efecto potenciado por la suma de dos factores: combinación de los ABs con el AE y acidificación del medio (emulando condiciones intracelulares donde se aloja *S. aureus*).

Con el análisis de los resultados de actividad antibacteriana en función de la concentración de RIF mediante el modelado matemático se puede observar que C_{50} es inferior en forma extremadamente significativamente para la combinación AE/RIF respecto de lo que sucede con el AB solo frente a *S. aureus* a los 3 pHs evaluados ($p < 0.0001$). La C_{50} de RIF fue 20 veces menor en presencia de AE a pH 7.4, pero a pH 5.0 la reducción es menor. Si bien la disminución de C_{50} es de menor magnitud al acidificar el medio, menor es la cantidad de AE utilizada (4 veces menos). La RIF demostró ser un AB potente frente a *S. aureus*, bajo nuestras condiciones experimentales. Estos resultados son hallazgos valiosos para el tratamiento de infecciones estafilocócicas de difícil resolución, considerando que por el avance de la RAM las opciones de tratamiento son cada vez más limitadas.

4.2.3. AE de *M. armillaris* y eritromicina

La combinación de AE de *M. armillaris* y ERI resultó interesante, especialmente en el caso de cepas de *S. aureus* resistentes a macrólidos. Estas cepas tuvieron valores muy altos de CIM (1024 $\mu\text{g/mL}$), perdiendo actividad antimicrobiana en condiciones ácidas. Pequeñas cantidades de AE de *M. armillaris* lograron disminuir significativamente la concentración requerida para inhibir a *S. aureus* con alta resistencia a ERI. Se ha encontrado sinergismo frente a *S. aureus* al combinar este AB con AE de *Lippia alba*⁵⁴ y el extracto de *Indigofera suffruticosa*⁵⁵. Magos et al. (2015) encontraron que la ERI es sinérgica con el carvacrol (terpeno que se encuentra en algunos aceites esenciales) contra los estreptococos⁵⁶.

Existen varios mecanismos de resistencia desarrollados por *S. aureus* que afectan la actividad de los macrólidos⁵⁷. En primer lugar, por la modificación del sitio diana por metilación o mutación, impidiendo la unión del AB a su diana ribosómica. Un segundo mecanismo implica la salida del AB y un tercero la inactivación del fármaco. La modificación de la diana ribosómica confiere resistencia de amplio espectro a los macrólidos, mientras que el eflujo y la inactivación afectan solo a algunas de estas moléculas⁵⁸.

Es difícil establecer el mecanismo por el cual el AE de *M. armillaris* y la ERI ejercen un efecto sinérgico. El 1,8 cineol puede desintegrar la membrana celular y reducir el citoplasma, provocando daños en la estructura de *S. aureus*³⁹. Una posible explicación de la sinergia entre el AE y la ERI sería que la desestabilización en la membrana, pared celular y una eventual disminución de la actividad de las bombas de eflujo aumentaría la llegada de AB al interior de la célula bacteriana, concentrándose aún más facilitando la interacción con el sitio de acción a nivel ribosomal. Piatkoswka et al. (2012), quienes estudiaron cepas de *S. aureus* resistentes a ERI, señalaron que la resistencia era consecuencia de una fuerte disminución de la permeabilidad de la pared celular a este AB⁵⁷. Según estos autores, esta

variante de los mecanismos de resistencia resulta ser la más eficiente, creando cepas más resistentes, con un valor de CIM superior a 1024 µg/mL. Las cepas altamente resistentes tendían a formar agregados más grandes y estables, indicando una diferencia en la composición de la pared celular con respecto a las sensibles, por lo que es posible que la actividad del AE tenga también implicaciones en la pared celular.

A los 3 pHs evaluados ERI se comportó como bacteriostática y con la adición de AE al medio de cultivo se obtuvieron efectos bactericidas. Esto también se reflejó en el análisis del índice E por modelado matemático. Es claro como la C₅₀ de la ERI disminuye por la adición del AE. Teniendo en cuenta que los macrólidos pueden concentrarse a nivel intracelular, principalmente dentro de los macrófagos y PMNs⁵⁹, la CIM y CBM de ERI combinada con el AE podría alcanzarse a nivel subcelular. Se ha reportado que la ERI puede acumularse entre 4 y 38 veces más a nivel intracelular que en el medio extracelular en macrófagos, 8 veces en neutrófilos PMNs y 6 a 12 veces en células epiteliales⁶⁰. Por lo tanto, es factible alcanzar estos niveles, convirtiendo su combinación con AE de *M. armillaris* en una buena alternativa a evaluar para el tratamiento de *S. aureus* a nivel intracelular.

4.3. Actividad antimicrobiana de las nanopartículas NLC cargadas con AE de *M. armillaris*

No existen en la literatura trabajos que mencionen la encapsulación de AE de *M. armillaris*. La CIM del AE encapsulado en las nanopartículas NLC fue la misma que la obtenida al utilizar el AE libre, por lo cual la encapsulación no perjudica su actividad antimicrobiana en un cultivo en suspensión frente a *S. aureus*. Saporito et al. (2018) obtuvieron un efecto similar al encapsular AE de *Eucalyptus globulus*⁶¹. Las NLC vacías lograron impedir la formación de biofilms de *S. aureus* aunque no tuvieron actividad antimicrobiana sobre bacterias en suspensión ni en la erradicación de biofilms preformados. Por otro lado, las NLC cargadas con AE resultaron tener una importante actividad tanto frente a *S. aureus* en suspensión como en la formación y erradicación de los biofilms, incluso para cepas SARM.

4.4. Citotoxicidad del AE de *M. armillaris* libre y nanoencapsulado

La determinación de la actividad intracelular del AE de *M. armillaris* frente a PMNs no ha sido reportada todavía en la bibliografía. El AE resultó ser citotóxico en un amplio rango de concentraciones (10-0.05 µL/mL). Caldefie-Chézet et al. (2006) encontraron que PMNs, aislados de humanos, expuestos al AE de *M. alternifolia* al 1% perdían un 50% en su viabilidad a las 2 h, mientras que frente a concentraciones del AE al 0.1% no había pérdida de viabilidad por lo menos durante dos h⁶². En cambio, utilizando células periféricas mononucleares humanas frente a 0.1 % del AE la viabilidad cae al 20% a los 30 min y a cero

a las 3 h, pero frente a una concentración de 0.01% la viabilidad se mantiene incluso durante 24 h. En otro estudio, Tullio et al. (2012), evaluaron la actividad intracelular del AE de *Thymus vulgaris* frente a *Candida albicans* internalizada en PMNs humanos⁶³. Las concentraciones del AE utilizado fueron de 0.25 y 0.5%, reportando actividad intracelular frente a *C. albicans*, sin embargo, no mencionan la realización de ensayos de viabilidad por efecto del AE sobre los PMNs. La reducción en el recuento de microorganismos podría ser el resultado de la muerte intracelular por el AM, lisis de las células fagocíticas con la liberación y posterior destrucción de los microorganismos por el AM extracelular, eliminación de microorganismos por AM residual después de la rotura de las células por sonicación al final del experimento y la estimulación de los mecanismos de destrucción intracelular por acción del AM⁶⁴. En un trabajo posterior realizado por Tullio et al. (2019) se evaluó la toxicidad de los AEs de *M. alternifolia* y de “*Mentha de Pancalieri*” sobre PMNs, hallando que disminuía drásticamente su viabilidad con 0.25% de los AEs a los 30 min de haber sido expuestos⁶³.

Una solución a este problema de toxicidad de los AEs sobre los PMNs es la nanoencapsulación a modo de “delivery” de moléculas al medio intracelular. Las nanopartículas penetran la membrana celular y los orgánulos subcelulares, depositándose en el sitio infectado, permaneciendo en forma intracelular durante tiempo prolongado y liberando su carga a través de los poros presentes en las membranas de las nanopartículas⁶⁵. Existen nanomateriales capaces de incorporar una o más moléculas sin tener efecto sobre la carga de estas y aumentar así su acción farmacológica. Permiten una dosificación uniforme del fármaco, aumentar su biodisponibilidad, localizarlo en el sitio infectado, disminuir el tiempo de tratamiento y los efectos secundarios²¹. En este trabajo logramos disminuir la citotoxicidad del AE para células PMNs al incorporarlas en las nanopartículas NLC. Estas nanopartículas vacías mantuvieron la viabilidad en un 90% respecto del control sin tratar. En el caso de las NLC-AE la supervivencia fue de 70% a la concentración más baja evaluada (0.05 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y de 30% a la concentración más alta evaluada (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$). No se encuentra reportado el efecto de nanopartículas NLC sobre la viabilidad de células PMNs.

4.5. Sinergismo entre los AEs de *M. armillaris* y *L. nobilis*

El uso de desinfectantes de pezones es una práctica de la rutina de ordeño que permite reducir el número de nuevas IIM en bovinos⁶. La limpieza de la ubre pre-ordeño disminuye a niveles aceptables la contaminación en la piel del pezón, reduciendo la propagación de microorganismos, la incidencia de IIM y la cantidad de bacterias en la leche de tanque⁶⁶.

Una recomendación importante para el desarrollo de soluciones prepping es que tengan una rápida actividad bactericida. Es deseable dejar un tiempo de contacto entre 15-30 segundos para que actúe el antiséptico y posteriormente corroborar que los pezones queden secos pasando sobre la punta de estos un papel individual descartable previo a colocar las pezoneras⁶⁶. Este tipo de productos debe tener un amplio espectro de acción, no ser irritantes, ser humectantes, de baja viscosidad, tener estabilidad física y germicida, poca persistencia, no dejar residuos y poseer detergencia⁶⁷. Los detergentes en la formulación favorecen la eliminación de materia orgánica y una mejor actividad del germicida. Por otro lado, los agentes humectantes penetran la piel del pezón, asegurando un contacto efectivo del antiséptico utilizado y maximizando la actividad germicida⁶⁶. En la formulación desarrollada en este trabajo se utilizó Tween 20 al 1% como detergente, y como emoliente a la glicerina en un 2% (contribuye a mantener la humectación de la piel del pezón y es recomendable su uso en concentraciones de entre 2 y 8%⁶⁷).

Entre los desinfectantes de pezones más utilizados se encuentran el Iodo, clorhexidina, amonio cuaternario, hipoclorito de sodio, cloro y peróxido de hidrógeno⁶⁸. Sin embargo, varios estudios establecen el riesgo de aparición de resistencia cruzada entre desinfectantes y ABs utilizados en la terapéutica con mecanismos de acción similares^{69, 70}. Es interesante encontrar alternativas a los antisépticos convencionales, siendo las plantas buena fuente de compuestos antimicrobianos. Se considera que un desinfectante efectivo debe lograr una reducción de al menos 3 logaritmos respecto del control sin desinfectar⁷¹. Con la formulación de AEs de *M. armillaris* y *L. nobilis* evaluada en este trabajo, frente a *S. aureus*, se observó una reducción de 2.88 Log₁₀ UFC/mL utilizando los AEs a concentración 0.6% cada uno. Al duplicar la concentración de los AEs la reducción respecto al control fue de 3.03 Log₁₀. Ganga Herrero (2014) evaluó mediante pezones escindidos inoculados, la capacidad germicida de formulaciones de cobre y de iodo frente a *S. aureus*, la formulación de cobre (2900 ppm) produjo una reducción de 6.86 Log₁₀, mientras que las de iodo (6-8 ppm) lograron una disminución de 2.16 Log₁₀⁷². Por otro lado, Leyton et al., (2013) evaluaron una alternativa fitoterápica, utilizaron un extracto de alfilerillo (*Erodium cicutarium*) con la que obtuvieron una reducción de más de 3 Log₁₀ en ensayos *in vitro* y una disminución de más de un 70% en el desarrollo de UFC en la piel del pezón en estudios a campo⁷³.

Los AEs tienen un gran historial en el estudio de sus propiedades antibacterianas sobre la piel humana, permitiendo controlar bacterias que colonizan el tejido e infectan heridas, incluyendo a *S. aureus*⁷⁴. Los AEs de *M. armillaris* y *L. nobilis* resultaron ser sinérgicos frente a *S. aureus*, tanto para la actividad antimicrobiana inhibitoria como bactericida. El AE de *M. armillaris* está escasamente descrito en la literatura como se mencionó anteriormente. *L. nobilis* es una planta ampliamente utilizada como condimento y la demanda mundial es

elevada⁷⁵. Su adaptabilidad al cultivo en Argentina permite pensar en la explotación comercial de esta especie. En la localidad de Henderson (provincia de Buenos Aires) se evaluó la composición del AE de laurel durante todo un año observando poca variabilidad y encontrando como componente principal al 1.8-cineol⁷⁶. Su actividad antimicrobiana está escasamente estudiada, pero hay trabajos que demuestran su actividad frente a *S. aureus*⁷⁷. El uso de AEs en animales está ampliamente difundido para su aplicación en animales de granja, donde particularmente se aprovecha la actividad antimicrobiana de los mismos para desarrollar promotores de crecimiento como aditivos alimentarios⁷⁸. En cuanto a las investigaciones para el control de IIM en bovinos con extractos vegetales los reportes se centran en la aplicación intramamaria (IMM) fundamentalmente⁷⁹⁻⁸¹. Los trabajos acerca de la eficacia de la acción tópica para disminuir las IIM por reducción de la carga bacteriana de la piel de la ubre son escasos. Almeida Schiavon et al. (2011) evaluaron la acción antiséptica de un extracto hidroalcohólico de *Tagetes minuta* para post-ordeño en bovinos⁸². Este extracto no presentaba diferencias significativas en la reducción de nuevas IIM por *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.* en comparación con una formulación comercial de Iodo en ensayos a campo. Por otro lado, una formulación comercial tópica para la ubre bovina (Mastilep-gel, compuesto por extractos de *Cedrus deodara*, *Curcuma longa*, *Glycyrrhiza glabra* y *Eucalyptus globulus*) ha demostrado un importante efecto en vacas con mastitis subclínica, aumentando el volumen de leche producido y reduciendo el conteo de células somáticas⁷⁹.

Los AEs de *M. armillaris* y *L. nobilis* demostraron ser sinérgicos entre sí y ser una interesante alternativa fitoterápica para la desinfección de pezones bovinos. Es necesario continuar con estudios de estabilidad de la formulación e incluir otros microorganismos que están presentes en el ambiente (por ejemplo, *Escherichia coli*), para finalmente evaluar su eficacia a campo y así poder promover su uso en los establecimientos lecheros.

5. Conclusiones

Nuestros resultados indican que el AE de *M. armillaris* presenta una fuerte acción antimicrobiana frente a cepas SARM y SASM formadoras de biofilm. La sinergia demostrada en combinación con CLOX, RIF, ERI y AE de *L. nobilis* permite pensar en potenciales aplicaciones en el control de infecciones animales de difícil resolución disminuyendo el uso de AMs convencionales y contribuyendo a la disminución de la diseminación de RAM como riesgo para la salud pública. La encapsulación de este AE en nanoestructuras como NLC no solo permite mantener la actividad antimicrobiana del AE, sino que también contribuye a disminuir la mortalidad de células PMNs por efecto del extracto vegetal. Hallazgo

extremadamente importante para futuros experimentos que evalúen la actividad intracelular del AE en PMNs, donde *S. aureus* sobrevive escapando a la acción de los ABs poco penetrantes o poco eficaces a nivel subcelular. Como conclusión final el presente estudio demuestra que el AE de *M. armillaris* es una excelente alternativa natural al uso de ABs para maximizar la eficacia AM disminuyendo la diseminación de bacterias con RAM. Es un estudio de alto impacto tanto médico como biológico, a partir de una aplicación específica, que es la salud animal bajo el concepto de “Una Salud”. Este proyecto tendrá impacto tanto médico como biológico, a partir de una aplicación específica, que es la salud animal.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT), la Universidad Nacional de La Plata y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por su colaboración en el otorgamiento de Becas de Doctorado y el financiamiento de la investigación. Queremos agradecer el apoyo técnico del Dr. Yamil Chain y del Dr. Sebastián Cisneros por las mediciones de DLS. Finalmente al personal del LEFyT-FCV-UNLP y en particular a la Prof. Dra. Nora Mestorino por su apoyo y acompañamiento.

7. Bibliografía

- 1- OMS. Resistencia a los antimicrobianos. 2020. Disponible en (ultimo acceso 19 septiembre 2022): <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- 2- Comisión Nacional de Control de la Resistencia Antimicrobiana (CoNaCRA) Resistencia Antimicrobiana (RAM) en la región y el mundo. Disponible en (ultimo acceso 19 septiembre 2022): <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologiaysituacion/cconacra--ram>
- 3- OMS. La falta de nuevos antibióticos pone en peligro los esfuerzos mundiales por contener las infecciones farmacorresistentes. 2020. Comunicado de prensa. Disponible en (ultimo acceso 19 septiembre 2020): <https://www.who.int/es/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>
- 4- Dutescu IA, Hillier SA. Encouraging the development of new antibiotics: are financial incentives the right way forward? A systematic review and case study. *Infect Drug Resist.* 2021;14:415–34. doi: doi.org/10.2147/IDR.S287792.
- 5- Monistero et al. *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. *Toxins.* 2018; 10(6): 247. doi: doi.org/10.3390/toxins10060247
- 6- Leslie KE, Vernooy E, Bashiri A, Dingwell RT. Efficacy of two hydrogen peroxide teat disinfectants against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *J Dairy Sci.* 2006; 89(9): 3696-3701. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72410-9
- 7- Haag et al. *Staphylococcus aureus* in animals. *Microbiol Spectrum.* 2019; 7(3). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019.
- 8- Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science.* 1994; 264(5157): 382–388.
- 9- Yap et al. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *Open Microbiol J.* 2014; 8: 6-14. doi: 10.2174/1874285801408010006
- 10- Begun J. *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a highthroughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. *Infect immun.* 2005; 73(2): 872-7. doi: 10.1128/IAI.73.2.872-877.2005

- 11- Sifri et al. Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model. *Infect Immun.* 2006; 74(2): 1091-1096.
doi: 10.1128/IAI.74.2.1091-1096.2006
- 12- Chabir et al. Chemical study and antimalarial, antioxidant, and anticancer activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm essential oil. *J Med Food.* 2011; 14(11): 1383–1388.
doi: 10.1089/jmf.2010.0168
- 13- Amri et al. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils from Three *Melaleuca* Species Grown in Tunisia. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(12): 16580-16591.
doi: 10.3390/ijms131216580
- 14- Buldain et al. Combination of Cloxacillin and Essential Oil of *Melaleuca armillaris* as an Alternative Against *Staphylococcus aureus*. *Front Vet Sci.* 2018; 5: 177.
doi: doi.org/10.3389/fvets.2018.00177
- 15- Buldain D. Evaluación de combinaciones antimicrobianas/aceite esencial de *Melaleuca armillaris* Sm. como alternativas terapéuticas para el tratamiento de mastitis bovina por *Staphylococcus aureus*. Facultad de Ciencias Veterinarias. 2021. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- 16- Davis RL. The Australian tea tree oil industry. Paper presented at the IFEAT International Conference 'Australia and New Zealand: Essential Oils and Aroma Chemicals - Production and Markets'; Sydney, 2-6 Nov. 2003. Pages 29–40 in the Conference Proceedings.
- 17- Elshafie et al. Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L. essential oil against postharvest disease of peach fruit. *J Med Food.* 2015; 18(8): 929-34.
doi: 10.1089/jmf.2014.0167
- 18- Rosato et al. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine.* 2007; 14(11): 727-32.
doi: 10.1016/j.phymed.2007.01.005
- 19- Rodrigues et al. (2009). Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine.* 2009; 16(11): 1052-1055.
- 20- Zhou et al. A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine.* 2018; 13: 7333-7347.
- 21- Garg et al. Current Nanotechnological Approaches for an Effective Delivery of Bioactive Drug Molecules to Overcome Drug Resistance Tuberculosis. *Current pharmaceutical design.* 2015; 21(22): 3076–3089. doi:10.2174/1381612821666150531163254
- 22- Islan et al. Development and tailoring of hybrid lipid nanocarriers. *Current pharmaceutical design.* 2018; 23: 6643–6658. doi: 10.2174/1381612823666171115110639
- 23- Bilia et al. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM.* 2014; 651593. doi:10.1155/2014/651593
- 24- Holmgren et al. *Index Herbariorum. The herbaria of the world.* 8va. Edición. P 1. Bronx, New York Botanical Gardens, 1990.
- 25- Plaza M, Ricalde M. Establecer parámetros de control de calidad físico-químicos del AE del *Schinus molle* l. obtenido por arrastre de vapor. *Revista Ciencia, Tecnología e Innovación.* 2015;11(12): 693-6.
- 26- Farmacopea Argentina. Séptima Edición, Volumen 1. Ministerio de salud de la nación, ANMAT, INAME. Buenos Aire, 2003.
- 27- Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: Lorian V. Editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Baltimore, MD: The Williams &Wilkins Co. 1996. pp. 330–96.
- 28- Sidhu et al. PK-PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Res Vet Sci.* 2010; 88(1): 134-141. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.05.013
- 29- Weidmann C, Dell' Elce A. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de marbofloxacin sobre *Escherichia coli*; entre la biología descriptiva y el modelo matemático. XXI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral, 2017. Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/1893>

- 30- Yu et al. PK/PD Approaches, in: Hock, F., Gralinski, M. (Eds.) Drug discovery and evaluation: methods in clinical pharmacology. Springer international publishing, Cham, Switzerland, 2018. pp. 1-23.
- 31- Philpot et al. Hygiene in the prevention of udder infections, IV evaluation of teat dips with excised cows' teats. J Dairy Sci. 1978; 61(7): 950-955. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(78)83672-8
- 32- National Mastitis Council (NMC). Protocol A, for screening germicidal activity of a teat dips on excised cows teats. 22nd annual meeting National Mastitis Council Inc, Louisville, Kentucky, USA, 1983, p. 88-90.
- 33- Davis RL. The Australian tea tree oil industry. Paper presented at the IFEAT International Conference 'Australia and New Zealand: Essential Oils and Aroma Chemicals - Production and Markets'; Sydney, 2-6 Nov. 2003. Pages 29-40 in the Conference Proceedings.
- 34- Prastyono. 2008. Potential of clones to boost yields in tea tree plantations. Southern Cross University, Lismore. Master of Science thesis.
- 35- Hayouni et al. Mechanism of action of *Melaleuca armillaris* (Sol. Ex Gaertn) Sm. essential oil on six LAB strains as assessed by multiparametric flow cytometry and automated microtiter-based assay. Food Chem. 2008; 111(3): 707-718.
- 36- Silva et al. Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. Flavour Fragr J. 2007; 22(6): 474-478.
- 37- Rodríguez et al. Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of Eucalyptus oils. Electron J Biotechnol. 2006; 9(3).
doi: dx.doi.org/10.4067/S0717-34582006000300011
- 38- Falci et al. (2015). Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. Acta Cir Bras. 2105; 30(7): 491-6.
doi: dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150070000007
- 39- Li et al. Antibacterial activity of leaf essential oil and its constituents from *Cinnamomum longepaniculatum*. Int J Clin Exp Med. 2014; 7(7): 1721-7
- 40- Carson et al. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(1): 50-62.
doi: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006
- 41- Oliveira et al. Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. Food Control. 2015; 47: 334-339.
doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.014
- 42- Yáñez Rueda X, Cuadro Mogollón OF. Composición química y actividad antibacteriana del AE de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2012; 10(1): 52-61.
- 43- Pankey GA, Sabath LD. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. Clin Infect Dis. 2004; 38(6): 864-70. doi: 10.1086/381972
- 44- Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis. 1998; 26(1): 1-12.
- 45 - Weinrick et al. Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. J bacteriol. 2004; 186(24), 8407-8423. doi: 10.1128/JB.186.24.8407-8423.2004
- 46- Vázquez-Sánchez et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms. Food Science and Technology International. 2015; 21(8): 559-570.
- 47- LaPlante KL. In vitro activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 57(4): 413-418. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.09.007
- 48- D'Arrigo et al. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Phytomedicine. 2010; 17(5): 317-22. doi: 10.1016/j.phymed.2009.07.008
- 49- Van Vuuren et al. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. Lett Appl Microbiol. 2009; 48(4): 440-446.

- 50- Chaves et al. Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates β -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. *Ind Crops Prod.* 2018; 112: 70–4. doi: doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.048
- 51- Nascimento et al. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or α -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2007; 92(1): 95-100. doi: 10.1007/s10482-006-9139-x
- 52- Mensa et al. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter.* 2013; 26(1): 1-84.
- 53- Liu et al. Rifampicin-Manuka Honey Combinations Are Superior to Other Antibiotic-Manuka Honey Combinations in Eradicating *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Front Microbiol.* 2018; 8: 2653. doi: 10.3389/fmicb.2017.02653
- 54- Veras et al. Enhancement of the antibiotic activity of erythromycin by volatile compounds of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown against *Staphylococcus aureus*. *Pharmacogn. Mag.* 2011; 7: 334-337. doi: 10.4103/0973-1296.90415.
- 55- Bezerra Dos Santos et al. Organic extracts from *Indigofera suffruticosa* leaves have antimicrobial and synergic actions with erythromycin against *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 13.
- 56- Magi et al. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 165. doi: 10.3389/fmicb.2015.00165.
- 57- Piatkowska et al. The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* to erythromycin is caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. *Cell Mol. Biol. Lett.* 2012; 17(4): 633-645. doi: 10.2478/s11658-012-0034-3.
- 58- Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 2002; 34(4): 482-92. doi: 10.1086/324626
- 59- Gómez-Lus et al. Quimioterapia antiinfecciosa y antitumoral: Antibióticos y quimioterápicos. Generalidades. En: *Farmacología básica y clínica.* 20ª. Edición. Leza Cerro JC, Lizasoain Hernández I, Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Moro Sánchez MA (eds). Buenos Aires, Ed Panamericana, 2005, p. 825-839.
- 60- Bosnar et al. Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6): 2372-7. doi: 10.1128/AAC.49.6.2372-2377.2005
- 61- Saporito et al. Essential oil-loded lipid nanoparticles for wound healing. *Int J Nanomedicine.* 2017;13:175–86.
- 62- Caldefie-Chézet et al. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytother Res.* 2006; 20: 364–370. doi: doi.org/10.1002/ptr.1862
- 63- Tullio et al. Positive interaction of thyme (red) essential oil with human polymorphonuclear granulocytes in eradicating intracellular *Candida albicans*. *Planta medica.* 2012; 78(15): 1633–1635. doi: 10.1055/s-0032-1315153
- 64- Easmon CS. The effect of antibiotics on the intracellular survival of *Staphylococcus aureus in vitro*. *Br J Exp Pathol.* 1979; 60(1): 24-28.
- 65- Zhou et al. A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine.* 2018; 13: 7333-7347.
- 66- Izak E, De Nicolás J. Predipping: clave en el manejo de los tambos modernos. *Producir XXI, Bs. As.* 2010; 18(221):12-18. Recuperado de: Sitio de producción animal. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/produccion_bovina_leche/132-preparar_bien_ubre.pdf
- 67- Hemling TC. Teat condition - prevention and cure through teat dips. *Proceedings of the British Mastitis Conference Brockworth, Institute for Animal Health/Milk Development Council.* 2002. pp. 1-14.
- 68- Nickerson SC. Choosing the best teat dip for mastitis control and milk quality. *Milk Quality Conference Proceedings, Louisiana, USA.* 2001. pp 43 - 49.

- 69- Fraise AP. Biocide abuse and antimicrobial resistance--a cause for concern?. J Antimicrob Chemother. 2002; 49(1): 11-12. doi:10.1093/jac/49.1.11
- 70- Russell AD. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. J Appl Microbiol. 2002; 92 Suppl:121S-35S.
- 71- Calvino L. Desinfección de pezones post-ordeño: limitaciones y recomendaciones. INTA Rafaela, Información Técnica. 1998; 143: 1-4. Disponible en: http://rafaela.inta.gov.ar/publicaciones/documentos/inf_tecnica/informac143.htm
- 72- Ganga Guerrero AI. Evaluación *in vitro* del poder germicida de un nuevo desinfectante de pezones a base de cobre, utilizando el método de los pezones extirpados. Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Médico Veterinario. Valdivia Chile. 2014.
- 73- Leyton et al. Alfilerillo sellador. Sitio argentino de producción animal. 2013. Disponible en: <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/alfilerillo-sellador-t30610.htm>
- 74- Orchard A, van Vuuren S. Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. Evid Based Complement Alternat Med. 2017; 2017: 4517971.
- 75- United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD). World Market in the Spices Trade 2000–2004. Geneva. 2006.
- 76- Di Leo Lira et al. Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. Ind Crop Prod. 2009; 30: 259–264.
- 77- Derwich et al. Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. Aust J Basic Appl Sci. 2009; 3 (4): 3818–3824.
- 78- Martínez Martínez et al. Uso de AEs en animales de granja. Interciencia. 2015; 40(11): 744-750
- 79- Hase et al. Management of subclinical mastitis with mastilep gel and herbal spray (AV/AMS/15). Int J Pharm Pract. 2013; 4: 64–67.
- 80- Mullen et al. An *in-vitro* assessment of the antibacterial activity of plant derived oils. Int J Dairy Sci. 2014; 97(9): 5587-5591. doi: 10.3168/jds.2013-7806
- 81- Reshi et al. Efficacy of *Fumaria indica*, *Nepeta cataria* and *Adiantum capillus* crude aqueous extracts in comparison to Cefuroxime in sub-clinical cases of bovine mastitis. Int J Lakes Rivers (IJLR). 2017; 7: 100–107. doi: 10.5455/ijlr.20170212032414
- 82- Almeida Schiavon et al. Aplicación de plantas medicinales para la antisepsia de pezones de vacas posordeño. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2011; 16(3): 253-259.

ANEXO

Tabla 1A. Composición porcentual del AE de *M. armillaris*.

COMPONENTE	COMPOSICIÓN (%)	COMPONENTE	COMPOSICIÓN (%)
α -Tujeno	1.5	γ -Terpineno	0.5
α -Pino	6.0	Terpinoleno	0.1
Sabineno	1.0	δ -Terpineol	0.1
Myrceno	2.2	Terpinen-4-ol	1.4
β -Pino	2.2	α -Terpineol	1.4
α -Phellandreno	0.1	Geranyl acetato	0.2
α -Terpineno	0.2	β -Caryophylleno	0.5
P-Cimeno	1.4	Aromandendreno	0.1
1,8-Cineol	72.3	Geranyl isobutyrate	0.1
Limoneno	7.8	Cis-Calameneno	0.1
Trans- β -Ocimeno	0.2	Oxi-Caryophylleno	0.1

Tabla 2A. Parámetros fisicoquímicos del aceite esencial de *M. armillaris*.

Parámetro	Valor obtenido
Apariencia a 20°C	Líquido oleoso y límpido
Olor	Penetrante, fresco
Sabor	Amargo, astringente
Color	Amarillo pálido
Densidad (usando picnómetro)	0.89197-0.93013 g/mL
Solubilidad en aceite mineral (1:1)	Soluble
Solubilidad en agua (1:10)	Parcialmente soluble
Solubilidad en etanol 70% (1:1)	Soluble
Índice de refracción at 20 ° C	1.4698 -1.4703
Índice de acidez	0.7824
Índice de esterificación	32.8526