

Susceptibilidad *in vitro* de una Cepa de *Staphylococcus aureus* Resistente a Diferentes Extractos Vegetales

Concepción García Luján¹, Sara E. Alonso Rojo², Rafael Rodríguez Martínez³, Aurora Martínez Romero¹, Patricia Ramírez Baca¹, Alejandro Moreno Reséndez³

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo., México. E-mail: conygarcialujan@hotmail.com. (*Autor responsable). ²Laboratorio de Microbiología de la Clínica de Especialidades No. 71, IMSS, Torreón, Coah., México. ³Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, 27054, Torreón, Coah., México.

Abstract

The emergence of resistant strains of *Staphylococcus aureus*, and its ability to cause diseases, is related to the widespread use of antibiotics and their potential to develop resistance and multiresistance. Therapeutic options for the treatment of infections caused by this pathogen tend to be limited, therefore the aim of this work was to evaluate the susceptibility of two strains of *S. Aureus*: a hospital one, and the other one for reference (ATCC 25923), to 10 vegetal extracts, and 2 essential oils. Alcoholic and hidroalcoholic extracts of parsley (*Petroselinum sativum*), ruda (*Ruta graveolens*), thyme (*Thymus vulgaris*), and gobernadora (*Larrea tridentata*) were evaluated, as well as the essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*), and oregano (*Lippia graveolens*), in order to assay the minimum inhibitory concentrations (CMI), by means of the macrodilution method. The results showed that there was no difference in the CMI (2,77 mgs mL⁻¹), in the vegetal extracts, alcoholic, as well as hidroalcoholic, for both strains, but the essential oils inhibited the bacterial growth to a CMI lower than those of the alcoholic, and hidroalcoholic, extracts of clove (1,38 mgs mL⁻¹) and oregano (0,17 mg mL⁻¹) for the hospital strain, and clove (0,34 mg mL⁻¹) and oregano (0,17 mg mL⁻¹) for the reference strain. The assayed compounds have a potential anti-bacterial application, and that is why it is suggested to assay their pharmaceutical properties in order to establish his usage as therapeutic agents.

Key words: Bacterial multiresistance, infectious diseases, new antimicrobials

Resumen

El surgimiento de cepas resistentes, y la capacidad de producir enfermedad por *Staphylococcus aureus* están relacionados con el amplio uso de antibióticos y su potencial para desarrollar resistencia y multirresistencia. Las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno tienden a ser limitadas, por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad de dos cepas de *S. Aureus*, una hospitalaria, y la otra de referencia (ATCC 25923), a 10 extractos vegetales y dos aceites esenciales. Se evaluaron extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de: perejil (*Petroselinum sativum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y gobernadora (*Larrea tridentata*); y los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia graveolens*), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) mediante el método de macrodilución. Los resultados mostraron que no existió diferencia en las CMI (2.77 mg mL⁻¹) en los extractos vegetales, tanto alcohólicos como hidroalcohólicos en las dos cepas, mientras que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento bacteriano a CMI inferiores a las de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de clavo (1.38 mg mL⁻¹) y orégano (0.17 mg mL⁻¹) para la cepa hospitalaria, y clavo (0.34 mg mL⁻¹) y orégano (0.17 mg mL⁻¹) para la cepa de referencia. Los compuestos estudiados tienen una aplicación potencial como antibacterianos por lo que se sugiere medir sus propiedades farmacéuticas para establecer su uso como agentes terapéuticos.

Palabras clave: Multirresistencia bacteriana, enfermedad infecciosa, nuevos antimicrobianos

Introducción

Todos los seres vivos, incluyendo los patógenos bacterianos y sus hospederos, participan en una evolución constante, en una batalla de ataque, defensa y contraataque. Se plantea que los patógenos bacterianos a través de la evolución, han obtenido una importante ventaja sobre sus hospederos, ya que los mecanismos de defensa de éstos conducen a la generación de nuevas formas virulentas a través de cambios en el genoma bacteriano de los patógenos (Holden *et al.*, 2004; O'Connell, 2006). La evolución de las especies bacterianas resistentes se debe a una variedad de factores que incluyen la diseminación y el uso inadecuado de agentes antimicrobianos, el uso extensivo de estos agentes como promotores del crecimiento en la alimentación animal, y el incremento de los viajes regionales e internacionales, a través de los cuales se facilita que las bacterias resistentes a los antimicrobianos crucen las barreras geográficas (Lowy, 2003).

Se entiende por resistencia la capacidad de un organismo de tolerar la acción de agentes químicos, físicos y biológicos. Donde quiera que exista un cambio de susceptibilidad provocado por un agente inefectivo en contra de cierto organismo, este organismo será considerado como resistente. Muchos organismos carecen de susceptibilidad a un agente particular, y por lo tanto son intrínsecamente resistentes por su naturaleza fisiológica o bioquímica; los organismos susceptibles pueden volverse insensibles ante los antimicrobianos, esto puede deberse a mutaciones, o a la incorporación de información genética que codifica la resistencia (Kummerer, 2004), sin embargo la resistencia, a menudo, no se restringe a un solo agente o grupo antimicrobiano, sino que involucra a múltiples agentes pertenecientes a diferentes grupos de antimicrobianos, empleándose entonces el término de multirresistencia a drogas, resistencia múltiple, o multirresistencia. La idea, tan difundida, de que, en la carrera por la supremacía entre el hombre y los microorganismos, son éstos los que van siempre a la cabeza, y que la resistencia microbiana a los tratamientos actuales puede llevarnos a regresar a la era anterior a los antibióticos. Lo anterior subraya la seriedad de uno de los problemas de salud global de hoy: la lucha en contra de las enfermedades infecciosas causadas por gérmenes multirresistentes (Witte, 1999; Crisóstomo *et al.*, 2001; Critchley *et al.*, 2003; Schmidt, 2004). En la actualidad, el incremento de la resistencia de los patógenos limita el uso de los agentes antimicrobianos disponibles, lo cual ha favorecido la búsqueda de nuevos agentes, con nuevas formas de acción, que sean capaces de burlar los mecanismos de resistencia actuales (Critchley *et al.* 2003; Dartois *et al.*, 2005; Dryla *et al.*, 2005). Una opción -tan

antigua como la civilización misma- es el uso de productos naturales de origen mineral, vegetal y animal, con propiedades terapéuticas que, por mucho tiempo, fueron las principales fuentes de fármacos. Con la revolución industrial y el desarrollo de la química orgánica se provocó la preferencia de los productos sintéticos para el tratamiento farmacológico, ya que los compuestos puros se obtienen fácilmente, y las modificaciones estructurales para producir drogas potencialmente más activas y seguras favorece el incremento del poder económico de las compañías farmacéuticas. Sin embargo, el impacto en la terapia anti-infecciosa, con el descubrimiento de la penicilina (obtenida de microorganismos) resaltó la importancia de los productos naturales. Otro hecho que destaca esta importancia, es el de que cerca del 25 % de las drogas prescritas a nivel mundial provienen de las plantas, y que 121 de sus compuestos activos se convierten en drogas de uso común, además de que de las 252 drogas consideradas como básicas y esenciales por la OMS, el 11% son de origen vegetal, y que un gran número son drogas sintéticas que se obtienen de precursores naturales (Rates, 2001).

El surgimiento de la resistencia múltiple en las bacterias patógenas de humanos ha creado un grave problema clínico para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. De manera permanente, las compañías farmacéuticas están buscando drogas alternativas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas provocadas por patógenos resistentes. Las plantas medicinales se consideran una fuente potencial de drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos, y al poco o nulo efecto tóxico (Holden *et al.*, 2004), por lo que se ha sugerido que el uso de los agentes antimicrobianos naturales puede ser una alternativa efectiva, o suplementaria para el control de microorganismos patógenos (Knowles *et al.*, 2005).

La evaluación de la sensibilidad de las bacterias a los diferentes agentes antibacterianos se basa en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria a diferentes concentraciones del agente. La sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico es determinada por la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la menor concentración del agente antimicrobiano, capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana (Prescott, 2000) y es considerada como el estándar de oro para la determinación de la susceptibilidad de los organismos a los antimicrobianos y, por lo tanto, es usada para juzgar la interpretación de otros métodos para probar la susceptibilidad a los antibióticos (Andrews, 2001).

En ciertas bacterias, como el *S. aureus*, los procesos evolutivos que pueden limitar o aumentar su potencial de invasividad, en diferentes hospederos, están poco definidos, aunque por ejemplo, el tipo y las combinaciones de ciertos

genes de virulencia pueden contribuir de manera importante a su potencial patogénico (Van Leeuwen *et al.*, 2005).

Uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión de selección a la que se someten las bacterias con el uso de antibióticos. A la fecha los extractos vegetales han sido poco utilizados como terapia antibacteriana, por lo cual se supone que las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra (Haddadin *et al.*, 2002; Lowy 2003; Begun *et al.*, 2005), entonces, es posible que éstos puedan inhibir el crecimiento de cepas bacterianas resistentes, y multirresistentes. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue valorar la actividad antimicrobiana *in vitro* de ocho extractos vegetales y de dos aceites esenciales en contra de dos cepas de *S. aureus* (una hospitalaria y una cepa de referencia).

Materiales y Métodos

Colección y adquisición de plantas

Durante agosto de 2005, se colectaron plantas de gobernadora (*L. tridentata*) y de orégano (*L. graveolens*) en Gómez Palacio, Dgo., México (103° 40'00" LN y 25° 34'15" LO), y de ruda (*R. graveolens*), tomillo (*T. vulgaris*), y perejil (*P. sativum*) en huertos de Juárez, Dgo., México (103°35'42" LN 25°29'43" LO), cortando las dos terceras partes de la planta para asegurar su regeneración. El clavo (*S. aromaticum*), del cual se utilizan los botones florales, se compró en un mercado de la localidad. Todas las plantas fueron identificadas taxonómicamente en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

Preparación de extractos

Se prepararon los extractos alcohólicos, e hidroalcohólicos de gobernadora (*L. tridentata*), ruda (*R. graveolens*), tomillo (*T. vulgaris*) y perejil (*P. sativum*), y se extrajo el aceite esencial del orégano (*L. graveolens*) y del clavo (*S. aromaticum*), mediante arrastre de vapor en un aparato de destilación. Para la obtención de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos (gobernadora, ruda, tomillo y perejil) las plantas se lavaron con agua para quitar impurezas; el material limpio se dividió en dos partes, la primera se secó al sol, y se molió en mortero, se adicionó solución de agua-alcohol (50-50;v:v) y se colocó en frasco ámbar para protegerlas de la luz del sol (extracto hidroalcohólico). La otra mitad se sometió a un proceso de maceración en fresco con una solución de etanol al 70% (extracto alcohólico) (Kuklinsky, 1993).

Para obtener los aceites esenciales de las especies de orégano y clavo, se sometieron éstos a una extracción por arrastre de vapor en un aparato de destilación, para obtener

sus aceites esenciales; el proceso de extracción se basa en la diferente volatilidad de los componentes de la droga vegetal, el cual permite la separación de los componentes volátiles de otros que son menos o nada volátiles (Kuklinsky, 1993).

Microorganismos y medios

Los materiales y el equipo empleados en el proceso se esterilizaron previamente en autoclave (FELISA, USA) y las pruebas de susceptibilidad se realizaron por triplicado en una campana de flujo laminar (Listed Man MTR CNTLR 572^a, U.S.A.). Para medir la susceptibilidad a los extractos vegetales, se utilizó una cepa hospitalaria de *S. aureus*, que se obtuvo de la Clínica N° 71 del IMSS en Torreón, Coah., México; cepa resistente a los siguientes antibióticos: Trimetropin con sulfametoxazol, Ampicilina, Levofloxacin, Cefuroxima, Meropenem, Carbenicilina, Amikacina, Piperacilina con tazobactam. La cepa de referencia ENCB *S. aureus* ATCC 25923, se obtuvo del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Para estandarizar el tamaño del inóculo bacteriano, las colonias se inocularon en caldo infusión de cerebro corazón (CC) (OXOID, LTD) y se ajustó la turbidez con caldo de cultivo CC estéril hasta alcanzar un equivalente al estándar 0.5 en la escala de MacFarland, de aproximadamente 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) mL⁻¹ (Kalemba y Kunicka, 2003).

Método de macrodilución

Se preparó una solución madre con los extractos de gobernadora, de ruda, de tomillo, de perejil, de orégano, y de clavo, con una concentración al 5% (22.22 mg mL⁻¹) mezclando 5 mL del extracto más 95 mL de etanol. Se preparó una serie de 10 tubos con 2 mL de caldo CC, se añadieron 2 mL del extracto a evaluar (solución madre) al primer tubo y se mezcló; a partir de este tubo se prepararon diluciones seriadas. Las concentraciones (mg mL⁻¹) de los extractos fueron entonces de 22.22 en el primer tubo y de 11.11, 5.5, 2.77, 1.38, 0.69, 0.34, 0.17, 0.086 y de 0.043 mg mL⁻¹ en los tubos subsecuentes hasta el 10. A cada tubo con el extracto se le añadieron 0.5 mL del inóculo previamente preparado que contenía aproximadamente 1.5×10^8 UFC mL⁻¹. Se incluyó un testigo negativo con 2 mL del caldo CC adicionado con 2 mL del extracto. Todos los tubos se incubaron a 37 °C por 24 h, transcurrido este tiempo se determinó la concentración mínima inhibitoria en el tubo con la menor concentración de extracto donde se observó desarrollo bacteriano por medio de turbidez visible a simple vista. Las pruebas se realizaron por triplicado y se empleó un testigo (Andrews, 2001; NCCLS, 2005).

Resultados y Discusión

Para determinar la susceptibilidad de la cepa bacteriana, se midieron las CMI de los diferentes extractos vegetales evaluados (Cuadro 1), los resultados muestran que todos ellos tienen propiedades antibacterianas, y que las CMI de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos son similares (2.77 mg mL^{-1}) para las dos cepas, sin importar el tipo de especie vegetal, lo que permite señalar que los componentes inhibitorios de los extractos vegetales no se modificaron con el tratamiento de extracción utilizado, ya que ensayos previos mostraron que el etanol no inhibe el crecimiento de la cepa.

En el caso de los aceites esenciales la CMI para la cepa hospitalaria de *S. aureus* fue de 1.38 mg mL^{-1} en el aceite esencial de clavo y de 0.17 mg mL^{-1} en el aceite esencial de orégano; para la cepa de referencia, las CMI fueron de 0.34 mg mL^{-1} en el clavo y de 0.17 mg mL^{-1} en el orégano (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos vegetales evaluados en dos cepas de *S. aureus*.

| Especie vegetal | Tipo de extracto | CMI (mg mL^{-1}) | |
|-----------------------|------------------|-----------------------------|------|
| | | CH | CR |
| Gobernadora | alcohólico | 2.77 | 2.77 |
| Ruda | alcohólico | 2.77 | 2.77 |
| Tomillo | alcohólico | 2.77 | 2.77 |
| Perejil | alcohólico | 2.77 | 2.77 |
| Gobernadora | hidroalcohólico | 2.77 | 2.77 |
| Ruda | hidroalcohólico | 2.77 | 2.77 |
| Tomillo | hidroalcohólico | 2.77 | 2.77 |
| Perejil | hidroalcohólico | 2.77 | 2.77 |
| Clavo ^{AE} | aceite esencial | 1.38 | 0.34 |
| Orégano ^{AE} | aceite esencial | 0.17 | 0.17 |

CH = Cepa hospitalaria; CR = Cepa de referencia

Los extractos de diversas especies vegetales, son una alternativa para el tratamiento de enfermedades y, debido a la baja presión de selección, las bacterias no han desarrollado mecanismos de defensa en su contra, por lo que es de suponer que puedan inhibir el crecimiento de algunas cepas resistentes a los antibióticos de uso común. Los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan la hipótesis de la capacidad antibacteriana de los extractos vegetales, inclusive ante una cepa resistente, ya que todos los extractos utilizados inhibieron el crecimiento de las cepas evaluadas. Los resultados de este experimento indican que tanto los extractos alcohólicos como los hidroalcohólicos

de gobernadora, ruda, tomillo y perejil, así como los aceites esenciales de clavo y orégano tienen actividad antibacteriana *in vitro* en contra de *S. aureus*, observándose que la CMI para todos los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos fue similar (2.77 mg mL^{-1}), mientras que en los aceites esenciales las CMI fueron menores a las de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos y diferentes entre sí (clavo 1.38 , orégano 0.17 mg mL^{-1} para la cepa hospitalaria; y de 0.34 mg mL^{-1} en el clavo y de 0.17 mg mL^{-1} en el orégano para la cepa de referencia).

Los resultados concuerdan en todos los casos, con reportes previos (Cowan, 1999; Dorman y Deans, 2000; Burt, 2004), quienes registraron actividad bactericida en contra de diversos patógenos importantes en la gobernadora, en el clavo, y en el tomillo. Sin embargo, las CMI de 0 a 25 [%v/v] para los aceites esenciales de orégano, de tomillo y de clavo en contra de *S. aureus*, reportadas por Hammer (1999), difieren de las que se obtuvieron en este experimento. En relación a los extractos alcohólicos y acuosos de tomillo, Thuillé (2003), reportó una CMI de 2.5 mg mL^{-1} para el primero y mayor de 5.0 mg mL^{-1} para el segundo, en contra de *S. aureus*. Las discrepancias que se presentan en los resultados de los análisis de la susceptibilidad bacteriana a los extractos de especies evaluadas podrían ser consecuencia, en primer término, del mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos que tiene que ver, con el tipo de microorganismo y de la constitución de la estructura de su pared celular y del arreglo de su membrana celular. En segundo lugar y con referencia a los extractos, los factores que influyen pueden ser la fuente botánica, la precedencia de la planta, la época de cosecha, la etapa de desarrollo, la técnica de extracción, el tratamiento de la planta (seca o fresca), y por último, también la metodología utilizada en las pruebas de susceptibilidad bacteriana (Vuorelaa *et al.*, 2004).

Los resultados mostraron la capacidad antibacteriana de los extractos vegetales evaluados, y la diferencia de acuerdo a tipo de extracto, ya que los aceites esenciales requirieron de una menor concentración para lograr la inhibición bacteriana que los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos. Las pruebas *in vitro* constituyen un buen aporte para el conocimiento de las propiedades de los extractos, sin embargo para continuar con la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos hace falta probar la gran variedad de plantas disponibles que son fuente potencial de agentes bioactivos y evaluar, además, sus propiedades farmacéuticas, tales como su farmacodinamia, su farmacocinética, y su toxicidad entre otras.

Conclusiones

Las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron susceptibles a todos los extractos de las especies vegetales evaluadas, aunque en diferentes concentraciones: los extractos alcohólicos (planta fresca) y los hidroalcohólicos (planta seca) no presentan diferencias en su acción bactericida resaltando así que los componentes bactericidas tienen el mismo peso molecular y su acción no se ve afectada por el método de extracción utilizado. En el caso de los aceites esenciales, el orégano mostró el mejor poder bactericida, le sigue el aceite esencial de clavo y por último los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de la gobernadora, el perejil, la ruda y, finalmente, el tomillo. Los resultados muestran el potencial de bioactividad que tienen todos los extractos vegetales evaluados y, por lo tanto, la gran importancia de las plantas como fuente de nuevos agentes antibacterianos.

Agradecimientos

A la MC. María de Jesús Cedillo Gómez, Directora de la Fac. de Ciencias Químicas-UJED, a la QFB Bertha Rosas Campos, a la Dra. Virginia Nevárez Moorillón, por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

Literatura Citada

- Andrews, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1: 5-16.
- Begun, J., Costi D. Sifri, S. Goldman, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel. 2005. *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. *Infect. Immun.* 73(2): 872-7.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94(3): 223-53.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 564-82.
- Crisóstomo, M.I., H. Westh, A. Tomasz, M. Chung, D. C. Oliveira, H. de Lencastre. 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98(17): 9865-9870.
- Critchley, I. A., R. S. Blosser-Middleton, M. E. Jones, C. Thornsberry, D. F. Sahm, and J. A. Karlowsky. 2003. Baseline study to determine in vitro activities of Daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(5): 1689-93.
- Dartois, V., J. Sanchez-Quesada, E. Cabezas, E. Chi, C. Dubbelde, C. Dunn, J. Granja, § C. Gritzen, D. Weinberger, M. Reza Ghadiri, and T. R. Parr, Jr. 2005. Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(8): 3302-10.
- Dorman, H. J. and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88(2): 308-16.
- Dryla, A., S. Prustomersky, D. Gelbmann, M. Hanner, E. Bettinger, B. Kocsis, T. Kustos, T. Henics, A. Meinke, and E. Nagy. 2005. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12(3): 387-98.
- Haddadin, A. S., S. A. Fappiano, P. A. Lipsett. 2002. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgrad. Med. J.* 78(921): 385-92.
- Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G., Parkhill, J. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(26): 9786-91.
- Kalemba, D. and A. Kunicka. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10(10): 813-29.
- Knowles, J. R., S. Roller, D. B. Murray and A. S. Naidu. 2005. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2): 797-803.
- Kuklinsky, C. 1993. Farmacognosia. Barcelona España, Editorial Omega.
- Kummerer, K. 2004. Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54(2): 311-20.
- Lowy, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111(9): 1265-73.
- NCCLS. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.

Clinical and Laboratory Standards Institute 25.

O'Connell, D. 2006. Bacterial evolution. Evolving virulence. *Nature reviews* 4: 83.

Prescott. 2000. Microbiología. Cuarta Edición, McGraw-Hill- Interamericana. Madrid, España. pp 493-495.

Rates, S. M. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39(5): 603-13.

Schmidt, F. R. 2004. The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(4): 335-43.

Thuillé, N. 2003. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 206: 1-5.

Van Leeuwen, W. B., D. C. Melles, A. Alaidan, M. Al-Ahdal, H. A. M. Boelens, S. V. Snijders, H. Wertheim, E. van Duijkeren, J. K. Peeters, P. J. van der Spek, R. Gorkink, G. Simons, H. A. Verbrugh, and A. van Belkum. 2005. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187(13): 4584-91.

Vuorelaa P., Leinonenb, M., Saikkuc, P., Tammela, P., Rauhad, J.P., Wennberge, T., Vuorela, H. 2004. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Curr. Med. Chem.* 11(11): 1375-89.

Witte, W. 1999. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J Antimicrob. Chemother.* 44 Suppl A: 1-9.