

Efecto antimicrobiano del extracto foliar de salvia blanca (*Sphacele salviae* (Lindl.) Briq.) sobre bacterias gram positivas y gram negativas

Antimicrobial effect of white sage (*Sphacele salviae* (Lindl.) Briq.) leaf extract on gram-positive and gram-negative bacteria

Maier, L.^a, Lineros, T.^a, Oberpaur, Ch.^a, Aracena, D.^a, Délano, G.^a

^aFacultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Ejército 146, Santiago, Chile.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 09.12.14

Accepted 24.04.15

Keywords:

Staphylococcus aureus

Bacillus cereus

Escherichia coli

Pseudomonas aeruginosa

Natural antibiotic

Original Research Article,
Plant Science

*Corresponding author:

Liliana Maier

E-mail address:

lmaier@santotomas.cl

ABSTRACT

White sage, a Chilean endemic medicinal herb, has a similar chemical composition similar to other Labiatae species, which have reported inhibitory effects on Gram-positive and Gram negative bacteria. In order to identify inhibitory and/or lethal effect of white sage leaf extract on two Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) and two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), an *in vitro* laboratory test was performed. Leaves were collected from wild populations located in Los Vilos, Coquimbo Region, and Cuesta El Melón, Valparaíso Region, Chile. The extract was obtained by steam stripping with dichloromethane. The biological activity of the extract was determined by agar susceptibility diffusion tests, using three concentrations (120, 200 y 300 mg mL⁻¹). The most sensitive microorganisms were Gram-positive bacteria, most inhibited at the concentration of 300 mg mL⁻¹, but inhibited from 120 mg mL⁻¹. Gram negative bacteria were only repressed at 300 mg mL⁻¹. There is a possibility that the inclusion of a White sage extract could be feasible to counteract the permanent and progressive appearance of multi-resistant bacteria.

RESUMEN

Salvia blanca, especie medicinal endémica chilena, presenta una composición química semejante a otras especies de la familia Labiatae, las que han presentado acción inhibitoria sobre bacterias Gram positivas y negativas. Con el objetivo de evaluar el efecto inhibitorio y/o letal del extracto de hojas de salvia blanca sobre dos especies bacterianas Gram positivas, (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*) y dos especies Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) se realizaron en laboratorio de microbiología de la UST estudios *in vitro*. Se recolectaron hojas de poblaciones silvestres ubicadas en el sector Los Vilos, Región de Coquimbo y Cuesta El Melón en la Región de Valparaíso, Chile. El extracto de las hojas se obtuvo mediante arrastre de vapor con diclorometano. La actividad antimicrobiana se determinó mediante pruebas de sensibilidad por difusión en agar con sensidiscos impregnados, donde se evaluaron tres concentraciones del extracto (120, 200 y 300 mg mL⁻¹). El estudio demostró mayor sensibilidad en bacterias Gram positivas, alcanzando una mayor inhibición en la concentración de 300 mg mL⁻¹ y siendo inhibidas a partir de la concentración de 120 mg mL⁻¹ del extracto de hojas de salvia blanca, opuesto a lo observado en las bacterias Gram negativas, en donde se requirió una concentración de 300 mg mL⁻¹ para alcanzar algún grado de inhibición. Estos resultados sugieren que la inclusión de un extracto de salvia blanca permitiría contrarrestar la aparición permanente y progresiva de cepas bacterianas con resistencia múltiple.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobiano natural.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la resistencia a antimicrobianos constituye una emergencia sanitaria, ya que representa un problema real y cada vez más frecuente en la atención de salud. Hay evidencias de cambios epidemiológicos significativos en los últimos 25 años en relación a las infecciones adquiridas en el ámbito hospitalario y

en la comunidad (Silva, 2011). En efecto la resistencia a antimicrobianos y en particular a los antibióticos, constituye una amenaza para la salud pública en todas las regiones del mundo pudiendo afectar a personas de diferentes edades y condiciones, en diversos países (OMS, 2014). La resistencia se produce cuando las bacterias sufren modificaciones genéticas, que les permiten utilizar mecanismos tales como la degradación enzimática

tica, modificación de receptores, cambios en los sitios activos, bombas de eflujo, entre los más importantes, de tal modo que los antibióticos dejan de ser efectivos en las personas que padecen dichas infecciones (Hemaiswarya et al., 2008). La resistencia a los antibióticos demanda la búsqueda de nuevos compuestos efectivos contra microorganismos patógenos para el hombre y los animales. Una alternativa son los compuestos fitoquímicos activos, con propiedades antimicrobianas, debidas principalmente a la acción de metabolitos secundarios presentes en las plantas, que incluyen monoterpenos, glicoesteroides, flavonoides y polifenoles (Wallace, 2004; Hemaiswarya et al., 2008), donde la mayoría de estos compuestos presentan acción antibiótica en sí. La ventaja de estos principios activos es que actúan de manera sinérgica sobre los agentes patógenos, lo que permite evitar el desarrollo de resistencias por parte de estos (Hemaiswarya et al., 2008).

Taxonómicamente la salvia blanca (*Sphacele salviae* (Lindl.) Briq.) pertenece a la familia Labiatae, también denominada Lamiaceae, que agrupa alrededor de 224 géneros y 5600 especies, muchas de ellas con fines ornamentales, culinarios y/o medicinales. La especie *salviae* es un arbusto endémico, perenne y deciduo de verano (Montenegro, 2000). Corresponde a una especie nativa chilena que según Peña et al. (2000) habita en terrenos arenosos de los cerros costeros, desde la desembocadura del Río Limarí (Región de Coquimbo) hasta Tiltil (Región Metropolitana). Posee propiedades medicinales y es utilizada para el tratamiento de afecciones al estómago, faringe e hígado, parálisis facial, resfríos y reumatismo crónico (Montenegro, 2000), además tiene cualidades cicatrizantes, antisépticas y antiinflamatorias (Hoffmann et al., 1992). Esta planta elabora varios terpenos de tipo abietano, donde predominan el ácido carnósico y carnosol (Escuder et al., 2002), compuestos presentes también en salvia común (*Salvia officinalis* L.) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.) (Labbé et al., 2010), ambas lamiáceas. Los compuestos del metabolismo secundario que le dan características medicinales se acumulan en los tricomas foliares de salvia blanca (Montenegro, 2000). Niemeyer (2014) indica la presencia de alcaloides en esta especie, sin que sea alta en comparación a otras lamiáceas nativas chilenas. Las hojas contienen ácido ursólico (1 al 2%); flavonoides, glucósidos de luteoína y de apigenina; ácidos: rosmarínico (2 al 3%), caféico y clorogénico; un principio amargo diterpénico, la pricosalvina o carnosol (0,35%), que es la forma lactónica de la salvina, un ácido diterpénico, contenido en la flor y su éter monometílico. También posee taninos catéquicos (Hoffmann et al., 1992). Escuder et al. (2002) en un ensayo preliminar de un extracto de hojas frescas con diclorometano se encontró terpenos del tipo abietans y ácido ursólico como los metabolitos secundarios principales, en semejanza química a la salvia común y al romero. En esta comunicación se

describen las estructuras de los abietans como carnosol, rosmanol, ácido carnósico, y 20-deoxocarnosol.

El objetivo de esta investigación fue establecer el efecto inhibitorio y/o letal de distintas concentraciones de un extracto de hojas de *Sphacele salviae* in vitro sobre bacterias Gram positivas, (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*) y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se realizó en Laboratorios de la Universidad Santo Tomás bajo condiciones de bioseguridad, Santiago, Región Metropolitana, Chile.

Material biológico y de laboratorio

Muestras de hojas de salvia blanca fueron colectadas en el mes de septiembre de 2011 en Los Vilos, Región de Coquimbo (Coordenadas GPS (UTM) 6470743 - 265162 y Cuesta El Melón, Región de Valparaíso, Coordenadas GPS (UTM) 6391984 - 289750. En el primer lugar a 32,8 m.s.n.m. las plantas presentaban una altura de 60 - 90 cm. En el segundo las plantas de 1 a 1,2 m de altura se encontraban en estado de floración. En ambos casos en exposición norte, en una ladera de aproximadamente 45° de inclinación. Las muestras de hojas se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta la obtención del respectivo extracto.

Se utilizaron cuatro cepas bacterianas procedentes de la *American Type Culture Collection* (ATCC) de la colección de cultivos de la Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria de la Universidad Santo Tomás. Las cepas bacterianas seleccionadas fueron las siguientes: *Staphylococcus aureus* 25923, *Bacillus cereus* 10876, *Escherichia coli* 25922, y *Pseudomonas aeruginosa* 25853. Durante el desarrollo del ensayo se efectuó tinción de Gram y pruebas bioquímicas para el aislamiento, identificación y mantención de la pureza de las cepas bacterianas. También los microorganismos fueron observados bajo microscopía óptica (Olympus, modelo CX21, Estados Unidos).

Los medios de cultivos utilizados fueron agar Baird Parker, agar Mac Conkey, agar Cetrimide y sensidiscos impregnados en antibióticos en las siguientes concentraciones: Ciproflaxino 5µg marca BBL™, Ceftazidime 30µg marca BBL™, Amoxicilina 30µg marca BBL™.

Método

Una vez ajustado el protocolo de obtención del extracto de hoja de salvia blanca, se efectuó la evaluación del efecto inhibitorio sobre bacterias Gram positivas y negativas.

Ajuste de Protocolo de extracción

Con el fin de reducir el efecto inhibitorio del alcohol (99,9%) sobre el crecimiento de las bacterias que pudiera afectar los resultados, se ajustaron los procedimientos de concentración de los extractos al siguiente procedimiento:

- Obtención del extracto: Para su preparación se siguió la metodología utilizada por Escuder *et al.* (2002), de las muestras colectadas, se separaron las hojas procedentes de cada población por separado de todo material extraño y se pesaron 300 g en base a peso húmedo, con el objetivo de evitar la volatilización de alguno de sus componentes. Las hojas no fueron previamente lavadas, se secaron a 68°C por 48 horas; una vez secas, se molieron en un mortero y se pesaron. Luego, se agregó aproximadamente 400 mL del solvente diclorometano hasta cubrir las totalmente, dejando reposar por 45 minutos. Se filtró la solución con el apoyo de una bomba al vacío modelo SU-660, Chile y un embudo con papel filtro (125 mm). La solución fue traspasada al rotovapor basic IKA modelo RV 05BS28, China, a 40°C. Una vez obtenido el extracto, fue conservado a 4°C y protegido de la luz. El rendimiento de extracto fue de 31,4% p/p en hojas de Los Vilos y de 12,5% p/p en las hojas provenientes de Cuesta El Melón.

Evaluación del efecto inhibitorio de extractos de salvia blanca sobre bacterias

Efectuadas las diluciones, se tomaron 3 mL de cada una de ellas, las que fueron pasadas por un filtro de jeringa de 0,45µm y vaciadas a vasos precipitados estériles. Con una micropipeta (100-1000 µL, Labnet modelo VE 20, Estados Unidos) se tomaron 20µL de las diluciones para impregnar sensidiscos blancos con las distintas concentraciones del extracto Cuesta El Melón de hojas de salvia blanca y se realizaron los antibiogramas para las bacterias *S. aureus* y *B. cereus* seleccionadas. Además, en cada placa se depositaron como testigos sensidiscos blancos y sensidiscos blancos impregnados con 20µL de alcohol al 70%. Posterior a estos resultados se escogieron 3 diluciones para efectuar las pruebas para todos los microorganismos en estudio. Se evaluó el halo de inhibición sobre la siembra bacteriana a las 24 horas post incubación a 35-37°C (estufa Memmert modelo 400, Alemania), medidos con pie de metro digital (Capiler) y se expresaron en milímetros, considerando como inhibición del crecimiento de los microorganismos a los halos mayores a 6 mm, correspondientes al diámetro estándar de los sensidiscos utilizados.

Efecto inhibitorio de extractos de hojas de salvia blanca sobre bacterias Gram positivas y negativas

Con el fin de determinar el efecto del extracto Los Vilos sobre las bacterias en estudio, se estableció un

ensayo *in vitro* en que se evaluaron tres concentraciones (300, 200 y 120 mg mL⁻¹ de la solución madre), más un antibiótico comercial para cada bacteria, un testigo blanco sin impregnar, más otro impregnado en alcohol 70% y un antibiótico comercial específico para cada bacteria ensayada, utilizando en *E. coli* y *B. cereus* Ciprofloxacino (5µg) en *S. aureus*, Amoxicilina (30 µg) y en el caso de *P. aeruginosa*, Ceftazidime (30 µg).

Se aplicó un diseño experimental en bloques completos al azar, con 6 tratamientos y 7 repeticiones. La unidad experimental correspondió a cada sensidisco, mientras que cada placa representaba un bloque.

La suspensión bacteriana se preparó ajustándose el inóculo a la concentración correspondiente a 0,5 de la escala Mac Farland, equivalente a 1 a 2 x 10⁶ Unidades Formadoras de Colonia (UFC mL⁻¹). Todas las cepas se conservaron por duplicado bajo refrigeración.

Antibiograma con diluciones del extracto de hojas de *S. salviae* de Los Vilos: se utilizó la técnica de Kirby-Bauer, estándar para la realización de las pruebas de sensibilidad por difusión en Agar con discos. Las bacterias se replicaron 24 horas antes de cada antibiograma. Se prepararon placas con el medio Mueller Hinton, apropiado para pruebas de susceptibilidad de rutina, tanto para Gram positivas como Gram negativas. Con una micropipeta se impregnaron los sensidiscos con 20µL del extracto y se dejaron secar por 20 minutos, para ser utilizados posteriormente en el antibiograma. Se preparó un inóculo que se llevó a una densidad determinada, para esto se utilizó un estándar de turbidez BaSO₄, correspondiente al estándar 0,5 Mac Farland o su equivalente óptico (10⁻⁶ UFC mL⁻¹). Este inóculo contiene un cultivo bacteriano incubado a 37°C por 24 horas, el cual fue transferido a las placas en no más de 15 minutos desde que fue estandarizado. Se sembró por rayado mediante tórula sobre toda la superficie de la placa. Este procedimiento se repitió rayando dos o más veces, rotando la placa cada vez, luego se extendió otro inóculo sobre los bordes del Agar y se dejó secar 5 a 15 minutos. Una vez seca la superficie de la placa, se

Cuadro 1. Tratamientos aplicados a sensidiscos.

Table 1. Treatments applied to sensidiscs.

Tratamientos	Descripción
T A	Antibiótico comercial (diferente según cada microorganismo)
T 300	Dilución 300 mg mL ⁻¹ de la solución madre
T 200	Dilución 200 mg mL ⁻¹ de la solución madre
T 120	Dilución 120 mg mL ⁻¹ de la solución madre
T OH	Testigo impregnado con alcohol 70%
T B	Testigo sin impregnar (blanco)

depositaron 3 sensidisos impregnados cada uno en su respectiva concentración (120, 200 y 300 mg mL⁻¹) del extracto de hojas de salvia blanca, sensidisco con antibiótico como control positivo y sensidisco no impregnado como control negativo. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas, transcurrido este tiempo se realizó la lectura del halo de inhibición, observado alrededor del disco.

Análisis de la información

En cada uno de los ensayos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso de haberlas se efectuó la prueba de comparación múltiple de Tukey (p<0,05). Los resultados fueron procesados con el programa computacional estadístico MINITAB 15 (versión en español).

RESULTADOS

Mediante los respectivos antibiogramas efectuados sobre cepas de *S. aureus* y *B. cereus* se determinó la concentración mínima inhibitoria (menor dilución capaz de producir efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano) que correspondió a 120 mg mL⁻¹ en ambas bacterias. En tanto, con la concentración de 300 mg mL⁻¹ se obtuvo el mayor efecto inhibitorio, estadísticamente significativo (p<0,05) sobre las mismas cepas.

Actividad inhibitoria del extracto de hojas de salvia sobre bacterias Gram positivas

A continuación se observa las respuestas de crecimiento de las bacterias Gram positivas: *S. aureus* y *B. cereus*, evaluadas *in vitro* frente el extracto de hojas de salvia blanca.

Efecto sobre *S. aureus*

De acuerdo al tamaño de los halos de inhibición, Cuadro 2, la dilución de 120 mg mL⁻¹ del extracto de hojas de salvia demostró inhibir el crecimiento de *S. aureus*. Al aumentar la dosis a 200 mg mL⁻¹ se logra una inhibición superior respecto a la concentración anterior de 120 mg mL⁻¹. La mayor inhibición, de 50% aproximadamente, se obtiene con la concentración más alta, de 300 mg mL⁻¹ (p<0,05).

El antibiótico comercial Amoxicilina, provoca la mayor inhibición del crecimiento de la bacteria, siendo diferente estadísticamente al resto de los tratamientos. Le sigue el sensidisco impregnado con extracto de hojas de salvia de 300 mg mL⁻¹ con una inhibición de 17,3 mm de diámetro, cercano al 50% de la inhibición obtenida por la Amoxicilina.

Los sensidisos impregnados con alcohol al 70% y sin impregnar, no provocaron inhibición en el creci-

miento de la bacteria. El alcohol de 70% utilizado para diluir el extracto, se volatiliza y no es capaz de difundir a través del agar, por lo que no ocasiona efecto inhibitorio por sí mismo, en consecuencia la inhibición puede atribuirse sólo a los compuestos contenidos en la especie evaluada (Figura 1).

Efecto inhibitorio sobre *B. cereus*

Los halos de inhibición producidos por el extracto de hojas de salvia blanca sobre *B. cereus* se muestran en el Cuadro 2, donde el mejor tratamiento correspondió al del antibiótico Ciprofloxacino con un halo de inhibición 25,5 mm.

Las diluciones del extracto 300 mg mL⁻¹, 200 mg mL⁻¹ y 120 mg mL⁻¹ también inhiben la bacteria, pero en menor grado que el antimicrobiano Ciprofloxacino. El efecto de inhibición del extracto disminuye a medida que se encuentra más diluido. Al igual que sobre *S. aureus*, ambos testigos no presentan diferencias estadísticamente significativas y diferentes a los demás tratamientos, lo que demuestra el poder antimicrobiano de salvia blanca. *B. cereus* se inhibe a partir de 120 mg mL⁻¹, obteniendo un mayor halo de inhibición al aumentar la concentración del extracto.

Actividad inhibitoria del extracto de hojas de salvia sobre bacterias Gram negativas

Se evaluó el comportamiento *in vitro* a la aplicación de extracto de hojas de salvia blanca en las bacterias Gram negativas: *E. coli* y *P. aeruginosa*.



Figura 1. Antibiograma de *Staphylococcus aureus* a concentraciones (12, 20 y 30%) de un extracto de hojas de salvia blanca. B: testigo sin impregnar, A: Amoxicilina, OH: alcohol 70%.

Figure 1. *Staphylococcus aureus* antibiogram at different concentrations (12, 20 and 30%) of sage leaf extract. B: unpermeated control, A: Amoxiciline, OH: 70% alcohol.

Cuadro 2. Efecto inhibitorio in vitro de un extracto de hojas de salvia blanca (*Sphacele salviae*) sobre bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) después de 24 h de incubación.

Table 2. In vitro inhibitory effect of white sage (*Sphacele salviae*) leaves extract on Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) and Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) after 24 h of incubation.

Bacteria	Tratamientos	Dosis	Halo de inhibición (mm)*
Gram positivas			
<i>Staphylococcus aureus</i>	TA Amoxicilina	30µg	34,31 ± 1,95 a
	T300 Extracto 300 mg mL ⁻¹	20µL	17,32 ± 1,52 b
	T200 Extracto 200 mg mL ⁻¹	20µL	13,92 ± 2,04 c
	T120 Extracto 120 mg mL ⁻¹	20µL	10,69 ± 1,57 d
	TOH Testigo Alcohol 70%	20µL	6,00 ± 0,00 e
	B Testigo sin impregnar	20µL	6,00 ± 0,00 e
<i>Bacillus cereus</i>	TA Ciprofloxacino	5µg	25,52 ± 0,84 a
	T300 Extracto 300 mg mL ⁻¹	20µL	13,74 ± 0,47 b
	T200 Extracto 200 mg mL ⁻¹	20µL	12,06 ± 0,42 c
	T120 Extracto 120 mg mL ⁻¹	20µL	9,61 ± 0,44 d
	TOH Testigo Alcohol 70%	20µL	6,00 ± 0,00 e
	TB Testigo sin impregnar	20µL	6,00 ± 0,00 e
Gram negativas			
<i>Escherichia coli</i>	TA: Ciprofloxacino	5µg	37,20 ± 1,16 a
	T300: Extracto 300 mg mL ⁻¹	20µL	7,31 ± 0,43 b
	T200: Extracto 200 mg mL ⁻¹	20µL	6,41 ± 0,47 bc
	T120: Extracto 120 mg mL ⁻¹	20µL	6,00 ± 0,00 c
	TOH: Testigo Alcohol 70%	20µL	6,00 ± 0,00 c
	TB: Testigo sin impregnar	20µL	6,00 ± 0,00 c
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TA: Ceftazidime	30µg	24,51 ± 1,28 a
	T300: Extracto 300 mg mL ⁻¹	20µL	8,31 ± 0,21 b
	T200: Extracto 200 mg mL ⁻¹	20µL	6,12 ± 0,07 c
	T120: Extracto 120 mg mL ⁻¹	20µL	6,00 ± 0,00 c
	TOH: Testigo Alcohol 70%	20µL	6,00 ± 0,00 c
	TB: Testigo sin impregnar	20µL	6,00 ± 0,00 c

* Promedio con su respectiva desviación estándar

Para cada especie los promedios unidos por letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey (P < 0,05).

Efecto inhibitorio sobre *E. coli*

En el Cuadro 2 se muestra los halos de inhibición obtenidos en el antibiograma realizado a *E. coli*.

El mejor resultado se obtuvo con el antibiótico Ciprofloxacino, con un halo de inhibición de 37,2 mm, siendo significativamente diferente a los demás tratamientos (p < 0,05), observándose un efecto similar al

utilizar las concentraciones del extracto de salvia blanca de 300 mg mL⁻¹ y de 200 mg mL⁻¹.

El tratamiento 300 mg mL⁻¹ muestra diferencias significativas respecto a los testigos con alcohol y sin impregnar. Aunque el extracto de salvia blanca muestra efecto en la inhibición de esta bacteria, este se encuentra muy por debajo del resultado obtenido con el antibiótico aplicado. Las concentraciones de 200 mg mL⁻¹

y 120 mg mL⁻¹ no se diferenciaron con los testigos, con alcohol y sin impregnar (p>0,05). Las bacterias Gram positivas evaluadas, *S. aureus* y *B. cereus*, fueron inhibidas a partir de 120 mg mL⁻¹, a diferencia de *E. coli*, donde con dosis menores a 300 mg mL⁻¹ no se inhibió su crecimiento.

Efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa*

El análisis de los halos de inhibición del ensayo efectuado sobre *P. aeruginosa* se resume en el Cuadro 2 y Figura 2. El mejor efecto se obtiene mediante la aplicación del antibiótico Ceftazidime con un halo de inhibición de 24,5 mm, seguido por el extracto de salvia de 300 mg mL⁻¹ con 8,3 mm. Los tratamientos 200 mg mL⁻¹ y 120 mg mL⁻¹ fueron iguales entre sí y sin diferencias significativas respecto de los testigos (p>0,05).

Las bacterias *P. aeruginosa* y *E. coli*, no fueron inhibidas con la menor dosis del extracto de salvia blanca probada, a diferencia de las Gram positivas, que si lo fueron. Las bacterias Gram negativas requieren al menos dosis de 300 mg mL⁻¹ para ser inhibidas. En este estudio, la inhibición producida por el extracto de hojas de salvia blanca sobre *P. aeruginosa* fue mayor a la obtenida en *E. coli*.

DISCUSIÓN

Este estudio, entrega los primeros antecedentes en Chile, respecto de los efectos antibacterianos obtenidos del extracto foliar de la especie salvia blanca (*Sphacele salviae*) sobre algunos agentes bacterianos gram positivos y gram negativos.



Figura 2. Antibiograma de *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones (12, 20 y 30%) de un extracto de hojas de salvia blanca. B: testigo sin impregnar, C: Ceftazidime, OH: alcohol 70%.

Figure 2. *Pseudomonas aeruginosa* antibiogram at different concentrations (12, 20 and 30%) of a sage leaf extract. B: unpermeated control, C: Ceftazidime, OH: 70% alcohol.

Como ya se ha señalado anteriormente, el extracto de hojas de salvia blanca está compuesto por distintos tipos de fenoles que ayudarían a inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas: *S. aureus* y *B. cereus*, en las que se observó un marcado efecto antimicrobiano. Estudios realizados con extracto etanólico-acuoso de *Capsicum annum*, *L. grossum* Sendt y *R. officinalis* L, demuestran actividad antibacteriana contra *S. aureus*, lográndose la inhibición de su crecimiento, lo que se atribuye principalmente a compuestos con estructura polifenólica, que promueven la lisis celular (Monroy et al., 2007).

Horiuchi et al. (2007) indican que el carnosol y el ácido carnósico aislados de un extracto crudo de salvia común, actúan de manera sinérgica, inhibiendo débilmente las bacterias Gram positivas *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* y *Staphylococcus aureus*, sin embargo, no tienen efecto sobre el crecimiento de las bacterias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*. Esto sería una consecuencia de que tanto el carnosol como el ácido carnósico aumentan la permeabilidad de la membrana celular en las bacterias Gram positivas, mientras que en las Gram negativas la presencia de la membrana externa u “otra” membrana, dificultaría este ingreso (Horiuchi et al., 2007). En el presente estudio, sin embargo, se obtuvieron resultados más satisfactorios que los descritos por este autor.

En otra experiencia realizada con romero, en un estudio *in vitro* descrito por Bernardes et al. (2010), se evaluó la capacidad inhibitoria de un extracto crudo en base a etanol, obtenido de hojas y tallos sobre distintos microorganismos responsables de iniciar caries: *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, y *Enterococcus faecalis*, identificándose al carnosol y ácido carnósico como los compuestos con mayor actividad inhibitoria. Cardile et al. (2009) probaron el efecto de aceites esenciales de *Salvia bracteata* y *Salvia rubifolia* colectadas en el Líbano sobre distintas bacterias Gram positivas, demostrando inhibición sobre *S. aureus* y *B. cereus*, a concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de 50 µg mL⁻¹. Indican que este efecto puede deberse a la alta concentración de β-cariofileno. Por otra parte Kivrak et al. (2009) comprobaron que el aceite esencial obtenido de *Salvia potentillifolia* también tiene un efecto de control sobre los mismos microorganismos, señalando que la composición química de los aceites aislados desde plantas del género *Salvia* incluye mayoritariamente 1,8-cineol (eucaliptol) y borneol.

Otros estudios coinciden en que los extractos vegetales provocan mejor efecto antibacteriano sobre agentes Gram positivos, obteniendo mayor respuesta inhibitoria *in vitro*, como es el caso de Horiuchi et al. (2007) con el extracto de *S. officinalis* quienes no observan efecto sobre *E. coli*, *P. aeruginosa* ni *Serratia marcescens*, todas correspondientes a bacterias Gram negativas. Ebrahimabadi et al. (2010) señalan que el aceite esen-

cial de *Salvia eremophila* tiene un efecto pronunciado sobre *E. coli* con una valor MIC mayor a 500 mg mL⁻¹.

Moreira *et al.* (2005) evaluaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), árbol de té (*Melaleuca alternifolia*), romero (*R. officinalis*), menta (*Mentha piperita*), rosa moschata (*Rosa moschata*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), limón (*Citrus limonum*), orégano (*Origanum vulgare*), pino (*Pinus silvestris*) y albahaca (*Ocimum basilicum*) sobre la supervivencia y el crecimiento de diferentes cepas de *E. coli*, donde se identificó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* contra varias cepas de *E. coli*. Klancnik *et al.* (2009), muestran que a partir de un extracto de *R. officinalis* se inhibió el crecimiento de bacterias mayormente del tipo Gram positivas, específicamente *B. cereus* y *S. aureus*, indicando que la actividad antimicrobiana depende de la naturaleza química y concentración de los compuestos fenólicos en los extractos. En concordancia con los resultados del presente estudio, Cardile *et al.* (2009) tampoco encontraron mayor efecto de aceites esenciales de *S. bracteata* y *S. rubifolia*, sobre bacterias Gram negativas.

En general el extracto de salvia blanca ejerció inhibición del crecimiento de bacterias Gram positivas, pero con efectos menores en comparación con los ejercidos por los fármacos antimicrobianos. A diferencia de las bacterias Gram negativas donde el extracto de salvia prácticamente no ejerció efecto inhibitorio. Ello puede explicarse al menos parcialmente, si se considera la naturaleza o estructura bioquímica de la pared de la célula Gram positiva, la que está formada por una única capa homogénea de 20 a 80 nm de grosor, de peptidoglicano ubicado por encima de la membrana plasmática. Por el contrario la pared de la célula Gram negativa es bastante más compleja y posee una capa de peptidoglicano (2 a 7 nm de grosor), rodeada por una membrana externa (7 a 8 nm) u "otra membrana" de naturaleza semejante a la membrana citoplasmática. Una de las funciones más importantes de la membrana externa es servir como barrera protectora, evitando o disminuyendo la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían destruir o lesionar la bacteria. Esto hace suponer que probablemente el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas descrito por Horiuchi *et al.* (2007) en el caso de la salvia común, sea similar al mecanismo de acción ejercido por el extracto de salvia blanca, es decir, actuaría sobre la permeabilidad de la membrana celular, haciendo más sensibles a las bacterias Gram positivas. En cambio, las bacterias Gram negativas, por presentar una doble membrana, dificultarían el ingreso del compuesto al interior celular.

En un estudio con un extracto acetónico de hojas de *S. officinalis*, se identificó actividad antimicrobiana de esta especie, presentando como responsables a compuestos

triterpénicos, principalmente al ácido oleanólico y el ácido ursólico, quienes intervienen en la inhibición de crecimiento de bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. En el presente estudio, llama la atención que el efecto del extracto de salvia blanca sobre *E. coli* fue menos efectivo que sobre *Pseudomonas aeruginosa*, esta última considerada una bacteria invasiva y que en general, presenta resistencia a un gran número de antibióticos y a varios desinfectantes.

Está comprobado que los componentes fenólicos, timol y carvacrol, tienen actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, efecto que también se ejercería sobre la membrana celular bacteriana.

Considerando la alta multiresistencia a antimicrobianos que presentan diversos microorganismos patógenos en la actualidad, la utilización de extractos de plantas en combinación con antibióticos tradicionales, ha demostrado el desarrollo de un importante sinergismo, que permite reducir tanto las dosis de antibióticos necesarias, como el desarrollo de mecanismos de resistencia antimicrobiana. Lo anterior se presenta como una promisorio alternativa para el combate de las infecciones bacterianas, causadas por la aparición de diversos mecanismos utilizados por los microorganismos para inactivar o impedir el ingreso del antibiótico, generando la llamada resistencia bacteriana (Hemaiswarya *et al.*, 2008). Por ello es necesario realizar estudios de separación de los distintos compuestos químicos activos del extracto de salvia blanca, para evaluar su comportamiento sobre cada microorganismo y la toxicidad que pueda tener sobre hospederos animales y humanos. Otro aspecto que debe ser considerado, es el estudio comparativo del efecto antimicrobiano de estas plantas, dependiendo de su lugar de origen o procedencia y en diferentes estaciones del año.

CONCLUSIONES

La salvia blanca posee efectos inhibitorios sobre bacterias, especialmente Gram positivas, alcanzando una mayor inhibición en concentraciones de 300 mg mL⁻¹.

En las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *Bacillus cereus*, se obtuvo una inhibición a partir de una concentración de 120 mg mL⁻¹ del extracto de hojas de salvia blanca.

En las bacterias Gram negativas *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, en cambio, se requirió una concentración de 300 mg mL⁻¹ para alcanzar algún grado de inhibición.

REFERENCIAS

- BERNARDES, A., LUCARINI, R., TOZATTI M., SOUZA, M., ANDRADE M., DA SILVA, A. MARTINS C. MILLER, A., PAULETTI, P., GROppo M., CUNHA, W. 2010, Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against Oral Patho-

- gens: Relevance of Carnosic Acid and Carnosol. Chemistry & Biodiversity 7: 1835-1840.
- CARDILE, V., RUSSO, A., FORMISANO, C., RIGANO D., SANATORE, F., APOLOSTOLIDES ARNOLD, N., PIOZZI, F. 2009. Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. Journal of Ethnopharmacology 126: 265-272.
- EBRAHIMABADI, A., MAZOOCHI, A., KASHI, F.J., DJAFARI-BIDGOLI, Z., BATOOLI, H. 2010. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss from Iran. Food and Chemical Toxicology 48(5): 1371-1376.
- ESCUDE, B., TORRES, R., LISSI, E., LABBÉ, C., FAINI, F. 2002. Antioxidant capacity of abietans from *Sphacele salviae*. Natural Product Letters 16(4): 277-281.
- HEMAISWARYA, S., KRUTHIVENTI, A., DOBLE M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine 15: 639-652.
- HOFFMANN, A., FARGA, C., LASTRA, J., VEGHAZI, E. 1992. Plantas medicinales de uso común en Chile. Ediciones Claudio Gay. Santiago.
- HORIUCHI, K., SHIOTA, S., KURODA, T., HATANO, T., YOSHIDA, T., TSUCHIYA, T. 2007. Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. Biological & Pharmaceutical Bulletin 30(2): 287-290.
- KLANCNIK, A., GUZEJ, B., KOLAR, M.H., ABRAMOVIC, H., MOZINA, S. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. Journal of Food Protection 72(8): 1744-52.
- KIVRAK, I., DURU, M.E., ÖZTÜRK, M., MERCAN, N., HARMANDAR, M., TOPCU, G. 2009. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. Food Chemistry 116: 470-479.
- LABBÉ, C., FAINI, F., CALDERÓN, D. 2010. Estudio comparativo entre *Lepechinia salviae* (Lindl.) Epling, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis*, como fuentes alternativas de ácido carnósico y carnosol. En: 29° Congreso Latinoamericano de Química. Cartagena de Indias, Colombia.
- MONROY, A., GONZÁLEZ, R., GARCÍA, I., TOTOSAUS, A., MINOR, H. 2007. Actividad antimicrobiana de extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y Chile ancho (*Capsicum annuum* L. grossum Sendt). En: 12° Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, México.
- MONTENEGRO, G. 2000. Chile nuestra flora útil. Guía de uso Apícola, Medicinal, Folclórica, Artesanal y Ornamental. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago.
- MOREIRA, M., PONCE, A.G., DEL VALLE, C., ROURA, S. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food-borne pathogen. Food Science and Technology International 38(5): 565-570.
- NIEMEYER, H. 2014. Quantitative screening for alkaloids of native vascular plant species from Chile: biogeographical considerations. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 13(1): 109-116.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2014. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. Comunicado de prensa. Consulta diciembre 2014. Disponible en: < <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/> >
- PEÑA, R., MONTENEGRO, G., ITURRIAGAL, Y., TIMMERMANN, B. 2000. *Sphacele salviae*, un recurso de medicina tradicional chilena poco conocido. Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas y Matemáticas 24(91): 193-199.
- SILVA, F., CIFUENTES, M., PINTO, M. 2011. Resultados de la vigilancia de susceptibilidad antimicrobiana en Chile: Consolidando una red. Revista Chilena de Infectología 28(1): 19-27.
- WALLACE, R. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proceedings of the Nutrition Society 63: 621-629.