



Efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto foliar de salvia blanca (*Sphacele salviae* (Lindl.) Briq.) sobre diferentes microorganismos patógenos.

Antimicrobial *in vitro* effect of the foliar extract of white sage (*Sphacele salviae* (Lindl.) Briq.) on different pathogenic microorganisms.

Westmoreland, A.^a, Maier, L.^a, Oberpaur, C.^a

^aFacultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria; Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Ejército 146, Casilla 8370003, Santiago, Región Metropolitana, Chile.

ARTICLE INFO

Keywords:

Medicinal plants
Dilution assay
Natural antimicrobials

Original Research Article,
Crop Science

*Corresponding author:

Allison Westmoreland
E-mail address:
awestmorelandr@gmail.com

ABSTRACT

White salvia (*Sphacele salviae*) is an endemic plant from the central zone of Chile, which has attributed antimicrobial properties. An *in vitro* research was performed with the objective of determining the antimicrobial effect of the White salvia plant extract concentrated to 50% w/w in different dilutions on Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*), Gram negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and a yeast-like fungus (*Candida albicans*). A steam drag extraction method with dichloromethane was used to obtain the extract which was then diluted in two vehicles (99.9% alcohol and 0.2% acidity extra virgin olive oil). The biological activity of the compound on the different pathogens was measured using antimicrobial sensitivity tests, with the agar diffusion method (Kirby Bauer). The results demonstrated a higher antimicrobial activity from the extract in Gram positive bacteria (*S. aureus* and *S. agalactiae*) than in Gram negative bacteria. *P. aeruginosa* showed a low antimicrobial sensitivity. There was no inhibitory effect on *E. coli*, while *C. albicans* yeast showed an intermediate sensitivity towards the olive oil diluted extract.

RESUMEN

Salvia blanca (*Sphacele salviae*) es una planta endémica de la zona central de Chile, a la cual se le atribuyen propiedades antimicrobianas. Se realizó un estudio *in vitro* con el objetivo de determinar el efecto antimicrobiano del extracto de la planta de Salvia blanca concentrado al 50% p/p en diferentes diluciones sobre bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*), Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y un hongo levaduriforme (*Candida albicans*). Para obtener el extracto se utilizó el método de extracción por arrastre de vapor con diclorometano, luego se diluyó el extracto en dos vehículos (alcohol 99,9% y aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez). La medición de la actividad biológica del compuesto sobre los diferentes patógenos se efectuó mediante pruebas de sensibilidad antimicrobiana, por el método de difusión en agar (Kirby Bauer) El estudio demostró mayor actividad antimicrobiana del extracto en bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *S. agalactiae*), que en bacterias Gram negativas. *P. aeruginosa* presentó baja sensibilidad antimicrobiana. No se observó efecto inhibitorio alguno sobre *E. coli*. Mientras que la levadura *C. albicans*, mostró una sensibilidad intermedia frente al extracto diluido en aceite de oliva.

Palabras clave: Plantas medicinales, ensayo de dilución, antimicrobianos naturales.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la resistencia a los antimicrobianos constituye un problema de salud pública cada vez más frecuente en la atención de salud (OMS, 2014). Desde un punto de vista práctico, una bacteria resistente se define como aquella que es capaz de multiplicarse en presencia de concentraciones mayores que las alcanzadas con dosis terapéuticas (García, 2003). Según la OMS (2018b), las bacterias resistentes más frecuentes son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella spp.*

La resistencia a los antibióticos demanda la búsqueda de nuevos compuestos efectivos contra microorganismos patógenos. Una alternativa son los compuestos fitoquímicos activos, con propiedades antimicrobianas, debido principalmente a la acción de metabolitos secundarios presentes en las plantas que incluyen monoterpenos, glicoesteroides, flavonoides y polifenoles (Wallace, 2004), 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).

Salvia blanca (*Sphacele salviae* (Lindl.) Briq.), pertenece a la familia Lamiaceae, plantas aromáticas labiadas, provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles (Fernández y Rivera, 2006). *S. salviae* es un arbusto nativo chileno que habita en terrenos arenosos de los cerros costeros desde la desembocadura del Río Limarí (IV Región) hasta Tiltil (Región Metropolitana) (Montenegro, 2000), es parte de las comunidades del matorral siempre verde de la zona central de Chile (Montenegro, 2000; Valdatara, 2001). Escuder *et al.* (2002), describieron la cobertura de la epidermis de *S. salviae* sugiriendo que los tricomas glandulares serían los responsables de los productos bioactivos, incluyendo derivados antraquinónicos y del ácido cafeico. 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).

La actividad farmacológica informada de abietanes fenólicos y ácido ursólico, que ayudarían a inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas: *S. aureus* y *B. cereus*, así como su uso potencial como aditivos alimentarios, debido a sus propiedades antioxidantes, confirman que *S. salviae* es una interesante fuente de compuestos bioactivos que podrían ser explotadas con fines terapéuticos e industriales (Escuder *et al.*, 2002).

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto inhibitorio del extracto de salvia blanca concentrado al 50% p/p usando diferentes diluciones frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y un hongo levadurifome.

MATERIALES Y MÉTODO

El estudio se realizó en los laboratorios de Ciencias Básicas y el de Microbiología de la Universidad Santo Tomás (UST), Santiago, Región Metropolitana, Chile.

Material vegetal

Las plantas utilizadas en este estudio, se encontraban en estado de floración, las cuales fueron obtenidas mediante propagación vegetativa por el método de estaca semileñosa desde plantas silvestres, y una vez enraizadas fueron establecidas en macetas bajo condiciones de invernadero. En el mes de diciembre del 2015 (verano), se recolectaron 850 g de hojas frescas de salvia blanca de la colección de plantas del campus experimental Catemito de la Universidad Santo Tomás (UST), comuna de San Bernardo, Región Metropolitana (Coordenadas GPS UTM -33.6117894, -70.73541009999997).

Material microbiológico y de laboratorio

Se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12386), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) y *Candida albicans* (ATCC 10231) procedente de American Type Culture Collection (ATCC) de la colección de cultivos de la Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria de la UST. Las cepas bacterianas se cultivaron durante 24 horas a 37 °C en agar nutritivo (Merck S.A.), mientras que la cepa de hongo se cultivó durante 24 a 48 horas a 37 °C utilizando agar Sabouraud (BD BBL™). Durante el desarrollo del ensayo se realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas para el aislamiento, identificación y mantención de las cepas. También los microorganismos fueron observados bajo microscopía óptica (Microscopio Labomet modelo CXRII, Los Ángeles, California, Estados Unidos).

Metodología

Obtención del extracto seco

Para la obtención del extracto seco de Salvia blanca se adaptó la metodología usada por Escuder *et al.* (2002). De la muestra inicial se separaron las hojas del tallo y flores, se pesó la muestra de hojas, obteniendo 850 g de peso húmedo, estas fueron secadas a temperatura ambiente (20 °C) por 18 días. Una vez secadas, se realizó la molienda en un mortero y luego se determinó el peso seco, que fue de 719,33 g. Luego, la muestra fue depositada en un vaso precipitado de 1 L, al cual se le agregó 8.770 mL de diclorometano (99,9%) hasta cubrir totalmente las hojas, por 45 minutos, luego la solución se filtró mediante bomba al vacío (Suction Units modelo SU-660, Chile) y un embudo con papel filtro (100 mm). La solución fue traspasada al rotavapor (IKA RV 05 Basic modelo RV 05BS28, Shanghai, China) a 40 °C. Una vez obtenido el extracto, se pesó, obteniendo 62,9 g y se calculó el rendimiento, que fue de 8,74%. Este porcentaje se obtuvo al relacionar el peso del extracto y el peso seco inicial de las hojas de salvia.

Elaboración de solución madre

El extracto seco obtenido se dividió en dos partes iguales de 31,45 g, cada parte a su vez se concentró al 50% p/p, ocupando dos solventes distintos en cada dilución: etanol 99,9% y aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez. La solución se conservó bajo refrigeración a 4 °C por 15 días y se protegió de la luz para evitar fotodescomposición.

Tratamientos

El extracto de *Sphacele salviae* en alcohol al 99,9% y aceite de oliva extra virgen fue probado frente a un pa-

nel de microorganismos usando diferentes diluciones de la solución madre, se utilizó una concentración de 200 mg mL⁻¹ para *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, de 300 mg mL⁻¹ en el caso de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. También, se evaluó la acción de los móviles de forma individual frente a los microorganismos y como control positivo se utilizó Amoxicilina + ácido clavulánico 30 µg (Oxoid), Cephadrine 30 µg (Oxoid), Estreptomina 300 µg (Oxoid), Ciprofloxacino 5 µg (BD BBL™) y Flucanazol 25 µg (BD BBL™). Se debe destacar que los sensidiscos impregnados con antibiótico fueron dispuestos en la misma placa, con el fin de evitar errores de medición a la hora de evaluar resultados del sensidisco impregnado con extracto de hoja de la planta en estudio.

Evaluación de la capacidad inhibitoria del extracto seco de *Salvia blanca* concentrado al 50% p/p sobre diferentes microorganismos

Las diluciones fueron vertidas en vasos precipitados estériles de 50 mL. Con una micropipeta se impregnó cada sensidisco blanco con 20 µL de solución, según el tratamiento correspondiente. Luego, se dejaron reposar por 20 min, se secaron con papel esterilizado en la estufa de secado (Labconco modelo ZFD-A5140, Kansas, Misuri, Estados Unidos) a 120 °C por 30 min. Una vez secos, los sensidiscos se depositaron en vasos precipitados estériles de 20 mL, para luego ser aplicados en el antibiograma. Con el fin de determinar el efecto del extracto sobre las bacterias en estudio, se utilizó el método de difusión en agar (Kirby Bauer), en medio Mueller Hinton (BD). En el caso de *Candida albicans* se utilizó la metodología descrita en el documento del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) 2008, para levaduras modificado, el cual recomienda la utilización del medio MHGBM: Mueller Hinton con 2% de glucosa y 0,5 µg mL⁻¹ de azul de metileno, siendo estos incorporados al medio y esterilizado en autoclave (All American, modelo NO.25 X, Juárez, México) a 121 °C por 20 min. Una vez depositados los sensidiscos, las placas fueron incubadas en una estufa de cultivo (Mettler modelo 400, Schwabach, Alemania) a 35-37 °C por 24 h en el caso de las bacterias, y 48 h en el caso de *C. albicans*. Transcurrido ese tiempo se realizó la lectura del halo de inhibición usando pie de metro, considerando como inhibición del crecimiento de los microorganismos un diámetro mayor a 6 mm, correspondiente al diámetro estándar de los sensidiscos utilizados.

Descripción del diseño experimental

Para cada microorganismo se aplicó un diseño experimental aleatorio en bloques, con 6 tratamientos y 5 repeticiones, cambiando el vehículo a usar. La unidad experimental correspondió a cada sensidisco, los cua-

les se dividieron en tres placas Petri, los sensidiscos fueron distribuidos al azar dentro de la placa.

Análisis Estadístico

Se realizó test de normalidad de Shapiro- Wilk. Como los datos siguieron una distribución normal, se utilizó análisis de varianza ANOVA para un factor. Los tratamientos con diferencias significativas se les realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey (p-valor ≤ 0,05). Los datos fueron procesados con el programa computacional estadístico MINITAB 17.

RESULTADOS

Mediante los respectivos antibiogramas efectuados sobre cepas Gram positivas y Gram negativas usando un extracto de *Salvia blanca* concentrado al 50% p/p se obtuvo el mayor efecto inhibitorio, estadísticamente significativo (p < 0,05) sobre cepas Gram positivas.

Actividad inhibitoria del extracto de *Salvia blanca* sobre bacterias Gram positivas

A continuación se observa las respuestas de crecimiento de las bacterias Gram positivas: *S. aureus* y *S. agalactiae*, evaluadas in vitro frente al extracto de hojas de *Salvia blanca* concentrado al 50% p/p y en dilución de 200 mg mL⁻¹.

Para *S. aureus* (Cuadro 1) la mayor inhibición se obtiene usando el antibiótico Amoxicilina con un halo de 29,6 ± 0,5 mm de diámetro, seguido por el extracto con aceite de oliva, halo de 22,0 ± 1,2 mm de diámetro (p < 0,05), el cual presenta diferencias estadísticamente significativas en relación del extracto de hojas de salvia con alcohol, inhibición de 20,2 ± 0,4 mm de diámetro. Los sensidiscos impregnados con alcohol al 99,9%, aceite de oliva y sin impregnar, no provocaron inhibición en el crecimiento de la bacteria. El alcohol de 99,9% 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).

En el caso de *S. agalactiae* (Cuadro 1), el tratamiento con el antibiótico Cephadrine presentó mayor halo de inhibición correspondiente a 24,8 ± 0,8 mm de diámetro, presentando diferencia estadísticamente significativa con el extracto diluido en aceite de oliva extra virgen con un halo de 14,0 ± 2,2 mm de diámetro. El efecto de inhibición del extracto disminuye usando alcohol al 99,9% con un halo de 13,4 ± 0,5 mm de diámetro. A pesar de lo mencionado anteriormente, las medias no presentaron diferencias significativas, por lo que el efecto inhibitorio del extracto es independiente del tipo de móvil usado.

Cuadro 1. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto de hoja de Salvia blanca concentrado al 50% p/p, en alcohol 99,9% y aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez sobre Gram positivos incubados a 37 °C por 24 horas.

Table 1. *In vitro* inhibitory effect of white sage extract with a concentration of 50% p/p, diluted in alcohol at 99.9% and extra virgin olive oil 0.2% acidity on Gram positive incubated at 37 °C for 24 hours.

M.O.	Tratamiento	Dosis	Halo de inhibición [mm] *	Agrupación
Gram positivas				
<i>S. aureus</i>	Amoxicilina	30µg	29,6 ± 0,5	a
	E-AO 200 mg mL ⁻¹	20µL	22,0 ± 1,2	b
	E-AL 200 mg mL ⁻¹	20µL	20,2 ± 0,4	c
	AL	20µL	0	d
	AO	20µL	0	d
	SN (control)		0	d
<i>S. agalactiae</i>	Cephadrine	30µg	24,8 ± 0,8	a
	E-AO 200 mg mL ⁻¹	20µL	14,0 ± 2,2	b
	E-AL 200 mg mL ⁻¹	20µL	13,40 ± 0,5	b
	AL	20µL	0	c
	AO	20µL	0	c
	SN (control)		0	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).

M.O.: Microorganismo; E-AL: Extracto en alcohol 99,9%; E-AO: Extracto en aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez; AL: Alcohol 99,9%; AO: Aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez; SN: Testigo sin impregnar (blanco).

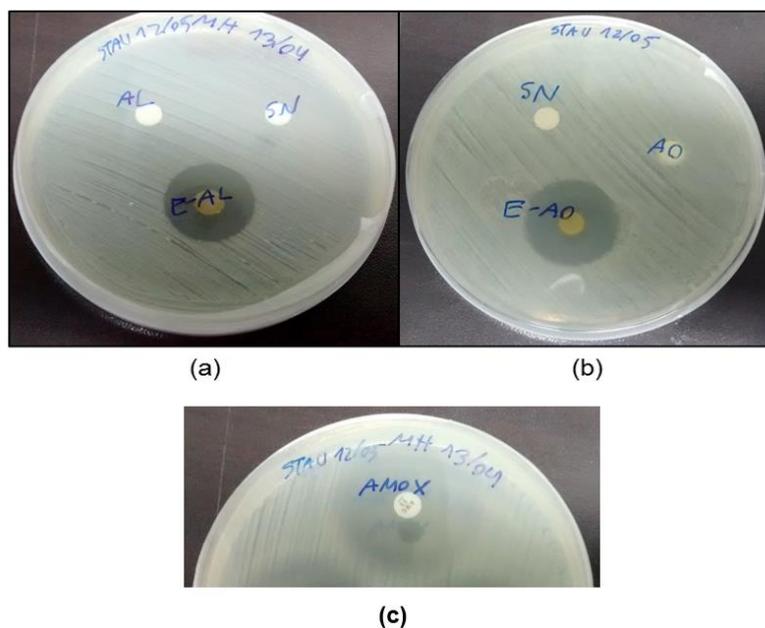


Figura 1. Antibiograma realizado a *Staphylococcus aureus*. **(a)** Alcohol 99,9% (AL) sin formación de halo de inhibición, Testigo sin impregnar (SN) sin formación de halo de inhibición, Extracto en alcohol 99,9% (E-AL) con formación de halo de inhibición, **(b)** Aceite de oliva (AO) sin formación de halo de inhibición, Testigo sin impregnar (SN) sin formación de halo de inhibición, Extracto en aceite de oliva (E-AO) con formación de halo de inhibición y **(c)** Amoxicilina.

Figure 1. Antibiogram performed on *Staphylococcus aureus*. **(a)** Alcohol 99.9% (AL) without formation of inhibition halo, Non-impregnated control (SN) without formation of inhibition halo, 99.9% alcohol extract (E-AL) with formation of inhibition halo, **(b)** Olive oil (AO) without formation of inhibition halo, Witness without impregnation (SN) without inhibition halo formation, Olive oil extract (E-AO) with formation of inhibition halo and **(c)** Amoxicilina.

Actividad inhibitoria del extracto de Salvia blanca 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* concentrado al 50% p/p y en dilución de 300 mg mL⁻¹.

El extracto de hojas de Salvia blanca disuelto en los dos móviles, alcohol 99,9% y aceite de oliva, no mostró ninguna actividad inhibitoria frente a la bacteria Gram negativa *E. coli* (Cuadro 2), a diferencia del antibiótico Ciprofloxacino con un halo de 38,4 ± 1,1 mm.

El análisis de los halos de inhibición del ensayo efectuado sobre *P. aeruginosa* se resume en el Cuadro 1 y Figura 2. El mayor efecto se obtiene mediante la aplicación del antibiótico Estreptomina, presentando diferencias estadísticamente significativas con el extracto diluido en alcohol al 99,9% con un halo de inhibición de 9,6 ± 1,5 mm de diámetro, seguido por el extracto de salvia diluido en aceite de oliva con un halo de 9,0 ± 1,0 mm de diámetro. Cabe destacar que las medias entre el extracto diluido en alcohol al 99,9% y aceite de oliva no presentaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que ambos medios tendrían efectos similares.

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*.

Actividad inhibitoria del extracto de Salvia blanca sobre un hongo levaduriforme

Para *C. albicans* usando una dilución de 300 mg mL⁻¹, los móviles alcohol 99,9% y aceite de oliva extra virgen no mostraron acción inhibitoria frente al microorganismo (Cuadro 3) (Figura 3). El antifúngico Fluconazol presento un halo de 34,4 ± 0,8 mm de diámetro, a diferencia del extracto de hoja de salvia blanca disuelto en alcohol, que no provocó inhibición frente a este hongo, en comparación al extracto disuelto en aceite de oliva, el cual mostró un halo de inhibición de 8,6 ± 0,5 mm de diámetro.

DISCUSIÓN

En este estudio, se pudo evidenciar la inhibición del crecimiento microbiano al confrontar algunas cepas frente al extracto foliar de salvia blanca perteneciente a la familia Lamiaceae usando diferentes concentraciones, las cuales se basaron en un estudio realizado por Maier *et al.* (2014), en donde se evidenció que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de *S. salviae* era de 150 mg mL⁻¹ para bacterias Gram positivas y 300 mg mL⁻¹ en el caso de bacterias Gram negativas. En el caso del hongo patógeno, no se presentan referencias en torno a la CMI del extracto, pero en

Cuadro 2. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto de hoja de Salvia blanca concentrado al 50% p/p, en alcohol 99,9% y aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez sobre Gram negativos incubados a 37 °C por 24 horas.

Table 2. *In vitro* inhibitory effect of white sage extract with a concentration of 50% p/p, diluted in alcohol at 99.9% and extra virgin olive oil 0.2% acidity on Gram negative incubated at 37 °C for 24 hours.

Gram negativas				
<i>E. coli</i>	Ciprofloxacino	5µg	38,4 ± 1,1	a
	E-AO 300 mg mL ⁻¹	20µL	0	b
	E-AL 300 mg mL ⁻¹	20µL	0	b
	AL	20µL	0	b
	AO	20µL	0	b
	SN (control)		0	b
<i>P. aeruginosa</i>	Estreptomina	300µg	21 ± 2,6	a
	E-AO 300 mg mL ⁻¹	20µL	9,0 ± 1,0	b
	E-AL 300 mg mL ⁻¹	20µL	9,6 ± 1,5	b
	AL	20µL	0	c
	AO	20µL	0	c
	SN (control)		0	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).

M.O.: Microorganismo; E-AL: Extracto en alcohol 99,9%; E-AO: Extracto en aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez; AL: Alcohol 99,9%; AO: Aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez; SN: Testigo sin impregnar (blanco).

un estudio realizado por Davacino *et al.* (2007), se evidenció que las decocciones de *G. gaudichaudianum*, *B. trimera* y *S. terebenthifolius* inhibieron el crecimiento de *C. albicans* con un valor de MIC de 250 mg mL⁻¹, por

lo que se aumentó la concentración esperando evidenciar una mayor inhibición en el crecimiento.

Según la literatura, la acción del extracto de hoja de salvia blanca se atribuye a los metabolitos secundarios,

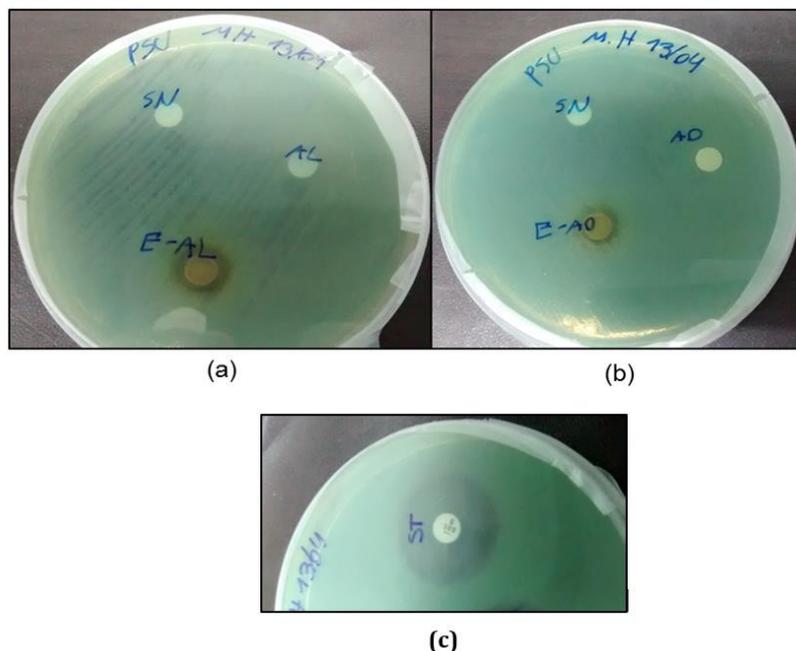


Figura 2. Antibiograma realizado a *Pseudomonas aeruginosa*. **(a)** Alcohol 99,9% (AL) sin formación de halo de inhibición, Testigo sin impregnar (SN) sin formación de halo de inhibición, Extracto en alcohol 99,9% (E-AL) con formación de halo de inhibición, **(b)** Aceite de oliva (AO) sin formación de halo de inhibición, Testigo sin impregnar (SN) sin formación de halo de inhibición, Extracto en aceite de oliva (E-AO) con formación de halo de inhibición y **(c)** Estreptomycina.

Figure 2. Antibiogram performed on *Pseudomonas aeruginosa*. **(a)** Alcohol 99.9% (AL) without formation of inhibition halo, Non-impregnated control (SN) without formation of inhibition halo, 99.9% alcohol extract (E-AL) with formation of inhibition halo, **(b)** Olive oil (AO) without formation of inhibition halo, Witness without impregnation (SN) without formation of inhibition halo, Olive oil extract (E-AO) with formation of inhibition halo and **(c)** Streptomycin.

Cuadro 3. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto de hoja de Salvia blanca concentrado al 50% p/p, en alcohol 99,9% y aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez sobre hongo levaduriforme incubado a 37 °C por 24-48 horas.

Table 3. *In vitro* inhibitory effect of white sage extract with a concentration of 50% p/p, diluted in alcohol at 99.9% and extra virgin olive oil 0.2% acidity on yeast-like fungus incubated at 37 °C for 24-48 hours.

Hongo levaduriforme				
<i>C. albicans</i>	Fluconazol	25µg	34,4 ± 0,8	a
	E-AO 300 mg mL ⁻¹	20µL	8,6 ± 0,5	b
	E-AL 300 mg mL ⁻¹	20µL	0	c
	AL	20µL	0	c
	AO	20µL	0	c
	SN (control)		0	

*Promedio con su respectiva desviación estándar

Los promedios unidos por letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey (P< 0,05).

M.O.: Microorganismo; E-AL: Extracto en alcohol 99,9%; E-AO: Extracto en aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez; AL: Alcohol 99,9%; AO: Aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez; SN: Testigo sin impregnar (blanco).

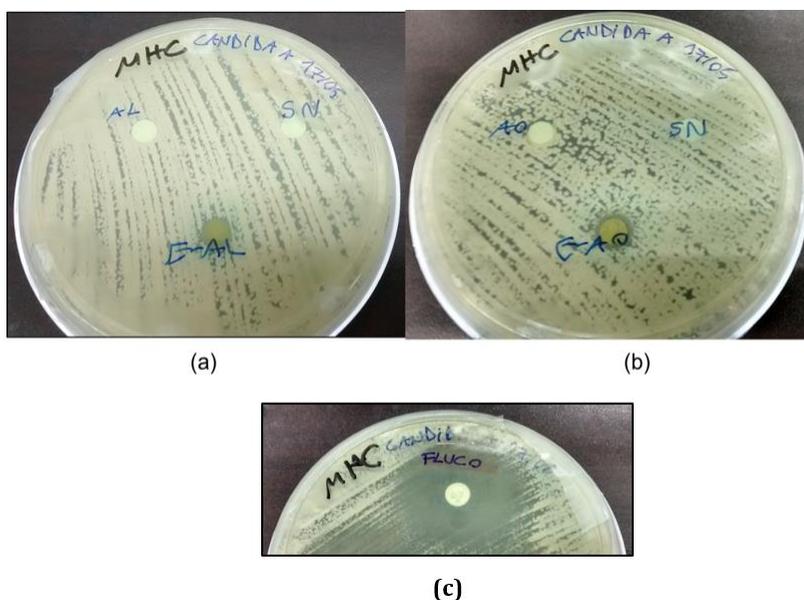


Figura 3. Antibiograma realizado a *Candida albicans*. **(a)** Alcohol 99,9% (AL) sin formación de halo de inhibición, Testigo sin impregnar (SN) sin formación de halo de inhibición, Extracto en alcohol 99,9% (E-AL) sin formación de halo de inhibición, **(b)** Aceite de oliva (AO) sin formación de halo de inhibición, Testigo sin impregnar (SN) sin formación de halo de inhibición, Extracto en aceite de oliva (E-AO) con formación de halo de inhibición y **(c)** Fluconazol.

Figure 3. Antibiogram performed on *Candida albicans*. **(a)** Alcohol 99.9% (AL) without formation of inhibition halo, Witness without impregnation (SN) without inhibition halo formation, Alcohol extract 99.9% (E-AL) without formation of inhibition halo, **(b)** Olive oil (AO) without formation of inhibition halo, Non-impregnated control (SN) without inhibition halo formation, Olive oil extract (E-AO) with formation of inhibition halo and **(c)** Fluconazole.

mayoritariamente a los compuestos con estructura polifenólica que ayudarían a la inhibición del crecimiento de las bacterias (Ávila *et al.*, 2011), los cuales producen una inhibición enzimática de los compuestos oxidados, mediante reacciones de grupos sulfhidrilo y por interacciones no específicas con proteínas (Domingo y López-Brea, 2003).

Investigaciones han dejado en evidencia la acción inhibitoria de diferentes extractos naturales, como es el caso de un estudio realizado por Barni *et al.* (2009), quienes estudiaron la eficacia antibacteriana *in vivo* de un extracto etanólico de romero (*Rosmarinus officinalis*), perteneciente a la familia Lamiaceae, contra *Staphylococcus aureus*, en dos modelos de infección en piel de ratón. El extracto seco de romero contenía 23% de compuestos fenólicos, 20% de diterpenos fenólicos, 10% de ácido carnósico, 10% de carnosol y un 3% de ácido rosmarínico. Los resultados evidenciaron la acción bactericida del extracto que contenía un 4,6% de polifenoles activos contra *S. aureus*, estos compuestos también están presentes en las hojas de salvia blanca, puesto que esta especie tiene una gran cercanía con salvia y romero, acumulando abietanes fenólicos en altas concentraciones (Escuder *et al.*, 2002).

En el caso del presente estudio, los halos de inhibición logrados frente a *S. aureus* son mayores a los ob-

tenidos por Maier *et al.* (2014), en el cual se probaron diferentes temperaturas de secado para la obtención del extracto y concentraciones etanólico-acuosas del extracto de hojas de *S. salviae*, el que presentó efectos inhibitorios sobre bacterias a partir de una dilución al 20% sobre *Bacillus cereus* y *S. aureus*, generando un promedio de halos de inhibición de hasta 17,3 mm al utilizar una dilución al 30%. Por lo que este estudio evidencia que una concentración mayor del extracto también produce un mayor efecto inhibitorio sobre *S. aureus* específicamente.

Son pocos los estudios documentados de sensibilidad sobre *Streptococcus agalactiae* de compuestos fitoquímicos, pero se ha descrito la acción antimicrobiana de plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae, los cuales presentaron resultados que concuerdan con los obtenidos en este estudio. Un experimento realizado por San Román (2013), que utilizó extracto etanólico de hoja de *Rosmarinus officinalis*, para comprobar su actividad antimicrobiana sobre cultivos de bacterias anaerobias, frecuentes en pacientes con bolsa periodontal, demostró que cepas de *S. mutans*, *S. mitis* y *S. sobrinus*, resultaron susceptibles a la acción del extracto, observándose halos de inhibición de 11 a 20 mm de diámetro, lo cual podría deberse a la acción de compuestos fenólicos, diterpenos fenólicos, ácido

carnósico, carnosol y del ácido rosmarínico (Barni *et al.*, 2009), compuestos presentes en las hojas de salvia blanca (Escuder *et al.*, 2002).

En el caso de *Escherichia coli* (Gram negativa), el extracto de hoja de salvia blanca no presentó acción antimicrobiana. Los resultados obtenidos son similares a los conseguidos por Maier *et al.* (2014), en el cual se ocupó extracto de hoja de Salvia blanca, pero a una concentración etanólica menor, como también lo fue para Ávila *et al.* (2011) a partir de un extracto de *Rosmarinus officinalis*, donde hubo mayor inhibición en el crecimiento de bacterias Gram positivas en comparación a las bacterias Gram negativas.

Los efectos de los mecanismos moleculares de resistencia más comunes en *E. coli*: inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad (Mosquito *et al.*, 2011) podrían ser la respuesta al nulo efecto del extracto de salvia blanca.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, a pesar de ser una bacteria muy resistente a distintos antimicrobianos, algunos estudios han comprobado su susceptibilidad frente a diferentes fitoquímicos, como es el caso de Genena *et al.* (2008), donde se probó un extracto de hoja de romero, obtenido mediante la técnica de fluidos supercríticos (SFE). Los extractos se analizaron y se comprobó su actividad inhibitoria sobre diferentes bacterias, tanto Gram positivas: *S. aureus*, y *B. cereus*, como Gram negativas: *E. coli* y *P. aeruginosa* y efectos antifúngicos sobre *Candida albicans*. Este resultado se explica, puesto que, estos microorganismos son susceptibles a los componentes del extracto de romero, en cuyo compuesto prevalecen el ácido caféico, ácido rosmarínico, carnosol, ácido carnosólico y flavonoides (Centeno y Calva, 2010), los que también están presentes en *Sphacele salviae*. Según el estudio de Escuder *et al.* (2002), esta especie tiene un parecido cercano con salvia y romero, acumulando abietanes fenólicos y ácido ursólico en altas concentraciones.

Las bacterias Gram negativas en general no han mostrado una marcada sensibilidad frente a extractos naturales, pero otros estudios han demostrado que se requiere una mayor concentración de extracto natural para inhibir este grupo bacteriano. Ebrahimabadi *et al.* (2010) señalan que el aceite esencial de *Salvia eremophila* tiene un efecto pronunciado sobre *E. coli* con un valor MIC mayor a 500 mg mL⁻¹, y en el caso del estudio realizado por Montenegro *et al.* (2009), al utilizar un extracto etanólico preparado a partir del musgo nativo *Sphagnum magellanicum* en un ensayo de actividad antibacteriana contra Gram negativas (*Azotobacter vinelandii*, *Erwinia carotovora subsp. carotovora*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*), y Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* tipo B), demostró que el crecimiento de los cultivos de las bacterias Gram negativas se inhibió a una concentra-

ción de 581 mg mL⁻¹ del extracto, mientras que los cultivos de las bacterias Gram positivas, se inhibieron a una concentración de 1,16 mg mL⁻¹ del extracto, valor significativamente más bajo.

Las divergencias de acción del extracto sobre Gram positivas y Gram negativas se pueden explicar por diferencias entre la estructura de la pared celular. En el caso de las Gram positivas, presenta una gruesa pared celular constituida principalmente por peptidoglicano, la cual se ubica por encima de la membrana celular. La superficie externa del peptidoglicano de las bacterias Gram positivas está generalmente cubierta de proteínas. Por el contrario la pared celular de las Gram negativas es mucho más compleja, puesto que presenta tres zonas: la membrana plasmática, el espacio periplásmico que incluye una fina capa de peptidoglicano y la membrana externa. Esta última, exclusiva de las bacterias Gram negativas, la cual es una bicapa lipídica que difiere de otras membranas por su capa externa, que está constituida por una molécula anfipática: el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. Además del LPS, la membrana externa contiene fosfolípidos y proteínas que la unen al peptidoglicano. El LPS está constituido por tres partes: el lípido A, el polisacárido central o del core y la cadena lateral. Una de las funciones más importantes de la membrana externa es servir como barrera protectora. Evita o disminuye la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían destruir o lesionar la bacteria (Tortora *et al.*, 2007).

La acción del extracto de hoja de salvia blanca se atribuye a los metabolitos secundarios, mayoritariamente a los compuestos con estructura polifenólica (Ávila *et al.*, 2011), se ha comprobado por medio de microscopía electrónica de transmisión, que estos compuestos dañan la integridad de la membrana celular bacteriana (García-Ruiz *et al.*, 2012). Observándose un mayor efecto sobre bacterias Gram positivas, las cuales presentan una mayor susceptibilidad a la acción antimicrobiana del extracto.

El hongo levaduriforme, *C. albicans*, mostró sensibilidad frente al extracto de hoja de salvia blanca diluido en aceite de oliva extra virgen, pero no en el extracto diluido en alcohol 99,9%. La literatura muestra información variada frente a los resultados obtenidos. Martínez *et al.* (2000) comprobaron que el extracto fluido (etanol a distintas concentraciones) de *Schinus terebinthifolius* Raddi presentó actividad antimicrobiana a concentraciones de 80, 60, 40, 30, 15, 5 y 1% frente a las bacterias *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, resultados que difieren en el caso de la levadura *C. albicans*, en la cual, el extracto fluido al 80% mostró una buena respuesta inhibitoria y los extractos acuoso y fluido (etanol 30%), demostraron ausencia de actividad inhibitoria. La diferencia en la acción de los extractos disueltos en los diferentes medios se puede explicar por las propiedades de los aceites esenciales. Lo mencionado anteriormente se

respalda por la acción antimicótica de los metabolitos secundarios, en los cuales puede intervenir el carácter lipofílico e hidrofílico de sus grupos funcionales y la polaridad que poseen (Mesa *et al.*, 2004), para desarrollar propiedades antisépticas, antimicrobianas y antimicóticas, siendo esta actividad biológica de mayor a menor en fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes y éteres (Kalamba y Kunicka, 2003). Por ello, se infiere que la acción antimicótica de los compuestos presentes en *S. salviae*, depende de sus características lipofílicas e hidrofílicas, lo que explicaría la mejor capacidad inhibitoria del extracto de Salvia blanca disuelto en aceite de oliva extra virgen frente a *C. albicans*.

Los móviles utilizados no provocaron inhibición sobre los microorganismos, por lo que el alcohol 99,9% y el aceite de oliva extra virgen utilizados para diluir el extracto, no tienen efecto antimicrobiano por sí mismos, por lo tanto, el efecto inhibitorio se atribuye sólo a los compuestos contenidos en las hojas de salvia blanca.

Los resultados obtenidos de los móviles usados en el antibiograma, se respaldan con un estudio realizado por Lineros (2013), en el cual se utilizó un extracto de *S. salviae* en diferentes concentraciones para evaluar su efecto inhibitorio frente a diferentes microorganismos, y como testigo se utilizaron sensibilizadores impregnados con alcohol al 70%, los cuales no provocaron efecto inhibitorio por sí solos, por lo que, el efecto de inhibición se atribuyó únicamente a los compuestos contenidos en la especie evaluada.

A la luz de los resultados antimicrobianos obtenidos de *S. salviae* sobre bacterias Gram positivas, la terapia con extracto de hoja de salvia blanca podría aportar a combatir la resistencia que presenta *S. aureus*, que, en los últimos decenios, ha desarrollado multiresistencia a antimicrobianos de uso comercial (OMS, 2018a). Diferentes estudios han comprobado que diversos extractos de plantas medicinales han sido eficaces frente a la bacteria *S. aureus* multiresistente. Lemus (2015), evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (90%) e hidroalcohólico (70%) de *Rosmarinus officinalis*, sobre dos cepas de *S. aureus*, una cepa resistente a la meticilina y otra cepa sensible a la meticilina. Los resultados mostraron que el extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* presentó una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 1 mg mL⁻¹ sobre la cepa *S. aureus* resistente a la meticilina, mientras que la concentración requerida del extracto etanólico fue de 2 mg mL⁻¹. En cuanto a la cepa *S. aureus* sensible a la meticilina, el extracto hidroalcohólico mostró una concentración inhibitoria mínima de 2 mg mL⁻¹, por lo que dichos extractos poseen una variedad de metabolitos secundarios que pueden antagonizar o minimizar la actividad bactericida. Los metabolitos secundarios presentes en el romero son similares a los de *Sphacele salviae*, siendo las dos plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae (Barni *et al.*, 2009), por lo que

el extracto de hoja de salvia blanca también podría ser efectivo contra *S. aureus* resistente a la meticilina. Resulta altamente recomendable continuar estudios con cepas de campo multiresistentes.

CONCLUSIÓN

El extracto de hoja de Salvia blanca diluido al 50% p/p en alcohol 99,9% y aceite de oliva extra virgen 0,2% acidez, presentó, en ambos medios, acción antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas; en el caso de las Gram negativas sólo presentó un mínimo efecto inhibitorio frente a *P. aeruginosa*. El extracto de hoja de salvia blanca diluido en alcohol 99,9% no presentó acción inhibitoria frente a *C. albicans*, pero si presentó acción al ser diluido en aceite de oliva extra virgen.

REFERENCIAS

- Ávila, R., Navarro, A., Vera, O., Dávila, R., Melgoza, N., Meza, R., 2011. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. Ciencia y Mar 15(43), 23-36. <https://www.researchgate.net/publication/273319161>
- Barni, M., Fontanals, A., Moreno, S., 2009. Estudio de la eficacia antibiótica de un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. contra *Staphylococcus aureus* en dos modelos de infección en piel de ratón. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 8(3), 219-223. <http://hdl.handle.net/11336/25936>
- Centeno, S., Calva, M., 2010. The antifungal activity of the extract of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* on *Aspergillus flavus* and *A. ochraeus*. Pakistan Journal of Biological Sciences 13(9), 452-455. <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2010/452-455.pdf>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. M44-A2 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Davicino, R., Mattar, M.a., Casali, Y., Correa, S., Pettenati, E., Micalizzi, B., 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Revista Peruana de Biología* 14(2), 247-251. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v14n2/a11v14n02.pdf>
- Domingo, D., López-Brea, M., 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia 16(4), 385-393. <http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.003>
- Escuder, B., Torres, R., Lissi, E., Labbé, C., Faini, F., 2002. Antioxidant capacity of abietanes from *Sphacele salviae*. Natural Product Letters 16(4), 277-281. <https://doi.org/10.1080/10575630290020631>
- Fernández, J., Rivera, O., 2006. Las labiadas (familia Labiatae)

- Libro Rojo de las plantas de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt - Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Flores, M.C., 2010. Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso. Tesis de grado Químico Farmacéutico, Universidad de Chile, Chile. 42 p.
- García, P., 2003. Resistencia bacteriana en Chile. Revista Chilena de Infectología 20(1), 11-23. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003020100002>
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Cueva, C., Rodríguez-Bentocomo, J., Requena, T., Martín, P., Moreno, M., 2012. Polifenoles como una alternativa natural a los sulfitos en el control del crecimiento de bacterias lácticas en vinos: eficacia tecnológica y mecanismos bioquímicos y moleculares implicados. 6ª Reunión de la Red Temática BAL: Participación de las bacterias lácticas en la salud humana y en la calidad alimentaria. Universidad Rovira i Virgili, 28-29 de Junio de 2012, Tarragona, España, pp. 27. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/63948/1/Polifenoles%20como%20alternativa.pdf>
- Genena, A.K., Hense, H., Junior, A.S., Souza, S.M., 2008. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) - a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. Food Science and Technology 28(2), 463-469. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000200030>
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine 15, 639-652. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.06.008>
- Hoffman, A., Farga, C., Lastra, J., Veghazy, E., 1992. Plantas medicinales de uso común en Chile. Fundación Claudio Gay, Santiago, Chile.
- Kalemba, D., Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry 10(10), 813-829. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867033457719>
- Klancnik, A., Guzej, B., Kolar, M.H., Abramovic, H., Mozina, S.S., 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. Journal of Food Protection 72(8), 1744-1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1744>
- Lemus, L.F., 2015. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de extractos de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Tesis Licenciado en Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador. 143 p.
- Lineros, T., 2013. Efecto letal y/o inhibitorio in vitro de un extracto de hojas de Salvia blanca (*Sphacele salviae* (Lindl) Briq.) sobre microorganismos patógenos. Tesis de grado Ingeniero Agrónomo, Universidad Santo Tomás, Chile. 45 p.
- Maier, L., Lineros, T., Oberpaur, Ch., Aracena, D., Délano, G., 2014. Efecto antimicrobiano del extracto foliar de salvia blanca (*Sphacele salviae* (Lindl.) Briq.) sobre bacterias gram positivas y gram negativas. Agro Sur 42(3), 47-54. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2014.v42n3-05>
- Martínez, M., López, M., Morejón, Z., Rubalcaba, Y., 2000. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). Revista Cubana de Plantas Medicinales 5(1), 23-25. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962000000100006
- Mesa, A.C., Sánchez, J.G., Betancur, L.A., 2004. Productos naturales con actividad antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia 17(4), 325-31. <http://seq.es/seq/0214-3429/17/4/325.pdf>
- Montenegro, G., 2000. Chile nuestra flora útil: guía de uso apícola, medicinal, folclórica, artesanal y ornamental. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- Montenegro, G., Portaluppi, M., Salas, F., Díaz, M., 2009. Biological properties of the Chilean native moss *Sphagnum magellanicum*. Investigación Biológica 42(2), 233-237. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602009000200012>
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J.L., Ochoa, T., 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública 28(4), 648-56. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.284.430>
- 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. <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018a. Resistencia a los antibióticos. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018b. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. <https://www.who.int/es/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>
- San Román, I., 2013. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal. Tesis de grado Cirujano Dentista, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 85 p.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C., 2007. Introducción a la microbiología, 9ª ed. Editorial Medica Panamericana, Madrid, España.
- Valdatara, V., 2001. Dinámica de crecimiento, productividad y regeneración de *Sphacele salviae* (Lindl) Briq., un recurso vegetal endémico de Chile. Tesis de grado Ingeniero Agrónomo, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile. 120 p.
- Wallace, R.J., 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proceedings of the Nutrition Society 63(4), 621-629. <https://doi.org/10.1079/PNS2004393>