

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

[Study of the antibiotic efficacy of an ethanolic extract from *Rosmarinus officinalis* against *Staphylococcus aureus* in two skin infection models in mice]

María V. BARNI, Adriana FONTANALS y Silvia MORENO*

Fundación Instituto Leloir I.I.B.B.A-CONICET, Patricias Argentinas 435, C1405FFX, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Abstract

In this paper we examined the antibacterial efficacy of an ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. containing a high amount of antioxidant polyphenols against the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* in two skin infection models in mice, superficial and subcutaneous. Results obtained showed that the rosemary extract containing 2.3% of polyphenols had bacteriostatic activity against *S. aureus* on the skin infection. Using a double concentration of bioactive polyphenols in the treatment (4.6% of polyphenols), a total bacterial growth inhibition on the skin was suggested since we did not recover any bacteria viable in the skin mouse. A similar effect was observed in two skin models. Our results also showed that the antibacterial efficacy of the bioactives of rosemary is comparable with the antibiotic action of the well recognized antibiotic fusidic acid. All findings indicated that bioactive polyphenols of rosemary are able to carry out bactericide as well as bacteriostatic action against *S. aureus* in the skin mouse.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L.; Antimicrobial activity; Superficial skin infection model in mouse; Subcutaneous skin infection model in mouse.

Resumen

En este trabajo evaluamos la eficiencia antibacteriana de un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. que contiene altas concentraciones de polifenoles antioxidantes, en dos modelos de infección en piel de ratón: superficial y subcutáneo contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos muestran que el extracto de romero que contiene 2,3% de polifenoles bioactivos presentó una acción bacteriostática contra *S. aureus* sobre la piel del ratón, mientras que ensayando una doble concentración de polifenoles bioactivos (4,6%) se observó una inhibición total del crecimiento bacteriano. En los dos modelos de infección experimentados se observaron efectos similares. Los datos obtenidos también demuestran que la eficacia antibacteriana del extracto de romero es comparable con la acción del antibiótico comercial ácido fusídico. Los resultados indican que los polifenoles bioactivos del romero, dependiendo de su concentración, pueden ejercer in vivo acciones bacteriostáticas y bactericidas contra *S. aureus*.

Palabras Clave: *Rosmarinus officinalis* L.; Actividad antimicrobiana, Modelo de infección superficial en piel de ratón, Modelo de infección subcutáneo en piel de ratón.

Recibido | Received: December 30, 2008.

Aceptado en Versión Corregida | Accepted in Corrected Version: May 18, 2009.

Publicado en Línea | Published Online: May 29, 2009

Declaración de Intereses | Declaration of interests: authors have no competing interests.

Financiación | Funding: This work was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) and ANPCyT, proyecto PICT2005-35401

This article must be cited as: María V. Barni, Adriana Fontanals y Silvia Moreno. 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. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 8(3):219– 223. {EPub May 29, 2009}.

*Contactos | Contacts: E-mail: smoreno@leloir.org.ar



BLACPMA es una publicación de la [Cooperación Latinoamericana y Caribeña de Plantas Medicinales y Aromáticas](#)

This is an open access article distributed under the terms of a Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivative Works 3.0 Unported Licence. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>) which permits to copy, distribute and transmit the work, provided the original work is properly cited. You may not use this work for commercial purposes. You may not alter, transform, or build upon this work. Any of these conditions can be waived if you get permission from the copyright holder. Nothing in this license impairs or restricts the author's moral rights.

Este es un artículo de Acceso Libre bajo los términos de una licencia "Creative Commons Atribucion-No Comercial-No trabajos derivados 3.0 Internacional" (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es>) Usted es libre de copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra bajo las condiciones siguientes: **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra). **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales. **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra. Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra. Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor. Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas representan en la actualidad una importante causa de mortalidad en humanos, especialmente en los países en desarrollo.

Actualmente la emergencia de resistencia a antibióticos de uso común en la clínica, se ha incrementado en algunas bacterias patógenas (Cabrera Cao et al., 2005) y es un problema particular en pacientes infectados con *Staphylococcus aureus* debido al aumento de variantes resistentes a β -lactamasas, aminoglicósidos (Styers et al., 2006). Esta bacteria puede ingresar al cuerpo a través de heridas, quemaduras, úlceras o puede ser transportada a través de sondas o cánulas en los pacientes hospitalarios, pudiendo llegar al torrente sanguíneo y así diseminarse en el organismo, comprometiendo el corazón, la sangre o los huesos (Naimi et al., 2003). Además, recientemente se encontraron bacterias resistentes en ámbitos hospitalarios que fueron transmitidas en la comunidad (Kollef et al., 2006).

En consecuencia, dichos sucesos impulsan la búsqueda de nuevas drogas para controlar las bacterias resistentes. La obtención de nuevos agentes antimicrobianos de origen vegetal es una estrategia competente en la farmacología actual (Cowan et al., 1999). Se sabe que las plantas bajo condiciones de estrés biótico y abiótico sintetizan metabolitos secundarios que incluyen flavonas, taninos, antocianinas y terpenos (mono-di y sesqui terpenos) para adaptarse al medio que las rodea (Demming-Adams et al., 2002; Kliebenstein, 2004). Algunos de estos compuestos presentan actividad antimicrobiana (Lewis et al., 2006).

Las plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae crecen en zonas áridas y de alta irradiación UV, por lo tanto acumulan una gran cantidad de metabolitos secundarios, en particular el género *Rosmarinus officinalis* L. es una fuente importante de compuestos antioxidantes de naturaleza polifenólica que presenta propiedades biológicas como antibacteriano, anti-inflamatorio y antitumoral. Previamente reportamos que la eficacia antimicrobiana *in vitro* de diferentes extractos de romero estandarizados en el contenido de ácido rosmarínico, ácido carnósico y carnosol dependía de la composición de sus polifenoles (Moreno et al., 2006). El objetivo de este trabajo es estudiar la eficacia antibacteriana *in vivo* de un extracto etanólico de *R. officinalis* contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*, en dos modelos de infección en piel de ratón comparando su potencia

antimicrobiana con el antibiótico comercial ácido fusídico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal fue cosechado en marzo del 2008 en el Valle de Lerma (Salta, Argentina). El extracto de *R. officinalis* L. fue obtenido a partir de hojas secas por extracción etanólica y se determinó por HPLC la composición de polifenoles (ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico) como se describió previamente (Moreno et al., 2006). El extracto de romero seco se almacenó a -20°C .

Preparación de inóculo bacteriano

Se preparó un cultivo bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en caldo Mueller Hinton (DIFCO) que se creció durante 20 horas a 37°C con una agitación de 250 rpm, luego se midió la concentración bacteriana por densidad óptica a 625 nm y se diluyó a una concentración final de 0,5 Mc Farland correspondiente a 1×10^8 UFC (unidades formadoras de colonias)/mL.

Animales y modelos de infección en piel de ratón

Se utilizaron ratones hembras BALB/cAnNCrl de 2 meses de edad y peso variable (19-21 g), criados en la Fundación Instituto Leloir. El protocolo de trabajo fue aprobado por el bioterio del Instituto Leloir, y cumple con el reglamento interno vigente y con la legislación nacional (Disposición 6344/96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y Resolución 617/2002 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). Responsable a cargo del bioterio Adriana Fontanals.

Los ratones fueron anestesiados vía intra-peritoneal con una dosis de 100 mg/kg de ketamina (Ketonal, Richmond) y 5 mg/kg de clorhidrato de xilacina (Xilacina 20, Richmond). Luego se procedió a rasurar con gillette la parte dorsal izquierda del animal para eliminar el pelaje.

Se establecieron dos modelos de infección en piel de ratón:

Modelo de infección superficial. Se utilizó el modelo de infección superficial previamente descrito por Kugelberg et al. (2005), con algunas modificaciones. Se removieron las primeras capas dérmicas del área de la piel de ratón rasurada, con tres pasajes de hoja de afeitar de acero inoxidable

para facilitar la infección bacteriana. Bajo campana de flujo laminar se colocaron 5 μ L del inóculo bacteriano (5×10^5 bacterias) sobre una superficie de piel de 2 cm^2 . Pasados 5 min, para dar lugar a la absorción de las bacterias en la piel del ratón, se colocó un apósito estéril sobre el área inoculada.

Modelo de infección subcutánea: Como describió Gisby et al. (2000), se estableció el número de bacterias adsorbidas en 1 cm de hilo de cirugía en ensayos *in vitro* ($7,5 \times 10^4$ bacterias). Para llevar a cabo la infección subcutánea se colocaron hilos de cirugía de 10 cm en tubos con 5 mL del inóculo bacteriano (1×10^8 UFC/mL) y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Luego cada hilo inoculado se enhebró en una aguja de cirugía. Esta se introdujo en la parte rasurada del ratón de modo de atravesar la dermis sin llegar al músculo carnoso y dejando 1 cm de hilo bajo la piel. Luego se anudaron y se cortaron los extremos del hilo. Para permitir la penetración de las cremas de tratamiento se realizó un incisión con bisturí por debajo de la sutura en la misma dirección que el hilo (Gisby et al., 2000). Posteriormente se colocó un apósito estéril sobre la herida.

Tratamientos

El extracto seco de *R. officinalis* L., empleado para la preparación de los tratamientos, contiene un porcentaje total de compuestos fenólicos de 23%, que comprende un 20% de diterpenos fenólicos (ácido carnósico 10% y su derivado carnosol 10%) y un 3% de ácido rosmarínico, determinados por HPLC.

Se realizaron dos preparaciones del extracto de romero que contienen diferentes concentraciones de compuestos polifenólicos bioactivos: 2,3% (p/p) y 4,6% (p/p), respectivamente. Para ello, se emulsionó de manera homogénea el extracto de *R. officinalis* L. con crema base hidrosoluble comercial.

El placebo consistió en la aplicación de la crema base hidrosoluble sin ningún agregado, y se consideró como control negativo. Como control positivo se utilizó el antibiótico tópico comercial, ácido fusídico (FUSIMED, Laboratorio Cassará) al 0,5; 1 y 2%.

Las dosis aplicadas fueron de 20 mg/2 cm^2 de piel.

Ensayos y diseño experimental

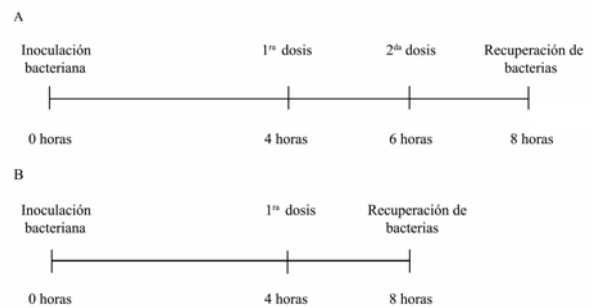
Para el modelo de infección subcutáneo se realizaron 2 ensayos que difieren en el diseño temporal y cantidad de dosis aplicadas. Uno consistió en la aplicación de 2 dosis a las 4 y 6 h post-inoculación y la recuperación de bacterias de la piel a

las 8 h post-inoculación (Fig. 1A). En el otro ensayo se aplicó una única dosis de tratamiento a las 4 h post-inoculación y la recuperación de bacterias se realizó a las 6 h post-inoculación (Fig. 1B).

Para el modelo de infección superficial se realizó el ensayo que consistió en la aplicación de 2 dosis a las 4 y 6 h post-inoculación y la recuperación de bacterias se realizó a las 8 h post-inoculación (Fig. 1A).

La primera dosis de los tratamientos se aplicó a las 4 h post-inoculación como se describió previamente (Gisby et al., 2000) dado que la colonización bacteriana se establece dentro de dicho período.

Figura 1. Diseño experimental. **A** - Modelo de infección subcutáneo y superficial (2 dosis). **B** - Modelo de infección subcutáneo (1 dosis).



Por lo tanto, para evaluar la acción antibiótica del extracto de romero se realizaron 3 tipos de ensayos diferentes en total, considerando los dos modelos de infección, variable tiempo y dosis aplicadas. En cada ensayo se incluyeron los controles: placebo, sin tratamiento y el control positivo (ácido fusídico a tres concentraciones).

Recuperación de bacterias de la piel de ratón

La determinación de la concentración bacteriana post-tratamiento en ambos modelos se realizó según Gisby et al. (2000). Se retiró con bisturí el área de 2 cm^2 de la piel tratada, se colocó en un tubo con 1 mL de caldo Mueller Hinton donde se homogeneizó con un grinder. Luego se realizaron diluciones del homogenato en solución fisiológica y se sembraron alícuotas de 100 μ L en placas de Petri con agar Mueller Hinton. Las placas se incubaron a 37 $^{\circ}$ C durante 24 h y posteriormente se determinaron las UFC/mL.

Se realizó un control de inóculo recuperando las bacterias de la piel del ratón sin tratamientos previos para confirmar su viabilidad en la piel.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa Info Stat para el análisis estadístico. El test t de Student ($\alpha = 0,001$) se aplicó a muestras independientes para cada grupo de tratamiento (n = 6).

El promedio del número de bacterias (UFC) recuperadas de la piel de ratón (n = 6) en cada tratamiento con su respectiva barra de error se transformó a \log_{10} UFC/herida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se utilizaron dos modelos de infección en piel de ratón para determinar la actividad antibiótica del extracto de *R. officinalis*. El modelo de infección subcutáneo fue ensayado para estudiar el efecto del extracto de romero sobre infecciones que se producen a niveles intradérmicos, como por ejemplo las infecciones producidas en heridas quirúrgicas. Por el contrario, el modelo superficial fue diseñado para estudiar infecciones provocadas en zonas dérmicas expuestas al ambiente.

En el modelo de infección superficial los promedios de concentración bacteriana recuperados de la piel de ratón para cada tratamiento expresados en UFC/herida fueron: placebo ($1,55 \times 10^4 \pm 5,47 \times 10^2$), no tratado ($1,25 \times 10^4 \pm 8,99 \times 10^2$), extracto de *R. officinalis* 2,3% ($2,02 \times 10^1 \pm 4,12$), extracto de *R. officinalis* 4,6% (0), ácido fusídico 0,5% ($1,27 \times 10^1$

$\pm 1,63$), ácido fusídico 1,0% (0), ácido fusídico 2,0% (0). Mientras que para el modelo de infección subcutáneo con el diseño experimental (Fig. 1A), los promedios para cada tratamiento fueron: placebo ($1,95 \times 10^4 \pm 5,47 \times 10^2$), no tratado ($1,72 \times 10^4 \pm 5,61 \times 10^2$), extracto de *R. officinalis* 2,3% ($2,57 \times 10^2 \pm 22,03$), extracto de *R. officinalis* 4,6% (0), ácido fusídico 0,5% ($1,78 \times 10^1 \pm 3,33$), ácido fusídico 1,0% (0), ácido fusídico 2,0% (0).

En el tercer ensayo, modelo de infección subcutáneo con el diseño experimental (Fig. 1B) los resultados fueron: placebo ($1,02 \times 10^4 \pm 5,63 \times 10^2$), no tratado ($1,10 \times 10^4 \pm 1,74 \times 10^3$), extracto de *R. officinalis* 2,3% ($1,21 \times 10^2 \pm 30,09$), extracto de *R. officinalis* 4,6% (0), ácido fusídico 0,5% ($1,27 \times 10^2 \pm 27$), ácido fusídico 1,0% ($4,40 \times 10^1 \pm 3,52$), ácido fusídico 2,0% (0).

Para los 3 ensayos se determinó que los resultados individuales de los tratamientos: placebo y no tratado, no fueron significativamente diferentes ($\alpha = 0,001$). En cada ensayo se compararon los resultados individuales de los tratamientos: extracto de *R. officinalis* 2,3% y ácido fusídico 0,5% y se obtuvo que no fueron significativamente diferentes ($\alpha = 0,001$) para el modelo de infección superficial y para el subcutáneo con una dosis, mientras que para el modelo subcutáneo con dos dosis si fueron significativamente diferentes ($P < 0,001$).

Tabla 1. Actividad antibiótica *in vivo* del extracto de *R. officinalis*.

Tratamiento	\log_{10} UFC/herida		
	Modelo de infección superficial (2 dosis)*	Modelo de infección subcutáneo (2 dosis)*	Modelo de infección subcutáneo (1 dosis)**
Extracto de <i>R. officinalis</i> (%)			
2,3	1,30 ± 0,24	2,41 ± 0,27	2,07 ± 0,08
4,6	-	-	-
Ácido fusídico (%)			
0,5	1,11 ± 0,04	1,24 ± 0,16	2,10 ± 0,07
1	-	-	1,64 ± 0,03
2	-	-	-
Placebo	4,19 ± 0,38	4,29 ± 0,30	4,01 ± 0,02
No Tratado	4,10 ± 0,35	4,23 ± 0,24	4,00 ± 0,02

* Se realizó según diseño experimental A. ** Se realizó según diseño experimental B.

(-) Ausencia de crecimiento bacteriano.

Los tratamientos fueron realizados con al menos n = 6 animales. Ácido fusídico, control positivo.

Se determinó que los resultados de los tratamientos con extracto de *R. officinalis* 2,3% y 4,6%, lograron ser significativamente diferentes ($P < 0,001$) a los obtenidos con el tratamiento placebo para los tres ensayos realizados.

El extracto de *R. officinalis* 2,3% logra reducir entre 2-3 \log_{10} UFC/herida según el modelo de infección y diseño experimental utilizado, logrando una acción bacteriostática sobre *S. aureus* (Tabla 1). Mientras que el tratamiento con extracto 4,6% logra inhibir el crecimiento bacteriano en su totalidad ejerciendo un efecto bactericida en los tres ensayos evaluados. Es importante destacar que el mismo efecto se logra por la aplicación de una única dosis en el modelo subcutáneo.

Estos resultados demuestran que el extracto vegetal presenta una acción antibiótica eficaz *in vivo* contra la infección de la bacteria patógena *S. aureus*.

CONCLUSIÓN

Los resultados evidenciaron la acción bacteriostática del extracto de *R. officinalis* que contiene un 2,3% de polifenoles activos y la acción bactericida del extracto que contiene un 4,6% de polifenoles activos contra la bacteria patógena *S. aureus* en los dos modelos de infección en piel de ratón. Además se estableció que el extracto de romero tuvo una potencia antibiótica *in vivo* comparable a la del ácido fusídico. Los sistemas ensayados, de carácter preclínico, aportan información científica y son útiles para la evaluación de los compuestos vegetales como potenciales drogas terapéuticas que podrían ser competentes con los antibióticos de uso común que actualmente ya no son efectivos contra las bacterias resistentes. Por dicha razón es pertinente la evaluación que hoy en día se lleva a cabo en nuestro laboratorio, sobre los mecanismos de acción de los compuestos activos que componen el extracto de *R. officinalis* L. y el estudio de la acción antibiótica de los bioactivos combinados con otras drogas, para aumentar su eficiencia antimicrobiana sobre un amplio espectro bacteriano.

REFERENCIAS

- Cabrera Cao Y, Fadrags Fernández A, Guerrero LG. 2005. Antibióticos naturales. Mito o realidad. Rev Cubana Med Gen Integr 21:3-4.
- Cowan MM. 1999. Plant Products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 12:564-582.
- Demmig-Adams B, Adams WW, 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. Science 298:2149-2153.
- Gisby J, Bryant J. 2000. Efficacy of a new cream formulation of mupirocin: comparison with oral and topical agents in experimental skin infections. Antimicrob Agents Chemother 44:255-260.
- Kliebenstein DJ. 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through Arabidopsis thaliana tinged glasses. Plant Cell Environ 27:675-684.
- Kollef MH, Micek ST. 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new community-acquired pathogen? Curr Opin Infect Dis 19:161-168.
- Kugelberg E, Norström T, Petersen TK, Duvold T, Andersson DI. 2005. Establishment of a superficial skin infection model in mice by using *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother 49:3435-3441.
- Lewis K, Ausubel FM. 2006. Prospects for plant-derived antibacterial. Nat Biotechnol 24:1504-1507.
- Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov A. 2006. Antimicrobial and antioxidant activities of Argentinean *Rosmarinus officinalis* L. extracts. Free Radical Res 40:223-231.
- Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynfield R. 2003. Comparison of community and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA 290:2976-2984.
- Romano CS, Abadi K, Repetto V, Vojnov A, Moreno S. 2008. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. Food Chem 115:456-461.
- Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahn DF. 2006. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. Ann Clin Microbiol Antimicrob 5:2.

