



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

RESOLUCIÓN N° 356/2023

GENERAL PICO, 23 de Noviembre de 2023.-

VISTO:

La evaluación positiva enviada por las/los integrantes del Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, respecto del Proyecto de Investigación: *“Evaluación de la actividad antimicrobiana de sustancias activas obtenidas de Lithraea molleoides, Origanum vulgare y Rosmarinus officinalis frente a microorganismos productores de mastitis bovina”* y,

CONSIDERANDO:

Que el citado Proyecto de Investigación estará bajo la dirección del Dr. Fernando MAÑAS participando en carácter de Investigadores el M.V. Federico TOSO, el M.V. Luciano HARTFIEL, la M.V. Vanina BENITEZ, la Mg. María Paula TONINI (Facultad de Agronomía y Veterinaria UNRC) y el Lic. Dardo ROMA (Facultad de Agronomía y Veterinaria UNRC) y en carácter de Asistentes de Investigación los estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria Rodrigo PÉREZ MANSILLA y Axel Jorge TAPIE.

Que tendrá una duración de cuarenta y ocho (48) meses, a partir del 01 de enero de 2024 y hasta el 31 de diciembre de 2027.

Que de acuerdo a la presentación el citado proyecto es de Investigación Aplicada.

Que participa en su desarrollo el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF), perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que el citado proyecto ha sido presentado de acuerdo con las normas vigentes y aprobado por el Comité Científico de la Facultad.

Que el Artículo 5° Anexo I de la Resolución N° 100/99 y su modificatoria N° 088/02 del Consejo Superior, estipula que: *“Todo Programa y todo Proyecto de Investigación que obtenga dos (2) evaluaciones externas favorables será acreditado mediante resolución del Consejo Directivo de cada Facultad a la que pertenezca”*.

Que cuenta con dos (2) evaluaciones externas satisfactorias, de acuerdo con lo previsto en la Resolución N° 100/99 y N° 088/02 del Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que las evaluaciones fueron realizadas por la Dra. Andrea BOZZO (UNRC) y la Dra. Alejandra MAGNOLI (UNRC).

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 23 de Noviembre de 2023, puesta la acreditación del Proyecto de Investigación a consideración de los/as Sres/as. Consejeros/as, se aprueba por unanimidad.



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución Nº 356/2023

//2.-

POR ELLO:

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

R E S U E L V E:

ARTICULO 1º: Acreditar como Proyecto de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, el proyecto denominado: *"Evaluación de la actividad antimicrobiana de sustancias activas obtenidas de Lithraea molleoides, Origanum vulgare y Rosmarinus officinalis frente a microorganismos productores de mastitis bovina"*, bajo la dirección del Dr. Fernando MAÑAS participando en carácter de Investigadores el M.V. Federico TOSO, el M.V. Luciano HARTFIEL, la M.V. Vanina BENITEZ, la Mg. María Paula TONINI (Facultad de Agronomía y Veterinaria UNRC) y el Lic. Dardo ROMA (Facultad de Agronomía y Veterinaria UNRC) y en carácter de Asistentes de Investigación los estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria Rodrigo PÉREZ MANSILLA y Axel Jorge TAPIE, el cual tiene trece (13) folios y que se adjunta como Anexo de la presente Resolución.

ARTICULO 2º: El proyecto tendrá una duración de cuarenta y ocho (48) meses, a partir del 01 de enero de 2024 y hasta el 31 de diciembre de 2027.

ARTICULO 3º: Justificar los gastos que se produzcan de pasajes, viáticos, combustibles, aparatos, material de laboratorio, etc., del citado proyecto.

ARTÍCULO 4º: Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento los/as interesados/as, Secretaría de Investigación y Posgrado, Dr. Fernando MAÑAS. Cumplido, archívese.

Presidente
Consejo Directivo
Facultad de Ciencias Veterinarias
UNLPam



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución N° 356/2023

TÍTULO del PROYECTO:

Evaluación de la actividad antimicrobiana de sustancias activas obtenidas de *Lithraea molleoides*, *Origanum vulgare* y *Rosmarinus officinalis* frente a microorganismos productores de mastitis bovina.

Fernando Mañas

María Paula Tonini

Dardo Andrés Roma

Federico Toso

Luciano Hartfiel

Vanina Benitez

Rodrigo Pérez Mansilla

Axel Jorge Tapie



Corresponde a Resolución N° 356/2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO:

Evaluación de la actividad antimicrobiana de sustancias activas obtenidas de *Lithraea molleoides*, *Origanum vulgare* y *Rosmarinus officinalis* frente a microorganismos productores de mastitis bovina.

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada.

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: Farmacología.

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: Salud Animal.

1.5 ÁREA DE CONOCIMIENTO: Agropecuarias y del Ambiente.

1.6 SUBÁREA DE CONOCIMIENTO: Ciencias Veterinarias.

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS: Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF)-Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLPam.

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

2.3. EQUIPO de TRABAJO

2.3.1. INTEGRANTES

| Apellido y Nombre | CUIL | Título Académico | Categ. Invest | Responsabilidad | Cátedra o Institución | Cargo y Dedicación | Tiempo dedicación hs./semana |
|-------------------|---------------|---------------------------------|---------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Fernando Mañas | 20-28701909-3 | Dr. M.V. en Ciencias Biológicas | III | D | Farmacología-FCV-UNLPam | PAD-Simple | 2 |
| Federico Toso | 24-30016167-3 | MV | | I | Farmacología-FCV-UNLPam | JTP Exclusivo | 3 |
| Luciano Hartfiel | 20-33106868-4 | MV | | I | Farmacología-FCV-UNLPam | Ayudante de 1° Exclusivo | 3 |
| Vanina Benitez | 23-39378593-4 | MV | | I | Farmacología-FCV-UNLPam | Ayudante de 1° Simple | 2 |



Corresponde a Resolución N° 356/2023

| | | | | | | | |
|---------------------------|---------------|---|---|----|--|-----------------------------------|---|
| María Paula Tonini | 27-20084312-1 | MV Magister en Calidad e Inocuidad de los Alimentos | V | I | Facultad de Agronomía y Veterinaria-UNRC | Ay Primera- Exclusivo | 1 |
| Dardo Roma | 20-30766505-1 | Lic. en Ciencias Biológicas. Dr en Ciencias Biológicas | | I | Facultad de Agronomía y Veterinaria-UNRC | Becario Posdoctoral CONICET | 1 |
| Rodrigo Pérez Mansilla | 23-39395192-9 | Estudiante de Medicina Veterinaria | | AI | Adscripto en Farmacología-FCV- UNLPam | | 2 |
| Axel Jorge Tapie | 20428446977 | Estudiante de Medicina Veterinaria | | AI | | | 2 |

D: director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.1. BECARIOS:

| Apellido y Nombre | Organismo que Financia | Tipo de Beca | Director | Tiempo de Dedicac. Hs./Sem. |
|-------------------|---------------------------|--------------|----------|-----------------------------------|
| | | | | |

2.3.2. TESISISTAS:

| Apellido y Nombre | Título Académico al que Aspira | Título Proyecto de Tesis | Organismo | Director | Tiempo de Dedicac. Hs./Sem |
|-------------------|---|-----------------------------------|-----------|----------|----------------------------------|
| | | | | | |

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

| Apellido y Nombre | Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.) | Tiempo de Dedicac. Hs./Sem. |
|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | | |

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

| Apellido y Nombre | Función | Título Proyecto de Tesis | Tiempo de Dedicac. Hs./Sem. |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| | Director Co-Director Tesisista | | |

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO:

3.1. FECHA de INICIO: 1/01/2024

FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/12/2027



Corresponde a Resolución N° 356/2023

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

Entre los patógenos contagiosos causantes de mastitis, *Staphylococcus aureus* es el agente más prevalente tanto en Argentina como en otros países. Una de las características más virulentas de *S. aureus* es su capacidad para formar biofilm, muchas veces considerada la razón subyacente por la que los tratamientos con agentes antimicrobianos fallan debido a una penetración incompleta del antimicrobiano, baja actividad metabólica de las bacterias y/o cambios en la expresión génica que conlleva modificaciones fisiológicas. Los compuestos derivados de plantas medicinales exhiben en muchos casos un importante efecto antimicrobiano en forma directa sobre las bacterias, inhibiendo su crecimiento y viabilidad, e incluso inhibiendo la formación de biofilm. En este proyecto, nos proponemos evaluar la actividad antimicrobiana y anti-biofilm de los extractos etanólicos de Molle de Córdoba (*Lithraea molleoides*), y los aceites esenciales de Romero (*Salvia rosmarinus*) y Orégano (*Origanum vulgare*) frente a aislamientos de *Staphylococcus aureus* productores de mastitis bovina; así como evaluar posibles interacciones entre los extractos y los aceites esenciales. Los resultados obtenidos permitirán verificar o descartar la necesidad de realizar posteriores evaluaciones terapéuticas y toxicológicas *in vitro* e *in vivo*, con la finalidad de elaborar una posible formulación terapéutica de utilidad en el tratamiento de la mastitis bovina.

4.1 Palabras claves: Fitoterápicos - Mastitis bovina – Molle – Orégano - Romero

4.2 Abstract en inglés: (Máximo 200 palabras)

Among the contagious pathogens causing mastitis, *Staphylococcus aureus* is the most prevalent agent both in Argentina and other countries. One of the most virulent characteristics of *S. aureus* is its ability to form biofilm, often considered the underlying reason why antimicrobial treatments fail due to incomplete penetration of the antimicrobial agent, low metabolic activity of the bacteria, and/or changes in gene expression leading to physiological modifications. Compounds derived from medicinal plants often exhibit a significant direct antimicrobial effect on bacteria, inhibiting their growth and viability, and even inhibiting biofilm formation. In this project, we aim to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of ethanolic extracts from Molle de Córdoba (*Lithraea molleoides*), as well as the essential oils of Rosemary (*Salvia rosmarinus*) and Oregano (*Origanum vulgare*), against isolates of *Staphylococcus aureus* that cause bovine mastitis. We also intend to assess possible interactions between the extracts and essential oils. The obtained results will allow us to verify or discard the need for further *in vitro* and *in vivo* therapeutic and toxicological evaluations, with the aim of developing a potential therapeutic formulation useful in the treatment of bovine mastitis.

4.3. Keywords: Phytotherapeutics - Bovine mastitis - Molle - Oregano - Rosemary

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. Introducción

Dentro de los patógenos contagiosos causantes de mastitis, *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico más prevalente tanto en Argentina como en otros países de gran desarrollo lechero, provocando mastitis subclínica y clínica, recurrente o crónica (Hoque et al., 2018). La frecuencia de *S. aureus* oscila entre 17% y 22% del total de muestras con aislamiento positivo. Lo mismo ocurre para los casos de mastitis clínicas, en donde la prevalencia de *S. aureus* como agente etiológico causante de la enfermedad es superior al 30% (Srednik et al., 2017). A lo largo de los años se han realizado numerosos estudios para determinar la susceptibilidad *in vitro* de *S. aureus* causantes de mastitis bovina a ciertos antimicrobianos usados en el control de la enfermedad, principalmente a través del cálculo de la mínima concentración inhibitoria (CIM) y



Corresponde a Resolución N° 356/2023

de otros parámetros. Una de las características más virulenta de *S. aureus* es su capacidad para formar una estructura denominada “biofilm”. Donlan y Costerton (2002) definieron el biofilm como una comunidad microbiana sésil que se caracteriza por células que están irreversiblemente adheridas a un sustrato o interfase, o unas con otras, embebidas en una matriz extracelular de sustancias poliméricas que ellas mismas han producido, y que exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción génica. La formación de biopelícula es muchas veces considerada la razón subyacente por la que los tratamientos con agentes antimicrobianos fallan debido a una penetración incompleta del antimicrobiano, la baja actividad metabólica de las células bacterianas y/o cambios en la expresión génica que conllevaría modificaciones fisiológicas (Nazar, 2007).

Los compuestos derivados de plantas medicinales exhiben en muchos casos un importante efecto antimicrobiano en forma directa sobre las bacterias, inhibiendo su crecimiento y viabilidad o afectando de algún modo sus factores de virulencia (Mundy et al., 2016). Incluso, una de las actividades biológicas que se les atribuyen a diversas especies vegetales es la capacidad de actuar sobre el biofilm, inhibiendo su formación o erradicándolo (Cecchini et al., 2018). Se ha podido determinar también que los fitoterápicos pueden generar un efecto sinérgico con los antimicrobianos tradicionales, incrementando la efectividad de estos últimos (Kuok et al., 2017). Por esta razón, en los últimos años se ha volcado una gran cantidad de recursos a la búsqueda de moléculas bioactivas que puedan generar un efecto sinérgico entre ellas y/o con antimicrobianos tradicionales, con la finalidad de reducir el creciente problema de la resistencia bacteriana.

Lithraea molleoides (Vell.) es una de las principales especies vegetales autóctona que domina la zona serrana de la provincia de Córdoba. Conocido con el nombre vulgar de Molle de beber o Molle de Córdoba, es ampliamente utilizado tanto en gastronomía como en fitomedicina. Sus hojas son utilizadas en forma de extracto alcohólico, decocción e infusión por sus propiedades antiinflamatorias, sedante, antimicrobianas, inmunomoduladoras, antioxidantes, entre otras (López et al., 2021). El estudio de las propiedades antimicrobianas del aceite esencial y del extracto etanólico de *Lithraea molleoides* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC ha arrojado resultados favorables, sin embargo, su acción sobre cepas de aislamientos de mastitis bovina permanece desconocida. Durante el desarrollo de un proyecto de investigación previo (UNRC), pudimos detectar en el laboratorio que el extracto de Molle tiene actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* ATCC (no publicado). Si bien el *S. aureus* sobre el que probamos el extracto de Molle es una cepa de referencia, consideramos posible que esa actividad antimicrobiana pueda extenderse sobre cepas de *S. aureus* aisladas de casos clínicos de mastitis bovina, incluso aquellas cepas capaces de producir biofilm.

Del mismo modo, algunos ensayos *in vitro* revelan actividad antimicrobiana de distintos aceites esenciales (AE) frente a diversas bacterias, incluyendo los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Origanum vulgare* (orégano).

El romero, perteneciente a la familia Lamiaceae (*Labiatae Labiadas*), es un arbusto con tallos prismáticos. Sus hojas son estrechas, agudas y pequeñas, con forma de espigas de color verde brillante, bordes revolutos y tallos leñosos y ramificados. Esta planta contiene diversos compuestos químicos que han sido clasificados generalmente por distintos autores como ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos. Entre los compuestos identificados se encuentran α -pineno, β -pineno, canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol, alcanfor, linalol, verbinol, terpineol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, 3-octanona, isobanil-acetato y β -cariofileno, así como los ácidos vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, ursólico, oleanólico, butilínico, betulínico, betulina, α -amirina, β -amirina, borneol y acetato de bornilo (Avila-sosa et al., 2011). El aceite esencial de romero ha demostrado actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Salmonella indiana*, posiblemente debido a su contenido de 1-8-cineol en un 49.99%. Baratta et al. (1998) llevaron a cabo pruebas de las actividades

Corresponde a Resolución N° 356/2023

antibacterianas y antifúngicas de una muestra comercial que contenía R-pineno, 1,8-cineol, alcanfor y R-terpineol, y encontraron una buena actividad contra *Staphylococcus aureus* (Angioni et al., 2004).

Por otro lado, el género *Origanum L.*, también perteneciente a la familia *Lamiaceae*, incluye 38 especies de hierbas anuales, perennes y arbustivas, la mayoría de las cuales son nativas o se encuentran restringidas al área del Mediterráneo oriental, Europa, Asia y el norte de África. Estas plantas han despertado un gran interés en la academia y en la industria alimentaria debido a las propiedades antioxidantes y otras propiedades biológicas de sus aceites esenciales y extractos, los cuales tienen potencial antioxidante y antimicrobiano (Chorianopoulos et al., 2004). El AE de orégano ha presentado actividad deletérea sobre una gran variedad de microorganismos, incluyendo *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Salmonella indiana* y *Staphylococcus aureus* (Avila-sosa et al., 2011).

El uso de fitoterápicos como agentes antimicrobianos para la prevención y/o tratamiento de patologías que afectan a los animales de producción, cuenta con algunos aspectos interesantes vinculados, por ejemplo, a la presencia de residuos en alimentos de origen animal. Asimismo, al determinar que los AE, no cuentan con un mecanismo de acción antimicrobiano específico y habiéndose comprobado que dicha acción ocurre a varios niveles celulares, se supone que esta característica dificultaría el desarrollo de resistencia antimicrobiana por parte de las bacterias implicadas (Carson et al., 2002).

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

Publicaciones vinculadas a la evaluación de diversos aspectos del uso de fitoterápicos en los últimos diez años:

- Campra, N. A., Cariddi, L. N., Escobar, F. M., Sabini, M. C., Freire-de-Lima, C. G., Decote-Ricardo, D., Roma, D., & Mañas, F. (2020). **Protective role of chlorogenic acid on DNA damage caused by ochratoxin A exposure**. *Analecta Veterinaria*, 40(2), 049. <https://doi.org/10.24215/15142590e049>
- Cariddi, L. N., Escobar, F. M., Sabini, M. C., Campra, N. A., Bagnis, G., Decote-Ricardo, D., Freire-de-Lima, C. G., Mañas, F., Sabini, L. I., & Dalcerro, A. M. (2016). **Phenolic acid protects of renal damage induced by ochratoxin A in a 28-days-oral treatment in rats**. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 43. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.03.004>
- Cariddi, L. N., Sabini, M. C., Escobar, F. M., Montironi, I., Mañas, F., Iglesias, D., Comini, L. R., Sabini, L. I., & Dalcerro, A. M. (2015). **Polyphenols as possible bioprotectors against cytotoxicity and DNA damage induced by ochratoxin A**. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(3). <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.03.013>
- Cecchini, M. E., Roma, D., Magnago, F., Vilchez, M. L., Varea, M. C., Torreña, M. E., Aiassa, D. E., & Mañas, F. J. (2018). **Effects of flaxseed supplementation on lipid metabolism, oxidative balance and genetic damage in goats**. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 13(2). <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2018.51.58>
- Cecchini, M. E., Roma, D., Pussetto, L., Iglesias, D., Basualdo, M., Aiassa, D., & Mañas, F. J. (2018). **In vitro evaluation of the antimicrobial, antioxidant and DNA protective activities of an ethanolic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*)**. *Analecta Veterinaria*, 38(2), 1–9. <https://doi.org/10.24215/xxxxxxx>
- Menis Candela, F., Giordano, W. F., Quiroga, P. L., Escobar, F. M., Mañas, F., Roma, D. A., Larrauri, M., Comini, L. R., Soria, E. A., & Sabini, M. C. (2020). **Evaluation of cellular safety and the chemical composition of the peanut (*Arachis hypogaea L.*) ethanolic extracts**. *Heliyon*, 6(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05119>
- Montironi, I. D., Campra, N. A., Arsaut, S., Cecchini, M. E., Raviolo, J. M., Vanden Braber, N., Barrios, B., Montenegro, M., Correa, S., Grosso, M. C., Mañas, F., Bellingeri, R. V., & Cariddi, L. N. (2022). **Minthostachys verticillata Griseb (Epling.) (Lamiaceae) essential oil orally administered modulates gastrointestinal immunological and oxidative parameters in mice**. *Journal of Ethnopharmacology*, 290(March), 115078. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115078>
- Roma, D., Vazquez, G., Martinez, V., Lucía, P., Laura, P., Claudia, B. M., & Mañas, F. (2014). **Evaluación de la actividad antimicrobiana y de los efectos sobre el balance oxidativo de la antimicrobiana ciprofloxacina y de la tintura de echinacea angustifolia**. *Dialogos*, 4(2), 53–63.



Corresponde a Resolución N° 356/2023

- Sabini, M. C., Cariddi, L. N., Escobar, F. M., Mañas, F., Roma, D., Menis Candela, F., Bagnis, G., Soria, E. A., Sabini, L. I., & Dalcerro, A. M. (2021). **Preventive effects of the antioxidant and antigenotoxic Achyrocline satureioides extract against zearalenone-induced mammal cytogenotoxicity and histological damage.** *World Mycotoxin Journal*, 14(3), 401–409. <https://doi.org/10.3920/WMJ2020.2571>
- Sabini, M. C., Cariddi, L. N., Escobar, F. M., Mañas, F., Comini, L., Iglesias, D., Larrauri, M., Montoya, S. N., Sereno, J., Contigiani, M. S., Cantero, J. J., & Sabini, L. I. (2016). **Potent inhibition of Western equine encephalitis virus by a fraction rich in flavonoids and phenolic acids obtained from Achyrocline satureioides.** *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(5). <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.004>

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

Participación en Proyectos de Investigación vinculados a la temática del proyecto:

- **02/2022 - 02/2025** Investigador en el Proyecto de I+D: **Nuevas estrategias adyuvantes basadas en el desarrollo de productos naturales nanoformulados con surfactantes sintéticos o biosurfactantes para su futura incorporación en vacunas de aplicación en sanidad porcina.** Dirección: Cariddi, Laura Noelia. FONCYT; UNRC.
- **03/2021 - 03/2024** Investigador en el Proyecto de I+D: **Estrategia nutricional basada en un producto natural nanoformulado para fortalecer el sistema inmunológico y antioxidante de animales de producción y lograr productos cárnicos de alta calidad.** Dirección: Cariddi, Laura Noelia. MINCYTCBA.
- **03/2021 - 03/2024** Investigador en el Proyecto de I+D: **Desarrollo de productos biotecnológicos innovadores basados en micro/nanotecnología para su aplicación en la salud porcina.** Dirección: Bellingeri, Romina. FONCYT; UNRC.
- **03/2021 - 03/2024** Investigador en el Proyecto de I+D: **Probióticos combinados con fitogénicos como herramienta para optimizar la salud intestinal y la eficiencia productiva aviar.** Dirección: Peralta, María Fernanda. FONCYT; UNRC.
- **02/2021 - 02/2023** Investigador en el Proyecto de I+D: **Desarrollo de nuevos adyuvantes basados en productos naturales nanoformulados con surfactantes sintéticos o biosurfactantes. Evaluación de eficacia y biocompatibilidad para su futura incorporación en vacunas de aplicación en sanidad porcina.** Dirección: Cariddi, Laura Noelia. CONICET.

Dirección de proyectos de investigación vinculados a la temática del proyecto:

- **03/2020 - 12/2023** Director en el Proyecto de I+D: **Evaluación de la actividad antimicrobiana y biocompatibilidad de sustancias activas obtenidas de Lithraea molleoides, una planta medicinal de la provincia de Córdoba, como alternativa para el tratamiento de la mastitis bovina.** Dirección: Mañas Fernando. SeCyT UNRC.
- **03/2016 - 12/2019** Director en el Proyecto de I+D: **Comparación de antimicrobianos naturales y sintéticos empleados en la producción de alimentos.** Dirección: Mañas Fernando. SeCyT, UNRC.
- **02/2012 - 12/2015** Director en el Proyecto de I+D: **Comparación de la actividad antimicrobiana y potencial tóxico de diversos extractos vegetales versus antimicrobianos de uso frecuente en medicina veterinaria.** Dirección: Fernando Mañas, SeCyT; UNRC.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

La mastitis bovina es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y es comúnmente consecuencia de una infección microbiana causada por patógenos que penetran a la glándula a través del canal del pezón (Srednik et al., 2017). En Argentina provoca pérdidas en la producción de un 5 a un 10 %, lo que representa hasta U\$S 1,2 diarios por vaca. Según datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, la cuenca lechera argentina produce cerca de 11.600 millones de litros de leche anuales.



Corresponde a Resolución N° 356/2023

La aplicación de antimicrobianos para el control de esta enfermedad es una práctica habitual. El uso masivo e indiscriminado de estas drogas trae consigo algunas consecuencias negativas como la generación de cepas bacterianas resistentes (Toribio et al., 2009). Srednik et al., (2017) informaron que el 64% de aislamientos de *S. aureus* obtenidos de casos de infección intramamaria en bovinos de las principales cuencas lecheras de Argentina mostraban resistencia a las drogas más comúnmente utilizadas en el tratamiento de la enfermedad, principalmente a beta lactámicos, tal y como sucede en diferentes regiones del mundo (Szweda et al., 2012). Por otro lado, el descubrimiento de nuevas drogas antimicrobianas no es una tarea sencilla debido a que de cientos de moléculas que se investigan un número muy reducido de ellas llega a la fase de evaluación clínica y sólo algunas son comercializadas. Entre algunos métodos empleados para descubrir nuevas drogas, la industria farmacéutica centra su atención en la investigación de compuestos naturales derivados de las plantas (Toribio et al., 2009). Es por ello que, en el presente proyecto de investigación, nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivos Generales

-Evaluar la capacidad antimicrobiana y anti-biofilm del extracto de Molle de Córdoba (*Lithraea molleoides*) y los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Origanum vulgare* (orégano) frente a *S. aureus* productores de mastitis bovina.

Objetivos específicos

-Comprobar la actividad antimicrobiana del extracto de Molle de Córdoba y los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Origanum vulgare* (orégano) frente a diversas cepas de *S. aureus* productores de mastitis bovina.

- Determinar la existencia de un potencial efecto sinérgico entre el extracto de Molle de Córdoba y los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Origanum vulgare* (orégano) frente a *S. aureus* productores de mastitis bovina.

-Evaluar la capacidad de inhibir la formación de biofilm del extracto de Molle de Córdoba y los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Origanum vulgare* (orégano) frente a diversas cepas de *S. aureus* productores de mastitis bovina.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS

Recolección y Procesamiento

Extracto etanólico de Molle

Se recolectarán hojas frescas de *Lithraea molleoides* en la localidad de Las achiras, Provincia de Córdoba, que serán trasladadas al laboratorio de Farmacología envueltas en papel. Posteriormente, las hojas serán secadas en estufa a 30°C hasta peso constante y finalmente molidas con molinillo eléctrico. El producto de la molienda se conservará en bolsas de plástico herméticas hasta el proceso de extracción.

Cinco gramos de hojas molidas de *Lithraea molleoides* se someterán a extracción con 100 ml. de etanol de 96° al 80% durante cinco días. Este extracto se concentrará en evaporador rotatorio hasta sequedad y el residuo sólido se disolverá en DMSO al 20%.

Aceites esenciales de Romero y Orégano

Se recolectarán hojas y ramas herbáceas de ambas especies vegetales ubicadas en las provincias de San Luis, Córdoba y Buenos Aires, Argentina. Se llevará a cabo la extracción del aceite esencial del material vegetal recolectado mediante destilación por arrastre de vapor de agua. La composición del mismo se determinará por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS).



Corresponde a Resolución N° 356/2023

Cepas bacterianas

Se utilizarán cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras de leche de vacas afectadas con mastitis bovina cedidas por el Laboratorio LASA (Laboratorio de Sanidad Animal, Río Cuarto).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antibacteriana del extracto de Molle y los aceites esenciales de Orégano y Romero se evaluará empleando la técnica de difusión en agar. Con un sacabocado estéril se realizarán en el agar de cada placa dos pocillos de 6 mm de diámetro en los que se adicionarán los extractos disueltos en DMSO e idéntico volumen de DMSO como control del vehículo. Se ensayarán además los siguientes antimicrobianos convencionales de uso frecuente en producción animal, de grado analítico: Tilosina, Estreptomina, Gentamicina, Amoxicilina, Florfenicol, Enrofloxacin y su metabolito Ciprofloxacina. La interpretación de los halos y la clasificación de los microorganismos se llevará a cabo siguiendo las directivas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2005).

Determinación de CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) y CBM (Concentración Bactericida Mínima)

Para la determinación de la CIM, se llevará a cabo el método de microdilución en placa de 96 pocillos descrito por el NCCLS. La CIM se determinará como la mínima concentración del extracto o el aceite que inhibe completamente el crecimiento bacteriano y se expresará en mg/ml. Para la determinación de la CBM, se tomarán 100 µl del pocillo control y de cada uno de los pocillos del pocillo control y de cada uno de los pocillos con caldo que no presentarán turbidez luego de la incubación y se los inoculará sobre una placa con Agar Mueller-Hinton. La CBM se calculará como la mínima concentración del compuesto que no permita el crecimiento visible de colonias.

Identificación de cepas productoras de biofilm mediante coloración con Rojo Congo

El método se realizará según el protocolo de Freeman et al. (1989). El medio será preparado con 37 g/L de caldo cerebro corazón, 50 g/L de sacarosa, 10 g/L de agar y 0,8 g/L de rojo Congo (Sigma, Aldrich). Las placas se inocularán con las diversas cepas de *S. aureus* y se incubarán durante 24 h a 37°C, para ser luego almacenadas a temperatura ambiente durante 48 h. Se considerará un resultado positivo cuando se observe la presencia de colonias negras con una consistencia cristalina seca.

Inhibición de la formación de biofilm

La cuantificación de la inhibición en la formación de biofilm en superficie abiótica será determinada según el método descrito por Stepanović (2000), con algunas modificaciones. Para la preparación del inóculo, el microorganismo será multiplicado en Caldo Trypticase-Soya (CTS) e incubado por un periodo de 24 hs a 37°C. Se tomarán alícuotas de 100 µl de la suspensión del microorganismo estandarizada a 10⁶ UFC/ml y se inocularán en pocillos de placas de 96 pocillos. Se adicionarán cinco diluciones del extracto, correspondientes a las concentraciones inhibitorias y sub-inhibitorias de crecimiento. Las placas serán incubadas a 37°C por 24 horas, tras lo cual se procederá a remover el contenido y enjuagar los pocillos con agua. Se realizará la tinción con 200 µl de una solución de cristal Violeta al 1%. La decoloración se llevará a cabo con una solución de ácido tricloroacético al 33%, cuya densidad óptica (DO) se medirá en lector de ELISA a 492 nm.

Determinación de interacción entre extracto de Molle de Córdoba y aceites esenciales mediante cálculo de Concentración Inhibitoria Fraccionada

Se evaluarán combinaciones del extracto vegetal de Molle con aceite esencial de Orégano o Romero (en placas de 96 pocillos, con caldo MH) frente a diversas cepas *S. aureus*, mediante la técnica de tablero de damas o checkerboard. El inóculo bacteriano utilizado será de 5 x 10⁵ UFC/ml por pocillo. Se incubará la placa a 37°C durante 18 hs. Se determinará el índice de concentración fraccionaria inhibitoria (ICF) según la siguiente ecuación: $[(A) / (CIM)_a] + [(B) / (CIM)_b] = ICF$ Donde (A) es la CIM del antibiótico en combinación con el extracto; (B) es la CIM del extracto en la mezcla con antibiótico; (CIM)_a es la CIM del



Corresponde a Resolución N° 356/2023

| | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|---|---|---|--|--|---|---|---|---|---|
| Medir actividad inhibitoria formación de biofilm aceite esencial de Romero | | | X | X | | | | | | | | |
| Medir actividad inhibitoria formación de biofilm aceite esencial de Orégano | | | | X | X | | | | | | | |
| Identificar interacciones entre aceites y extractos | | | | | | | | X | X | X | X | X |

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:

El presente proyecto de investigación se desarrollará en el Laboratorio del CIDEF (Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos), Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. El mismo cuenta con el equipamiento e infraestructura necesarios para desarrollar los objetivos planteados: Laboratorio para la elaboración de extractos etanólicos con rotavapores y de aceites esenciales con los destiladores correspondientes; Laboratorio de análisis cromatográfico; Sala de esterilización; Laboratorio de análisis microbiológico, Laboratorio de Microscopía y Laboratorio para el procesamiento de muestras biológicas.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)

Total

- ✓ Bienes de Consumo \$ 320.000
- ✓ Viajes..... \$ 160.000
- ✓ **Total..... \$480.000**

Primer Año

- ✓ Bienes de Consumo \$ 80.000
- ✓ Viajes..... \$ 40.000
- ✓ **Total..... \$120.000**

Segundo Año

- ✓ Bienes de Consumo \$ 80.000
- ✓ Viajes..... \$ 40.000
- ✓ **Total..... \$120.000**

Tercer Año

- ✓ Bienes de Consumo \$ 80.000
- ✓ Viajes..... \$ 40.000
- ✓ **Total..... \$120.000**



Corresponde a Resolución N° 356/2023

Cuarto Año

| | |
|---------------------------|-----------|
| ✓ Bienes de Consumo | \$ 80.000 |
| ✓ Viajes..... | \$ 40.000 |
| ✓ Total..... | \$120.000 |

* El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.

8.1. BIBLIOGRAFÍA

- Angioni, a, Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J. D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., & Cabras, P. (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem.*, 52, 3530–3535. <https://doi.org/10.1021/jf049913t>
- Avila-sosa, R., Navarro-cruz, A. R., Vera-lópez, O., Dávila-márquez, R. M., Melgoza-palma, N., & Meza-pluma, R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis*): Una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*, 52(222), 23–36.
- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(1998070\)13:4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(1998070)13:4)
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914–1920. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002>
- Cecchini, M. E., Roma, D., Pussetto, L., Iglesias, D., Basualdo, M., Aiassa, D., & Mañas, F. J. (2018). In vitro evaluation of the antimicrobial, antioxidant and DNA protective activities of an ethanolic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Analecta Veterinaria*, 38(2), 1–9. <https://doi.org/10.24215/xxxxxxx>
- Choriantopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G. J., & Haroutounian, S. A. (2004). Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8261–8267. <https://doi.org/10.1021/jf049113i>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 15, Issue 2, pp. 167–193). <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*, 42, 872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
- Hoque, M. N., Das, Z. C., Rahman, A. N. M. A., Haider, M. G., & Islam, M. A. (2018). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.03.008>
- Kuok, C. F., Hoi, S. O., Hoi, C. F., Chan, C. H., Fong, I. H., Ngok, C. K., Meng, L. R., & Fong, P. (2017). Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study. <https://doi.org/10.1177/1535370216689828>, 242(7), 731–743. <https://doi.org/10.1177/1535370216689828>
- López, P., Basile, P., Wallace, F., Olivaro, C., Minteguiga, M., & Ferreira, F. (2021). *Lithraea molleoides* (Vell.) Engler Paula. In *Medicinal and Aromatic Plants of South America Vol. 2* (Vol. 7, pp. 1–551). <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-62818-5>
- Mundy, L., Pendry, B., & Rahman, M. (2016). Antimicrobial resistance and synergy in herbal



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución N° 356/2023

medicine. *Journal of Herbal Medicine*, 6(2), 53–58. <https://doi.org/10.1016/J.HERMED.2016.03.001>

– Nazar C, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 67(1). <https://doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>

– NCCLS. (2005). Metodología dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. In Norma Aprovada (Vol. 23, Issue 2).

– Srednik, M. E., Tremblay, Y. D. N., Labrie, J., Archambault, M., Jacques, M., Cirelli, A. F., & Gentilini, E. R. (2017). Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina. *FEMS Microbiology Letters*, 364(8). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx001>

– Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)

– Szweda, P., Schielmann, M., Milewski, S., Frankowska, A., & Jakubczak, A. (2012). Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the Eastern Poland. *Polish Journal of Microbiology*, 61(1), 65–69. <https://doi.org/10.33073/pjm-2012-009>

– Toribio, M. S., Oriani, S., Toso, R. E., Tortone, C. ., & Fernández, J. . (2009). *Staphylococcus Aureus* sensible a extractos metanólicos obtenidos de plantas nativas de la provincia de La Pampa, Argentina. *Ciencia Veterinaria*, 11(1515–1883), 14–18.