



TITULO: Evaluación in vitro del potencial efecto de extractos vegetales de *Prosopis spp.* como promotor de crecimiento en aves.

INTEGRANTES	FIRMA
ARDOINO, Silvia Marina	
TOSO, Ricardo Enrique	
TORIBIO, Mirta Susana	
ORIANI, Delia Susana	
ZUCCARI, Natalia	
ALVAREZ, Hebe Lina	



Número de Proyecto: .....

Año: .....

(No llenar)

## UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

### Facultad de Ciencias Veterinarias

#### 1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

**1.1. TÍTULO del PROYECTO “Evaluación in vitro del potencial efecto de extractos vegetales de *Prosopis spp.* como promotor de crecimiento en aves”**

**1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Básica - Aplicada - Desarrollo Experimental**

**BÁSICA:** Consiste en trabajos experimentales o teóricos que se emprenden principalmente para obtener nuevos conocimientos acerca de los fundamentos de fenómenos y hechos observables, sin prever en darles ninguna aplicación o utilización determinada o específica.

**APLICADA:** Consiste también en trabajos originales realizados para adquirir nuevos conocimientos, pero fundamentalmente dirigidos hacia un objetivo práctico específico.

**DESARROLLO EXPERIMENTAL:** Consiste en trabajos sistemáticos basados en los conocimientos existentes, derivados de la investigación y/o la experiencia práctica, dirigidos a la producción de nuevos materiales, productos y dispositivos; al establecimiento de nuevos procesos, sistemas y servicios, o a la mejora substancial de los ya existentes, es decir, producir una tecnología.

**1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: (Ver Códigos en Planilla Adjunta) .....**

**1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: (Ver Códigos en Planilla Adjunta) .....**

#### 2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

**2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS**

Departamento de Producción Animal y CIDEF de la Facultad de Ciencias veterinarias de la UNLPam.

**2.2. OTRAS INSTITUCIONES: .....**  
 .....

**2.3. EQUIPO de TRABAJO: (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)**

**2.3.1 . INTEGRANTES**

Apellido y Nombre	Título Académico	Categ. Invest.	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
ARDOINO, Silvia M.	M.V.; Dr	IV	D	Prod. De Aves y Pilíferos y Patología Aviar, CIDEF	JTP Ex Investigadora	8
TOSO, Ricardo E.	M.V.; Dr.	II	I	CIDEF	Director	2
TORIBIO, Mirta S.	M.V.; Esp	III	I	CIDEF	Investigadora	2



<b>ORIANI, Delia S.</b>	<b>M.V; Mg</b>	<b>II</b>	<b>I</b>	<b>Cátedra Microbiología Especial</b>	<b>Prof. Adjunta dedicación Exclusiva</b>	<b>2</b>
<b>ZUCCARI, Natalia</b>	<b>M.V.</b>	<b>S/C</b>	<b>I</b>		<b>Egresada</b>	<b>2</b>
<b>ALVAREZ, Hebe L.</b>	<b>Lic. Biología</b>	<b>S/C</b>	<b>I</b>	<b>CIDEF</b>	<b>Becaria Conicet</b>	<b>2</b>

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

### 2.3.1. BECARIOS:

<b>Apellido y Nombre</b>	<b>Organismo que Financia</b>	<b>Tipo de Beca</b>	<b>Director</b>	<b>Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.</b>

### 2.3.2. TESISISTAS:

<b>Apellido y Nombre</b>	<b>Título Académico al que Aspira</b>	<b>Título Proyecto de Tesis</b>	<b>Organismo</b>	<b>Director</b>	<b>Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.</b>

### 2.3.3. PERSONAL de APOYO:

<b>Apellido y Nombre</b>	<b>Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)</b>	<b>Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.</b>

### 2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

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



### **3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (de 1 a 5 años con una sola prórroga) 3 años**

**3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 /2016      FINALIZACIÓN: 31 /12 /2018**

### **4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)**

Durante décadas se han utilizado en la producción aviar los antibióticos como promotores de crecimiento, obteniéndose muy buenos resultados en los parámetros productivos. Sin embargo, con el paso del tiempo se puso en evidencia que la administración de estos compuestos en dosis subterapéuticas podía encerrar un riesgo para la Salud Pública, aumentando la resistencia de determinados microorganismos a antibióticos utilizados en terapéutica. Así fue que a partir de 1997 se comienza a discutir su uso, llegando en los últimos 10 años a la prohibición de la utilización de los antibióticos como promotores de crecimiento en producción animal, tanto en la Unión Europea como en EEUU. En el presente trabajo se propone evaluar compuestos de origen natural, obtenidos de plantas pertenecientes al Género *Prosopis*, como agentes promotores de crecimiento. Se realizarán ensayos *in vitro* para determinar la presencia de acción antimicrobiana sobre *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* y *Salmonella gallinarum gallinarum*. La evaluación se llevará a cabo utilizando extractos metanólicos de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*, *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, *Prosopis strombulifera* y *Prosopis alpataco*, mediante la técnica de dilución en placa.

#### **4.1 Palabras claves: (de 4 a 6)**

**Fitoaditivos / Promotores de crecimiento / *Prosopis* spp. / *Clostridium perfringens***

#### **4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras) Res.N° 097-CS-12.**

During decades they have been used in poultry production antibiotics as growth promoters, obtaining very good results in the production parameters. However, over time it became clear that the administration of these compounds in subtherapeutic doses could present a hazard to Public Health, increasing the resistance of certain microorganisms to antibiotics used in therapy. So it was that from 1997 begins to discuss its use, coming in the last 10 years to the prohibition in the use of antibiotics as growth promoters in animal production, both in the European Union and in the US. This study intends to evaluate naturally compounds obtained from plants belonging to the genus *Prosopis*, as growth-promoters agents. In vitro assays were conducted to determine the presence of antimicrobial action on *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and *Salmonella gallinarum gallinarum*. The evaluation was carried out using methanol extracts of *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*, *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, *Prosopis strombulifera* and *Prosopis alpataco*, by plate dilution technique.

#### **4.3. Key words: (de 4 a 6)**

**Phytoadditives / Growth-promoters / *Prosopis* spp. / *Clostridium perfringens***



## **5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES**

### **5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA**

El término “antibiótico promotor de crecimiento” (AGPs: antimicrobial growth performance promoters) es usado para describir medicamentos que destruyen o inhiben bacterias y son administradas a dosis bajas o subterapéuticas, con la finalidad de mejorar la conversión alimenticia, la ganancia de peso y reducir la morbilidad y mortalidad debido a enfermedades infecciosas (Huyghebaert et al., 2010).

Este efecto de los antibióticos fue descubierto en la década de 1940 cuando se observó que las aves alimentadas con micelios secos de *Streptomyces aureofaciens* que contenían residuos de clortetraciclina incrementaban su tasa de crecimiento. Esta acción se relacionó con el efecto del residuo de antibiótico sobre la población microbiana intestinal (Castanon, 2007). A partir de este descubrimiento se generalizó el uso de antibióticos como promotores de crecimiento a tal punto que en 1951 la Food and Drug Administration aprobó en EEUU el uso de antibióticos como aditivo en nutrición animal sin prescripción veterinaria y lo mismo hicieron en los diez años siguientes los diferentes países europeos involucrados en la producción avícola (Jones y Ricke, 2003).

Todos los antibióticos controlan la proliferación de los microorganismos, sin embargo no todos lo hacen de la misma forma. Por lo tanto también actúan de diferente manera tanto para controlar enfermedades como para promover el crecimiento. En el lumen intestinal hay una amplia variedad de especies microbianas, algunas benéficas y otras patógenas. Las células epiteliales a través de las cuales se realiza la absorción de los nutrientes están cubiertas por una capa de mucina que actúa como barrera protectora frente al daño que se pueda ocasionar a partir de la adhesión e invasión de las células por estos patógenos. Los *Lactobacillus* tienen la capacidad de adherirse a las células epiteliales, compitiendo con otras bacterias patógenas, y por lo tanto se consideran benéficas. La microflora intestinal puede ser modificada mediante diferentes manejos nutricionales. Durante años se han utilizado antibióticos a dosis subterapéuticas como suplementos alimenticios con la intención de disminuir la cantidad de patógenos en la luz intestinal, el daño en la superficie mucosa y aumentar la producción de carne y huevos (Smirnov et al. 2015). La mayoría de los antibióticos usados como promotores de crecimiento se han estudiado en base a su efecto sobre las poblaciones bacterianas intestinales de *Lactobacillus* y *Clostridium perfringens* y los cambios que la presencia o ausencia de los mismos ocasiona sobre la salud y la estructura del tracto gastrointestinal, considerándose beneficiosa la presencia de *Lactobacillus* y negativa la de *Clostridium perfringens*, agente de la enteritis necrótica (Miles et al., 2006). Los antibióticos promotores de crecimiento no esterilizan el tracto gastrointestinal, sino que controlan ciertas poblaciones bacterianas para mejorar el estado del huésped. La modificación de las poblaciones bacterianas provoca cambios de la estructura del tracto



intestinal tales como la disminución de la proliferación celular, adelgazamiento de la mucosa, menos lámina propia e incremento del área de la superficie de absorción por aumento de la altura de las vellosidades. Estos cambios traen aparejados beneficios como menor necesidad de energía para mantener el tejido gastrointestinal, energía que el ave puede utilizar para aumentar la absorción de nutrientes o mejorar su crecimiento (Miles et al., 2006). A pesar de los efectos beneficiosos sobre los parámetros productivos también se han hecho numerosos estudios que en su mayoría coinciden en concluir que el uso continuado de antibióticos, en especial a dosis subterapéuticas, en la dieta de animales de consumo como las aves, incrementan la probabilidad de resistencia bacteriana contra patógenos en humanos (Heyman y Menard, 2002). Actualmente sólo están autorizados para su uso como promotores de crecimiento antibióticos que actúan por contacto, y no se absorben (Donoghue, 2003). Sin embargo, el uso generalizado de los mismos como aditivos puede contribuir al desarrollo de bacterias resistentes al mismo, los cuales ya no podrán usarse en terapéutica. Estas bacterias resistentes se consideran un riesgo potencial para la salud humana si son transferidas a las personas. Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud, en el año 1997 y el Comité Económico y Social de la Unión Europea al año siguiente concluyeron que el uso de antimicrobianos como aditivos en alimentación animal son un tema que concierne a la Salud Pública (Castanón, 2007). El reglamento N° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, teniendo en cuenta un dictamen anterior del año 1999 que considera que «La utilización de antimicrobianos promotores del crecimiento pertenecientes a categorías utilizadas o que pueden utilizarse en la medicina humana o veterinaria (es decir, cuando hay un riesgo de selección de una resistencia cruzada a los medicamentos utilizados para tratar las infecciones bacterianas) debe ir reduciéndose lo más rápidamente posible y, por último, suprimirse» determina como fecha límite para prohibir el uso de los mismos el 31 de diciembre de 2005. Incluye junto con los antibióticos a los coccidiostáticos e histomononásticos (Diario Oficial de la Unión Europea, 2003). También indica que deben extremarse los esfuerzos para desarrollar productos alternativos con efectos similares, pero sin riesgo para la salud humana. Actualmente esta legislación está implementada, permitiéndose el uso de antibióticos en la terapéutica con indicación veterinaria, no así como promotores de crecimiento o aditivos.

Los EEUU formalizaron más tardíamente esta situación a través de la FDA (Food and Drug Administration), de una manera más flexible hasta el momento, determinando a partir de 2013 un período de tres años para la retirada de los antibióticos como promotores de crecimiento en producción animal y normalizando el uso en terapéutica bajo indicación veterinaria (Cosgrove, 2014). Estas medidas dieron origen a numerosas investigaciones para reconocer otro tipo de productos que brindaran los mismos resultados productivos, sin los efectos potencialmente negativos sobre la Salud Pública. Aquellos compuestos con los que se pueda reemplazar a los antibióticos como promotores de crecimiento deberían cumplir con ciertos requisitos: reducir la incidencia y severidad de las infecciones subclínicas, reducir el uso de nutrientes por parte de la flora microbiana, estimular la absorción de nutrientes a través del adelgazamiento de la pared



intestinal y reducir la producción de metabolitos de bacterias Gram positivas que inciden negativamente en el crecimiento (Huyghebaert et al., 2011). Entre las alternativas propuestas figuran enzimas (exógenas), ácidos orgánicos, probióticos, prebióticos y metabolitos secundarios de las plantas: los fitoaditivos (Haghighi et al., 2006; Perić et al., 2009; Dhama et al., 2014). Estos productos, denominados también fitobióticos, consisten en sustancias derivadas de plantas medicinales o especias, han probado ser poco tóxicos y tienen un efecto positivo en la producción y la salud de los animales. Como fitobióticos se incluyen plantas enteras, partes de plantas o aceites esenciales. Estimulan el consumo y la conversión del alimento, la digestibilidad y la ganancia de peso de las aves. El mecanismo de acción de los fitoaditivos no es claro, en general influyen sobre el proceso de digestión y producción de enzimas digestivas, y a la vez demuestran efecto bactericida, antiviral y antioxidante (Perić et al., 2009; Dharma et al., 2014). Teniendo en cuenta la necesidad de abandonar el uso de antibióticos promotores de crecimiento se comenzó a pensar en evaluar el uso de fitobióticos con esta finalidad. Estas evaluaciones se llevaron a cabo tanto in vivo como in vitro, y con diferentes especies vegetales. Entre otros, se ha probado la Lupulina, combinación de aceites esenciales y resinas amargas del *Humulus lupulus* (lúpulo), con respecto a su efecto sobre la población de *Clostridium perfringens* de la flora intestinal comprobándose que disminuía la misma tras su administración en el agua de bebida (Tillman et al. 2011). También se ha ensayado el efecto de numerosos aceites esenciales (Mathlouthi et al., 2012). Se realizó la evaluación in vitro de extracto hexánico de *Artemisia annua* (ajenjo dulce), el cual inhibió el crecimiento de *Clostridium perfringens*. Además se llevó a cabo la evaluación del efecto in vivo, determinándose la disminución de las lesiones asociadas al microorganismo en intestino delgado al ser administrado y verificándose además de la disminución de la carga de *Clostridium perfringens* una recuperación del estado y aumento en la ganancia de peso (Engberg et al., 2012). Uno de los fitobióticos más evaluados con respecto a su efecto como promotor de crecimiento es el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano), con resultados muy alentadores para su uso en parrilleros y ponedoras, a tal punto que en numerosos países ya se lo elabora para uso comercial. Además se han evaluado con resultados positivos los extractos secos de *Cynaras colymus* (Alcachofa), *Silybum marianum* (Cardo Mariano) y *Capsicum annum L.*, (Cápsico), observándose en todos los casos mejora en la ganancia de peso de las aves, con incrementos en la eficiencia de conversión (Bernardino, 2011). Asimismo se evaluó la suplementación con cebolla cruda a distintas concentraciones en la dieta de pollos parrilleros y se observó que se producía un incremento tanto del consumo de alimento como del peso corporal en diferentes períodos de crecimiento (Goodarzi et al., 2013). La evaluación de los efectos como promotor de crecimiento de estas sustancias se puede realizar in vivo mediante la evaluación de parámetros tales como consumo, ganancia de peso corporal e índice de conversión (Bernardino, 2011; Goodarzi, 2013), con sacrificios seriados de las aves en estudio evaluando lesiones y estado de la mucosa intestinal, relacionados con la proliferación de *Clostridium* (Tillman et al., 2011; Engberg et al., 2012), o bien in vitro evaluando la inhibición del crecimiento de microorganismos identificados como productores de efectos indeseables, tales como *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp.* y *E. coli spp.* ((Perić et al., 2009; Engberg et al., 2012; Mathlouthi et al., 2015).



**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)**

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

*Artículos:*

TOSO RE; BOERIS, M.; ARDOINO SILVIA; TORIBIO, M.; POBLETE G; RIO F. Estudio preliminar para determinar el potencial empleo de extractos de Prosopis flexuosa NV Algarrobo y Ruta chalepensis NV ruda en la formulación de fármacos. *Ciencia Veterinaria*. General Pico: Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam. 2013 vol.15 n°. p97 - 103. Issn 1515-1883.

ARDOINO, S.; BOERIS, M.; BARUTA, D.; TOSO, R.. Comparación del efecto antimicrobiano de partes aéreas y corteza de prosopis flexuosa var.. *Ciencia Veterinaria*.: Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam. 2012 vol.14 n°1. p7 - 13. issn 1515-1883.

TOSO RE; TORIBIO, M.; BOERIS, M.; ARDOINO, S.; FERNANADEZ, Y; MENGELLE, C.; ORIANI, D.; GAGLIANO, L.; TROIANI, H.; STEIBEL, P.. Métodos Biotecnológicos aplicados al desarrollo de nuevos medicamentos. *Cuadernos de Ciencia y Técnica*. Santa Rosa: Universidad nacional de La Pampa. 2008 vol.3 n°. p19 - 38. issn 1852-0626.

TOSO, R.; STEIBEL PEDRO E.; TROIANI, H.; ORIANI, D.; ARDOINO, S.; TORIBIO, M.; BOERIS, M.. Búsqueda sistematizada de plantas con actividad farmacológica utilizando el Banco de Extractos Vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa. *Ciencia Veterinaria*.: Facultad de Ciencias Veterinarias. 2006 vol.8 n°1. p25- 30. issn 1515-1883.

*Trabajos en eventos científico-tecnológicos publicados:*

ARDOINO S; BARUTA D; BOERIS, M.; BRANDAN, J.; MARIANI, E.; ORIANI, D.; SOSA, R.; TOSO R. EFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS VEGETALES DE PROSOPIS SPP SOBRE BRUCELLA CANIS. Argentina. Santa Rosa. 2014. Libro. Resumen. Jornada. Jornada de Ciencia y Técnica 2014 UNLPam. Consejo de Ciencia y Técnica UNLPam.

ARDOINO S.; BOERIS, M.; TOSO RE. Caracterización fitoquímica de Prosopis Flexuosa var. flexuosa (Algarrobo) y Prosopis flexuosa var. depressa (Alpataco), plantas con acción farmacológica. Argentina. General Pico. 2013. Revista. Resumen. Jornada. VIII Jornada de Ciencia y Técnica I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias - Facultad de Ingeniería. Facultad de Ciencias Veterinarias.

TOSO RE; BOERIS, M.; ARDOINO SILVIA; TORIBIO, M.; POBLETE G; RIO F. Potencial empleo de extractos de Prosopis flexuosa N.V. Algarrobo y Ruta chalepensis N.V. Ruda, en la





formulación de fármacos. Argentina. General Pico. 2013. Revista. Resumen. Jornada. VIII Jornada de Ciencia y Técnica I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias. Facultad de Ingeniería. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam

ARDOINO, S.; BARUTA DA; BRANDAN JL; MARIANI EL; BOERIS, M.; ORIANI, D.; TOSO RE; DUCASSE L; SOSA RE. EFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS VEGETALES DE PROSOPIS SPP. SOBRE BRUCELLA CANIS. Argentina. Santa Rosa. 2012. Libro. Resumen. Jornada. Jornada de Ciencia y Técnica 2012: Proyectar y comunicar, estrategias para la investigación en la UNLPam. UNLPam

ARDOINO, S.; BARUTA DA; BRANDAN JL; MARIANI EL; SOSA RE; ORIANI, D.; TOSO RE. Efecto antimicrobiano de Solanum diflorum sobre Brucella canis. Argentina. General Pico. 2011. Revista. Resumen. Jornada. VII Jornada de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam

ARDOINO S; BARUTA D; SOSA, R.; BRANDAN, J.; MARIANI, E.; ORIANI, D.; TOSO, R.. Actividad antimicrobiana contra Brucella canis de extractos de plantas nativas o naturalizadas de la Provincia de La Pampa. Argentina. Santa Rosa. 2010. Libro. Resumen. Jornada. Jornada de Ciencia y Técnica 2010: "La investigación científica: historia y proyección". UNLPam

ARDOINO, S.; BARUTA, D.; BRANDAN, J.; FERNÁNDEZ, L.; ORIANI, D.; TOSO, R.. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra Brucella canis de extractos vegetales. Argentina. Córdoba. 2010. Libro. Artículo Breve.

ARDOINO, S. M. ; BARUTA, D. A.; ORIANI, D. S.; SOSA, R. E.; TOSO, R. E. . ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA BRUCELLA CANIS DE EXTRACTOS DE PLANTAS NATIVAS O NATURALIZADAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA. Argentina. General Pico. 2009. Revista. Resumen. Jornada. VI Jornada de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam

STEIBEL PEDRO E.; TROIANI, H.; ORIANI, D.; ARDOINO, S.; TORIBIO, M.; BOERIS, M.; TOSO, R.. Banco de extractos vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa. Argentina. Tucumán. 2007. Revista. Artículo Breve. Simposio. IX Simposio Argentino y XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica.

TROIANI, H.; STEIBEL, P.; BOERIS, M.; ARDOINO S; TORIBIO, M.; TOSO, R.. Banco de extractos vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa. Aplicaciones para estudios farmacognósticos sistematizados. Argentina. Santa Rosa. 2006. Revista. Resumen. Jornada. VI Jornada de Ciencia y Técnica de la UNLPam: 1996-2006. Balances y perspectivas. UNLPam



ORIANI, D.; ARDOINO S; TOSO R. Plantas de la Provincia de La Pampa con actividad antimicrobiana in vitro sobre cepas de *Brucella canis*. Argentina. Santa Rosa. 2006. Revista. Resumen. Jornada. VI Jornadas de Ciencia y Técnica de la UNLPam: 1996-2006 balances y perspectivas. UNLPam

ORIANI, D.; ARDOINO S; TOSO R. Actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa frente a *Brucella canis*. Argentina. Santa Rosa. 2006. Revista. Resumen. Jornada. VI Jornadas de Ciencia y Técnica de la UNLPam: 1996-2006 balances y perspectivas. UNLPam

ARDOINO, S.; BARUTA DA; MARIANI EL; RIESCO, S.; TOSO RE. Actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* de extractos de plantas nativas o naturalizadas de la provincia de La Pampa (Argentina) (Antibacterial activity of native extracts of vegetables of La Pampa (Argentina) against *Brucella canis*). Argentina. General Pico. 2005. Revista. Resumen. Jornada. Memorias de la IV Jornada de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam

*Trabajos en eventos científico-tecnológicos no publicados:*

ARDOINO, S.; BARUTA DA; BRANDAN JL; FERNÁNDEZ, L.; ORIANI, D.; TOSO RE. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *BRUCELLA CANIS* DE EXTRACTOS VEGETALES. Argentina. Córdoba. 2010. Simposio. X Simposio Argentino y XIII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica.

ARDOINO, S.; BARUTA DA; ORIANI, D.; TOSO RE. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa contra *Brucella canis*. Argentina. Santa María de Punilla. 2009. II Reunión de Biotecnología aplicada a plantas medicinales y aromáticas. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba y REDBIO

STEIBEL, P.; TROIANI, H.; ORIANI, D.; ARDOINO, S.; TORIBIO, M.; BOERIS, M.; TOSO RE. Banco de Extractos Vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa. Argentina. San Miguel de Tucumán. 2007. Simposio. IX Simposio Argentino y XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. Universidad Nacional de Tucumán y Fundación Miguel Lillo.

STEIBEL, P.; TROIANI, H.; ORIANI, D.; ARDOINO S; TORIBIO, M.; BOERIS, M.; TOSO, R. Banco de extractos vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa. Argentina. San Miguel de Tucumán. 2007. Simposio. IX Simposio Argentino y XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. Universidad Nacional de Tucumán, Fundación Miguel Lillo y SIDETEC Gobierno de Tucumán



ORIANI, D.; ARDOINO, S.; TOSO RE. Actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa, frente a *Brucella canis*. Argentina. Buenos Aires. 2006. Congreso. Congreso SADEBAC 2006. SADEBAC

*Tesis:*

ARDOINO, S. *Estudio Fitoquímico de Extractos con actividad antimicrobiana contra Brucella canis obtenidos a partir de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa, Argentina*. Doctor en Ciencias Veterinarias. UNIV.NAC.DE LA PLATA / FAC.DE CS.VETERINARIAS. 2014. Español

## **6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO**

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

**Problema científico:** es necesario reemplazar el uso de los antibióticos como promotores de crecimiento en aves por otras sustancias que presenten menores riesgos para la salud humana y animal.

**Objetivo general:** Evaluación in vitro del efecto promotor de crecimiento de *Prosopis* spp.

#### **Objetivos específicos:**

Evaluar in vitro el efecto antimicrobiano de *Prosopis* spp. frente a *Clostridium perfringens*.

Evaluar in vitro el efecto antimicrobiano de *Prosopis* spp. frente a *Salmonella gallinarum* *gallinarum*.

Evaluar in vitro el efecto antimicrobiano de *Prosopis* spp. frente a *Escherichia coli*.

**Hipótesis:** los extractos vegetales de *Prosopis* spp. inhibirán el crecimiento bacteriano in vitro de *Clostridium perfringens*, *Salmonella gallinarum* *gallinarum* y *Escherichia coli*.

**Resultados esperados:** Que la especie vegetal *Prosopis* spp inhiba el desarrollo “in vitro” de las cepas bacterianas seleccionadas. Los resultados permitirán luego realizar evaluaciones in vivo para determinar su potencial empleo como promotores de crecimiento. Eventualmente el uso de compuestos de origen natural en reemplazo de los antibióticos de síntesis que se utilizan actualmente en el país significará un avance en la producción avícola, Salud Pública y animal.



## 6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

### Obtención de los extractos vegetales a evaluar.

Se evaluarán extractos vegetales *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa*, *Prosopis flexuosa* var. *depressa*, *Prosopis alpacato* y *Prosopis strombulifera*.

Las muestras de las cuatro especies vegetales se secarán en estufa por corriente de aire a 45°C y conservarán en bolsas individuales hasta la realización de los extractos.

Los extractos metanólicos se obtendrán por maceración de 20 g de partes aéreas trituradas de la planta en 100 mL de una solución etanol:agua (1:1, v/v) durante 24 h (3x). Los Extractos hidroalcohólicos obtenidos se juntarán y llevarán a sequedad en rotavapor a una temperatura de 70°C. Los extractos secos se retomarán con 200 mL de metanol (3X). Se juntarán los extractos y llevarán a sequedad en rotavapor a 70°C obteniendo los Extractos Metanólicos Desecados. Estos extractos desecados se conservarán a – 20°C hasta el momento de realizar los ensayos. Antes de realizar los ensayos, los extractos metanólicos desecados se resuspenderán en un volumen total de 5 mL de agua destilada estéril obteniendo el Extracto Metanólico

### Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales frente a los microorganismos seleccionados.

La actividad antimicrobiana se evaluará mediante el método de dilución en placas.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales contra *Salmonella gallinarum* y *Escherichia coli*: las pruebas de actividad antimicrobiana se realizarán sobre placas de Petri de 60 mm de diámetro con 10 mL de agar Mueller Hinton a la que se le adicionarán 100 µL de extracto por placa obteniendo una concentración del extracto en la placa de 1/100. Cada placa se sembrará con una suspensión bacteriana del agente etiológico en solución fisiológica estéril correspondiente al 0,5 en la escala de Mc Farland. Además se sembrarán dos placas control negativo sin extracto para verificar crecimiento y dos placas control positivo con disco de antibiótico para verificar inhibición del crecimiento. Se utilizará como antibiótico control norfloxacina para el caso de *E. coli*, y gentamicina para *Samonella gallinarum gallinarum*. Se incubará en estufa a 37°C durante 24 horas y se realizará la lectura de la presencia o no de crecimiento bacteriano en las placas con extracto y control negativo y el halo de inhibición en las placas con disco de antibiótico control positivo. En las placas en que se observe inhibición del crecimiento se realizará una ansada y tinción a fin de verificar la ausencia de crecimiento bacteriano. Se realizarán cuatro repeticiones de cada extracto.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales contra *Clostridium perfringens*: las pruebas de actividad antimicrobiana se realizarán sobre placas de Petri de 60 mm de diámetro con 10 mL medio agar sangre a la que se le adicionarán 100 µL de extracto por placa obteniendo una concentración del extracto en la placa de 1/100. Cada placa se sembrará con una suspensión bacteriana del agente etiológico en solución fisiológica estéril correspondiente al 0,5 en la escala de Mc Farland. Además se sembrarán dos placas control negativo sin extracto para verificar crecimiento y dos placas control positivo con disco de antibiótico para verificar inhibición del crecimiento. Se utilizará como antibiótico control lincomicina. Se incubará en estufa en anaerobiosis a 37°C durante 24 horas y se realizará la lectura de la presencia o no de crecimiento



bacteriano en las placas con extracto y control y el halo de inhibición en las placas con disco de antibiótico control. En las placas en que se observe inhibición del crecimiento se realizará una ansada y tinción a fin de verificar la ausencia de crecimiento bacteriano. Se realizarán cuatro repeticiones de cada extracto.

### 6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

Luego de la prohibición del uso de antibióticos como promotores de crecimiento en aves en la Unión Europea y EEUU, se realizaron numerosos ensayos para suplantarlos y obtener con otros compuestos resultados productivos similares. Así fue que aparecieron en el mercado probióticos, prebióticos, enzimas, acidificantes, antioxidantes y fitoaditivos. Estos son los últimos que han sido incorporados a la lista, incluyendo extractos vegetales y aceites esenciales. Si bien en el país aún no existen las mismas restricciones antes mencionadas, la búsqueda de compuestos que puedan reemplazar a los antibióticos en esta función en la producción aviar implicaría un avance y estar preparados para cuando las restricciones existan. Pero por sobre todo, lograr una producción más saludable y segura para el consumidor, disminuyendo los riesgos que implica para la Salud Pública la capacidad potencial de generar resistencia antimicrobiana contra antibióticos utilizados en terapéutica humana y animal.

### 6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

#### AÑO 1

	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Revisión de material bibliográfico	X	X	X								
Recolección del material vegetal			X	X	X	X	X				
Preparación de los extractos vegetales							X	X	X	X	X

#### AÑO 2

	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Ensayos de actividad antimicrobiana	X	X	X	X	X	X	X	X			
Análisis de resultados								X	X	X	X

#### AÑO 3

	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Ensayos de actividad antimicrobiana	X	X	X	X							
Análisis de resultados	X	X	X	X							
Presentación de resultados					X	X	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:**

Se cuenta con espacio para acondicionamiento y procesamiento de muestras vegetales, equipamiento para realización de diversos tipos de extractos vegetales (Rotavapor, extractor Soxhlet), freezers para su almacenamiento en el laboratorio de investigación y desarrollo del CIDEF.

Se cuenta con los laboratorios de bacteriología para preparar medios y realizar los ensayos de actividad antimicrobiana, equipados con autoclaves, estufas de cultivo y campana de bioseguridad en el CIDEF.

### **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) \***

#### **PRESUPUESTO AÑO 1**

<b>EQUIPAMIENTO E INFRAESTRUCTURA</b>	-
<b>BIENES DE CONSUMO</b>	
Etanol y solventes varios	<b>\$ 350</b>
Frasco ampolla color caramelo de 25 y 50 mL, tapas de goma y aros de seguridad de aluminio	<b>\$ 500</b>
Guantes	<b>\$ 150</b>
Papel de filtro	<b>\$ 180</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	-
<b>VIAJES</b>	<b>\$ 2500</b>
<b>PERSONAL DE APOYO</b>	-
<b>OTROS</b>	-
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 3680</b>

**PRESUPUESTO AÑO 2**

<b>EQUIPAMIENTO E INFRAESTRUCTURA</b>	-
<b>BIENES DE CONSUMO</b>	
Cepas bacterianas	\$ 3000
Medios de cultivo	\$ 800
Material descartable para microbiología	\$ 400
Discos de antibiograma	\$ 100
Sobres de anaerobiosis	\$ 1000
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	-
<b>VIAJES</b>	-
<b>PERSONAL DE APOYO</b>	-
<b>OTROS</b>	-
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 5300</b>

**PRESUPUESTO AÑO 3**

<b>EQUIPAMIENTO E INFRAESTRUCTURA</b>	-
<b>BIENES DE CONSUMO</b>	
Cepas bacterianas	\$ 1000
Medios de cultivo	\$ 250
Material descartable para microbiología	\$ 600
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	-
<b>VIAJES</b>	<b>\$ 3500</b>
<b>PERSONAL DE APOYO</b>	-
<b>OTROS</b>	-
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 5350</b>

**PRESUPUESTO TOTAL**

<b>EQUIPAMIENTO E INFRAESTRUCTURA</b>	-
<b>BIENES DE CONSUMO</b>	<b>8330</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	-
<b>VIAJES</b>	<b>6000</b>
<b>PERSONAL DE APOYO</b>	-
<b>OTROS</b>	-
<b>TOTAL</b>	<b>14330</b>

*\* 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**

Bernardino, M. 2011. *Evaluación de promotor de crecimiento a base de extractos vegetales en la alimentación de aves*. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central “San Benito Abad”. <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/evaluacion-promotor-crecimiento-base-extractos.pdf>

Castanon, J. 2007. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poultry Science* 86:2466–2471 doi:10.3382/ps.2007-00249.

Cosgrove, J. 2014. Alternatives to antibiotics in food production animals. <http://www.petfood2.com/reports/2014/04/feed-alternatives-to-antibiotics.aspx>

Dhama, K.; R. Tiwari, R.U. ;Khan, S.; Chakraborty; M. Gopi; Kartik, K.; Saminathan, M.; Desingu, P.; Sunkara, L. 2014. Growth promoters and novel feed additives improving poultry production and health, bioactive principles and beneficial applications: The trends and advances: A review..*Int. J. Pharmacol.*, 10: 129-159.

Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. (Texto pertinente a efectos del EEE) Versión electrónica: <http://eurlex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&qid=1434660412365&from=EN>

Engberg, R; Grevsen, K; Ivarsen, E; Frette´, X, Christensen, L; Højberg, O;Jensen, B;Canibe, N. 2012. The effect of *Artemisia annua* on broiler performance, on intestinal microbiota and on the course of a *Clostridium perfringens* infection applying a necrotic enteritis disease model.*AvianPathology*41(4), 369\_376

Goodarzi, M.; Landy, N; Nanekarani, S. 2013. Effect of onion (*Allium cepa* L.) as an antibiotic growth promoter substitution on performance, immune responses and serum biochemical parameters in broiler chicks. *Health*. Vol.5:1210-1215 <http://dx.doi.org/10.4236/health.2013.58164>

Haghighi, H; Gong, J; Gyles, C; Hayes, A; Zhou, H; Sanei, B; Chambers, J;2 and Sharif1, S; 2006. *Clinical and Vaccine Immunology*, p. 975–980 Vol. 13, No. 9:1556-6811 doi:10.1128/CVI.00161-06

Heyman, M.; Menard, S. 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1151–1165.

Huyghebaert, G.;Ducatelle, R.; Van Immerseel, F. 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal* 187:182–188.





Jones, F.; Ricke, S. 2003. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult. Sci.* 82:613–617.

Mathlouthi, N.; Bouzaienne, T.; Oueslati, I.; Recoquillay, F. Hamdi, M.; Urdaci, M.; # Bergaoui, R. (20125). Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: In vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *J. Anim. Sci.* 90:813–823. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2010-3646>

Miles, R; Butcher, G; Henry, P; Littell, R. 2006. Effect of Antibiotic Growth Promoters on Broiler Performance, Intestinal Growth Parameters, and Quantitative Morphology. *Poultry Science* 85:476–485.

Perić, L.; Žikić, D.;Lukić, M. 2009. Application of alternative growth promoters in broiler production. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25 (5-6):387-397.

Smirnov, A; Perez, R; Amit-Romach, E; Sklan, D; Uni, Z; 2005. Mucin Dynamics and Microbial Populations in Chicken Small Intestine Are Changed by Dietary Probiotic and Antibiotic Growth Promoter Supplementation. *J. Nutr.* 135:187–192.

Tillman, G.; Haas, G.; Wise, M.; Oakley, B.; Smith, M.; Siragusa, G. 2011. Chicken intestine microbiota following the administration of lupulone, a hop-based antimicrobial. *FEMS Microbiol Ecol* 77:395–403.