

Determinación *in vitro* de la Actividad Antimicótica del Aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Microsporium canis*

In vitro DETERMINATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ROSEMARY OIL (*Rosmarinus officinalis*) ON *Microsporium canis*

Sandra Dentone¹, Siever Morales Cauti²

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antimicótica *in vitro* del aceite de romero (*Rosmarinus Officinalis*) sobre *Microsporium canis*. Se aisló una cepa de *M. canis* a partir de muestras clínicas. El aceite de romero se obtuvo por el método de arrastre a vapor con una concentración del 100% de pureza. Mediante el método de difusión en pocillo, se enfrentó la cepa de *M. canis* a ocho concentraciones del aceite de romero (250, 500, 1000, 2000, 5000, 10 000, 50 000 y 100 000 ppm). Los resultados indicaron una adecuada sensibilidad de *M. canis* a partir de la concentración de 50 000 ppm.

Palabras clave: aceite de romero, *Microsporium canis*

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antifungal *in vitro* activity of rosemary oil (*Rosmarinus officinalis*) against *Microsporium canis*. A strain of *M. canis* was isolated from clinical samples. The rosemary oil was obtained by the method of steam distillation with a purity of 100%. By the well diffusion method the strain of *M. canis* was faced against eight concentrations of rosemary oil (250, 500, 1000, 2000, 5000, 10 000, 50 000 and 100 000 ppm). The results showed an adequate sensitivity of *M. canis* at a concentration of 50 000 ppm onwards.

Key words: rosemary oil, *Microsporium canis*

¹ Laboratorio de Microbiología, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

² Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ E-mail: sieverm@hotmail.com

Recibido: 3 de mayo de 2016

Aceptado para publicación: 2 de setiembre de 2016

INTRODUCCIÓN

La creciente resistencia a antimicrobianos y la menor disponibilidad económica para adquirir fármacos ha propiciado la búsqueda de nuevos compuestos como alternativa terapéutica contra las micosis (Domingo y Lopez-Brea, 2003; Abad *et al.*, 2007; Guerra, 2011). Principalmente, se buscan productos de origen natural, que sean seguros, no tóxicos, eficaces y de bajo costo; por ello, los productos naturales como el aceite de romero son una excelente opción a investigar.

En el Perú, Ruiz y Roque (2009) evaluaron los efectos medicinales de cuatro plantas del nororiente del país (*Cassia reticulata*, *Ilex guayusa* Loes, *Piper lineatum* y *Terminalia catappa*). Algunos extractos presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Microsporium canis*. Asimismo, estudios en plantas medicinales utilizadas en Brasil y Colombia demostraron que diversos extractos redujeron el crecimiento de hongos, incluyendo *M. canis* (Lizcano y Vergara, 2009; Rodríguez y Kozusny-Andreani, 2010). Estos resultados sustentan el estudio de la determinación del efecto inhibitorio del aceite de romero frente a *M. canis* aislado de cuadros clínicos.

Una de las plantas más utilizadas de manera casera en la población peruana es el romero (*Rosmarinus officinalis*), debido a sus múltiples propiedades medicinales (Purca, 2013). El romero pertenece a la familia Lamiaceae, planta arbustiva con tallos prismáticos, cuyas hojas finas, estrechas, agudas y pequeñas contienen aceites esenciales con diversos principios activos (Ruiz *et al.*, 1975; López, 2008; Diaz *et al.*, 2011).

El aceite esencial de romero presenta propiedades antimicrobiales contra una variedad de agentes patógenos, posiblemente debido al alto contenido de 1,8-cineol (Estrada, 2010; Diaz *et al.*, 2011; Teixeira, 2012). Una

de las patologías más comunes en la clínica de animales menores es la dermatofitosis, producida generalmente por los dermatofitos *Microsporium*, *Trichopytum* y *Epidermophyllum*, donde el *Microsporium canis* es el dermatofito más común en perros y gatos. La infección por *M. canis* se presenta a menudo en forma asintomática. Se considera una antropozoonosis asociada a pequeños animales que afecta piel, pelo y uñas (Scott *et al.*, 2002).

El método más fiable para el diagnóstico de una dermatofitosis por *M. canis* es mediante el cultivo, donde se pueden observar las características macroscópicas (forma y color de las colonias) y microscópicas (presencia de macroconidias y microconidias) (Gueaguere, 2007). Además, existen pruebas rápidas como la lámpara de Wood, así como el examen directo de pelos, escamas o raspado de uñas donde se puede observar las artrosporas o hifas sobre el material parasitado. Asimismo, la biopsia de piel es un método no necesario, aunque es efectivo (Birchard y Sherding, 2002).

El tratamiento para la dermatofitosis canina depende de la extensión de las lesiones. Así pues, el tratamiento tópico es utilizado en lesiones aisladas, utilizándose productos antimicóticos como ketoconazol, miconazol, clotrimazol o terbinafina en forma de pomadas, soluciones y cremas, en tanto que para las lesiones generalizadas se puede usar champús antimicóticos y tratamiento sistémico (Escobedo, 2011). El fármaco de elección para las infecciones sistémicas es la griseofulvina, pero también se utiliza el ketoconazol e itraconazol, aunque suelen producir efectos adversos como vómitos, diarrea, y anorexia, además de ser hepatotóxicos (Maddison *et al.*, 2004; Plumb, 2010). Además, los tratamientos suelen ser efectivos después de varios meses (Cervantes, 2003). Por ello, el presente estudio evalúa el uso de alternativas naturales, como los aceites esenciales del romero, para el control de este tipo de infecciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Científica del Sur, distrito de Villa el Salvador, departamento de Lima.

El tamaño de la muestra ($n=80$) se determinó según la fórmula de determinación de tamaño de muestra para diferencia de proporciones (Mateu y Casal, 2003), con nivel de confianza ($Z_{\alpha}=2.58$), poder de prueba ($Z_{\beta}=1.282$), proporción control ($P_1=0.1$) y proporción tratamiento ($P_2=0.75$).

El aceite de romero fue extraído por el método de destilación por arrastre a vapor (Cerpa, 2007). La cepa de *M. canis* fue aislada de un paciente clínicamente afectado.

Se realizaron 80 evaluaciones, empleando ocho concentraciones del aceite esencial (250, 500, 1000, 2000, 5000, 10 000, 50 000 y 100 000 ppm), además del control positivo de ketoconazol al 1% y el control negativo, con ocho repeticiones cada uno.

La siembra de *M. canis* se realizó en 32 placas petri con agar Sabouraud, mediante la técnica de arrastre con el hisopo sobre toda la superficie del agar en tres direcciones. Luego, se perforó el agar en 4 puntos con un sacabocado de 11 mm, los que se inocularon hasta formar una superficie cóncava con el aceite esencial en sus diferentes concentraciones (dilutor: Dimetildisulfoxido – DMSO). En las primeras 8 placas se colocaron las concentraciones de aceite esencial de romero de 250, 500, 1000 y 2000 ppm, en las siguientes 8 placas se colocaron las concentraciones de 5000, 10 000, 50 000 y 100 000 ppm. El control positivo (ketoconazol al 1%) se colocó en 8 placas y el control negativo (agua destilada estéril) en las restantes 8 placas.

Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 7 días. Los resultados se registraron según el tamaño del halo (diámetro

de inhibición del aceite de romero sobre la cepa de *M. canis*). Se compararon los halos de inhibición obtenidos con el reporte de la Asociación Argentina de Fitomedicina sobre los resultados de la concentración mínima inhibitoria (Flores *et al.*, 2004). Se fijaron tres categorías: sensible (S), intermedia (I) y resistente (R), según se describe en el Cuadro 1. Para los efectos del estudio se midió el diámetro (= radio x 2).

Cuadro 1. Interpretación de la actividad antimicótica sobre *Microsporium canis* según halo de inhibición

Actividad inhibitoria	Radio del halo
Sensible	Mayor a 9 mm
Intermedia	De 6 a 9 mm
Resistente	Menor de 6 mm

Fuente: Flores *et al.*, 2004

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la actividad antimicótica para el presente estudio se evidencian a partir de concentraciones mayores de 5000 ppm del aceite de romero, con un promedio de 10.5 mm de diámetro de inhibición para 10 000 ppm del aceite evidenciando una actividad inhibitoria frente al *Microsporium canis* aislado de cuadros clínicos en perros con dermatitis micótica (Cuadro 2).

De acuerdo a la interpretación, el *Microsporium canis* se muestra sensible a la actividad inhibitoria del aceite de romero a una concentración de 50 000 ppm con un porcentaje de 75% de la cepa en sus repeticiones (Cuadro 3). La validación de la técnica se desarrolló a través de los controles positivos (ketoconazol 1%) en pastilla y crema, con resultados de actividad antimicótica ma-

Cuadro 2. Actividad antimicótica de varias concentraciones de aceite de romero¹ sobre el *Microsporium canis*, según el halo de inhibición

Repetición	Diámetro del halo de inhibición (mm)					
	5000 ppm	10,000 ppm	50,000 ppm	100,000 ppm	Control positivo	Control negativo
1	0	10	12	18	> 50	0
2	0	8	26	32	> 50	0
3	0	12	28	30	> 50	0
4	0	8	18	20	> 50	0
5	0	12	22	40	> 50	0
6	0	14	28	30	> 50	0
7	0	10	30	34	> 50	0
8	0	10	28	36	> 50	0
Promedio	0	10.5	24	30	> 50	0

¹ Los resultados de las concentraciones de 250, 500, 1000 y 20000 no se muestran, pero fueron de 0 mm de halo de inhibición en todas las repeticiones

Cuadro 3. Interpretación del halo de inhibición sobre *M. canis* de tres concentraciones de aceite esencial de romero

Concentración (ppm)	Resistente	Intermedio	Sensible
10,000	62.5% (5/8)	37.5% (3/8)	0% (0/8)
50,000	0% (0/8)	25% (2/8)	75% (6/8)
100,000	0% (0/8)	12.5% (1/8)	87.5% (7/8)

mayor de 50 mm de inhibición, y el control negativo (suero fisiológico) con actividad de 0 mm de inhibición (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

M. canis demostró ser sensible *in vitro* a las concentraciones de 50 000 (75%) y 100 000 ppm (87.5%) de aceite de romero. Este aceite presenta, además, un amplio espectro de acción antibacteriana, tanto sobre

bacterias Gram positivas como Gram negativas, aunque a diferentes concentraciones (Castaño *et al.*, 2010), posiblemente debido a la menor complejidad de los componentes de la pared celular de las bacterias, como son peptidoglucanos y fosfolípidos, y a través de los diversos componentes de los aceites esenciales (Estrada, 2010).

Las propiedades biológicas del aceite esencial de romero se atribuyen, generalmente, a sus componentes mayoritarios, como los

compuestos terpénicos, tales como los sesquiterpenos y sesquiterpenlactonas (Abad *et al.*, 2007; Estrada, 2010); sin embargo, en ocasiones estos componentes actúan en sinergia con otros componentes minoritarios, como los heterósidos, flavónicos, polifenoles, flavonoides y alcaloides, favoreciendo las propiedades biológicas (Bakkali *et al.*, 2008).

Los extractos de romero han demostrado actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* (Estrada, 2010), *Leishmania braziliensis* (Arevalo *et al.*, 2009). Sin embargo, en la mayoría de reportes se demuestra su actividad contra hongos filamentosos y levaduras (Tabanca *et al.*, 2006).

El control utilizado para la evaluación del aceite esencial de romero fue ketoconazol al 1%, el cual es el fármaco de elección para el tratamiento de las dermatofitosis, tanto sistémico como localmente. Actúa inhibiendo la síntesis de ergosterol, provocando una actividad enzimática relacionada con la membrana, lo que conduce a un aumento de la permeabilidad e inhibición del crecimiento celular y su replicación (Sumano y Ocampo, 1997). En este estudio, los halos de inhibición del fármaco fueron mayores de 50 mm, lo que valida los resultados obtenidos.

CONCLUSIÓN

Microsporum canis es sensible *in vitro* al aceite esencial de romero a una concentración de 50 000 ppm.

LITERATURA CITADA

1. **Abad M, Ansuategui M, Bermejo P. 2007.** Active antifungal substances from natural sources. *ARKIVOC* 7: 116-145.
2. **Arévalo Y, Robledo S, Muñoz D, Granados-Falla D, Cuca L, Delgado G. 2009.** Evaluación *in vitro* de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis*. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* 38: 131-141.
3. **Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008.** Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* 46: 446-475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106
4. **Birchard S, Sherding R. 2002.** Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies. 2º ed. México: McGraw-Hill. 1941 p.
5. **Castaño H, Ciro G, Zapata J, Jiménez S. 2010.** Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L sobre algunas bacterias de interés alimentario. *VITAE* 17: 149-154.
6. **Cerpa MG. 2007.** Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Tesis de Doctorado. Valladolid, España: Universidad de Valladolid. 304 p.
7. **Cervantes RA. 2003.** Ringworm infection in dogs and cats. In: Carmichael L (ed). *Recent advances in canine infectious diseases*. Ithaca: IVIS. [Internet]. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/cervantes/ivis.pdf
8. **Díaz P, Cabrera M, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, Dalla M. 2011.** Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean J Agric Res* 71: 231-239.
9. **Domingo D, López-Brea M. 2003.** Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap* 16: 385-393.
10. **Escobedo J. 2011.** Dermatofitosis, diagnóstico y tratamiento. [Internet]. Disponible en: <http://dermatologiveterinaria.puebla.blogspot.com/2011/04/dermatofitosis.html>
11. **Estrada S. 2010.** Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Tymus vulgaris*). Tesis de Bioquímico Farmacéutico. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 87 p.

12. **Flores A, Hernández A, Valladares M. 2004.** Determinación de la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos de *Lippia graveolens* (Orégano), *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Eucalyptus globulus* (Eucalipto) en *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*. Tesis de Licenciatura. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador. 96 p.
13. **Guaguere E. 2007.** Terapia dermatológica del perro. 3° ed. España: Elsevier. 272 p.
14. **Guerra L. 2011.** Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas en medicina tradicional. Tesis de Maestría. México: Universidad Autónoma de Nuevo León. 118 p.
15. **Lizcano A, Vergara J. 2009.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos. Tesis de Grado. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. 131 p.
16. **López M. 2008.** El romero, planta aromática con efectos antioxidantes. OFFARM 27: 60-63.
17. **Maddison J, Page S, Church D. 2004.** Farmacología clínica en pequeños animales. Argentina: Inter-Médica. 300 p.
18. **Plumb D. 2010.** Manual de farmacología veterinaria. 6° ed. Argentina: Inter-Médica. 1256 p.
19. **Purca T. 2013.** Efectividad antibacteriana «*in vitro*» del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre la flora salival. Tesis de Cirujano Dentista. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 97 p.
20. **Rodríguez D, Kozusny-Andreani D. 2010.** Utilização de extratos de plantas medicinais e óleo de Eucalyptus no controle in vitro de *Microsporum canis*. Rev Cub Plantas Med 15: 119-125.
21. **Ruiz M, Nieto D, Larios R. 1975.** Tratado elemental de botánica. 13ª ed. México: Ed ECLAL. 655 p.
22. **Ruiz J, Roque M. 2009.** Actividad antimicrobiana de cuatro plantas de nor-orienté peruano. Ciencia e Investigación 12: 41-47.
23. **Scott D, Miller W, Griffin C. 2002.** Dermatología en pequeños animales. 2° ed. Argentina: Inter-Médica. 1349 p.
24. **Sumano H, Ocampo L. 1997.** Farmacología veterinaria. 2° ed. México: McGraw-Hill. 1000 p.
25. **Tabanca N, Demirci B, Baser K, Aytac Z, Ekici M, Khan S, Jacob MR, Wedge DE. 2006.** The chemical composition and antifungal activity of *Salvia macrochlamys* and *Salvia recognita* essential oils. J Agric Food Chem 54: 6593-6597.
26. **Teixeira L. 2012.** Avaliação do uso do extrato de alecrim de jardim (*Rosmarinus officinalis* Linn) no controle do biofilme dental. Tesis de Cirujano Dentista. Curitiba: Universidad Federal de Paraná. 28 p.