

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



"Efecto de la concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento de *Microsporium canis* in vitro"

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO

AUTOR:

Br. ROOSVELT ARTURO HERNANDEZ MESTANZA

ASESOR

Dr. MARCO LEONCIO SALAZAR CASTILLO

TRUJILLO – PERU

2018

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Dr. Orlando Moisés Gonzales Nieves

RECTOR

Dr. Rubén César Vera Véliz

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dr. Weyder Portocarrero Cárdenas

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN

Dr. Steban Alejandro Ilich Zerpa

SECRETARIO GENERAL

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. Freddy Rogger Mejía Coico

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. William Elmer Zelada Estraver

SECRETARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. Jaime Asunción Agreda Callirgos

**DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

DEL ASESOR

El que suscribe, profesor asesor de la tesis titulada: **"Efecto de la concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento de *Microsporium canis in vitro*"**

CERTIFICA:

Que ésta ha sido desarrollada, de acuerdo al reglamento establecido por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, estando en conformidad con su correspondiente proyecto, y que el informe ha sido redactado acogiendo las observaciones y sugerencias alcanzadas.

Por lo tanto, autorizo a ROOSVELT ARTURO HERNANDEZ MESTANZA, continuar con el trámite del reglamento correspondiente.

Trujillo, Diciembre del 2018

Dr. Marco Leoncio Salazar Castillo
ASESOR

PRESENTACIÓN

Señores miembros del jurado:

En cumplimiento con las disposiciones establecidas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, pongo a vuestra consideración y criterio el presente trabajo de tesis titulado:

"Efecto de la concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento de *Microsporium canis in vitro*" con el cual pretendo obtener el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo.

Trujillo, diciembre del 2018

Br. Roosevelt Arturo Hernández Mestanza

MIEMBROS DEL JURADO

Msc. Juan Héctor Wilson Krugg

Msc. Jaime Enrique Agreda Gaitán

Dr. Marco Leoncio Salazar Castillo

APROBACIÓN

Msc. Juan Héctor Wilson Krugg

Msc. Jaime Enrique Agreda Gaitán

Dr. Marco Leoncio Salazar Castillo

DEDICATORIA

A Dios, que sin ÉL todo esfuerzo realizado es en vano.

*A mi madre, **Amalia Mestanza Cruzado**, por el esfuerzo constante que siempre ha realizado para poder educarme. Un esfuerzo que no solo ha sido económico, sino que también emocional.*

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darnos la vida y permitir realizarnos como personas de bien.

En forma muy especial a mi madre, que gracias a ella he podido realizarme como persona y profesional.

*A **Joann Guerrero Rubio, Oscar Barba Barboza y Cecilia Díaz Arias**, por su amistad y el apoyo incondicional recibido.*

*A mis profesores: **Dr. Julio Arellano, Dr. Marco Salazar y Dra. Icela Rodríguez**, por su amistad y por el apoyo constante en la realización de esta tesis.*

INDICE

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO	II
AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.....	III
DEL ASESOR.....	IV
PRESENTACIÓN	V
MIEMBROS DEL JURADO.....	VI
APROBACIÓN.....	VII
DEDICATORIA.....	VIII
AGRADECIMIENTO	IX
INDICE.....	X
RESUMEN.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	4
MATERIAL Y METODO.....	5
1.- LUGAR DE EJECUCIÓN:	5
2.- COLECCIÓN DE MUESTRA BIOLÓGICA:	5
3.- SELECCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO:	5
4.- PROCESAMIENTO:	5
a.- <i>Obtención del aceite esencial de R. officinalis.</i>	5
b.- <i>Preparación de las concentraciones del aceite esencial.</i>	6
c.- <i>Obtención de cultivo monospórico de Microsporum canis.</i>	6
d.- <i>Siembra, incubación y lectura del crecimiento de M. canis.</i>	7
5.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	8
RESULTADOS.....	9
DISCUSIÓN.....	11
CONCLUSIONES	13
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
II.- ANEXOS	19

RESUMEN

La presente investigación tuvo como propósito evaluar el efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre el crecimiento de *Microsporium canis* in vitro, para la cual, se preparó y esterilizó el medio agar Sabouraud conteniendo concentraciones de dicho aceite esencial de 0 (control), 2, 5, 10 y 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. Se sembró por puntura central un fragmento de micelio proveniente de un cultivo monospórico del hongo en estudio, se incubó a 25 °C por 14 días y se realizaron las lecturas del crecimiento micelial en milímetros de diámetro. Se encontró que el aceite esencial de romero en la concentración de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ reduce el crecimiento micelial de *M. canis* a un 60.41% y concentraciones $\geq 5\mu\text{L}/\text{mL}$ no permiten el crecimiento del hongo en estudio. Se concluye que el incremento (0 - 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de la concentración aceite esencial de hojas de *R. officinalis* reduce el crecimiento micelial de *M. canis* y concentraciones $\geq 5\mu\text{L}/\text{mL}$ lo reducen al 0 %, in vitro.

Palabras clave: *Rosmarinus officinalis*, aceite esencial, *Microsporium canis*, crecimiento.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el aumento de la resistencia antifúngica y el decremento de la disponibilidad económica para adquirir medicamentos, han promovido investigaciones en búsqueda de compuestos fitoquímicos como una alternativa al tratamiento contra las distintas micosis ¹⁻³. Cabe destacar que dicha búsqueda alcanza a productos de origen natural vegetal, que sean seguros, no tóxicos, eficaces y de bajo costo; así, los aceites esenciales y en este caso el de romero sería una excelente alternativa a investigar.

En Perú, se han evaluado los efectos de plantas provenientes del nororiente, como *Cassia reticulata*, *Ilex guayusa* Loes, *Piper lineatum* y *Terminalia catappa*⁴; encontrando que extractos de estas plantas presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Microsporum canis*. En Brasil y Colombia, se realizaron estudios con plantas en las cuales encontraron que diversos extractos inhibieron el desarrollo de hongos, en los que se incluye a *M. canis* ^{5,6}.

El romero, *Rosmarinus officinalis*, es una de las plantas más utilizadas artesanalmente por la población, esto debido a sus múltiples propiedades medicinales que posee ⁷. El romero pertenece a la familia Lamiaceae, es una planta tipo arbusto que presenta tallos de forma prismáticos, sus hojas son finas, estrechas, agudas y pequeñas que contienen aceites esenciales con diversos principios activos ⁸⁻¹⁰.

El aceite esencial de romero presenta propiedades antimicrobianas contra una diversidad de agentes patógenos, probablemente debido a que presenta un alto contenido de 1,8-cineol ¹⁰⁻¹². Las patologías más comunes en la clínica humana y

veterinaria en animales menores es la de dermatofitosis, producida *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, siendo el dermatofito más importante *M. canis* común en perros y gatos.

La dermatofitosis por *M. canis* es una infección que se presenta a menudo en forma asintomática y se considera como una antropozoonosis asociada a animales menores que afecta piel, pelo y uñas¹³. El diagnóstico de una dermatofitosis por *M. canis* se realiza por cultivo, que permite observar las características culturales macroscópicas, tales como la forma y el color del micelio y las microscópicas como la presencia de macro y microconidias¹⁴. Por otro lado, existen pruebas rápidas, basadas en la observación directa de pelos, escamas o raspado de uñas donde se puede observar las artrosporas o hifas sobre el material infectado. Asimismo, la biopsia de piel es un método no necesario, aunque es efectivo¹⁵.

Por otro lado, el tratamiento para la dermatofitosis depende de la extensión de las lesiones; siendo principalmente tópico y se utilizan productos antimicóticos en presentaciones de pomadas, soluciones o cremas conteniendo ketoconazol, miconazol, clotrimazol o terbinafina y para las lesiones generalizadas se usan champús antimicóticos y tratamiento sistémico¹⁶. La elección de la droga en particular a usar para las infecciones sistémicas es la griseofulvina, sin embargo, también se utiliza el ketoconazol e itraconazol, aunque estos suelen generar ciertos efectos adversos como vómitos, diarrea, y anorexia, y son hepatotóxicos^{17, 18}. Un inconveniente importante de los tratamientos con estas drogas es que suelen ser efectivos después de varios meses¹⁹.

Se han evaluado los efectos antibacterianos y antifúngicos de los aceites esenciales obtenidos de hojas frescas de romero, aislados por hidrodestilación obteniendo actividad en contra de las siguientes especies bacterianas: *Klebsiella*

pneumoniae, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, entre otras. Las especies fúngicas *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium culmorum* y *Alternaria alternata*, mostrando una sensibilidad significativa a los aceites volátiles ²⁰.

Generalmente, los aceites esenciales son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes (metabolitos secundarios) que pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. Estos metabolitos secundarios cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades biológicas, como propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, y anticancerígenos ²¹. Otras actividades biológicas también se reportan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios, insectos y plantas²².

Las hojas contienen aceite esencial, polifenoles, pigmentos flavónicos (apigenina, luteolina), ácidos orgánicos (cafeico, clorogénico, fenólico, neoclorogénico, rosmarínico), alcaloides diterpénicos (isorosmaricina, metilrosmaricina, rosmaricina), flavona (repriteína), diterpenoides (picrosalvina, rosmadiol, rosmanol, rosmarinol, rosmariquinona), ácido ursólico, taninos, salvigenina, hispidulina, nepetina y genkwareno ²¹.

Los aceites esenciales surgen como una alternativa al control de plagas y enfermedades pues su aplicación a nivel de laboratorio ha demostrado eficiencia en el control de agentes fitopatógenos, creando la posibilidad de contar con productos que garanticen inocuidad en el medio ambiente y garantizando producciones sanas y libres de residuos contaminantes²¹.

La actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular contra diversos hongos, que causan infecciones frecuentes en humanos, ha sido ampliamente estudiada, debido a los efectos adversos de algunas de las drogas antifúngicas utilizadas actualmente, a que son poco efectivas e inducen frecuentemente resistencia, a los elevados costos de los tratamientos antimicóticos, numerosos investigadores han encaminado sus trabajos hacia la búsqueda y aplicación de nuevos compuestos biológicamente activos que exhiban efectos secundarios mínimos. 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.

OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de la concentración del aceite esencial hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento de *Microsporum canis*, in vitro.
- Obtener el aceite esencial de hojas de *R. officinalis* (romero).
- Preparar diferentes concentraciones del aceite esencial de *R. officinalis* con las que se evaluará el crecimiento de *M. canis*.

MATERIAL Y METODO

1.- Lugar de Ejecución:

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Tecnología Enzimática y Productos Naturales, Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal de la Universidad Nacional de Trujillo

2.- Colección de Muestra Biológica:

El material biológico para este proyecto fueron hojas de *R. officinalis* “romero”, las que se colectaron de cultivos agrícolas ubicados en la provincia de Otuzco.

3.- Selección de Material Biológico:

El material biológico colectado fue debidamente clasificado, seleccionado, es decir, se tomaron las hojas aparentemente sanas y completas. Estas hojas fueron cegadas con todo tallo a partir de plantas con dos años de siembra y en el comienzo de su floración (información personal), esto con el fin de su posterior rebrote.

4.- Procesamiento:

a.- Obtención del aceite esencial de *R. officinalis*.

La obtención del aceite esencial de *R. officinalis* se realizó en un equipo de acero inoxidable de destilación por arrastre de vapor de agua ²⁴, en el laboratorio de Farmacognosia, Departamento Académico de Farmacotecnia – Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo. Para ello se trabajó con hojas frescas de romero obtenidas según el paso anterior. Se preparó dicho equipo,

el cual consta de un recipiente grande con una rejilla móvil donde se colocó el material vegetal y el fondo contiene el agua destilada; se cerró herméticamente y la tapa porta el refrigerante que en su parte distal se colecta el hidrolato conteniendo el aceite esencial, el cual es separado en una pera de separación.

Se trabajó con 6 kg de hojas frescas del material en estudio y se procedió a extraer el aceite esencial, con el vapor de agua generado en el mismo recipiente donde se colocaron las hojas de romero sobre una rejilla o cesta. Se destiló por aproximadamente 20 minutos hasta agotar los aceites esenciales de dichas hojas y se obtuvo 6 mL del aceite esencial. Finalmente, el volumen obtenido del aceite esencial se colocó en un frasco de color ámbar con previa rotulación y se conservó en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso.

b.- Preparación de las concentraciones del aceite esencial.

Se prepararon diferentes concentraciones (V/V) del aceite esencial de *R. officinalis* en solución de tween 80 al 0,1%²⁵ en viales de 2 mL y se conservaron en refrigeración.

c.- Obtención de cultivo monospórico de *Microsporium canis*.

El cultivo de *M. canis* fue obtenido por donación del laboratorio del Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo.

A fin obtener resultados confiables, respecto a la reproducibilidad, fue necesario realizar un cultivo un monospórico de *M. canis* para garantizar la autenticidad y pureza del hongo en estudio y los datos obtenidos en la investigación. El aislamiento monospórico²⁵ fue a partir de una colonia micelial y se procedió de la siguiente manera:

Se resembró *M. canis* en un tubo inclinado con medio de agar Sabouraud ²⁶, se incubó a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 20 días. En una solución acuosa estéril de Tween 80 al 0.1% se preparó una suspensión de esporas, a partir del crecimiento micelial esporulado del hongo, se agitó suavemente y vertió a tubo tapa rosca estéril la suspensión de esporas. Se sembró 200 μL de dicha suspensión de esporas medio agar Sabouraud y distribuyó homogéneamente con una espátula de Drigalski, se incubó a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 20 días.

De una pequeña colonia de micelio en crecimiento, se transfirió un fragmento del mismo micelio a otra placa con agar Sabouraud (una colonia - una conidia) y se incubó nuevamente en las mismas condiciones anteriores.

d.- Siembra, incubación y lectura del crecimiento de *M. canis*.

A partir de los cultivos monospóricos de *M. canis*, se sembró por puntura central ²⁷, un fragmento de micelio de dicho cultivo en placas de agar Sabouraud conteniendo cada una de las concentraciones del aceite esencial de romero preparadas previamente. Se incubó a temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ aprox.) por 15 días. Se observó el crecimiento micelial diariamente a partir del cuarto día de incubación, se midieron los diámetros (mm) del crecimiento micelial del hongo en estudio ²⁸ y se determinó el porcentaje crecimiento e inhibición de crecimiento en cada tratamiento

5.- Diseño experimental.

Bioensayos: Los bioensayos o tratamiento se realizaron por estímulo creciente. Cada placa contuvo las concentraciones (V/V) del aceite esencial de romero en relación al medio de cultivo:

Nº	Testigo / Tratamiento	Concentración (µL/mL)	Crecimiento micelial (mm)
[1]	Testigo	0	100 %
[2]	Tratamiento	2	A %
[3]	Tratamiento	5	B %
[4]	Tratamiento	10	C %
[5]	Tratamiento	50	D %

Donde: $100 \geq A \geq B \geq C \geq D$

Para garantizar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados se realizaron 3 ensayos y cada uno de los ensayos fue por triplicado.

RESULTADOS

Se encontró que el aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* en concentraciones mayores e iguales a 5 μ L/mL no permiten el crecimiento micelial de *Microsporun canis* in vitro (Fig. 1)

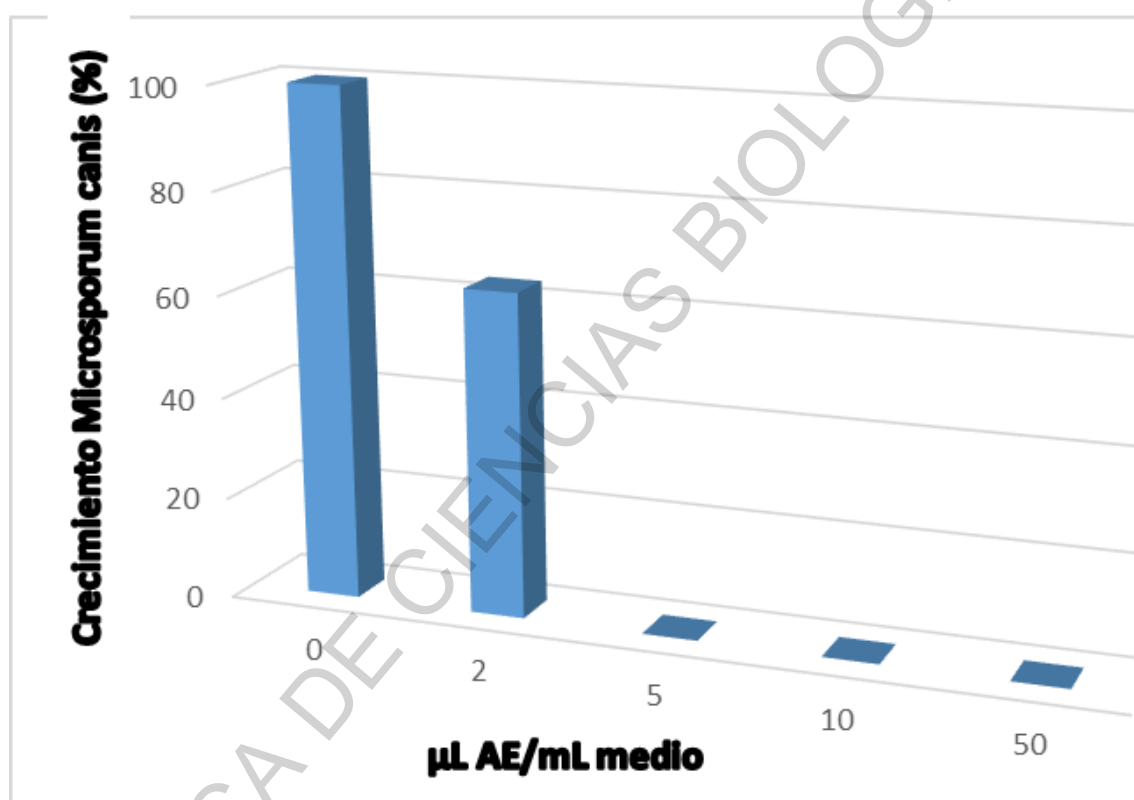


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento de *Microsporun canis*, in vitro, expresado en %

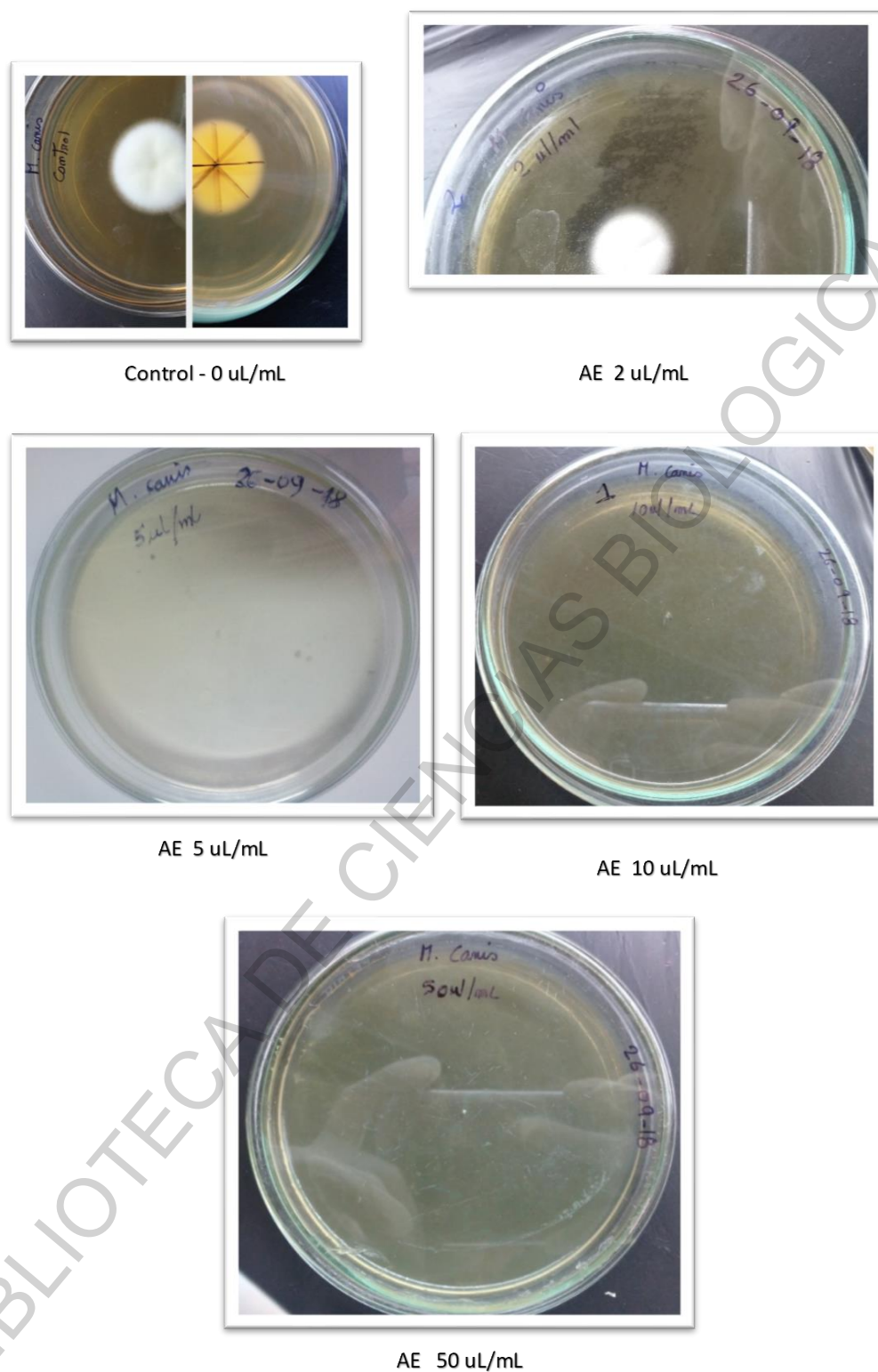


Figura 2. Observación del crecimiento micelial de *Microsporium canis* en los diferentes tratamientos con el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” y en el control.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, el aceite esencial de romero inhibió el crecimiento de *M. canis* en un 36,6% a una concentración V/V de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y una inhibición completa del 100% a partir de la concentración de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Esta actividad se le atribuye a la naturaleza hidrófoba de los aceites esenciales que generan pérdida de la integridad de la membrana y de la filtración del material celular. La actividad antifúngica del aceite esencial de romero ya ha sido demostrada en varios trabajos, donde encontraron²⁹ un MIC de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Candida albicans*, 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Rhodotorula glutinis*, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Schizosaccharomyces pombe*, 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Saccharomyces cerevisiae* y 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Yarrowia lipolytica*; en dicho estudio el componente principal del aceite esencial de romero fue verbenona, la concentración de microorganismos fue de 10^5 conidios/mL y la técnica utilizada fue diferente de la utilizada en el presente estudio. En otro trabajo³⁰ describieron que el aceite esencial de romero presentaba un MIC de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un MFC de 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Aspergillus niger*, también se ha reportado que el aceite esencial de romero inhibió el crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides*, así concentraciones ≥ 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ un 17% y 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ un 67% en comparación al control positivo de nistatina que lo hace en un 79%.

Los resultados obtenidos no fueron comparados con ningún agente antifúngico comercial, por lo tanto, no se podría comparar el efecto del aceite esencial de romero con los encontrados en la literatura, ya que las condiciones de trabajo fueron diferentes.

Se ha encontrado que algunos agentes antifúngicos inhiben el crecimiento celular al interrumpir la biosíntesis de ergosterol, que resulta de la unión de antifúngicos al ergosterol en la membrana celular. Esto significa que en este proceso se afecta

la integridad y la función de algunas de las proteínas unidas a la membrana y por lo tanto, conduce a trastornos osmóticos, interrupción del crecimiento celular. y proliferación ³¹. Los aceites esenciales de romero probablemente son capaces de activar un mecanismo semejante a los antifúngicos comerciales como la nistatina, ya que se ha encontrado que 1000 µg/mL produce menor inhibición de ergosterol que una concentración de 600 µg/mL de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" cuando los cultivos fueron incubados durante 14 días a 25°C ³².

Por otro lado, los resultados encontrados del efecto del aceite esencial de romero sobre el crecimiento de *M. canis* es muy superior (2 µL/L) a los reportados por otro autor trabajando con el mismo hongo, pero aislado de muestras veterinarias, quien demostró ser sensible in vitro a las concentraciones de 50 000 y 100 000 ppm (µL/L) de aceite de romero o que es igual a 50 y 100 µL/mL ³³, cabe resaltar que la metodología de trabajo de dichos autores es distinta a la utilizada en la presente tesis.

El incremento en el costo de los antimicóticos comerciales, la disminución del poder adquisitivo de la población en general, hacen de este trabajo una posibilidad de poder utilizar este aceite esencial de romero; ya sea como loción o como ungüento de naturaleza tópica, en el tratamiento de esta micosis, la cual es un problema de naturaleza estética, que en las estaciones calurosas y húmedas (como lo es el verano) se convierte en una micosis de importancia a tomar en cuenta.

Finalmente, según los resultados encontrados, in vitro, el aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* puede ser utilizado como producto alternativo en el tratamiento de dermatomicosis, por lo que habría que realizar investigaciones in vivo con el mismo aceite esencial y a concentraciones más bajas

CONCLUSIONES

Concentraciones iguales y mayores de 5 $\mu\text{L/mL}$ del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* tienen efecto inhibitorio del crecimiento de *Microsporum canis* in vitro.

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterapia. 2003; 16: 385-393.
2. Abad M, Ansuategui M, Bermejo P. Active antifungal substances from natural sources. ARKIVOC; 2007. 7: 116-145.
3. Guerra L. 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. 2011. 118 p.
4. Ruiz J, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas de nororiente peruano. Ciencia e Investigación. 2009. 12: 41-47.
5. Lizcano A, Vergara J. 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. 2009. 131 p.
6. Rodríguez D, Kozusny-Andreani D. Utilização de extratos de plantas medicinais e óleo de Eucaliptus no controle in vitro de *Microsporum canis*. Rev Cub Plantas Med. 2010. 15: 119-125.
7. Purca T. 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. 2013. 97 p.

8. Ruiz M, Nieto D, Larios R. Tratado elemental de botánica. 13ª ed. México: Ed ECLAL. 1975. 655 p.
9. López M. El romero, planta aromática con efectos antioxidantes. OFFARM. 2008. 27: 60-63.
10. Díaz P, Cabrera M, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, Dalla M. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. Chilean J Agric Res. 2011. 71: 231-239.
11. Estrada S. 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. 2010. 87 p.
12. Teixeira L. 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. 2012. 28 p.
13. Scott D, Miller W, Griffin C. Dermatología en pequeños animales. 2º ed. Argentina: Inter-Médica. 2002. 1349 p.
14. Guaguere E. Terapia dermatológica del perro. 3º ed. España: Elsevier. 2007. 272 p.
15. Birchard S, Sherding R. Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies. 2º ed. México: McGrawHill. 2002. 1941 p.
16. Escobedo J. Dermatofitosis, diagnóstico y tratamiento. [Internet]. Disponible en: <http://dermatologiaveterinariaPuebla.blogspot.com/2011/04/dermatofitosis.html>

17. Maddison J, Page S, Church D. Farmacología clínica en pequeños animales. Argentina: Inter-Médica. 2004. 300 p.
18. Plumb D. Manual de farmacología veterinaria. 6° ed. Argentina: Inter-Médica. 2010. 1256 p.
19. Cervantes RA. Ringworm infection in dogs and cats. In: Carmichael L (ed). Recent advances in canine infectious diseases. 2003. Ithaca: IVIS. [Internet]. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/cervantes/ivis.pdf
20. Yelasco, A. Medicinal Plants from Pampallakta: an Andean Community in Cuzco (Perú). *Fitoterapia*. 1995. 66 (5): 447-462.
21. García, R. Especies y subespecies de *Erwinia* en Actividad Biocontroladora de hongos de suelo sobre microorganismos fitopatógenos. Tesis para optar al grado de Biólogo. Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador. 2000.
22. Kalemba, D. & Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003. 10:813-829.
23. Davicino R, Mattar M, Casali Y, Correa S, Pettenati E, Blas M. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev. Peru. Biol.* 2007. 14(2): 247-251.
24. Sharapin N, Machado L, Pinzón R. Fundamentos de Tecnología de procesos fitoterapéuticos. Edit. CAB-CYTED. Bogotá D.C. (Colombia). 2000.
25. Cañedo V, Ames T. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos, Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú, 2004. 62p

26. JANKE, D. Pilznährboden nach SABOURAUD, modifiziert MERCK, ein neuer Trockennährboden zur Züchtung von Dermatophyten. - Zschr. Haut- u. Geschl.-Krankh. 1961. 15; 188-193.
27. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC y Woods GL. Koneman-Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas en color. 6ª ed. Edit Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina. 2008.
28. Pérez-Cárdenas J. A., Hoyos A. M., Cárdenas C. Sensibilidad antimicótica de diferentes especies de hongos aislados de pacientes con micosis ungueal en la ciudad de Manizales (Caldas, Colombia). Biosalud, 2013. 11 (2): 26-39.
29. Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., et al. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry, 91, 621–632.
30. Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y. J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C. J., et al. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environmental Toxicology and Pharmacology, 32, 63–68.
31. Bendaha, H., Yu, L., Touzani, R., Souane, R., Giaever, G., Nislow, C., et al. (2011). New azole antifungal agents with novel modes of action: synthesis and biological studies of new tridentate ligands based on pyrazole and triazole. European Journal of Medicinal Chemistry, 46, 4117–4124.
32. Da Silva N., Polis L., Faggion J., Oliveira P., Yumie C., Galerani S.A., Grespan R., Botiã S., et al. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by Rosmarinus officinalis L. essential oil in Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg. Food Chemistry. 2015. 166: 330–336.

33. Dentone, S.; Morales S. Determinación in vitro de la Actividad Antimicótica del Aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Microsporum canis*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, RIVEP, Lima Perú. 2017. 28, (1): 56-61pp.

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANEXOS

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Anexo 1.- Datos obtenidos del efecto de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento de *Microsporun canis*, con sus repeticiones y expresado en milímetros.

Días de incubación	CONTROL			Aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> ($\mu\text{L}/\text{mL}$)											
	0 $\mu\text{L}/\text{mL}$			2			5			10			50		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
14	33	32	33	19	19	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	33	32	33	20	22	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	31	32	20	22	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	33	33	19	21	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Promedio	32.33			20.50			0			0			0		
% crecimiento	100			36.59			0			0			0		

Anexo 2.- Composición del aceite de romero.Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil (REO).

No.	Compounds	RI ^a	Percentage (%)	Identification ^b
1	α -Pinene	930	12.4	CG/MS, NMR
2	Canfene	945	3.7	CG/MS, NMR
3	β -Pinene	974	1.8	CG/MS, NMR
4	β -Myrcene	989	0.7	CG/MS, NMR
5	α -Phellandrene	1002	0.1	CG/MS
6	3-Carene	1008	0.2	CG/MS
7	α -Terpinene	1013	0.4	CG/MS, NMR
8	p-Cimene	1020	2.1	CG/MS, NMR
9	Limonene	1024	3.5	CG/MS, NMR
10	1.8-cineole	1027	52.2	CG/MS, RMN
11	Trans- β -ocimene	1041	0.1	CG/MS
12	γ -Terpinene	1055	0.4	CG/MS, NMR
13	Linalol	1098	0.4	CG/MS, NMR
14	6-Canfenol	1111	0.1	CG/MS
15	Camphor	1142	15.2	CG/MS, NMR
16	Isoborneol	1154	0.1	CG/MS
17	Borneol	1163	3.0	CG/MS, NMR
18	4-Terpineol	1175	0.5	CG/MS, NMR
19	α -Terpineol	1189	2.3	CG/MS, NMR
20	Verbenone	1209	0.1	CG/MS
21	Isobornyl acetate	1285	0.3	CG/MS, NMR
22	Eugenol	1355	0.1	CG/MS, NMR
23	β -Caryophyllene	1420	0.2	CG/MS, NMR
24	Cis-guaia-3,9-dien-11-ol	1644	0.1	CG/MS
	Total		100.0	

^a RI = Retention indices obtained with reference to an *n*-alkane series C₈H₁₈-C₂₀H₄₂ using DB-5 column.

^b GC/MS - gas chromatography/mass spectrometry and NMR - nuclear magnetic resonance spectroscopy.