



Actividad antifúngica *in vitro* del extracto crudo acuoso de *Rosmarinus officinalis* contra *Candida albicans*

In vitro* antifungal activity of the aqueous crude extract of *Rosmarinus officinalis* against *Candida albicans

Pérez-Delgado Orlando^{1*}, Vallejos-Campos Elmer César

Datos del Artículo

¹Laboratorio de Microbiología.
Facultad de Ciencias de la Salud.
Universidad Señor de Sipán
Chiclayo-Perú
Dirección postal: 14001
Tel: +51 074481610

²Escuela de Estomatología.
Facultad de Ciencias de la Salud.
Chiclayo-Perú.
Dirección postal: 14001
Tel: +51 074481610
cavallejosel@crece.uss.edu.pe

***Dirección de contacto:**
Laboratorio de Microbiología.
Facultad de Ciencias de la Salud.
Universidad Señor de Sipán
Chiclayo-Perú
Dirección postal: 14001
Tel: +51 074481610

Orlando Pérez Delgado
E-mail address:
operezd@gmail.com

Palabras clave:

Antifúngico,
extracto acuoso,
Candida albicans,
Rosmarinus officinalis.

J. Selva Andina Res. Soc.
2019; 10(1):45-51.

Historial del artículo.

Recibido julio, 2018.
Devuelto noviembre 2018
Aceptado diciembre, 2018.
Disponible en línea, febrero, 2019.

Editado por:
**Selva Andina
Research Society**

Resumen

La candidiasis bucal puede desarrollarse en los niños y adultos, aunque en la cavidad bucal *Candida albicans* puede formar parte de la flora comensal, pero cuando el hospedero no tiene una buena higiene bucal o se está inmunodeprimido puede dar lugar a una candidiasis. El objetivo esta investigación fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto crudo acuoso de *Rosmarinus officinalis* contra *C. albicans*. El estudio fue experimental, se emplearon 60 unidades experimentales, constituidas por 6 concentraciones diferentes del extracto acuoso de *R. officinalis* y dos cepas de la especie de *C. albicans* y 5 repeticiones, el método de dilución doble seriada se determinaron las diferentes concentraciones, para la actividad antifúngica se empleó el método de difusión en pozo en agar Mueller-Hinton. Se obtuvieron 2 g de residuo seco de *R. officinalis*, se obtuvieron concentraciones 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1.25 mg/mL, respectivamente. Al enfrentar a *C. albicans* al extracto crudo acuoso, se obtuvo halos promedios de 21.12 mm 16.08 mm, 9.22 mm, 7.12 mm para las concentraciones de 40, 20, 10, 5 mg/mL, sin embargo, para la otra cepa se obtuvo halos promedios de y para la otra cepa 10.35, 8.43 y 7.21 mm para las concentraciones de 40, 20, 10 mg/mL respectivamente. Se concluye que el extracto crudo acuoso de hojas de *R. officinalis* presenta un efecto antifúngico contra *C. albicans*.

© 2019. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

Oral candidiasis can develop in children and adults, although in the oral cavity *Candida albicans* can be part of the commensal flora, but when the host does not have good oral hygiene or is immunosuppressed can lead to a candidiasis. The objective of this research was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of the crude aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* against *C. albicans*. The study was experimental, 60 experimental units were used, consisting of 6 different concentrations of the aqueous extract of *R. officinalis* and two strains of the species of *C. albicans* and 5 repetitions, the serial dilution method was determined the different concentrations, for the antifungal activity was used the well diffusion method on Mueller-Hinton agar. 2 g of dry residue of *R. officinalis* were obtained, concentrations were obtained 40, 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 mg/mL respectively. When facing *C. albicans* to the aqueous crude extract, average haloes were obtained of 21.12 16.08, 9.22, 7.12 mm for the concentrations of 40, 20, 10, 5 mg/mL, however, for the other strain, average halos were obtained from and for the other strain 10.35, 8.43, 7.21 mm for the concentrations of 40, 20, 10 mg/mL respectively. It is concluded that the aqueous crude leaf extract of *R. officinalis* has an antifungal effect against

C. albicans.

Key words:

Antifungal,
aqueous extract,
Candida albicans,
Rosmarinus officinalis.

© 2019. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. All rights reserved.

Introducción

Candida albicans es considerado un microorganismo comensal oral, su ocurrencia oral es de un 50-70% en individuos sanos y su efecto sobre la ecología oral a pesar de la naturaleza compleja de los biofilms orales, así *C. albicans* puede proliferar en biofilms cultivadas en condiciones aerobias, sin embargo, en estas condiciones, se ha evidenciado la presencia de bacterias anaeróbicos facultativos o estrictos como *Veillonella*, *Prevotella*, *Leptotrichia* y *Fusobacterium*.¹ Asimismo, la candidiasis oral es considerada una infección oportunista de la cavidad oral, siendo sub diagnosticada entre los ancianos, particularmente en aquellos que usan dentaduras postizas, de ahí que la incidencia de *C. albicans* en aislados de la cavidad oral ha sido reportado en un 45% en neonatos, 64.5-65% de niños sanos, 30-45% de adultos sanos, 50% - 65% de personas que usan prótesis removibles.²

Por otro lado, las infecciones frecuentes de la cavidad oral ocasionadas por *Candida* se manifiestan en adultos de edad avanzada, aunque su incidencia real se desconoce, se sabe que existe una prevalencia elevada, en ciertas ocasiones como ocurre en ancianos, en presencia de prótesis mucoso portadas, xerostomía o en patologías asociadas frecuentemente en los adultos mayores.³

Además, la estomatitis de dentadura puede ocurrir en respuesta a la acumulación de placa en dentaduras postizas, siendo *C. albicans* uno de los principales microorganismos patógenos que causan este tipo

de inflamación, asimismo una candidiasis oral se presenta con dolor en la mucosa oral, complicado por estomatitis angular.⁴

En la actualidad las plantas medicinales han sido utilizadas durante siglos como remedios para diversas enfermedades humanas, por contener compo

ponentes de valor terapéutico, existe un interés creciente en los fitoquímicos como nuevas fuentes de antioxidantes naturales y agentes antimicrobianos, que a través de sus extractos se ha evidencia capacidad de inhibir su crecimiento.⁵

R. officinalis conocido como romero, es un vegetal de la familia Lamiaceae utilizado ampliamente en medicina tradicional e industria cosméticos⁶, como sus extractos acuosos, hidroalcohólicos, aceites esenciales, además se ha evidenciado la presencia en su composición química variada como, ácido rosmarínico, α -pineno, acetato de bornilo, alcanfor y carvacrol, responsables de propiedades antibacterianas, citotóxicas, inclusive la presencia de β -carotenos que se asocia a capacidades antimutagénicas, antioxidantes, antiflogísticas y quimiopreventivas.⁷⁻¹⁰

Por tal motivo el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto crudo acuoso de *R. officinalis* contra *C. albicans*.

Materiales y métodos

Rosmarinus officinalis. Se colectaron ejemplares con ramas, hojas y flores en cerros aledaños del distrito San Luis de Lucma, provincia de Cutervo, región de Cajamarca, dos ejemplares fueron transportados al herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo para su identificación, luego se inició el proceso de desinfección de las hojas con una torunda de algodón humedecida con etanol al 95 °GL, 1 Kg hojas fueron secadas empleando una estufa a temperatura a 50 °C, posteriormente se realizó su molien-da hasta obtener 100 g de materia prima en polvo.

Preparación del extracto acuoso de Rosmarinus officinalis. 20 g de materia prima en polvo, se agregaron 500 mL de agua destilada, se hirvió por 15 min, el producto fue filtrado con papel filtro Whatmann N° 40, se obtuvo un extracto libre residuos, luego se distribuido en placas petri para su secado en hornilla a una temperatura de 50 °C hasta sequedad. 2 g de residuo seco obtenido, fue guardado en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio color ámbar. Para las concentraciones se tomó como referencia a Purca¹¹ con modificaciones, 2 g del residuo seco se disolvió en 50 mL de agua destilada estéril, obteniéndose una solución madre de 40 mg/mL, se realizó diluciones seriadas por duplicado, obteniéndose diferentes concentraciones de 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL 2.5 mg/mL y 1.25 mg/mL.¹²

Preparación del inóculo de Candida albicans. Se emplearon dos cepas proporcionadas del Laboratorio de Micología del Hospital Regional Lambayeque, Chiclayo, Perú, se preparó una suspensión de *C. albicans*, se tomaron 5 Unidades Formadores de Colonia (UFC) \geq 1 mm de diámetro procedente de cultivo agar dextrosa Sabouraud (ADS), de 24 h, CLSI¹³. Se suspendieron en 5 mL de caldo Sabouraud y con ayuda del espectrofotómetro (Spectrophotometer UNICO™ UV/VIS) a una longitud de

onda de 625 nm, se ajustó a una densidad óptica de 0.12 equivalente a la turbidez del tubo N° 0.5 de la escala de Mc Farland equivalente a una concentración aproximadamente de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL.¹⁴ Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con caldo Sabouraud glucosado, obteniéndose una concentración de $1-5 \times 10^3$. Esta última, es la que se utilizó para sembrar en las placas de con agar Mueller-Hinton.

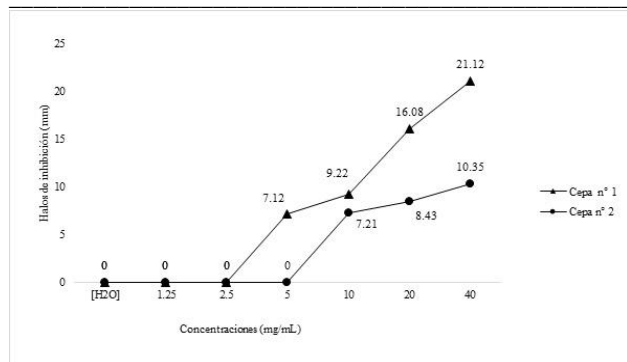
Actividad antifúngica del extracto acuoso contra Candida albicans. Sobre las placas sembradas (5 placas para cada cepa), se realizaron 6 perforaciones de 6 mm de diámetro, con un sacabocado¹⁵ colocándose 50 µL de cada concentración del extracto crudo acuoso de *R. officinalis* en cada pozo, posteriormente fueron selladas con parafilm e incubándose a 37 °C, por un periodo de 24 h, para luego realizar la medición de los halos de inhibición de crecimiento fúngico, para el control negativo se empleó una placa con 6 perforaciones más agua destilada estéril.

Análisis estadístico. Para determinar la relación de la actividad antifúngica *in vitro* del extracto crudo acuoso de *R. officinalis* en el crecimiento de fúngico de *C. albicans*, se realizó un análisis de varianza¹⁶ (ANOVA) con un nivel de significación de $P < 0.05$.

Resultados

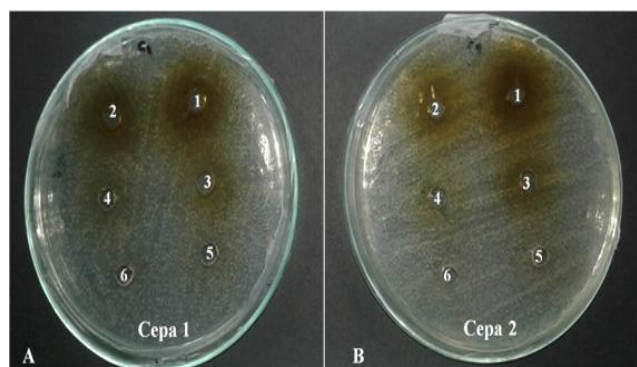
En la figura 1 se observa el promedio de los halos de inhibición (mm) de las 6 concentraciones del extracto acuoso de las hojas de *R. officinalis* contra dos cepas de *C. albicans*.

Figura 1 Promedio halos de inhibición en milímetros (mm) del extracto crudo acuoso de *R. officinalis* contra las cepas de *C. albicans* y control negativo con agua destilada estéril [H₂O]



De las 6 concentraciones evaluadas se observa que la de 40, 20, 10 y 5 mg/mL presentaron halos de inhibición promedio 21.12, 16.08, 9.22 y 7.12 mm para cepa n°1 y para la cepa n° 2, la actividad fue diferente, las concentraciones de 40, 20 y 10 mg/mL presentaron halos de 10.35, 8.43 y 7.21 mm respectivamente, El agua estéril no presentó halo de inhibición.

Figura 2 Diferencias de las halos de inhibición en relación las concentraciones del extracto crudo acuoso de *R. officinalis* (1: 40 mg/mL, 2: 20 mg/mL, 3: 10 mg/mL, 4: 5 mg/mL, 5: 2.5 mg/mL, 6: 1.25 mg/mL, contra las 2 cepas de *C. albicans* (A, B)



En la figura 2, mediante el método de difusión en pozo se observa la actividad antifúngica del extracto crudo acuoso de las hojas de *R. officinalis*, asimismo se muestra la diferencia de los tamaños de los halos inhibición dependiendo de las concentraciones evaluadas *in vitro*.

Discusión

La candidiasis oral puede estar presente en los hospederos como placa, estomatitis protésica, quelitis angular y manifestaciones orales mucocutáneas sistémicas, asimismo también se ha reportado la presencia genes activos de resistencia de *C. albicans* frente a antifúngicos conocidos.^{17,18} En la actualidad como parte de la solución, se busca nuevos principios bioactivos presentes en partes de las plantas (tallo, raíces, hojas y semillas).¹⁹ El romero (*R. officinalis* L.) pertenece a la familia Lamiaceae, es una planta aromática y es utilizado en medicina popular, cosmética y en la industria alimentaria.²⁰

Este estudio se realizó para evaluar la actividad antifúngica del *R. officinalis*, por sus propiedades terapéuticas, que en concordancia con otras especies de plantas, como *Picralima nitida* que ha reportado capacidad antifúngica de extractos acuosos de semillas, por su capacidad de inhibir el crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* y *Microsporum canis*²¹, e inclusive en extractos acuosos de hojas de Oliva, con capacidad antifúngica contra *C. albicans*.²²

Estudios fitoquímicos de *R. officinalis* han demostrado la presencia de ácido rosmarínico y su capacidad antibacteriana^{23,24} y además de otros componentes principales como 1,8-cineol, isoborneol, α -pineno y α -terpineol, existiendo una diversidad significativa por la variación estacional.²⁰

El extracto crudo acuoso de las hojas de *R. officinalis* tuvo una actividad antifúngica contra *C. albicans*, por el método de difusión en pozo, los halos promedios para una cepa fueron de 21.12m 16.08, 9.22, y 7.12 mm para las concentraciones de 40, 20, 10, 5 mg/mL respectivamente, sin embargo, respectivamente para la otra cepa se obtuvo halos prome-

dios de 10.35, 8.43 y 7.21 mm para las concentraciones de 40, 20, 10 mg/mL, se logró una relación directamente proporcional entre la concentración del extracto y el diámetro de la zona de inhibición.

Lo anterior señala la capacidad antifúngica de *R. officinalis* contra *C. albicans*, a pesar de los escasos estudios que reporten su actividad antifúngica, pero coinciden con lo reportado por Oliveira *et al.*²⁵, a una concentración de 200 mg/mL obtuvo una reducción significativa de biopelículas formadas por *C. albicans* después de la exposición al extracto y con una metodología diferente para evaluar su actividad antifúngica, mediante el método de microdilución, determinando una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0.78 mg/mL y una Concentración Mínima Microbicida (CMM) de 3.13 mg/mL.

Los principios bioactivos los extractos acuosos en *R. officinalis* no solamente pueden inhibir el crecimiento de bacterias, sino también pueden presentar capacidad antifúngica, concordante con estudios con extractos acuosos de plantas de diferentes especies tales como la *Mimosa púdica* y *Azadirachta indica*.^{26,27}

Se observó que las cepas de *C. albicans* utilizados en esta investigación exhibieron diferentes grados de susceptibilidad al extracto de *R. officinalis*, inclusive la susceptibilidad observada a este podría atribuirse al factor de resistencia inherente de los microorganismos.^{21,22,26}

Finalmente, con estos datos el extracto crudo de hojas de *R. officinalis* revela un gran potencial biológico al presentar una actividad antifúngica a diferentes dosis, representando una alternativa terapéutica ante infecciones oportunistas, aunque los datos son concluyentes, se requiere realizar trabajos que validen esta técnica, extraer sus compuestos bioactivos y permitan en el tiempo ser explotado en el tratamiento terapéutico a través de pastas dentales,

enjuagues bucales, irrigación de canales radiculares, ungüentos, entre otros y control de algunas infecciones fúngicas.

Conflictos de intereses

Los autores declaramos no presentar conflictos de interés potenciales con respecto a la investigación, autoría y/o publicación de este artículo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Señor de Sipán, Facultad de Ciencias de la Salud, por el apoyo técnico, científico y logístico realizado a la presente investigación.

Aspectos éticos

La aprobación de la investigación por el Comité de Ética, Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Señor de Sipán, (Chiclayo, Perú) y siguió las pautas establecidas para este comité.

Literatura citada

1. Janus MM, Crielaard W, Volgenant CMC, van der Veen MH, Brandt BW, Krom BP. *Candida albicans* alters the bacterial microbiome of early *in vitro* oral biofilms. J Oral Microbiol 2017;9(1):1-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/20002297.2016.1270613>
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J 2002;78(922):455-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/pmj.78.922.455>
3. Otero Rey E, Peñamaría Mallón M, Rodríguez Piñon M, Martín Biedma B, Blanco Carrión A.

- Candidiasis oral en el paciente mayor. Av Odontostomatol 2015;31(3):135-48. DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S0213-12852015000300004>
4. Hoshi N, Mori H, Taguchi H, Taniguchi M, Aoki H, Sawada T, et al. Management of oral candidiasis in denture wearers. J Prosthodont Res 2011;55(1):48-52. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2010.03.004>
 5. Najem AM, Ibrahim JA. Potential use of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil as anti-bacterial and anti-algal. J Pharm Biol Sci 2017;12(2):68-71. DOI: <https://dx.doi.org/10.9790/3008-1202016871>
 6. Hussain Abdullah I, Anwar F, Chatha Shahzad AS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam Poonam S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Braz J Microbiol 2010;41(4):1070-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838220100004000027>
 7. Montero Recalde MA, Martínez Jimenéz JA, Avilés Esquivel DF, Valle Velástegui EL, Pazmiño Miranda NP. Efecto antimicrobiano del extracto crudo oleoso de *Rosmarinus Officinalis* sobre cepa de *Escherichia coli*. J Selva Andina Biosph 2017;5(2):168-75.
 8. Solano Solano XK, Moya Silva TJ, Zambrano Gutierrez MI. Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* “romero”. Odontologia 2016;19(2):29-34.
 9. Kadri A, Zarai Z, Chobba IB, Békir A, Gharsallah N, Damak M, et al. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. J Med Plants Res 2011;5(25):5999-6004. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR11.423>
 10. Takayama C, Meirade Faria F, Alvesde Almeida AC, Dunder RJ, Manzo LP, Rabelo Socca EA, et al. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. Asian Pac J Trop Biomed 2016;6(8):677-81. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.027>
 11. Purca Peña TP. Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival [tesis de Licenciatura]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013. Recuperado a partir de: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3092>
 12. National Committee for Clinical Laboratory Standards [Internet]. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Document M07-A10. 2015. NCCLS, Wayne, PA. Recuperado a partir de: <https://clsi.org/>
 13. Clinical and Laboratory Standards Institute [Internet]. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Document M27-A3. 2017. NCCLS, Wayne, PA. Recuperado a partir de: <https://clsi.org>
 14. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SA. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal 2016;6(2):71-9. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
 15. Valgas C, Machado de Souza S, Smânia EFA, Smânia Jr A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Braz J Microbiol 2007;38(2):369-80. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>
 16. Álvarez Cáceres R. Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Ediciones Díaz de Santos. España; 2007. 989 p.
 17. Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. J Oral Maxillofac Pathol 2014;18(Suppl 1):S81-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0973-029X.141325>

18. Ali Habeeb A. Detection of drug resistance gene expression in *Candida albicans* isolated from oral thrush of children via real-time PCR technique. *J Pharm Sci Res* 2018;10(3):594-6.
19. Nieto G, Ros G, Castillo J. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines* 2018;5(3): E98. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/medicines5030098>
20. Yıldırım. ED. The effect of seasonal variation on *Rosmarinus officinalis* (L.) essential oil composition. *Int J Agric Wildlife Sci* 2018;4(1):33-3. DOI: <http://dx.doi.org/10.24180/ijaws.381564>
21. Ubulom P, Akpabio E, Ejikeme Udobi C, Mbon R. Antifungal activity of aqueous and ethanolic extracts of *Picralima nitida* seeds on *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* and *Microsporium canis*. *Res Pharm Biotech* 2011;3(5):57-60.
22. Nasrollahi Z, Abolhasannezhad M. Evaluation of the antifungal activity of olive leaf aqueous extracts against *Candida albicans* PTCC-5027 *Curr Med Mycol* 2015;1(4):37-9. DOI: <https://dx.doi.org/10.18869/acadpub.cmm.1.4.37>
23. Tawfeeq AA, Mahdi MF, Abaas IS, Alwan AH. Phytochemical and antibacterial studies of leaves of *Rosmarinus officinalis* cultivated in Karbala, Iraq. *Al-Mustansiriyah J Pharm Sci* 2017;17(2): 86-94.
24. Pires Amaral G, Rigon Mizdal C, Terra Stefanello S, Loureiro Mendez AS, Puntel RL, Anrakude Campos MM, et al. Antibacterial and antioxidant effects of *Rosmarinus officinalis* L. extract and its fractions. *J Tradit Complement Medi* 2018; En prensa. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.10.006>
25. de Oliveira JR, de Jesus D, Figuerira LW, de Oliveira FE, Pacheco Soares C, Camargo S, et al. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017;242(6):625-34. DOI: <https://dx.doi.org/10.1177/1535370216688571>
26. Gupta SP, Rana KS, Sharma K, Chhabra BS. Antifungal activity of aqueous leaf extract of *Ocimum sanctum* on dominant fungal species of monuments. *Eur Chem Bull* 2014;2(6):609-11. DOI: <https://dx.doi.org/10.17628/ECB.2014.3.609>
27. Mahmoud DA, Hassanein NM, Youssef KA, Abou Zeid MA. Antifungal activity of different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens. *Braz J Microbiol* 2011;42(3):1007-16. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S1517838220110003000021>