

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO) SOBRE LA OTITIS EXTERNA POR *Malassezia* SPP. EN PERROS (*Canis lupus familiaris*)

Effect of essential oil *Origanum vulgare* L. (oregano) on external otitis by *Malassezia* spp. in dogs (*Canis lupus familiaris*)

Zaida C. Rojas¹, Sandra G. Bezada², Martín Condorhuamán³, Jorge L. Arroyo⁴

¹Universidad Alas Peruanas. ²Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal; Facultad de Medicina Veterinaria. ³Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara", Facultad de Farmacia y Bioquímica. ⁴Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre la otitis externa por *Malassezia* spp. en perros. Se emplearon 38 animales, 22 de los cuales presentaron otitis bilateral y 16 otitis unilateral (60 orejas). Se colectó la secreción ótica de ambos oídos con ayuda de hisopos estériles y las muestras se evaluaron efectuando el conteo de levaduras por campo visual después de haber sido sometidas a tinción Wright. Se realizaron diluciones estables del aceite esencial de orégano en aceite mineral al 1, 2 y 5%. La evaluación del efecto antifúngico *in vivo* se realizó comparando las tres diluciones con clotrimazol al 1% –utilizado como control positivo– y con aceite mineral puro en el grupo placebo. La eficacia del efecto de las diluciones se comparó mediante el conteo de levaduras por campo visual al 3er y 8vo días de tratamiento. Se presentó un mejor efecto al 8vo día con el aceite esencial de orégano (AEO) al 5% que logró un 75% de orejas recuperadas en comparación al grupo clotrimazol (50%), concluyéndose que la dilución del AEO al 5% presentó un mayor efecto fungicida sobre la otitis externa en perros por *Malassezia* spp.

Palabras clave: *Origanum vulgare* L, aceite esencial de orégano (AEO), efecto fungicida, otitis externa, *Canis lupus familiaris*.

SUMMARY

The present study aimed to determine the effect of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) on the external otitis in dogs by *Malassezia* spp. Were used 38 animals, 22 had bilateral otitis and 16 unilateral (60 ears). Were collected the ear discharge of both ears using sterile swabs and samples were evaluated by performing yeast count per field, after had been subjected to Wright staining. Were made stable dilutions of essential oil of oregano in mineral oil at 1, 2 and 5%. The evaluation of the antifungal effect *in vivo* was determined by comparing the three dilutions with clotrimazole 1%, used as positive control, and with pure mineral oil in placebo group. The effectiveness of the effect of the dilutions was compared by counting yeasts visual field to the 3rd and 8th day of treatment. Got Better effect to the 8th day with the essential oil of oregano (AEO) 5% with 75% of ears recovered compared to clotrimazole group (50%), concluding that dilution of AEO 5% had a best fungicidal effect on otitis externa in dogs by *Malassezia* spp.

Keywords: *Origanum vulgare* L, essential oil of oregano (AEO), fungicidal effect, external otitis, *Canis lupus familiaris*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se viene impulsando el empleo de extractos a partir de recursos naturales como reemplazo o coadyuvante a los tratamientos farmacológicos convencionales, buscando una manera de desarrollar alternativas que no causen efectos adversos en la población. Uno de éstos recursos es el *Origanum vulgare* L, cuyo uso se extiende a la industria cosmética y culinaria. Las características antibacterianas y antifúngicas del aceite esencial de esta planta aromática se han venido estudiando ^(1, 2). En medicina veterinaria la elevada incidencia de otitis externa fúngica es habitual en la casuística diaria, con diversos grados

de afección y *Malassezia* spp. es agente asociado con mayor frecuencia ^(3, 4). Esta levadura se multiplica de manera rápida por cambios en su medio, existiendo diversos medicamentos y protocolos de tratamiento con diferentes niveles de éxito según la naturaleza de la afección y a la continuidad del tratamiento, que se relaciona de manera directa con la resolución del cuadro clínico y cronicidad del mismo ^(5, 6).

Por lo expuesto, es importante buscar nuevos agentes antifúngicos para el uso clínico, otorgando así terapias alternativas en el tratamiento de la otitis externa fúngica, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto fungicida *in vivo* del aceite esencial del *Origanum vulgare* L. (AEO) como tratamiento para la otitis externa en caninos (*Canis lupus familiaris*) por *Malassezia* spp.

Tabla 1. Resultado de las citologías en los grupos experimentales, grupo control positivo y grupo placebo al 3er y 8vo día de tratamiento.

Grupos	Día 3			Día 8		
	Curados (0, +, ++)	Enfermos (+++, +++)	Total	Curados (0, +, ++)	Enfermos (+++, +++)	Total
(AEO 1%) GE-1	41,60%	58,40%	12	33,30%	66,70%	12
(AEO 2%) GE-2	8,30%	91,70%	12	16,70%	83,30%	12
(AEO 5%) GE-3	33,30%	66,70%	12	75,00%	25,00%	12
(Clotrimazol 1%) CP	25,00%	75,00%	12	50,00%	50,00%	12
(Aceite) PL	0,00%	100,00%	12	8,30%	91,70%	12

AEO = Aceite esencial de orégano. El total se refiere al número de orejas por grupo.

Tabla 2. Porcentaje de eficacia del aceite esencial de orégano en los grupos experimentales y grupo control positivo al octavo día de tratamiento.

Grupo de tratamiento	Porcentaje de Eficacia
Aceite esencial de orégano al 1% (GE-1)	27,3%
Aceite esencial de orégano al 2% (GE-2)	9,2%
Aceite esencial de orégano al 5% (GE-3)	72,7%
Clotrimazol (grupo CP)	45,5%

Tomando un nivel de confianza del 95% se determinó que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la eficacia del clotrimazol y la eficacia del AEO al 5% ($p > 0,05$).

MATERIAL Y MÉTODOS

Es un diseño de investigación experimental de tipo descriptivo, analítico, prospectivo y longitudinal. El estudio se realizó en tres albergues caninos ubicados en los distritos de Chaclacayo, Cieneguilla y Villa El Salvador.

Obtención del aceite esencial de *Origanum vulgare* L.

Se extrajo el aceite esencial de orégano (AEO) mediante la técnica de arrastre de vapor de agua, que es utilizada en la separación de sustancias orgánicas inmiscibles en agua y volátiles (aceite esencial) de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla y que no son extraídas⁽⁷⁾. Se utilizaron 3,5 kg de hojas secas de orégano de las cuales se obtuvo un rendimiento de 29,3 mL.

Colecta del material biológico

Se seleccionaron 38 perros, de los cuales 22 presentaron otitis bilateral y 16 otitis unilateral. La secreción ótica se colectó con ayuda de hisopos estériles. Las muestras se evaluaron en el Laboratorio Central de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Alas Peruanas y en un laboratorio clínico privado, realizándose el conteo de levaduras de *Malassezia* spp. después de haber sido sometidas a tinción Wright (figura 1). Se evaluó la presencia de *Malassezia* spp., como sigue: *negativo* o células/campo; *una cruz* (+) de 1 a 5 células/campo; *dos cruces* (++) de 6 a 10 células/campo; *tres cruces* (+++) de 11 a 19 células/campo; *cuatro cruces* (++++) > 19 células/campo^(4, 8, 9). Se elaboró, por cada canino, una ficha de registro donde se anotó la evaluación de la población de *Malassezia* spp.

Determinación del efecto antifúngico

Se establecieron cinco grupos de tratamiento; CP=Control Positivo (tratamiento con clotrimazol en gotas al 1%); Grupos experimentales 1, 2 y 3

(GE-1, GE-2 y GE-3, tratamiento con aceite de orégano al 1, 2 y 5%, respectivamente); y Grupo placebo (PL = tratamiento sólo con aceite mineral). El aceite esencial colectado se diluyó con aceite mineral para obtener concentraciones al 1, 2 y 5%, aplicándose cinco gotas del AEO como tratamiento respectivo en las orejas afectadas (unilateral o bilateral) cada 24

horas durante un período de 8 días, masajeando el pabellón auricular para asegurar que el producto cubra el interior del conducto auditivo de manera uniforme, de igual manera se efectuó para los grupos controles. Se realizó el control al 3er y 8vo días de tratamiento.

Los indicadores de evaluación fueron la disminución en el número de levaduras al 3er y 8vo días después de iniciado el tratamiento, expresándose en porcentaje de eficacia.

Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante estadística descriptiva, empleándose métodos gráficos y numéricos (porcentajes) para interpretar los resultados y comparando a los animales del grupo placebo con los grupos tratamiento (experimentales y control positivo) para determinar la eficacia a través del conteo del número de levaduras halladas por campo visual al 3er y 8vo días de tratamiento. Se consideró estadísticamente significativo para un $p < 0,05$.

RESULTADOS

El grupo del aceite esencial de orégano al 5% presentó mejor efecto al 8vo día de tratamiento con 75% de orejas recuperadas (tabla 1, figuras 2 y 3).

En la tabla 2, se señalan los porcentajes de eficacia de los grupos experimentales (AEO al 1, 2 y 5%) comparado con el grupo control positivo (Clotrimazol 1%).

Durante el tratamiento realizado con el aceite esencial de orégano al 1, 2 y 5% no se evidenciaron efectos adversos en los caninos tratados al no

presentarse irritación, prurito o enrojecimiento en la epidermis de las orejas tratadas.

DISCUSIÓN

Para comprobar el efecto del aceite esencial de orégano como fungicida sobre los organismos de *Malassezia* spp., se compararon las diluciones al 1, 2 y 5% con clotrimazol en gotas al 1%, principio activo fungicida comprobado y existente en el mercado.

El efecto fungicida sobre *Malassezia* spp puede deberse a los metabolitos secundarios timol y carvacrol, presentes en el aceite esencial de orégano, a los cuales se atribuyen efectos bactericidas y fungicidas. Según Muñoz ⁽¹⁰⁾, estos compuestos fenólicos naturales, están presentes en forma considerable en los aceites esenciales de diversas plantas, incluyendo al *Origanum vulgare* L. Villa y Villavicencio ⁽¹¹⁾, refieren que el AEO tiene como componentes principales al timol en 16,7% y carvacrol, atribuyéndose la actividad antifúngica y antibacteriana al carvacrol. Ambos estudios coinciden en que los valores varían según el clima al momento de recolección de la planta, la conservación y preservación del aceite, así como del tiempo transcurrido hasta la extracción del aceite esencial.

Lambert ⁽¹²⁾ estudió la capacidad del timol y carvacrol, presentes en el aceite esencial de orégano, para alterar la integridad de la membrana celular de las bacterias y hongos, demostrando que dicho efecto se lograba porque estos compuestos modifican el pH celular ocasionando fuga de iones, provocando así la muerte celular. Esta sería la razón por la cual en la presente investigación se observaron detritus celulares en muchos de los frotises realizados al 8vo día de tratamiento, así como una notable disminución de las levaduras de *Malassezia* spp.

Según los resultados obtenidos, al tercer día de tratamiento se pudo ver efecto fungicida sobre los organismos de *Malassezia* spp., el cual fue incrementándose hasta finalizar el tratamiento (octavo día). La excepción fue

el AEO al 1% si se considera como valor de recuperación definitivo al obtenido en el octavo día.

No se hallaron trabajos realizados con el aceite esencial de orégano aplicado *in vivo* en animales; sólo se encontró el estudio realizado por García ⁽¹³⁾ en nuez pecanera contaminada con aflatoxinas, que inhibió el crecimiento del hongo productor desde

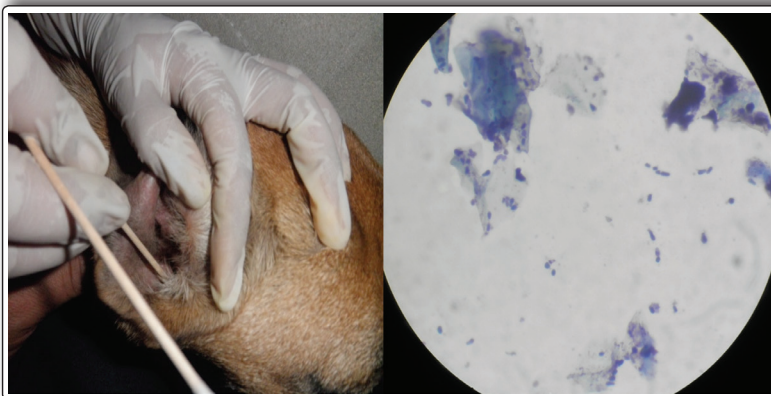


Figura 1. Obtención de muestra de secreción ótica y levaduras de *Malassezia* spp.

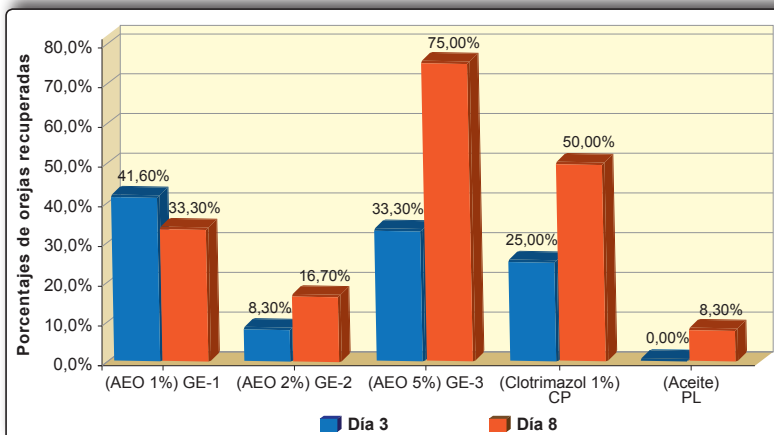


Figura 2. Porcentajes de orejas recuperados en los grupos experimentales al 3er y 8vo día de tratamiento.

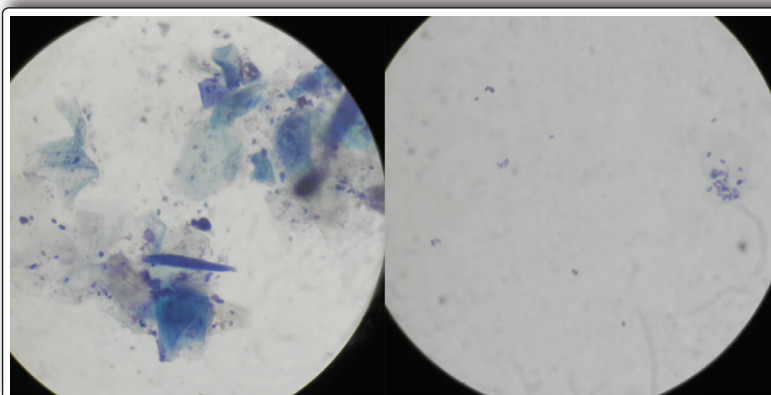


Figura 3. Muestra de secreción ótica al día 0 y 8vo día de tratamiento (AEO 5%).

la concentración 250 ppm. En el presente estudio se procedió a realizar las diluciones de aceite esencial de orégano y aplicarlas por primera vez de manera tópica en animales que presentaban cuadro clínico de otitis externa por *Malassezia* spp.

Es notoria la baja eficacia del tratamiento que presenta el GE-2 con respecto a los demás; uno de los factores que pudieron influir en ello fue que como la asignación de animales en los grupos de tratamiento fue aleatoria no se contemplaron sexo, edad, forma de la oreja, ni cronicidad de la enfermedad, y precisamente en este grupo estuvieron las tres únicas orejas con otitis crónica del estudio (todas las demás estaban en fase aguda), con signos de engrosamiento y estenosis del conducto auditivo, representando el 25% de los casos del GE-2. El que los animales vivieran bajo cobijo o al aire libre sería otro factor importante a considerar, pues en el 67% de orejas tratadas en este grupo, los canes vivían a la intemperie en el patio de los albergues, los cuales en su mayoría eran descampados de tierra, quedando así a merced de las condiciones del clima y el suelo que habitaban.

En relación al GE-3, la eficacia del tratamiento fue mayor que en los demás grupos, incluyendo al clotrimazol 1%. El tratamiento con aceite de orégano al 5%, presentó mejor efecto al 8vo día de tratamiento con un 75% de orejas recuperadas. Observando los resultados de la tabla 2 se puede afirmar que clotrimazol al 1% puede ser sustituido por AEO al 5% para el tratamiento de la otitis externa en perros por *Malassezia* spp ($p>0,05$).

CONCLUSIONES

- El aceite esencial de orégano (AEO) al 5% presentó mejor efecto fungicida sobre la otitis externa por *Malassezia* spp, en caninos.
- La dilución de AEO al 5% presentó un porcentaje de eficacia fungicida mayor a clotrimazol al 1% y a las otras diluciones (1 y 2%).
- El AEO en ninguna de las diluciones empleadas presentó efectos adversos como irritación, prurito o enrojecimiento en la epidermis de las orejas tratadas de los caninos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bandoni A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Buenos Aires: Red de Editoriales Universitarias; 2000. p. 29-232.
2. Arcila C, Loarca G, Lecona S, Gonzáles E. El orégano; propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2004; 54(1): 100-8.
3. Giusiano GE. Malassezia. Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. Rev Argent Microbiol. 2006; 38(1): 41-8.
4. Kaneko T, Makimura K, Abe M, Shiota R, Nakamura Y, Kano R, et al. Revised culture-based system for identification of *Malassezia* sp. J Clin Microbiol. 2007; 45(11): 3737-42.
5. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. J Clin Microbiol. 2000; 38(6): 2383-5.
6. Gabal MA. Preliminary studies on the mechanism of infection and characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. Mycopathología. 1988; 104(2): 93-8.
7. Peredo H, Palou E, López A. Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas selectos de ingeniería de alimentos. 2009; 3(1): 24-32.
8. Rosser EJ. Causes of otitis externa. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2004; 34(2): 459-68.
9. Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species. J Mycol Med. 1996; 6: 103-10.
10. Muñoz AA, Castañeda M, Blanco K, Cardenas C, Reyes J, Kouznetsov V, et al. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. Scientia et Technica. 2007; XIII(33): 125-8.
11. Villa ML, Villavicencio OV. Manual de Fitoterapia. Lima: EsSalud; 2001.
12. Lambert R, Skandamis P, Coote P, Nychas G. Study of the minimum inhibitory concentration on mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol. 2001; 91(3): 453-62.
13. García EC, Quezada MV, Lara J, Sánchez GH, Moreno EM, Pérez MJ. Actividad antifúngica de aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. Revista Mexicana de Fitopatología. 2006; 24(1): 8-12.

Manuscrito recibido el: 23/04/15

Aceptado para su publicación el: 20/05/2015

Correspondencia:

Nombre: Zaida C. Rojas Bernal
 Dirección: Av. Paul Poblete S/N Rinconada Alta. Pachacamac.
 E-mail: zaida.r.b@hotmail.com