



Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Patricio Godoy
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

Profesor Co-Patrocinante
Dr. Ociel Muñoz
Instituto de Ciencia y Tecnología de los
Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias

**ACTIVIDAD INHIBITORIA *IN VITRO* DE ACEITES ESENCIALES
FRENTE AL ALGA *PROTOTHECA* SPP., PERTENECIENTE A LA
FAMILIA *CHLORELLACEAE*.**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciada en Bioquímica y Título
Profesional de ***Bioquímico***

PAMELA ANDREA BRÛLÉ GUIÑEZ

**VALDIVIA – CHILE
2014**

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a mi casa de estudios, Universidad Austral de Chile, en especial al Instituto de Microbiología Clínica y al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, lugares donde se desarrolló esta Tesis, porque muchas de las personas que allí trabajan, colaboraron en alguna medida en que este trabajo se llevara a cabo.

A mi Profesor Patrocinante, Dr. Patricio Godoy, por aceptarme como tesista y por tener siempre una sonrisa y buena disposición.

A mi Profesor Co-Patrocinante, Dr. Ociel Muñoz, por ayudarme en la parte química de esta tesis, entregándome la confianza y las herramientas para el desarrollo de la misma.

Al Profesor Mario González por su simpatía y por aceptar gentilmente ser mi Profesor Informante.

Al Profesor Hernán Palma, del Instituto de Química, quien accedió a brindarme toda su ayuda en el proceso de análisis de los aceites empleados en este trabajo, y que si bien, por razones externas, esto no se pudo concretar, su voluntad siempre fue la mejor.

A Iván Montenegro, Bioquímico egresado de esta misma Universidad, quien no tuvo problemas para compartir conmigo parte de sus investigaciones y resultados.

A mis amigos, por su comprensión y apoyo, porque directa o indirectamente han sido un pilar fundamental en este proceso.

A mis amados padres, porque gracias al cariño, apoyo y al esfuerzo que hacen día a día, ha sido posible llegar al fin de una etapa.

A mi pequeña gran familia, por su contención, y por llenar mis días de amor y alegrías.

A todos quienes contribuyeron, de alguna u otra manera a que esto fuera posible, pero muy especialmente, a dos personas que si bien no están físicamente, me acompañan en cada momento, mis queridos abuelos. Gracias de corazón.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	AGRADECIMIENTOS	i
	ÍNDICE DE CONTENIDOS	ii
	ÍNDICE DE TABLAS	v
	ÍNDICE DE FIGURAS	vi
	LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1	RESUMEN	1
1.1	SUMMARY	2
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	Generalidades	3
2.2	<i>Prototheca</i> spp.	6
2.3	Epidemiología	9
2.4	Mastitis Bovina causada por <i>Prototheca</i> spp.	12
2.5	Tratamiento	13
2.6	Hipótesis de trabajo	15
2.7	Objetivos generales	15
2.8	Objetivos específicos	15

3	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1	Materiales	16
3.1.1	Material Biológico	16
3.1.1.1	Especies vegetales y su clasificación taxonómica	16
3.1.1.2	Cepas	26
3.1.2	Equipos	28
3.2	Métodos	28
3.2.1	Preparación y extracción de los aceites esenciales	28
3.2.1.1	Recolección e identificación de las especies vegetales	28
3.2.1.2	Extracción de los aceites esenciales	29
3.2.1.3	Preparación del extracto AcOet de <i>L. sempervirens</i>	29
3.2.1.4	Análisis químico de los aceites esenciales	30
3.2.2	Pruebas de susceptibilidad de <i>Prototheca</i> spp.	30
3.2.2.1	Cultivo de muestras	30
3.2.2.2	Preparación de la suspensión	31
3.2.2.3	Método de difusión en agar	31
3.2.2.4	Evaluación de la susceptibilidad	33
4	RESULTADOS	35
4.1	Actividad inhibitoria del aceite esencial de <i>E. globulus</i>	35
4.1.1	Susceptibilidad de las cepas de <i>Prototheca</i> spp. frente al aceite esencial de EG	39
4.1.2	Análisis cromatográfico del aceite esencial de EG	41

4.2	Actividad inhibitoria del aceite esencial de <i>L. sempervirens</i>	45
4.2.1	Susceptibilidad de las cepas de <i>Prototheca</i> spp. frente al aceite esencial de LS	49
4.2.2	Análisis cromatográfico del aceite esencial de LS	51
4.3	Actividad inhibitoria del aceite esencial de <i>L. philippiana</i>	54
4.3.1	Susceptibilidad de las cepas de <i>Prototheca</i> spp. frente aceite esencial de LP	58
4.3.2	Análisis cromatográfico del aceite esencial de LP	60
5	DISCUSIÓN	62
6	BIBLIOGRAFÍA	69
7	ANEXOS	76
7.1	Medios de cultivo	76
7.1.1	Caldo nutriente	76
7.1.2	Medio Agar Sabouraud	77
7.1.3	Medio Agar Mueller Hinton	78

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I.	Taxonomía del género <i>Prototheca</i>	8
TABLA II.	Jerarquía taxonómica de <i>Eucalyptus globulus</i> .	21
TABLA III.	Jerarquía taxonómica de <i>Laurelia sempervirens</i> .	23
TABLA IV.	Jerarquía taxonómica de <i>Laureliopsis philippiana</i>	25
TABLA V.	Lugar de origen de las muestras desde donde se aislaron las cepas de <i>Prototheca</i> spp.	27
TABLA VI.	Medida de halos de inhibición (mm) de las cepas de <i>P. stagnora</i> , <i>P. wikerhamii</i> y <i>P. zopfii</i> frente al aceite esencial de <i>E. globulus</i>	40
TABLA VII.	Lista de compuestos identificados en aceite esencial de <i>E. globulus</i> .	43
TABLA VIII.	Medida de halos de inhibición (mm) de las cepas de <i>P. stagnora</i> , <i>P. wikerhamii</i> y <i>P. zopfii</i> frente al extracto de <i>L. sempervirens</i>	50
TABLA IX.	Lista de compuestos identificados en el extracto etanólico de corteza de <i>L. sempervirens</i> .	52
TABLA X.	Medida de halos de inhibición (mm) de las cepas <i>P. stagnora</i> , <i>P. wikerhamii</i> y <i>P. zopfii</i> frente al aceite esencial de <i>L. philippiana</i>	59
TABLA XI.	Lista de compuestos identificados en el aceite esencial de <i>L. philippiana</i>	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Material vegetal: <i>Eucalyptus globulus</i>	17
FIGURA 2.	Material vegetal: <i>Laurelia sempervirens</i>	18
FIGURA 3.	Material vegetal: <i>Laureliopsis philippiana</i>	19
FIGURA 4.	Esquema de ensayos de susceptibilidad de <i>Prototheca</i> spp. frente a diferentes aceites esenciales	32
FIGURA 5.	Evaluación de la susceptibilidad	34
FIGURA 6.	<i>P. stagnora</i> frente al aceite esencial de <i>E. globulus</i>	36
FIGURA 7.	<i>P. wikerhamii</i> frente al aceite esencial de <i>E. globulus</i>	37
FIGURA 8.	<i>P. zopfii</i> frente al aceite esencial de <i>E. globulus</i>	38
FIGURA 9.	Compuestos mayoritarios identificados en aceite esencial de <i>E. globulus</i>	44
FIGURA 10.	<i>P. stagnora</i> frente al extracto etanólico de <i>L. sempervirens</i>	46
FIGURA 11.	<i>P. wikerhamii</i> frente al extracto etanólico de <i>L. sempervirens</i>	47
FIGURA 12.	<i>P. zopfii</i> frente al extracto etanólico de <i>Laurelia sempervirens</i>	48
FIGURA 13.	Compuestos mayoritarios identificados en extracto etanólico de corteza de <i>L. sempervirens</i>	53
FIGURA 14.	<i>P. stagnora</i> frente al aceite esencial de <i>L. philippiana</i>	55
FIGURA 15.	<i>P. wikerhamii</i> frente al aceite esencial de <i>L. philippiana</i>	56
FIGURA 16.	<i>P. zopfii</i> frente al aceite esencial de <i>L. philippiana</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOet	Acetato de etilo
AE	Aceite esencial
CG-EM	Cromatografía de Gases-Espectrómetro de Masas
CMI	Concentración mínima inhibitoria
EDAS	Estación depuradora de aguas servidas
EG	<i>Eucalyptus globulus</i>
EtOH	Etanol
LS	<i>Laurelia sempervirens</i>
LP	<i>Laureliopsis philippiana</i>
RT	Tiempo de retención
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

1. RESUMEN

El presente estudio trata sobre la actividad inhibitoria *in vitro* de los aceites esenciales obtenidos de las especies *Eucalyptus globulus*, *Laureliopsis philippiana* y el extracto etanólico de corteza de *Laurelia Sempervirens* frente a 12 cepas de *Prototheca* spp., aisladas de aguas, lodos y muestras de leche de vacas con mastitis. Estas especies vegetales han reportado poseer actividad frente a un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones, tanto en el hombre como en animales y plantas.

El objetivo del trabajo fue realizar un estudio químico y microbiológico de estos aceites. Para ello, la extracción de los aceites se llevó a cabo mediante hidrodestilación, mientras que la determinación de los compuestos químicos presentes se realizó mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

La actividad inhibitoria de los aceites se evaluó utilizando una versión modificada del método de difusión en agar sobre las 12 cepas de *Prototheca* spp.

Los componentes mayoritarios identificados en los aceites correspondieron a los monoterpenos oxigenados eucaliptol (60,54%), en el caso de *E. globulus*, y safrol (63,03%) en *L. sempervirens* y (96,92%) en *L. philippiana*. Si bien, todos los aceites presentaron actividad antifúngica, el aceite de *L. philippiana* fue el que evidenció una mayor actividad.

1.1 SUMMARY

The present study is about the *in vitro* inhibitory activity of essential oils obtained from *Eucalyptus globulus* and *Laureliopsis philippiana* species, and ethyl acetate extract *Laurelia Sempervirens* bark, against 12 strains of *Prototheca* spp. isolated from water, mud and milk samples of cows with mastitis. These plant species have been reported to possess activity against a wide range of microorganisms that cause infections in both humans and animals and plants.

The objective was to conduct a chemical and microbiological study of these oils. For this, the oil extraction is carried out by hydrodistillation, while determination of the chemical compounds was performed using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer.

The inhibitory activity of the oils was evaluated using a modified agar diffusion method on 12 strains of *Prototheca* spp.

The major components identified in the oils were for oxygenated monoterpenes eucalyptol (60.54%) in the case of *E. globulus*, and safrole (63.03%) in *L. sempervirens* and (96.92%) in *L. philippiana*. While all oils showed antifungal activity, *L. philippiana* oil which was evidenced increased activity.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

A lo largo de la historia, las distintas civilizaciones que han habitado el planeta, han recurrido a la naturaleza para combatir diversas afecciones. A través de la observación del comportamiento de los animales, e incluso por medio del ensayo y error, las diferentes culturas fueron perfeccionando el uso medicinal que daban a las plantas, transmitiendo sus conocimientos de generación en generación (Fonnegra y Jiménez, 2007).

Hoy en día, debido al pobre desarrollo de nuevos fármacos que tengan acción inhibitoria contra microorganismos patógenos, han cobrado gran relevancia las investigaciones científicas relacionadas con el estudio de especies vegetales que sean capaces de combatir enfermedades causadas por dichos microorganismos (Patwardhan, 2009).

Nuestro país, gracias a su diversidad geográfica y su amplia variedad de climas, propicia la existencia de una flora muy rica con propiedades medicinales aún no estudiadas en su totalidad. Según Hoffman *et al.* (1992), sólo alrededor del 5 % del total de las especies conocidas de la flora chilena han sido estudiadas químicamente.

Las plantas sintetizan metabolitos secundarios como las fitoanticipinas y las fitoalexinas, que son productos que utilizan para defenderse de la acción de los microorganismos, entre ellos los hongos. Otras moléculas producidas por las plantas son las fitodefensinas, de naturaleza peptídica y ricas en cisteína, con capacidad de

inhibir el crecimiento de los hongos al producir en ellos cambios morfológicos y daño en algunas estructuras celulares (Mesa *et al.*, 2004).

Dentro de los metabolitos secundarios con actividad fungicida se encuentran los provenientes de la fracción líquida volátil que contiene las sustancias responsables del aroma de las plantas o aceites esenciales. Generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes de bajo peso molecular como compuestos alifáticos simples, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos, que hacen parte de los monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Alzate *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales de las plantas, pueden ser buenos candidatos para el control de ciertos microorganismos, ya que constan de muchas sustancias químicas bioactivas. Además, debido a que sus componentes son muy volátiles, no persisten cuando se les utiliza en los campos o en el agua. Muchos aceites esenciales de plantas y sus compuestos han sido reportados por presentar propiedades antifúngicas (Park y Kim, 2012).

Las monimiáceas (*Monimiaceae*), es una familia de Angiospermas del Orden *Laurales*. Consta de 23 géneros con unas 150 especies, que se distribuyen por los trópicos del Viejo y Nuevo Mundo, y las zonas templadas de Chile, Argentina, Nueva Zelanda, Australia y Tasmania.

Bittner *et al.* (2009), evaluaron la actividad fungistática de aceites esenciales extraídos de diferentes especies de la familia *Monimiaceae*; boldo (*Peumus boldus*), tepa (*Laureliopsis philippiana*), y laurel (*Laurelia sempervirens*), sobre importantes fitopatógenos, tales como: *Rhizoctonia solani*, *Pythium irregulare*, *Ceratocystis pilifera*,

Phragmidium violaceum y *Fusarium oxysporum*, si bien todos los aceites presentaron actividad biológica, fue el aceite esencial de *L. sempervirens* el que presentó la mejor actividad fungistática contra las cepas tratadas, con diferencias significativas tanto en dosis como en tiempo de exposición.

Por su parte, Montenegro (2006), reveló la actividad inhibitoria del extracto de *L. sempervirens* contra bacterias nosocomiales altamente resistentes, tales como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*, presentando actividad contra las dos primeras principalmente.

Otra familia cuyas especies han sido estudiadas por diversos investigadores, corresponde a la familia *Myrtaceae*, que contiene al menos 3000 especies con 130-150 géneros y se distribuye en varias áreas tropicales con cálidas temperaturas. Muchos aceites esenciales producidos por estas especies exhiben propiedades insecticidas, fungicidas y/o nematocidas (Park y Kim, 2012).

El género *Eucalyptus*, perteneciente a la familia *Myrtaceae*, es nativo de la región australiana, y comprende más de 600 especies de árboles. Dentro del género, *Eucalyptus globulus*, es posiblemente la especie más conocida y difundida en el mundo por su facilidad de establecimiento, rápido crecimiento y múltiples usos.

Si bien es una especie introducida, *Eucalyptus globulus* es cada vez más utilizado en la medicina tradicional para diversas implicaciones médicas, debido a sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antipiréticas (Noumi *et al.*, 2011).

Ensayos de actividad antimicrobiana realizados por Damjanović-Vratnica *et al.* (2011), mostraron que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* posee una fuerte actividad antimicrobiana, especialmente contra *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*.

Mishra *et al.* (2012), en un estudio realizado para determinar la actividad pesticida del aceite esencial de dos plantas medicinales, entre ellas, el aceite de eucalipto, confirmaron su actividad frente a dos especies de coleópteros, siendo el aceite esencial de eucalipto, el que presentó mayor actividad.

Con los antecedentes observados en la literatura que confirman las propiedades medicinales atribuidas a las especies vegetales mencionadas, se realizó un estudio con el fin de evaluar el efecto de los aceites esenciales presentes en estas especies sobre el crecimiento *in vitro* de distintas cepas de *Prototheca* spp.

2.2 *Prototheca* spp.

El género *Prototheca* fue descrito por primera vez por Wilhelm Krueger, en 1894, como un grupo de microorganismos aislados de la savia de algunos árboles. De acuerdo con sus características estructurales, histológicas y reproductivas, estos agentes fueron clasificados como algas aclorofiladas con afinidades filogenéticas a *Chlorella* spp. (Camboim *et al.*, 2010). Debido a su semejanza con las levaduras, inicialmente, estos microorganismos unicelulares, fueron descritos como hongos, pero

difieren de ellos por el modo de reproducción, que es semejante a las algas del género *Chlorella*.

Las algas del género *Prototheca*, fueron relacionadas desde el punto de vista nutricional, con *Chlorella protothecoides*, debido a que ambas requieren tiamina y no necesitan nitrato (Costa y Gadelha, 2004). Este género consta de cinco especies: *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. ulmea*, *P. stagnora* y *P. blaschkeae* (Roesler *et al.*, 2006), de las cuales, *P. zopfii* y *P. wickerhamii* son patógenas y han sido asociadas a infecciones tanto en animales como en humanos en Europa, Asia, África, Australia y América. En la **tabla I**, se presenta la taxonomía de este género.

TABLA I. Taxonomía del género *Prototheca*.

Clasificación taxonómica	
Reino	<i>Viridiplantae</i>
División	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden	<i>Chlorellales</i>
Familia	<i>Chlorellaceae</i>
Género	<i>Prototheca</i>
Especies	<i>P. blaschkeae</i>
	<i>P. stagnora</i>
	<i>P. ulmea</i>
	<i>P. wikerhamii</i>
	<i>P. zopfii</i>

De acuerdo con el medio de cultivo que se emplee, el crecimiento de estos microorganismos puede variar entre dos a siete días, en intervalos de temperatura de 25°C a 37°C. En saprofitismo, presenta crecimiento rápido en agar Sabouraud, a temperatura ambiente con desarrollo de colonias blanco-amarillas de entre 1 a 2mm de diámetro. Después de 72 a 96 horas de incubación las colonias presentan un diámetro variable entre 3 a 6mm y bordes irregularmente ondulados con elevación central (Camboim *et al.*, 2010).

Las colonias pueden ser lisas, cremosas o mucoides, semejantes a las levaduras, de las que se distinguen sólo a través de micromorfología (Costa y Gadelha, 2004). Las células de *P. wikerhamii* son esféricas y miden de 2,5 a 13µm de diámetro, mientras que las células de *P. zopfii* pueden ser esféricas u ovaladas con un tamaño que varía de 4,5 a 25µm de diámetro (Camboim *et al.*, 2010).

2.3 Epidemiología

Las algas del género *Prototheca* son seres ubicuos, están distribuidas en el ambiente, principalmente en lugares húmedos y ricos en materia orgánica. En estos lugares, el alga puede ser ingerida por animales y ser diseminada por la eliminación de ésta a través de las heces (Camboim *et al.*, 2010).

La patogenia de la prototecosis es en gran parte desconocida. Se cree que infecciones de tipo cutáneo en el hombre, en perros y en gatos pueden ser el resultado del contacto de lesiones o áreas traumatizadas con fuentes potenciales o por

inoculación traumática con las algas. Sin embargo, no ha sido descartada la posibilidad de que exista un mecanismo de transmisión por insectos (Lass Flörl y Mayr, 2007). En algunas especies animales se han descrito casos de prototecosis, asumiendo varios aspectos clínicos, siendo la mastitis bovina la que ocurre con mayor frecuencia.

El tiempo de incubación aún no ha sido determinado con exactitud, pero en situaciones donde la lesión primaria es relatada, se acredita que sería de aproximadamente dos semanas (Camboim *et al.*, 2010).

La primera descripción de infección humana atribuida a *Prototheca* spp. fue en 1964, por Davies y colaboradores, presentando lesiones cutáneas en los pies de un agricultor de arroz, en Sierra Leona (África), cuya especie fue identificada como *P. zopfii* (Costa y Gadelha, 2004).

Desde aquel primer caso de prototecosis humana, se han descrito a la fecha, más de una centena de casos, la mayoría de ellos en pacientes con factores de riesgo como: diabetes mellitus, transplantes renales, diálisis peritoneal continua ambulatoria, uso de esteroides, VIH, o defectos inmunológicos que involucren a linfocitos o neutrófilos (Woolrich *et al.*, 1994, DiPersio, 2001).

En general, una prototecosis puede ocurrir en una de las tres formas clínicas definidas, denominadas (i) lesiones cutáneas, (ii) bursitis olecraniana e (iii) infecciones diseminadas o sistémicas, sin embargo, se han reportado presentaciones poco comunes de infecciones a causa de esta alga, como prototecosis del tracto urinario (van Bezooijen, 2002).

En un estudio de pacientes con cáncer, realizado en 2003 por Torres y colaboradores, se concluyó que *Prototheca* spp. tiene un potencial patogénico bajo en este tipo de población, reportándose tan sólo 13 casos a la fecha en la literatura.

Al menos la mitad de los casos de prototecosis son infecciones cutáneas simples, ocurriendo la mayoría de ellas en individuos que han sido comprometidos con terapias inmunosupresoras (Lass Flörl y Mayr, 2007). Por su parte, la prototecosis diseminada, definida como la presencia de lesiones en dos o más órganos no contiguos, generalmente ocurre en pacientes severamente inmunocomprometidos (Mathew *et al.*, 2010).

Frecuentemente, *P. zopfii* está más relacionado a los procesos patológicos en animales y *P. wikerhamii* en humanos, pero aún es difícil establecer una delimitación estricta. La infección tiene, generalmente, un aspecto crónico con evolución granulomatosa que es muy difícil de tratar (Răpunțean *et al.*, 2007).

Prototheca spp. es resistente al tratamiento con cloro, resistiendo también el tratamiento de aguas residuales, la digestión intestinal, y lo más preocupante, la pasteurización de la leche, tanto lenta como rápida, lo que representa un problema para el consumo de leche y sus derivados, aumentando el potencial zoonótico. La resistencia de estos microorganismos se explica por la presencia de un componente de la pared celular, llamado esporopolenina, que le confiere resistencia a diversos agentes físicos y químicos (Camboim *et al.*, 2010).

En 2009, en un estudio realizado en la ciudad de Valdivia por Valenzuela, se aislaron por primera vez en nuestro país, algas del género *Prototheca*, a partir de

distintas fuentes hídricas de las regiones IX^a, X^a y XIV^a, en lodos de plantas de tratamiento de aguas servidas de Valdivia y Osorno y en una muestra de leche de vaca con mastitis (Valenzuela, 2009).

Debido al aumento del número de infecciones por algas, sobre todo en los sujetos inmunodeprimidos, y de la aparición de resistencia a los agentes antifúngicos (Hazen, 1995), existe un gran interés científico y comercial en el descubrimiento de nuevas clases de algicidas.

2.4 Mastitis bovina causada por *Prototheca* spp.

Se ha descrito prototecosis en muchas especies animales, con diversas formas de ocurrencia, pero la mastitis bovina es la forma principal. También se ha descrito mastitis bovina subclínica, que se caracteriza principalmente por la reducción de la producción de leche. Incluso si la terapia pudiese erradicar la infección de la glándula, el extenso daño sufrido por ésta, con los consecuentes tratamientos secundarios, generan una fuerte disminución de la producción de leche, por lo que mantener al animal no resulta económicamente rentable (Costa *et al.*, 1996).

Existe un gran número de géneros y especies de microorganismos que están asociados a mastitis bovina, de los cuales, una pequeña parte se aísla de un alto porcentaje de muestras de leche. Los agentes más comunes son: estafilococos, estreptococos y bacilos. En ocasiones, ocurren casos de mastitis que no responden a los tratamientos de rutina, estos casos pudieran ser ocasionados por organismos como:

actinomicetos, hongos, levaduras o algas incoloras, que pueden provocar casos aislados o brotes en los hatos (Almeraya, 1994).

P. zopfii ha sido identificada como responsable de inflamación de la glándula mamaria de las vacas lecheras, siendo resistente a la mayoría de las terapias, conduciendo a fuertes pérdidas en el hato infectado (Buzzini *et al.*, 2004).

McDonald *et al.* (1984), realizaron ensayos *in vitro*, demostrando que algunos antimicóticos como mixina y nistatina son efectivos contra este agente, pero presentan un alto costo por lo que no son de uso frecuente para el tratamiento de mastitis, dejando como medida de control más práctica, la eliminación de los animales infectados (Marques *et al.*, 2006).

2.5 Tratamiento

Por lo general, el tratamiento de prototecosis en humanos, involucra enfoques médicos y quirúrgicos y el fracaso del tratamiento no es infrecuente. Se han utilizado varios tratamientos, entre ellos antifúngicos como ketoconazol, itraconazol, fluconazol y la anfotericina B que son los fármacos más comúnmente usados, siendo la anfotericina B la que muestra la mejor actividad contra *Prototheca* spp. (Lass Flörl *et al.*, 2007).

En animales en tanto, no existe hasta ahora, ningún ompuesto efectivo. La respuesta al tratamiento es insatisfactoria y por la posibilidad de transmisión a otros animales y/o seres humanos no se recomienda el tratamiento de animales enfermos (Camboim *et al.*, 2010).

En 2007, Răpunțean y colaboradores testearon el efecto *in vitro* de la miel y algunos extractos de plantas sobre dos especies del género *Prototheca* (*P. zopfii* y *P. wickerhamii*), encontraron que el producto llamado polioel 3 (aceite obtenido del extracto del ajeno dulce (*Artemisa annua*), hisopo (*Hyssopus officinalis*), anís (*Pimpinella anisum*), presentaron efecto inhibitorio sobre ambas especies.

En otro estudio realizado por Tortorano y colaboradores (2008), se comparó la actividad *in vitro* de los antifúngicos convencionales utilizados contra el alga *Prototheca*, versus la actividad de algunos aceites esenciales. Los resultados revelaron la resistencia de las especies tanto a fluconazol y caspofungina. Voriconazol, anfotericina B, itraconazol y posaconazol, si bien presentaron actividad, destacó la actividad inhibitoria de los aceites esenciales de bergamota y del árbol del té.

La mastitis constituye un serio problema para la salud pública en la industria láctea, ya que el uso incorrecto e indiscriminado de los antibióticos es evidente. Éstos, contaminan la leche con niveles cada día más elevados e inhiben la fermentación de los cultivos bacterianos que se utilizan en la fabricación de productos lácteos.

La mastitis bovina es la causa más común para el uso de antibióticos antibacterianos en el ganado de la industria lechera. La terapia antibacteriana de enfermedades de tipo bacteriano en el ganado, se ha relacionado como un catalizador para la resistencia de las bacterias aisladas de los animales tratados, y otros animales del hato y de los alimentos derivados del ganado vacuno para consumo humano (Erskine *et al.*, 2002).

2.6 Hipótesis de trabajo:

Los aceites esenciales y/o extractos obtenidos de las especies vegetales: *Eucalyptus globulus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana*, pueden presentar actividad algicida sobre las distintas cepas de *Prototheca* spp.

2.7 Objetivos generales:

Evaluar el efecto de los aceites esenciales o extractos vegetales sobre las distintas cepas de *Prototheca* spp., aisladas de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas, leche de vacas con mastitis y/o agua de diferentes fuentes hídricas naturales.

2.8 Objetivos específicos:

- Determinar la susceptibilidad de las diferentes cepas de *Prototheca* spp. frente a los aceites esenciales o extractos obtenidos de especies vegetales.
- Identificar mediante análisis químicos, los principales compuestos de los aceites esenciales implicados en la acción inhibitoria de los estudios de susceptibilidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

3.1.1.1 Especies vegetales y su clasificación taxonómica

Para el trabajo experimental, se emplearon las siguientes especies vegetales: *Eucaliptus globulus* (hojas), *Laurelia sempervirens* (corteza) y *Laureliopsis philippiana* (hojas), las que se pueden observar a continuación en las **figuras 1, 2 y 3**, respectivamente.



Figura 1. Material vegetal: *Eucalyptus globulus*.



Figura 2. Material vegetal: *Laurelia sempervirens*.



Figura 3. Material vegetal: *Laureliopsis philippiana*.

Familia *Myrtaceae*: *Eucalyptus globulus*

Nombre común: eucalipto blanco, gomero azul de Tasmania, árbol de la fiebre.

Descripción:

Estos árboles pueden alcanzar hasta 60 metros de altura y tienen corteza blanquecina que se desprende fácilmente en tiras en los ejemplares adultos. Sus frutos son como una cápsula campaniforme de color blanco, cubierta de un polvo blanquecino de 1,4 a 2,4cm de diámetro.

Distribución:

Prefiere los climas húmedos y sin heladas. Es originario de Australia, algunas especies también nacen de forma espontánea en Nueva Guinea y en algunas zonas de Indonesia. En nuestro país se encuentra principalmente en la zona centro-sur de la Región del Bío Bío. Allí es frecuente encontrar eucaliptos de 20 años con 60 metros de altura y 50 centímetros de diámetro.

En la **tabla II** se presenta la jerarquía taxonómica de esta especie.

Tabla II. Jerarquía taxonómica de *Eucalyptus globulus*.

Nombre científico:	<i>Eucalyptus globulus</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Myrtales</i>
Familia	<i>Myrtaceae</i>
Género	<i>Eucalyptus</i>

Familia *Monimiaceae*: *Laurelia sempervirens*

Nombre común: laurel, trihue, tihue, laurel chileno.

Descripción:

Árbol siempreverde, de hasta 40 metros de altura y tronco de unos dos metros de diámetro. La corteza es grisácea, gruesa, perfumada y se desprende en placas redondeadas. Las hojas son duras, aromáticas y con margen dentado. En aspecto general es similar a la tepa (*Laureliopsis philippiana*).

Distribución:

Endémico de Chile. Crece entre las provincias de Cardenal Caro y Llanquihue. Habita en ambas cordilleras, en suelos profundos y húmedos, especialmente en las quebradas, desde casi el nivel del mar hasta los 950 metros de altitud (García y Ormazabal, 2008).

La jerarquía taxonómica de esta especie se presenta en la **tabla III**, a continuación.

Tabla III. Jerarquía taxonómica de *Laurelia sempervirens*.

Nombre científico:	<i>Laurelia sempervirens</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Lurales</i>
Familia	<i>Monimiaceae</i>
Género	<i>Laurelia</i>

Familia *Monimiaceae*: *Laureliopsis philippiana*

Nombre común: tepa, huahuán, vauván, laurela.

Descripción:

Árbol siempreverde, de hasta 40 metros de altura y tronco de unos dos metros de diámetro. De corteza delgada, gris clara y lisa o con protuberancias. Las hojas son duras, muy aromáticas y con margen marcadamente aserrado. En aspecto general es similar al laurel (*Laurelia sempervirens*).

Distribución:

En nuestro país crece desde la costa de la Provincia de Talca, pero es más frecuente entre las provincias de Arauco y Aysén. Habita en ambas cordilleras, en lugares húmedos y suelos profundos, desde el nivel del mar hasta más de 1.000 metros de altitud. Es abundante en las provincias de Llanquihue, Chiloé y Palena. También está presente en el sur de Argentina. (García y Ormazabal, 2008).

La clasificación taxonómica de *L. philippiana* se presenta en la **tabla IV**.

Tabla IV. Jerarquía taxonómica de *Laureliopsis philippiana*.

Nombre científico:	<i>Laureliopsis philippiana</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Lurales</i>
Familia	<i>Monimiaceae</i>
Género	<i>Laureliopsis</i>

3.1.1.2 Cepas

Las pruebas de susceptibilidad fueron realizadas en 12 distintas cepas de *Prototheca* spp. (*P. stagnora*, *P. wickerhamii* y *P. zopfi*), las que fueron aisladas desde diferentes muestras obtenidas en sectores del Río Damas (Osorno), Río Rahue (Osorno), lodos primarios y secundarios de plantas de tratamiento de aguas servidas (Osorno-Valdivia), y leche de vacas con mastitis. Dichas cepas fueron conservadas bajo refrigeración, en el Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. En la **tabla V**, se señala la procedencia de cada muestra.

Tabla V. Lugar de origen de las muestras desde donde se aislaron las cepas de *Prototheca* spp.

Cepa	Especie	Lugar origen muestra
00	<i>P. zopfii</i>	Leche vaca con mastitis
3.1	<i>P. stagnora</i>	Lodo primario, Osorno
3.3	<i>P. zopfii</i>	Lodo primario, Osorno
3.4	<i>P. zopfii</i>	Lodo primario, Osorno
4.2	<i>P. stagnora</i>	Lodo secundario, Osorno
8.1	<i>P. wickerhamii</i>	Río Damas sector Los Notros, Osorno
10b	<i>P. wickerhamii</i>	Río Rahue, Osorno
10.2b	<i>P. wickerhamii</i>	Río Rahue, Osorno
10.4	<i>P. wickerhamii</i>	Río Rahue, Osorno
11.4	<i>P. wickerhamii</i>	Lodo primario EDAS 1
12.1b	<i>P. wickerhamii</i>	Lodo primario EDAS 2
12.2a	<i>P.zopfii</i>	Lodo primario EDAS 2

3.1.2 Equipos

Para la preparación del extracto etanólico, se utilizó un rotavapor Hahn Shin HS-2000NS con un baño termorregulado Hahn Shin Water bath HS-3001.

Para la cromatografía de gases se usó un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 6890 acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett Packard 5973, provisto de una columna capilar HP Ultra 2 de 25m de longitud y de 0.2mm de diámetro interno, y de un sistema de análisis de datos.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación y extracción de los aceites esenciales

3.2.1.1 Recolección e identificación de las especies vegetales

Para realizar la extracción de los aceites esenciales de las especies vegetales en estudio, se recolectaron tanto hojas como corteza de dichas especies, según fue el caso, desde distintas localidades de la ciudad de Valdivia. Para su identificación las muestras se compararon con material Herbario perteneciente a la Universidad de Austral de Chile (UACH).

3.2.1.2 Extracción de los aceites esenciales

La obtención de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Laureliopsis philippiana*, se realizó mediante la técnica de hidrodestilación o arrastre de vapor. Para ello, se utilizaron aproximadamente 1,5 kilogramos de hojas frescas de cada especie vegetal.

En un alambique de cobre de 10 litros, se introdujo la totalidad de las hojas, añadiendo abundante agua y se llevó a cabo el proceso de destilación, el que duró alrededor de dos horas, hasta obtener la totalidad del aceite esencial de cada especie vegetal. A continuación, se separaron las fases, y se filtró el aceite obtenido con embudo y papel filtro para eliminar impurezas. La solución resultante se conservó refrigerada en frascos ámbar hasta su utilización.

3.2.1.3 Preparación del extracto etanólico de corteza de *Laurelia sempervirens*.

Para extraer los compuestos bioactivos de *Laurelia sempervirens*, se pesaron 0,280kg de muestra (corteza) y se dejaron macerar en un frasco de vidrio con tapa rosca, capacidad 1L, con 400mL de acetato de etilo por un lapso de 5 días. La solución resultante se concentró en rotavapor Hahn Shin HS-2000NS con un baño termostático Hahn Shin Water bath HS-3001, se filtró con embudo y papel filtro para eliminar impurezas, y el extracto obtenido se conservó refrigerado hasta su utilización.

3.2.1.4 Análisis químico de los aceites esenciales

Los aceites esenciales de las especies vegetales estudiadas, se obtuvieron por arrastre de vapor, la caracterización de los aceites esenciales se efectuó mediante cromatografía de gases y la identificación de sus constituyentes químicos se realizó por espectrometría de masa. Para ello se utilizó un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 6890 acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett Packard 5973, provisto de una columna capilar HP Ultra 2 de 25m de longitud y de 0.2mm de diámetro interno, y de un sistema de análisis de datos, el cual identificó los compuestos mayoritarios presentes en los aceites.

3.2.2 Pruebas de susceptibilidad de *Prototheca spp.*

3.2.2.1 Cultivo de muestras

Las cepas aisladas fueron repicadas con asa de metal en tubos de vidrio utilizando caldo común como medio de cultivo y se incubaron en estufa a 29°C hasta observarse turbidez (aproximadamente luego de 5 días). Al cabo de este tiempo, se extrajo un poco de este caldo de cultivo con pipeta Pasteur de vidrio estéril, y se depositó en tubos conteniendo agar Sabouraud, los que se incubaron en estufa a una temperatura constante de 29°C por 3 a 5 días.

3.2.2.2 Preparación de la suspensión

Una vez activadas las cepas de *Prototheca* spp. en estudio, se prepararon suspensiones de cada una de éstas, en tubos de vidrio conteniendo suero fisiológico esterilizado. Para preparar dichas suspensiones, se extrajo con asa de metal estéril, un inóculo de cada alga, los que se resuspendieron en el suero fisiológico, homogenizando la solución hasta lograr una turbidez comparable al patrón de turbidez de 0,5 McFarland. Esta comparación se realizó de manera visual.

3.2.2.3 Método de difusión en agar

Para evaluar la susceptibilidad de las cepas frente a cada aceite esencial, se utilizó una versión modificada del método de difusión en agar Mueller Hinton o método Kirby-Bauer, en donde en lugar de utilizar discos sobre la superficie de la placa, se utilizaron pocillos realizados con sacabocados, en los que se depositó dicho aceite.

Cada placa Petri se preparó depositando aproximadamente 20mL de agar Mueller Hinton previamente fundido, de tal modo de obtener una superficie con 5mm de espesor. Posteriormente, una vez solidificado el medio, se realizaron 6 pocillos con sacabocados de 6mm de diámetro, como se esquematiza en la **figura 4**.

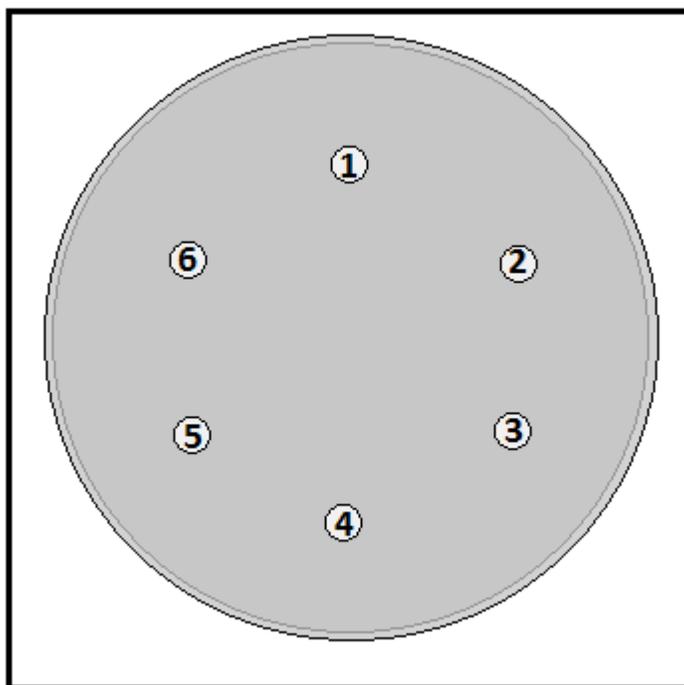


Figura 4. Esquema de ensayos de susceptibilidad de *Prototheca* spp. frente a diferentes aceites esenciales. Placa de agar Mueller Hinton conteniendo 6 pocillos de 6mm. Pocillos: (1) 25 μ l de aceite esencial o extracto puro, (2) 25 μ l dilución 1:10; (3) 25 μ l dilución 1:100; (4) 25 μ l dilución 1:1000; (5) 25 μ l dilución 1:10000; (6) 25 μ l solvente puro.

Para la siembra se utilizó el método de estría sobre agar, realizando la siembra en tres direcciones diferentes, con una tórula de algodón estéril embebida con la suspensión conteniendo la cepa de *Prototheca* a estudiar.

A partir de cada uno de los aceites, se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000), utilizando alcohol al 70% como diluyente, debido a la insolubilidad de éstos en agua. A un primer pocillo se añadieron 25µl de aceite o extracto puro y a los pocillos restantes, 25µl del aceite o extracto diluido. Para descartar la actividad del solvente, se realizaron controles con el solvente puro (pocillo 6).

Una vez realizada la siembra y la posterior aplicación de los aceites en los pocillos correspondientes de cada placa, éstas fueron incubadas durante un período de 3 a 5 días en estufa de cultivo a una temperatura constante de 29°C.

3.2.2.4 Evaluación de la susceptibilidad

Para determinar la susceptibilidad de las diferentes cepas de *Prototheca* spp. en estudio, frente a los aceites esenciales de *E. globulus* y *L. philippiana* y el extracto de corteza de *L. sempervirens*, se realizaron mediciones de los halos de inhibición formados alrededor de cada uno de los pocillos de las placas (**figura 5**).

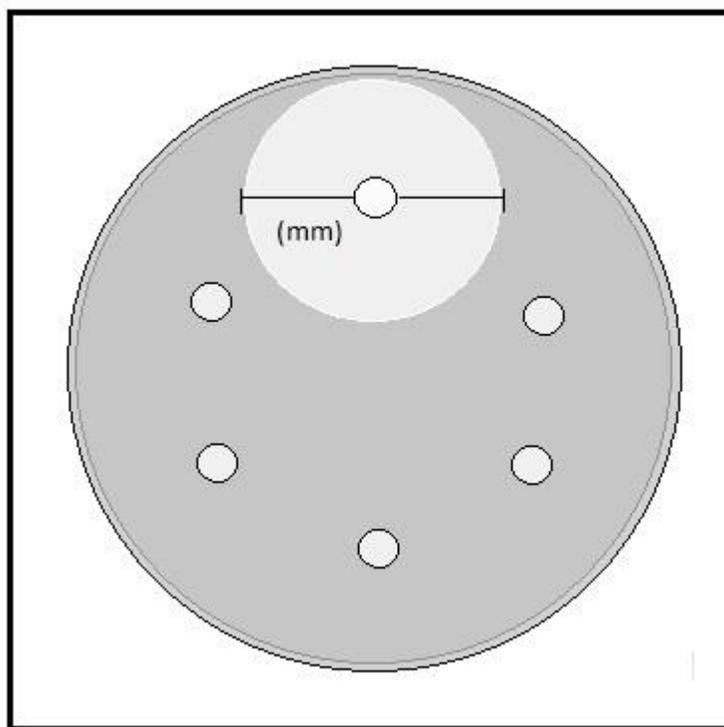


Figura 5. Evaluación de la susceptibilidad. Placa de agar Mueller Hinton y medida (en milímetros) de los halos de inhibición formados alrededor de los pocillos.

4. RESULTADOS

4.1 Actividad inhibitoria del aceite esencial de *E. globulus* frente a las cepas de *Prototheca* spp.

Se realizaron ensayos de inhibición contra distintas cepas de *Prototheca* spp. (*P. stagnora*, *P. wikerhamii* y *P. zopfii*), en placas de agar Mueller Hinton, como se describe en la sección **3.2.2.3** de **Materiales y Métodos**, para evaluar la susceptibilidad de las cepas frente a distintas concentraciones del aceite esencial de *E. globulus*.

A continuación se presentan las **figuras 6, 7 y 8**, revelando algunos de los resultados obtenidos. Según es posible observar en ellas, las tres especies de *Prototheca* spp., enfrentadas al aceite esencial de *E. globulus*, presentan susceptibilidad frente a él, siendo *P. wikerhamii* la especie que presentó la mayor susceptibilidad.

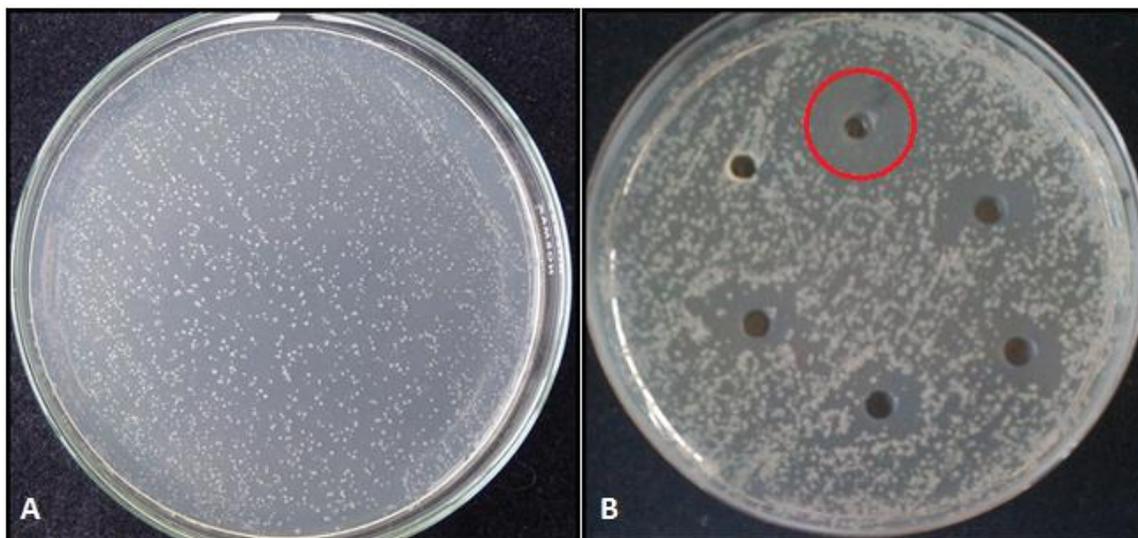


Figura 6. *Prototheca stagnora* frente al aceite esencial de *Eucalyptus globulus*. (A) Control positivo de crecimiento; (B) Efecto del aceite esencial de *E. globulus* sobre *P. stagnora*. En rojo, área de inhibición del aceite sin diluir.

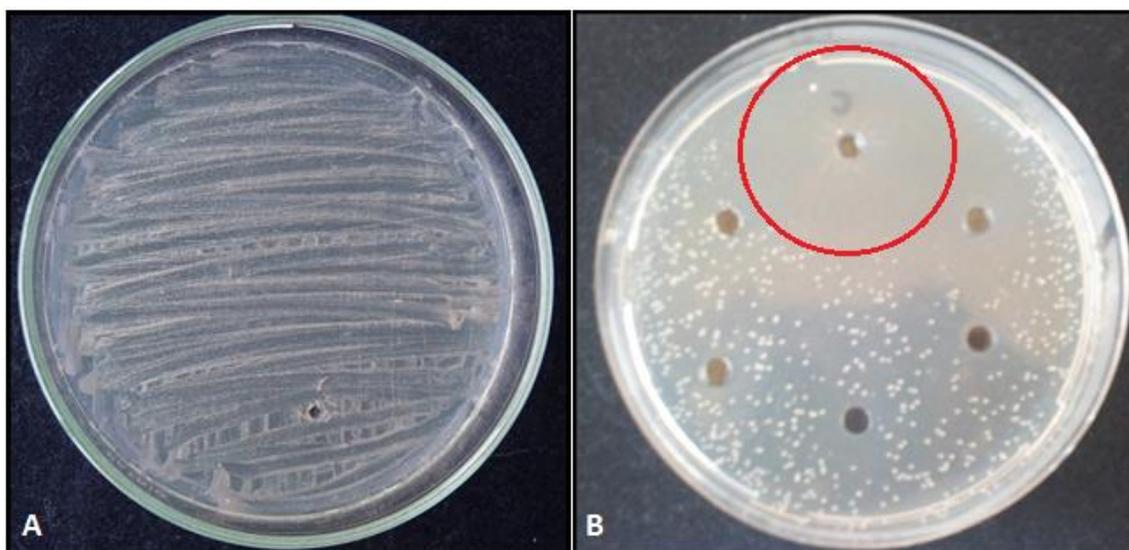


Figura 7. *Prototheca wickerhamii* frente al aceite esencial de *Eucalyptus globulus*. (A) Control positivo de crecimiento; (B) Efecto del aceite esencial de *E. globulus* sobre *P. wickerhamii*. En rojo, área de inhibición del aceite sin diluir.

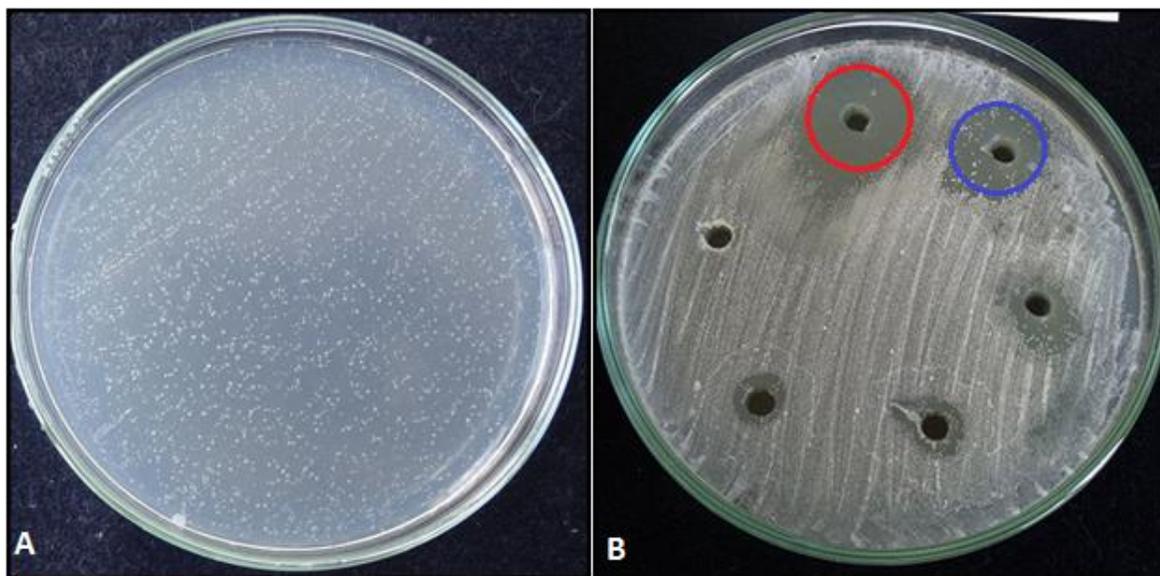


Figura 8. *Prototheca zopfii* frente al aceite esencial de *Eucalyptus globulus*. (A) Control positivo de crecimiento; (B) Efecto del aceite esencial de *E. globulus* sobre *P. zopfii*. En rojo, área de inhibición del aceite sin diluir. En azul, crecimiento del alga sobre el área de inhibición.

4.1.1 Susceptibilidad de las cepas frente al aceite esencial de *E. globulus*.

Todas las placas fueron incubadas en estufa de cultivo a 29 °C por tiempo de 3 a 5 días, como se describe en la sección **3.2.2.3** de **Materiales y Métodos**.

La inhibición del crecimiento de las cepas se evaluó visualmente, registrando la medida de los halos de inhibición. En la **tabla VI** se presenta la medida de los halos (mm) formados alrededor de los pocillos de las placas de agar Mueller Hinton.

Tabla VI. Medida de los halos de inhibición (mm) de cepas de *P. stagnora*, *P. wickerhamii* y *P. zopfii* frente al extracto de *Eucalyptus globulus*.

Cepas	Aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i>					
	Sin diluir	1:10	1:100	1:1000	1:10000	EtOH
00	20	16	13	12	12	0
3.1	45	34	14	11	12	0
3.3	43	23	18	16	16	0
3.4	24	15	12	12	10	0
4.2	40	31	19	16	11	0
8.1	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
10b	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
10.2b	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
10.4	23	19	11	9	9	0
11.4	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
12.1b	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
12.2a	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0

□ : PS (*P. stagnora*)

■ : PZ (*P. zopfii*)

■ : PW (*P. wickerhamii*)

S/C: sin crecimiento o crecimiento escaso

Según Toda *et al.* (1991), la actividad de un aceite se puede clasificar a través de la medida del diámetro de los halos de inhibición. Los rangos de la escala que utilizaron señala que la actividad puede ser clasificada como: marcada (diámetro >16 mm), moderada (diámetro <16mm - >12mm), ligera (diámetro <12mm - >8mm) o sin actividad (diámetro < 8 mm).

Tomando como referencia esta clasificación, es posible indicar que el aceite de *E.globulus* sin diluir, presentó una actividad marcada frente a las diferentes cepas. Lo mismo sucede en el caso de la dilución 1:10, donde sólo en uno de los casos la actividad fue moderada.

Si bien no siempre la actividad fue marcada, el aceite de *E.globulus*, presentó actividad en todas las placas, inclusive en la menor de las concentraciones empleadas, ya que el diámetro de los halos de inhibición, en ningún caso fue menor a 8mm.

4.1.2 Análisis por cromatografía de gases y espectroscopía de masa del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*.

Para los análisis cromatográficos del aceite esencial de eucalipto, se extrajo una alícuota del mismo, la que fue diluida con n-hexano. 1 µL de esta muestra diluida fue analizada en un cromatógrafo HP 6890 acoplado a un detector de masas HP 5973 provisto de una columna capilar Ultra 2 de 25m de longitud y de 0.2mm de diámetro interno. Para producir la separación cromatográfica de los compuestos presentes en los

extractos, el cromatógrafo de gases fue mantenido a una temperatura de 70°C por 3 minutos y luego programado para subir 10°C/min hasta 300°C.

La identificación de los compuestos se efectuó por medio de una búsqueda en la biblioteca de espectros de masas. Para que un compuesto se considere identificado, el porcentaje de correlación entre el espectro de masas del compuesto presente en la muestra y el espectro de masas proveniente de la biblioteca de espectros de masas debe ser superior a 95%.

En la **tabla VII** se señalan los compuestos identificados, con su nombre, tiempo de retención molecular, y el porcentaje (área) de cada compuesto presente en la muestra de aceite esencial, mientras que en la **figura 9** se presentan los compuestos identificados encontrados en mayor proporción. El mismo procedimiento fue realizado con los demás aceites.

Tabla VII. Compuestos mayoritarios identificados en aceite esencial de EG.

Compuesto	TR (min)	Área (%)
α -Pino	16,42	12.07
β -Pino	18	0.37
β -Mirceno	18,36	0.34
α -Felandreno	18,91	0.18
D-Limoneno	19,75	3.93
Eucaliptol	19,95	60.54
4-Terpineol	24,63	0.23
α -Terpineol	25,01	0.71
α -Terpineol acetato	29,43	3.53
Aromadendreno	32,64	0.38
β -Eudesmol	37,22	0.64

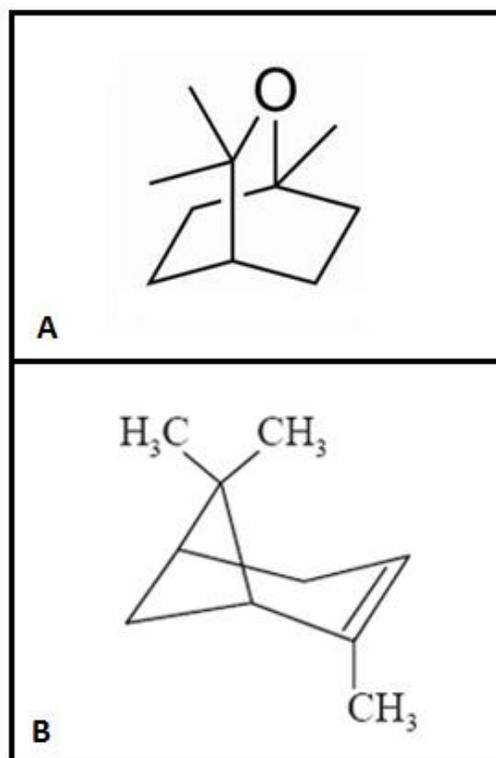


Figura 9. Compuestos mayoritarios identificados en aceite esencial de *Eucalyptus globulus*. (A) Eucaliptol (60,54%); (B) α -Pinoeno (12,07%).

4.2 Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Laurelia sempervirens* frente a las cepas de *Prototheca* spp.

Se realizaron ensayos de inhibición contra distintas cepas de *Prototheca* spp. (*P. stagnora*, *P. wikerhamii* y *P. zopfii*), en placas de agar Müller Hinton, como se describe en la sección **3.2.2.3 de Materiales y Métodos**, para evaluar la susceptibilidad de las cepas frente a distintas concentraciones del aceite esencial de *L. sempervirens*.

Las **figuras 10, 11 y 12** se presentan a continuación, revelando algunos de los resultados obtenidos. A partir de ellas es posible afirmar que el extracto etanólico de corteza de *L. sempervirens* presentó actividad inhibitoria frente a las cepas de *Prototheca* spp. que se emplearon en este estudio.

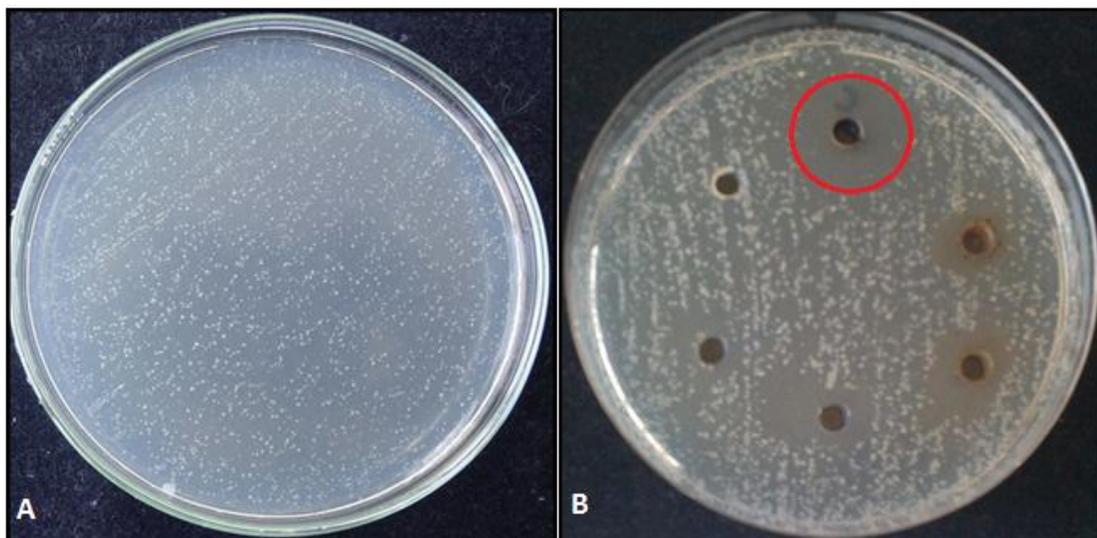


Figura 10. *Prototheca stagnora* frente al extracto etanólico de *Laurelia sempervirens*. (A) Control positivo de crecimiento; (B) Efecto del aceite esencial de *L. sempervirens* sobre *P. stagnora*. En rojo, área de inhibición del extracto sin diluir.

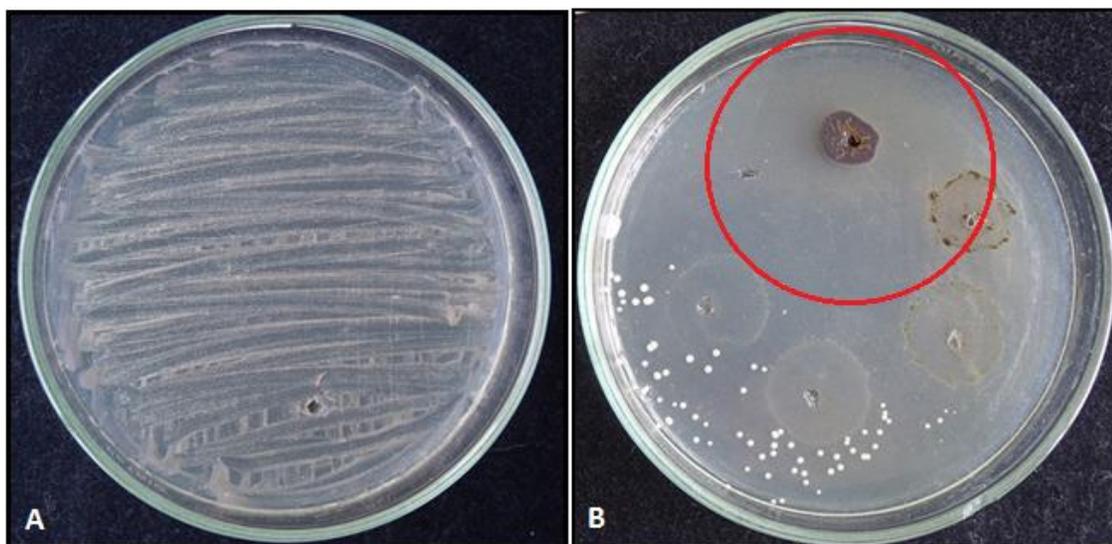


Figura 11. *Prototheca wickerhamii* frente al extracto etanólico esencial de *Laurelia sempervirens*. (A) Control positivo de crecimiento; (B) Efecto del aceite esencial de *L. sempervirens* sobre *P. wickerhamii*. En rojo, área de inhibición del extracto sin diluir.

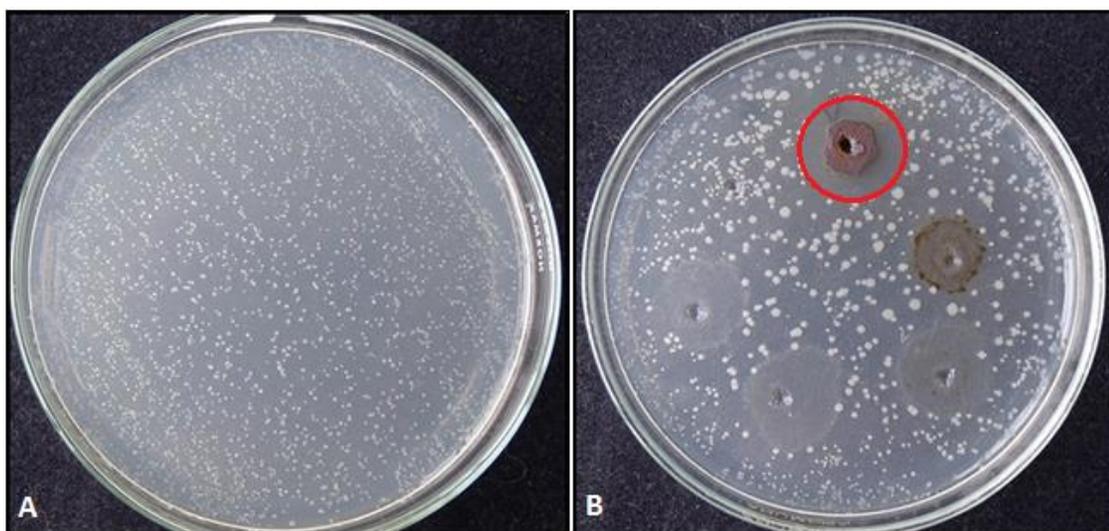


Figura 12. *Prototheca zopfii* frente al extracto etanólico de *Laurelia sempervirens*. (A) Control positivo de crecimiento; (B) Efecto del aceite esencial de *L. sempervirens* sobre *P. zopfii*. En rojo, área de inhibición del extracto sin diluir.

4.2.1 Susceptibilidad de las cepas frente al extracto etanólico de *Laurelia sempervirens*.

Como se describe en la sección **3.2.2.3** de **Materiales y Métodos**, todas las placas fueron incubadas en estufa de cultivo a 29 °C por tiempo de 3 a 5 días. Al cabo de este tiempo, se registró la medida de los halos de inhibición (mm) formados alrededor de los pocillos de las placas de agar Mueller Hinton, resultados que se presentan en la **tabla VIII**.

Tabla VIII. Medida de los halos de inhibición (mm) de cepas de *P. stagnora*, *P. wickerhamii* y *P. zopfii* frente al extracto de *L. sempervirens*.

Cepas	Aceite esencial de <i>L. sempervirens</i>					
	Sin diluir	1:10	1:100	1:1000	1:10000	EtOH
00	21	17	16	16	16	0
3.1	18	13	11	12	12	0
3.3	23	19	14	11	10	0
3.4	19	15	17	16	15	0
4.2	22	14	14	12	11	0
8.1	25	23	15	15	13	0
10b	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
10.2b	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
10.4	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
11.4	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
12.1b	30	17	12	N/D	N/D	0
12.2a	32	23	16	12	12	0

□ : PS (*P. stagnora*)

■ : PZ (*P. zopfii*)

■ : PW (*P. wickerhamii*)

S/C: sin crecimiento o crecimiento escaso; N/D: no determinado; halo con forma irregular

A partir de los resultados presentados en la tabla anterior, es posible apreciar una vez más, que el extracto puro o sin diluir presenta una actividad inhibitoria marcada frente a las 12 cepas de *Prototheca* spp.

Al igual como sucedió en el caso del aceite esencial de *E. globulus*, a la menor concentración del extracto etanólico de *L. sempervirens* (1:10000), aún es posible encontrar actividad inhibitoria, puesto que en ningún caso el diámetro de inhibición fue menor a 8mm.

4.2.2 Análisis por cromatografía de gases y espectroscopía de masa del extracto etanólico de corteza de *Laurelia sempervirens*.

Para los análisis cromatográficos del extracto de corteza de laurel, se extrajo una alícuota de éste, la que fue diluida con n-hexano. 1 μ L de la muestra diluida fue analizada en un cromatógrafo HP 6890 acoplado a un detector de masas HP 5973 provisto de una columna capilar Ultra 2 de 25m de longitud y de 0.2mm de diámetro interno, tal como se describe en la sección **4.1**.

En la **tabla IX** se señalan los compuestos identificados, con su nombre, tiempo de retención molecular, y el porcentaje (área) de cada compuesto presente en la muestra de aceite esencial. En la **figura 13** se presentan los compuestos identificados encontrados en mayor proporción.

Tabla IX. Compuestos mayoritarios identificados en el extracto etanólico de corteza de *Laurelia sempervirens*.

Compuesto	TR (min)	Área (%)
Isosafrol	19.63	12.94
Safrol	21.54	63.03
Espatulenol	24.29	6.60

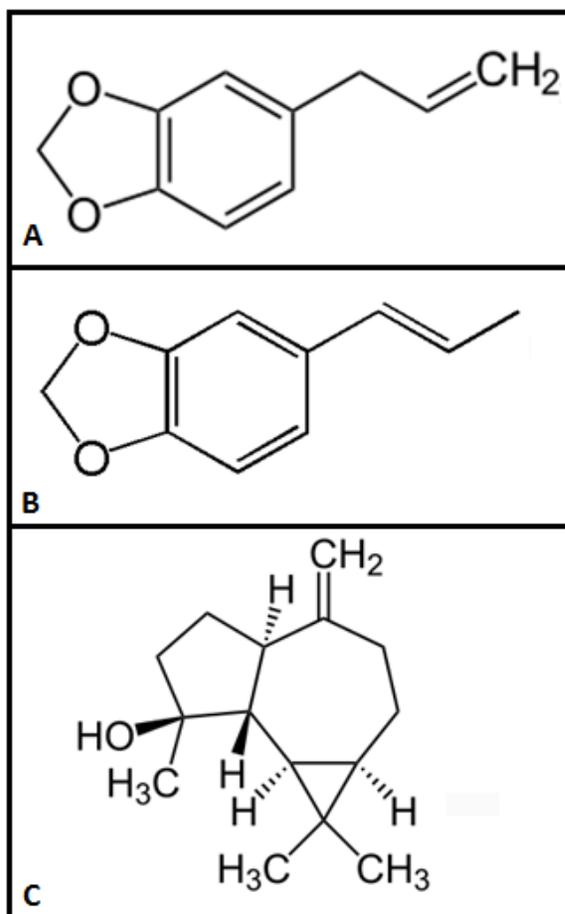


Figura 13. Compuestos mayoritarios identificados en extracto etanólico de corteza de *Laurelia sempervirens*. (A) Safrol (63,03%); (B) Isosafrol (12,94%); (C) Epatulenol (6,60%).

4.3 Actividad inhibitoria del aceite esencial de *L. philippiana* frente a las cepas de *Prototheca* spp.

Se realizaron ensayos de inhibición contra distintas cepas de *Prototheca* spp. (*P. stagnora*, *P. wikerhamii* y *P. zopfii*), en placas de agar Mueller Hinton, como se describe en la sección **3.2.2.3** de **Materiales y Métodos**, para evaluar la susceptibilidad de las cepas frente a distintas concentraciones del aceite esencial de *L. philippiana*.

Las **figuras 14, 15 y 16** se presentan a continuación, revelando algunos de los resultados obtenidos. Se observa en las figuras una inhibición aún más marcada que en los casos anteriores, apreciándose halos de mayor diámetro. El efecto del aceite de *L. philippiana* sobre las distintas cepas de *Prototheca* spp. es evidente.

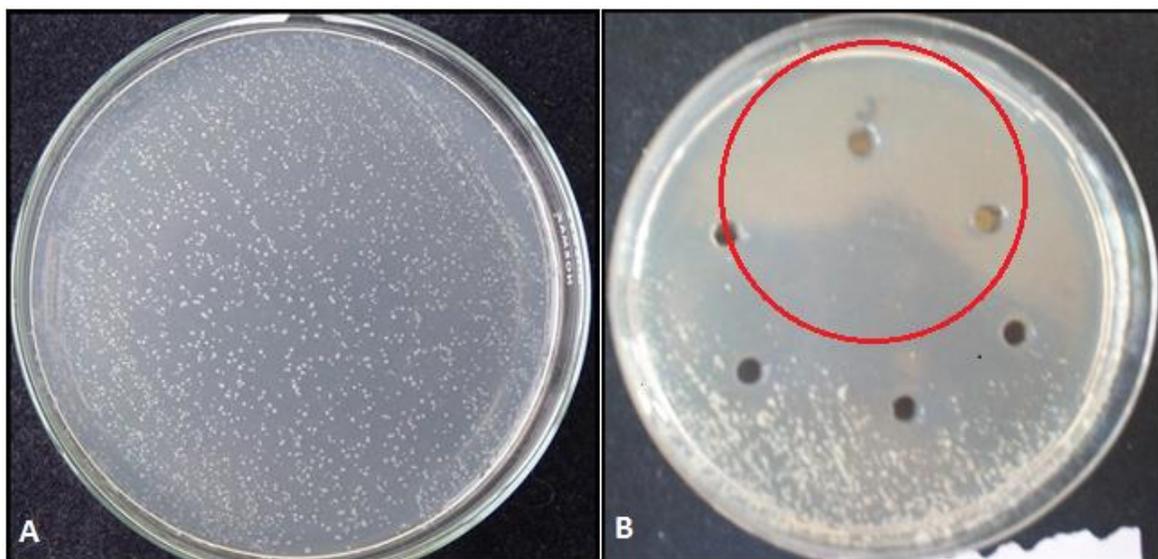


Figura 14. *Prototheca stagnora* frente al aceite esencial de *Laureliopsis philippiana*. (A) Control positivo de crecimiento; (B) Efecto del aceite esencial de *L. philippiana* sobre *P. stagnora*. En rojo, área de inhibición del aceite sin diluir.

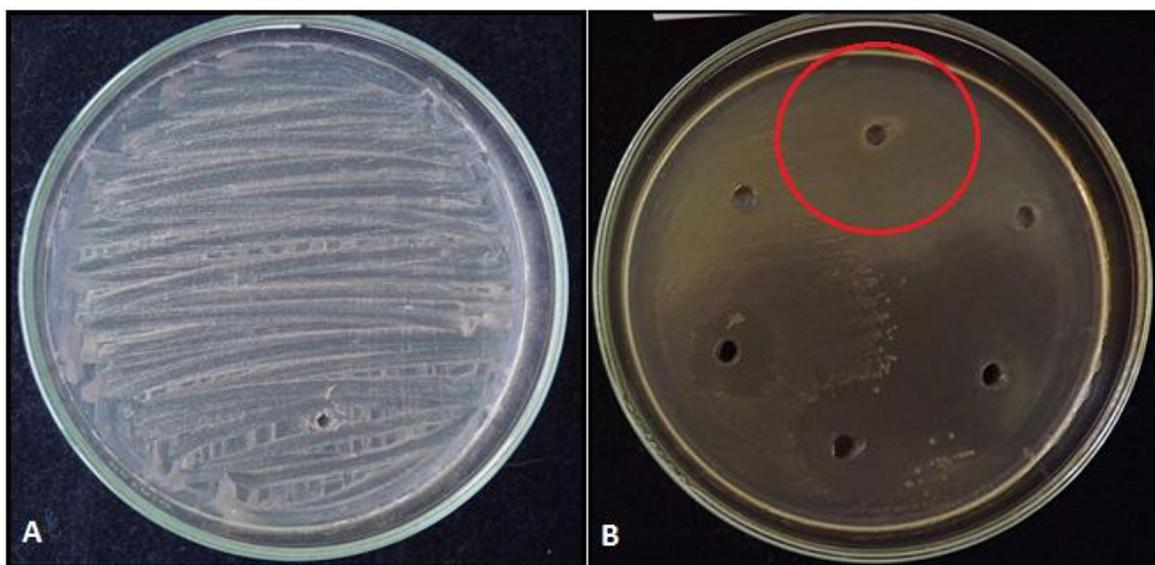


Figura 15. *Prototheca wikerhamii* frente al aceite esencial de *Laureliopsis philippiana*. (A) Control positivo de crecimiento; (B) Efecto del aceite esencial de *L. philippiana* sobre *P. wikerhamii*. En rojo, área de inhibición del aceite sin diluir.

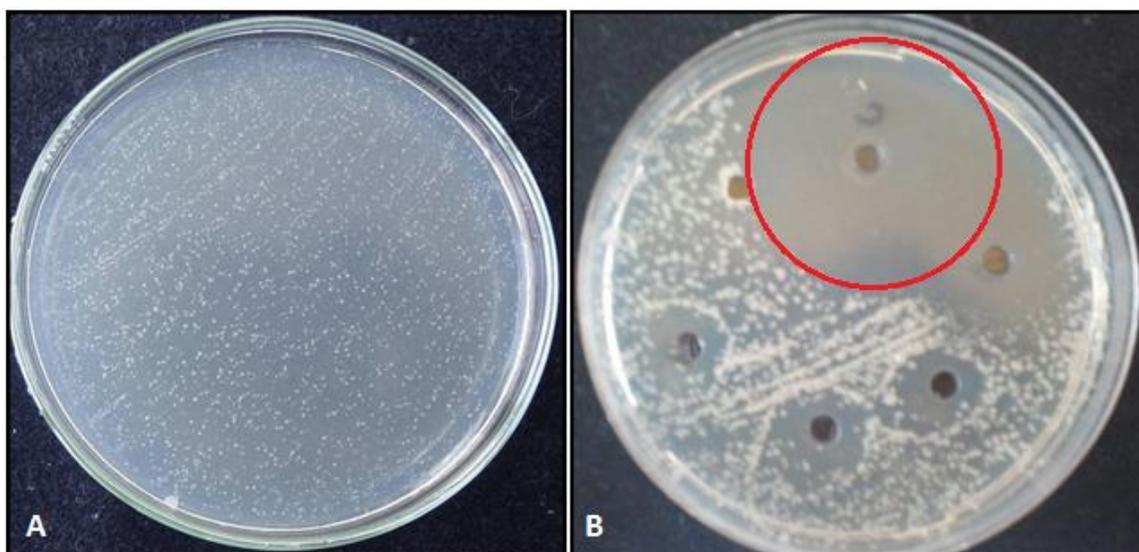


Figura 16. *Prototheca zopfii* frente al aceite esencial de *Laureliopsis philippiana*. (A) Control positivo de crecimiento; (B) Efecto del aceite esencial de *L. philippiana* sobre *P. zopfii*. En rojo, área de inhibición del aceite sin diluir.

4.3.1 Susceptibilidad de las cepas frente al aceite esencial de *Laureliopsis philippiana*.

Las placas de agar Mueller Hinton fueron incubadas en estufa de cultivo a 29 °C por tiempo de 3 a 5 días, como se describe en la sección **3.2.2.3** de **Materiales y Métodos**. Posteriormente, se realizó un registro de la medida de los halos de inhibición (mm) formados alrededor de los pocillos de dichas placas. Los resultados se presentan en la **tabla X**.

Tabla X. Medida de los halos de inhibición (mm) de cepas de *P. stagnora*, *P. wickerhamii* y *P. zopfii* frente al extracto de *L.philippiana*.

Cepas	Aceite esencial de <i>L. sempervirens</i>					
	Sin diluir	1:10	1:100	1:1000	1:10000	EtOH
00	42	25	14	14	13	0
3.1	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
3.3	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
3.4	42	29	16	13	13	0
4.2	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
8.1	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
10b	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
10.2b	37	N/D	N/D	23	18	0
10.4	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
11.4	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
12.1b	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0
12.2a	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	0

□ : PS (*P. stagnora*)

■ : PZ (*P. zopfii*)

■ : PW (*P. wickerhamii*)

S/C: sin crecimiento o crecimiento escaso; N/D: no determinado; halo con forma irregular

Como ya fue mencionado, según la clasificación de Toda *et al.*, una actividad inhibitoria marcada es aquella cuyo halo de inhibición presenta un diámetro igual o superior a 16mm. Como es posible observar en la **tabla X**, en las tres placas que presentaron crecimiento, el aceite esencial sin diluir de *L. philippiana* posee una actividad inhibitoria marcada, mientras que en la mayor de las diluciones, sigue teniendo actividad, siendo ésta moderada. En las demás placas, es decir, 9 de las 12 placas, la inhibición fue total.

4.3.2 Análisis cromatográficos del aceite esencial de *Laureliopsis philippiana*.

Para los análisis cromatográficos aceite esencial de tepa, se extrajo una alícuota de éste, la que fue diluida con n-hexano. 1 µL de la muestra diluida fue analizada en un cromatógrafo HP 6890 acoplado a un detector de masas HP 5973 provisto de una columna capilar Ultra 2 de 25m de longitud y de 0.2mm de diámetro interno, tal como se describe en la sección **4.1**.

En la **tabla XI** se señalan los compuestos identificados, con su nombre, tiempo de retención molecular, y el porcentaje (área) de cada compuesto presente en la muestra de aceite esencial.

Tabla XI. Lista de compuestos identificados en el aceite esencial de LP.

<i>Compuesto</i>	<i>TR (min)</i>	<i>Área (%)</i>
α -Pino	16.44	0.88
α -Felandreno	18.94	0.17
β -Felandreno	19.82	1.80
β -trans-Ocimeno	20.34	0.14
Safrol	28.03	96.92
β -Eudesmol	37.25	0.09

5. DISCUSIÓN

La Prototecosis es una enfermedad crónica infrecuente causada por especies de *Prototheca* spp., tradicionalmente incluida entre los hongos, es considerada un alga sin clorofila que afecta con más frecuencia a la piel, tejidos blandos y causa bursitis del olecranon.

Una Prototecosis causada por *P. wickerhamii* o *P. zopfii* es una enfermedad emergente tanto en animales como en seres humanos. En bovinos, *P. zopfii* es una causa importante de mastitis ambiental. En perros y gatos, la Prototecosis es causada principalmente por *P. zopfii*, mientras que en el hombre, es causada principalmente por *P. wickerhamii*, donde se manifiesta de diferentes formas.

Hasta hace algunos años, se desconocía la presencia de algas del género *Prototheca* en nuestro país como causantes de mastitis bovina. Fue recién en 2011, en donde se dio a conocer, el primer aislamiento de *Prototheca zopfii* en Chile (Zaror *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, se realizó la evaluación de la actividad inhibitoria de los aceites esenciales de *E. globulus* y *L. philippiana* y el extracto de *L. sempervirens*, frente a 12 cepas del alga *Prototheca* spp. Para este efecto, se empleó una versión modificada del método de difusión en agar Mueller Hinton o método Kirby-Bauer, como se describe en la sección **3.2.2.3** de **Materiales y Métodos**, determinando luego la medida de los halos de inhibición formados alrededor de los pocillos.

Los resultados de la actividad inhibitoria de los aceites esenciales empleados, pusieron de manifiesto la actividad presentada por los mismos frente a las especies *P. stagnora*, *P. wikerhamii* y *P. zopfii*.

Se encontró que la actividad inhibitoria tanto del extracto como de los aceites obtenidos de las especies vegetales en estudio, fue marcada en todos los casos (Toda *et al.*, 1991), cuando el aceite se encontraba sin diluir. Si bien fue ligera, a la menor concentración, que correspondía a la dilución 1:10000, aún se encontró actividad inhibitoria, por lo que no fue posible determinar la CMI de los aceites.

El aceite de *L. philippiana* fue el que evidenció un mayor grado de inhibición, lo que no sólo queda demostrado por los resultados de las tablas, sino que es posible apreciar a simple vista, a través de la comparación de las figuras presentadas con anterioridad. Este aceite inhibió el crecimiento total de 9 de las 12 cepas de *Prototheca* spp., es decir, en un 75% de las placas no existió ningún tipo de desarrollo de las algas, mientras que en el 25% restante, la actividad fue entre marcada y moderada.

Si bien las placas fueron controladas entre los días 3 y 5 de cultivo para determinar la medida de los halos de inhibición, se realizó un segundo control, aproximadamente a la semana de cultivo, manteniendo las placas bajo las mismas condiciones. Esto se realizó para determinar el efecto de los aceites en el tiempo, vale decir, si presentaron actividad algicida o no. Los resultados revelaron que sólo el aceite de *L. philippiana* presentó actividad algicida, ya que el efecto del aceite se mantuvo sin variación hasta la segunda observación. En el caso del aceite de *E. globulus* y el extracto de *L. sempervirens*, algunas algas fueron capaces de crecer sobre el halo de

inhibición (como se puede observar en la **figura 8B**, página 38), lo que no les confiere a estos aceites la propiedad algicida. Esto sucedió sólo en algunas cepas de *P. stagnora* y *P. zopfii*, las que parecieron ser menos susceptibles a los aceites.

Con respecto a esto último, *P. wickerhamii* evidenció ser la especie en estudio más sensible a la exposición a los aceites, lo que se demuestra por el nulo o escaso desarrollo de casi la totalidad de las cepas frente a cualquiera de los aceites. Similares resultados obtuvieron Cuc *et al.* (2010), en un estudio donde se enfrentaron cepas de *P. zopfii* y *P. wickerhamii* provenientes de vacas con mastitis a los aceites esenciales obtenidos del árbol del té (*Maleleuca alternifolia*), menta (*Mentha piperita*) y ajedrea (*Satureja hortensis*), siendo *P. wickerhamii* la especie que presentó la mayor susceptibilidad en todos los casos, presentando además, susceptibilidad frente al aceite esencial del abeto blanco (*Abies alba*) y orégano (*Oreganum compactum*).

Con relación al efecto del solvente sobre las algas, en ningún caso se observó actividad inhibitoria, por lo que los resultados son sólo imputables a los aceites.

Los análisis químicos realizados para determinar los principales compuestos de los aceites esenciales implicados en la acción inhibitoria, arrojaron que en caso del aceite esencial de *E. globulus* los principales compuestos fueron el monoterpeno oxigenado 1,8-cineol (eucaliptol), con un 60,54% de abundancia relativa y el hidrocarburo monoterpénico alfa-pineno con un 12,07% (**tabla VII**, página 43). Los resultados obtenidos no discrepan con otros estudios de similares características, en donde se ha reportado la composición química de los aceites esenciales de diferentes especies de eucaliptos pertenecientes a distintas regiones del mundo, siendo en todos

los casos, el compuesto 1,8-cineol identificado como principal constituyente de las muestras. En Uruguay, se ha reportado una abundancia relativa del 64.5%, en Cuba de un 77%, 86.7% en California, 58-82% en Morocco, 48.7% en África, y un 50-65% en Argentina (Dethier *et al.*, 1994; Viturro, 2003; Derwich *et al.*, 2009; Noumi *et al.*, 2011).

Según Montes *et al.*, (2001), el componente más importante del aceite esencial de *L. sempervirens*, es el monoterpeno oxigenado safrol, lo que se condice con los resultados obtenidos en este trabajo, donde la abundancia relativa de este compuesto fue de un 63,03% para *L. sempervirens*, y un 96,92% para *L. philippiana*, ambas especies pertenecientes a la familia *Monimiaceae* (**tablas IX y XI**, respectivamente). En el caso del extracto etanólico de corteza de *L. sempervirens*, destaca además, la presencia de isosafrol (12.94%) y espatulenol (6,60%).

Si bien ha sido posible caracterizar los componentes de los aceites esenciales de *E. globulus* y *L. philippiana*, a través CG-EM, no sucede lo mismo en el caso del extracto AcOet de corteza de *L. sempervirens*, porque la técnica CG-EM identifica los compuestos volátiles, mientras que los no volátiles pueden ser retenidos en la columna y/o ser descompuestos en la inyección de la muestra al equipo, por tanto, los compuestos identificados en el extracto de LP, no corresponden a la totalidad de los compuestos presentes en la muestra, y la actividad biológica que presentó este extracto, puede o no deberse en alguna medida, a algún tipo de compuesto minoritario no volátil y por tanto, no identificado, ya que, según Zapata *et al.*, (2010), incluso los compuestos minoritarios pueden tener una función crítica.

Diferencias relacionadas con la composición de los aceites, en cuanto a la abundancia relativa de ciertos constituyentes identificados, pueden explicarse si se consideran las variaciones en las condiciones ecológicas, como el clima, tipo de suelo, estación del año o lugar geográfico en el que se desarrolla la planta; así como las condiciones de extracción (método de extracción, tiempo, condiciones de la materia prima), factores que pueden producir en el aceite cambios cualitativos y cuantitativos (Durán *et al.*, 2007).

Según diversos estudios realizados, se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales, se debe en gran medida, a la presencia de terpenoides; teniendo mayor actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos. Así mismo, algunos autores plantean que los aceites con un alto porcentaje de compuestos terpenoides del tipo fenólicos poseen notables propiedades antimicrobianas (Sikkema *et al.*, 1995; Maguna *et al.*, 2006).

Becerra *et al.*, (2002) y Solis *et al.*, (2004) han reportado la actividad antifúngica de terpenos naturales aislados de extractos de especies de gimnospermas chilenas, de la familia *Podocarpaceae* y *Cupressaceae*, respectivamente. Según Solis, en general, un grupo fenólico unido a al menos un grupo hidroxilo confiere lipofilia y acidez a una molécula, factores importantes en la actividad antifúngica. Sus resultados señalan que los diterpenos fenólicos con más grupos hidroxilo, presentan mayor actividad sobre bacterias y hongos, concluyendo que para que exista actividad antifúngica, se deben considerar factores como el grado de lipofilia y el grado de conjugación molecular.

Un mecanismo de acción específico de estos compuestos aún no ha sido claramente caracterizado, pero se propone actualmente como posible sitio de acción, la membrana celular, donde los terpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos que podrían arribar a la muerte celular.

Uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenoides consiste en la disrupción de la membrana celular mediante 3 posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos 3 efectos produce la muerte en la célula (Helander *et al.*, 1998).

En los tres análisis químicos realizados, los resultados arrojaron que los principales compuestos identificados corresponden a monoterpenos oxigenados, eucaliptol en el caso de *E. globulus*, y safrol en el caso de *L. sempervirens* y *L. philippiana*.

Según Kubo *et al.*, (2001), moléculas del tipo terpenoide presentes en los aceites esenciales, estarían actuando específicamente sobre los sitios activos de algunas enzimas, lo que se podría deber a que los oxígenos presentes en terpenos tipo aldehído reaccionan con nucleófilos biológicos, posibilitando el bloqueo de la síntesis de ergosterol, el mayor componente de la membrana plasmática.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, es posible concluir que:

- Existe actividad inhibitoria de los aceites obtenidos de las especies EG, LS y LP, siendo esta última, la especie que presentó una más marcada inhibición, frente a cada una de las especies de *Prototheca* spp.
- La especie con mayor susceptibilidad a los aceites fue *P.wikerhamii*, quien fue inhibida casi en su totalidad, por cada uno de los aceites.
- La flora chilena es una fuente potencial de compuestos bioactivos, incluyendo algunas con actividad antifúngica y/o microbiana.
- Estos estudios preliminares son muy interesantes, ya que abren las puertas para que nuevos estudios puedan realizarse, lo que permitiría la validación del uso tradicional de las plantas en el tratamiento de infecciones.
- Si bien los resultados *in vitro* fueron alentadores, es importante y necesario analizar el efecto y toxicidad de estos compuestos *in vivo*, para determinar la aplicabilidad práctica de los aceites y/o sus constituyentes como nuevos algicidas en cuadros de Prototecosis.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Almeraya, A.P. (1994). Aislamiento de *Prototheca* en un brote de mastitis bovina. *Vet. México*, 25(1), 65-67.
2. Alzate, N.A., López, V.K., Marín, H.A., Murillo, A.W. (2009). Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, *Myrtaceae*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) sobre algunos hongos filamentosos. *Revista Tumbaga*, 4,59-71.
3. Becerra, J., Flores, C., Mena, J., Aqueveque, P., Alarcón, J., Bittner, M. (2002). Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from Word extractables of Chilean *Podocarpaceae*. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 47(2):151-157.
4. Bittner, M., Aguilera, M.A., Hernández, V., Arbert, C., Becerra, J., Casanueva, M.E. (2009). Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) schodde and *Laurelia Sempervirens* (ruiz & pav.) Tul. (Chilean Monimiaceae). *Chilean J. Agric. Res.*, 69(1), 30-37.
5. Buzzini, P., Turchetti, B., Facelli, R., Baudino, R., Cavarero, F., Mattalia, L., Mosso, P., Martini, A. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. (2004). *Mycopathol.* , 158, 427-30.
6. Camboim, E.K.A., Neves, P.B., Garino, Jr.F., Madeiros, J.M., Riet-Correa, F. (2010). Prototecose: uma doença emergente. *Pes. Vet. Bras.*, 30(1), 94-101.

7. Costa, E.O., Riveiro, A.R., Melville, P.A., Prada M.S., Watanabe, E.T. (1996). Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. *Mycopathologia*, 133, 85-88.
8. Costa, J.J. and Gadelha, M.F. (2004). *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. 408 p.
9. Cuc, C., Cătoi, C., Fiț, N., Răpunțean, S., Nadăș, G., Bolfă, P., Taulescu, M., Gal, A., Tăbăran, F., Nagy, A., Borza, G., Moussa, R. (2010). The inhibitory effect of some natural essential oils upon *Prototheca* algae *in vitro* growth. *Bulletin UASVM, Vet. Med.*, 67(1), 34-38.
10. Damjanović-Vratnica, B., Dakov, T., Šuković, D., Damjanović, J. (2011). Antimicrobial effect of Essentials oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech J. Food Sci.*, 29, 277-284.
11. Davies, R., Spencer, H. and Wakelin, P. (1964). A case of human protothecosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58, 448-451.
12. Derwich, E., Benziane, Z., Boukir, A. (2009). GC/MS Analysis of volatile constituents and antibacterial activity of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* in Atlas Median from Morocco. *Adv. Nat. Appl. Sci.*, (In press).
13. Dethier, M., Nduwimana, A., Cordier, Y., Menut, C., Lamaty, G. (1994). Aromatic plants of tropical central Africa. XVI. Studies on essential oils of five *Eucalyptus* species grown in Burundi. *J. Essent. Oil. Res.*, 6, 469-673.

14. DiPersio, J. R. (2001). *Prototheca* and protothecosis. *Clin. Microbiol. Newslett.*, 23, 115-121.
15. Durán, D.C., Monsalve, L.A., Martínez, J.R., Stashenko, E.E. (2007). Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Scientia et Técnica*, 33, 435-437.
16. Erskine, R. J., Walter, R.D., Bolin, C.A., Bartlett, P.C., White, D.G. (2002). Trends in Antibacterial Susceptibility of Mastitis Pathogens During a Seven year Period. *J. Dairy Sci.*, 85, 1111-1118.
17. Fonnegra, R. and Jiménez, S.L. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia, 371p.
18. García, N. and Ormazabal, C. (2008). Árboles Nativos de Chile. Enersis S.A. Santiago, Chile. 196 p.
19. Hazen, K.C. (1995). New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8, 462-478.
20. Helander, I., Alakomi, H.m Lavta-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E., Gorris, L., Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3590-3595.
21. Hoffmann, A., Farga, C., Lastra, J., Veghazi, E. (1992). Plantas medicinales de uso común en Chile. 2a. Ed. Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 275 p.

22. Kubo, I., Xiao, P., Fujita, K. (2001). Antifungal activity of octylgallate: Structural criteria and mode of action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 347-350.
23. Lass Flörl, C. and Mayr, A. 2007. Human Protothecosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20(2), 230-242.
24. Maguna, F.P., Romero, A.M., Garro, O.A., Okulik, N.B. (2006) Actividad antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Facultad de Agroindustrias, UNNE, Argentina.
25. Marques, S., Silva, E., Carvalheira, J., Thompson, G. (2006). *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, 89, 4202-4204.
26. Mathew, L.G., Pulimood, S., Thomas, M., Acharya, M.A., Raj, P.M., Mathews, M.S. (2010). Disseminated Protothecosis. *Indian J. Pediatr.*, 77(2), 198-199.
27. Mesa, A.C., Bueno, J.G., Betancur, L.A. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 17, 325-331.
28. McDonald, J.S., Richard, J.L., Cheville, N.E. (1984). Natural and experimental bovine intramammary infection with *Prototheca zopfii*. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 592-595.
29. Mishra, B.B., Treipathi, S.P., Tripathi, C.P.M. (2012). Repellent effect of leaves essential oils from *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) and *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) against two major stored grain insect pest of Coleopterons. *Nature and Science*, 10(2), 50-54.

30. Montenegro, I. (2006). Estudio preliminar del efecto biológico de productos naturales en termitas, bacterias y hongos. Tesis de pregrado, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 176 p.
31. Montes, M.O., Muñoz, L., Wilkomirsky, T. (2001). Plantas medicinales de uso en Chile. Química y farmacología. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 330 p.
32. Noumi, E., Snoussi, M., Hajlaoui, H., Trabelsi, N., Ksouri, R., Valentin, E., Bakhrouf, A. (2011). Chemical composition, antioxidant and antifungal potential of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils against oral *Candida* species. *J. Med. Plant. Res.*, 5(17), 4147-4156.
33. Park, I.K. and Kim, E. (2012). Fumigant antifungal activity of Myrtaceae essential oils and constituents from *Leptospermum petersonii* against three *Aspergillus* species. *Molecules*, 17, 10459-10469.
34. Patwardhan, B. (2009). Drug discovery and development: Traditional medicine and ethnopharmacology perspectives. *SciTopics*.
35. Răpunțean, Gh., Mărghitas, S., Răpunțean, S., Dezmirean, D., Fit, N., Cuc, C. (2007). The effect of honey and some plant extracts, on unicelular algae from *Prototheca* genus. Bulletin *USAMV – CN*, 64, 277-281.
36. Roesler, U., Möller, A., Hensel, A., Baumann, D., Truyen, U. (2006). Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, 56, 1419-1425.

37. Sikkema, J., DeBont, J., Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59, 201-222.
38. Solis, C., Becerra, J., Flores, C., Robledo, J., Silva, M. (2004). Antibacterial and antifungal terpenes from *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin. *J. Chil. Quim. Soc.*, 49(2):157-161.
39. Toda, M., Okubo, S., Mara, Y., Shimamura, T. (1991) Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Jap J Bacteriol.*, 46(5), 845-849.
40. Torres, H.A., Bodey, G.P., Tarrand, J.J., Kontoyiannis, D.P. (2003). Protothecosis in patients with cancer: case series and literature review. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9, 786-792.
41. Tortorano, A.M., Prigitano, A., Dho, G., Piccinini, R., Daprà, V., Viviani, A.M. (2008). *In vitro* activity conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 1312-1314.
42. Valenzuela, K. (2009). Búsqueda e identificación de algas del género *Prototheca* en muestras de agua, lodos de plantas de tratamiento de aguas servidas y en leche de vacas con mastitis. Tesis de pregrado, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Univ. Austral de Chile, 63 p.
43. van Bezooijen, B.P., (2002). Protothecosis of the urinary tract. *J. Urol.*, 167, 252.

44. Viturro, C.I. (2003). Volatile componentes of *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *bicostata* from Jujuy, Argentina. *J. Essent. Oil. Res.*, 15, 206-208.
45. Woolrich, A., Koestemblatt, E., Don, P., Szaniawski, W. (1994). Cutaneous protothecosis and AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 31, 920-924.
46. Zaror, L., Valenzuela, K., Kruze, J. (2011) Mastitis bovina por *Prototheca zopfii*: primer aislamiento en Chile. *Arch. Med. Vet.*, 43, 173-176.
47. Zapata, M., Lognay, G., Smagghe, G. 2010. Bioactivity of essential oil from leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Acyrtosiphon pisum*. *Pest Manag Sci.*, 66, 1324 - 1331.

7. ANEXOS

7.1 Medios de cultivo

7.1.1 Caldo nutriente (1 litro)

Composición:

Extracto de res.....3,0g

Peptona.....5,0g

Agua destilada csp*.....1000mL

* : cantidad suficiente para

pH.....6,8 ± 0,2

Preparación:

Se suspenden 8g de polvo en un litro de agua purificada. Se mezcla bien. Se calienta, agitando frecuentemente, y se deja hervir durante un minuto. Se autoclava a 121°C durante 15 minutos. Se distribuye en tubos estériles y se conserva refrigerado.

7.1.2 Medio Agar Sabouraud (1 litro)

Composición:

Digerido pancreático de caseína.....	5,0g
Digerido péptico de tejido animal.....	5,0g
Dextrosa.....	40,0g
Agar.....	15,0g
Agua destilada csp*	1000mL
pH.....	5,6 ± 0,2

Preparación:

Se adicionan 65g de medio deshidratado a 1000ml de agua destilada y se calientan hasta su completa disolución. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se distribuye en tubos estériles. Para mejor conservación, almacenar refrigerado.

7.1.3 Medio Agar Mueller Hinton (1 litro)

Composición:

Extracto de carne bovina.....	2,0g
Hidrolisado ácido de caseína.....	17.5g
Almidón.....	1.5g
Agar.....	15g
Agua destilada csp.....	1000mL
pH.....	7,3 ± 0,1

Preparación:

Se suspenden 38g de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se calienta con agitación frecuente y se deja hervir durante 1 minuto. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. A continuación se distribuye en placas Petri, sobre una superficie horizontal.