

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efecto inhibitorio de extractos vegetales y aceites esenciales frente a *Prototheca bovis*

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Microbiología

LYDIA ABIGAIL VINUEZA BRAZALES

Quito, 2024

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología de la señorita LYDIA ABIGAIL VINUEZA BRAZALES ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, reading "Martin Marcial Coba", is written over a horizontal line.

Martin Marcial Coba
Director de la Disertación
Quito, 28 de junio del 2024

DEDICATORIA

A mis padres,

Por ser mi apoyo incondicional, su amor y consejos mi guía constante. Gracias por su paciencia, por nunca soltar mi mano, por levantarme cuando me caigo y por enseñarme a enfrentar la vida con confianza, honestidad y perseverancia. Este logro es un pequeño tributo a la luz que han traído a mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis padres, mi hermano y mi cuñada, por ser mi pilar en diferentes aspectos y momentos de mi vida. Gracias por su constante atención y el apoyo incondicional para perseguir mis metas y sueños.

Al PhD. Martín Marcial Coba, expresar un profundo agradecimiento por la oportunidad que me brindó, por su guía constante durante este proceso, por su paciencia. Sus sabios consejos, amplia experiencia y conocimiento fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación. Gracias por su sinceridad, dedicación y el tiempo invertido.

A mi mejor amigo, Matías, quiero agradecerte de corazón por tu constante amistad, compañía y consejos durante estos años. Tu apoyo y ánimos en los momentos más difíciles. A pesar de las ocupaciones y el tiempo que ha pasado, siempre has estado a mi lado.

Por último, deseo expresar mi agradecimiento a todo el equipo que trabaja en la sala de preparaciones, especialmente a Bolívar Salas por su valiosa contribución, esfuerzo y dedicación en la disposición de materiales, equipos y un entorno adecuado para el aprendizaje.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AE:** aceites esenciales
CMI: Concentración mínima inhibitoria
AG: aceite de guaviduca
AT: aceite de árbol de té
AR: aceite de romero
AL: aceite de lavanda
AA: aceite de albahaca

TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS	V
1. RESUMEN.....	1
1. ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	7
OBJETIVO GENERAL:	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1 TIPO DE ESTUDIO	8
3.2 CEPA DE MICROALGA, ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS VEGETALES EVALUADOS.....	8
3.3 TAMIZAJE DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES SOBRE <i>Prototheca bovis</i>	9
3.4 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL USO COMBINADO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES FRENTE A <i>Prototheca bovis</i>	10
3.5 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES SOBRE EL DESARROLLO DE <i>Prototheca bovis</i>	10
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	10
4. RESULTADOS	11
4.1 TAMIZAJE DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES SOBRE <i>Prototheca bovis</i>	11
4.2 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL USO COMBINADO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES FRENTE A <i>Prototheca bovis</i>	12
4.3 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES SOBRE EL DESARROLLO DE <i>Prototheca bovis</i>	14
5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	15
6. CONCLUSIONES	21
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografías de la capacidad inhibitoria de los extractos vegetales en formulación acuosa de pepa de aguacate y viruta de laurel frente a <i>Prototheca bovis</i>	11
Figura 2. Fotografías de la capacidad inhibitoria de los extractos vegetales en formulación alcohólica de pepa de aguacate (etilenglicol) y viruta de laurel (etilenglicol) frente a <i>P. bovis</i>	11
Figura 3. Fotografías de la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales de guaviduca y lavanda frente a <i>P. bovis</i>	12
Figura 4. Fotografías de la capacidad inhibitoria de las combinaciones de los aceites esenciales frente a <i>P. bovis</i>	13
Figura 5. Medición de la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales y combinaciones frente a <i>P. bovis</i>	13

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (mg/mL) de aceites esenciales

..... 14

1. RESUMEN

La mastitis bovina asociada a protothecosis, es una enfermedad provocada por microalgas patógenas, como *Prototheca bovis*. Esta representa un desafío considerable en el sector ganadero por su impacto en la salud animal y en la economía agropecuaria. En respuesta a esta problemática, este estudio se enfocó en investigar el potencial inhibitorio de extractos vegetales y aceites esenciales frente a *P. bovis*. Los extractos vegetales y aceites esenciales fueron obtenidos mediante percolación y destilación, respectivamente. Esos productos fueron evaluados bajo condiciones estándar en ensayos de susceptibilidad y con el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria en placas de 96 pocillos. Los resultados obtenidos evidenciaron que los extractos vegetales, en todas las formulaciones evaluadas, no mostraron capacidad de inhibición efectiva contra *P. bovis*. Por el otro lado, se observó que los aceites esenciales de guaviduca, árbol de té y albahaca presentaron un potencial significativo como agentes biocontroladores. Sin embargo, los ensayos de combinación entre estos aceites no demostraron efectos sinérgicos. Con respecto a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes aceites, se encontró que aquél obtenido de árbol de té inhibió el desarrollo de *P. bovis* a una concentración de 40 mg/mL, seguido por el aceite de guaviduca y albahaca con valores de 80 mg/mL. Por otra parte, los aceites de lavanda y romero exhibieron CMIs potencialmente superiores a las concentraciones evaluadas. Este estudio sugiere que algunos de los productos naturales evaluados poseen un potencial prometedor como agentes antimicrobianos contra *Prototheca bovis*. Estos hallazgos subrayan la importancia de explorar alternativas naturales para el tratamiento frente a esta enfermedad en el ganado bovino.

Palabras clave: aceites esenciales, antagonismo, capacidad de inhibición, CMI, extractos vegetales

1. ABSTRACT

Bovine mastitis caused by protothecosis is a disease caused by pathogenic microalgae, such as *Prototheca bovis*. This represents a considerable challenge in the livestock sector due to its impact on animal health and the agricultural economy. In response to this issue, this study focused on investigating the inhibitory potential of plant extracts and essential oils against *P. bovis*. Plant extracts and essential oils were obtained by percolation and distillation, respectively. These products were evaluated under standard conditions in susceptibility assays and with the aim of determining the minimum inhibitory concentration in 96-well plates. The results showed that the plant extracts, in all the formulations evaluated, did not show effective inhibition capacity against *P. bovis*. Conversely, it was observed that guavidauca, tea tree and basil essential oils presented significant potential as biocontrol agents. However, combination trials between these oils did not demonstrate synergistic effects. Regarding the minimum inhibitory concentration (MIC) of the different oils, it was found that the one obtained from tea tree inhibited the development of *P. bovis* at a concentration of 40 mg/mL, followed by guavidauca and basil oil with values of 80 mg/mL. In contrast, lavender and rosemary oils exhibited MICs potentially higher than the concentrations evaluated. This study suggests that some of the natural products evaluated possess promising potential as antimicrobial agents against *Prototheca bovis*. These findings underscore the importance of exploring natural alternatives for the treatment of this disease in cattle.

Keywords: essential oils, antagonism, inhibition, MIC, plant extracts

2. INTRODUCCIÓN

La leche es considerada como un alimento básico en la alimentación humana, ya que es una fuente de vitaminas, minerales, proteínas y otros nutrientes esenciales. Por tal razón, la producción lechera es categorizada como una de las actividades más importantes, en términos económicos, dentro del sector agropecuario y en la economía del Ecuador (Brassel et al., 2007; AECID, 2021). No obstante, la producción lechera y la industria láctea se ve limitada por la ocurrencia de mastitis en vacas. Esta patología, conduce a una disminución en la calidad, cantidad de la leche y ocasionalmente al sacrificio de los animales infectados (Vissio et al., 2015). Además, se estima que esta enfermedad ocasiona pérdidas anuales globales de aproximadamente 35 millones de dólares (Caneschi et al., 2023).

Entre los factores que favorecen el desarrollo de mastitis se incluyen las malas condiciones ambientales como el hacinamiento en las ganaderías, ventilación insuficiente de los establos y remoción inadecuada de estiércol (Calvinho y Gianre, 2013). También influyen la deficiente higiene durante el ordeño y formas de contagio entre animales por medio del contacto directo como el amamantamiento, manos de los operadores, equipos y utensilios de ordeño (Herencia y Mamani-Mango, 2022; Sykes, 2023). Los microorganismos más frecuentemente asociados a esta enfermedad son bacterias, principalmente, Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, seguido de otras especies del mismo género y *Streptococcus* spp. Además, se han identificado otros agentes etiológicos como *Corynebacterium* spp., *Mycoplasma* spp., hongos, levaduras, y microalgas como *Prototheca* spp. (Hernández, 2015).

Aunque, la mastitis causada por *Prototheca* spp. no es una infección muy común en bovinos, por ser un patógeno oportunista ambiental, recientemente ha adquirido mayor importancia en los rebaños lecheros debido a que al establecerse en el rodeo se comporta como patógeno contagioso, propagándose entre los animales que se encuentran en el establecimiento, existiendo situaciones de brote que pueden afectar a más del 30% del rebaño (Cortés et al., 2015; Huilca-Ibarra et al., 2022).

El género *Prototheca* se compone de especies de algas eucariotas, saprófitas, carentes de cloroplastos, encontrándose ampliamente distribuidas en el medio ambiente, por lo que ha sido aislado de suelos, cursos de agua, heces de bovinos, cerdos, perros, roedores y seres humanos (Kruze, 2015). Filogenéticamente, se encuentra estrechamente relacionada con el género *Chlorella* (Zúñiga Carrasco y Caro Lozano, 2023). Las formas más infecciosas son

los esporangios y esporangiosporas que son liberadas al romperse las envolturas que las rodean (tecas) (Cortés et al., 2015). Su metabolismo es heterotrófico, utilizan la glucosa como fuente de carbono orgánico y sales de amonio como fuente de nitrógeno (Marques et al., 2010).

Adicionalmente, se ha suscitado un nuevo interés en los casos de mastitis bovina, específicamente por *Prototheca bovis*, debido a que mantiene propiedades patógenas únicas y, consecuentemente, su control y tratamiento plantea dificultades significativas (UTMACH, 2019). Por ejemplo, *P. bovis* exhibe la capacidad de formar biopelículas, incrementando la resistencia de los microorganismos a varios desinfectantes, lo que potencialmente aumenta la transmisión, evita también la eliminación de superficies contaminadas (Tashakkori et al., 2022).

Aunque el uso de antimicrobianos como anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y voriconazol, sean el principal método de tratamiento de protothecosis, su eficacia se encuentra limitada (Hillerton, 2002). Adicional a esto, los productos obtenidos a partir de animales tratados con antibióticos pueden contener residuos de estos compuestos, lo que resulta perjudicial para el consumidor; situación que es prohibida por las normas sanitarias de distintos países (Subirats, 2019; Proskurnicka et al., 2023). Por ende, es importante buscar tratamientos alternativos basados en productos naturales (Yang, 2019). En este contexto, el uso de extractos de plantas o aceites esenciales, como biocontroladores, representa un potencial prometedor como tratamiento alternativo de la mastitis, en función de las propiedades antimicrobianas de la diversidad de compuestos activos que puedan contener (Alsheikh et al., 2020). Adicionalmente, podrían aportar varios beneficios tanto para la salud del ganado, así como para la industria lechera en general (Morales-Ubaldo et al., 2023).

La obtención de extractos de plantas tiene como objetivo recuperar y purificar ingredientes activos partiendo de materiales vegetales (Tan et al., 2013). Este proceso implica una producción con bajo costo y fácil obtención, debido a que, la materia prima usada a menudo proviene de productos de desecho agroindustrial (Rója E. et al., 2012). No obstante, según Kher (2019) los ensayos *in vivo* que informan su eficacia son aún escasos. Esto es crucial dado que, aunque la obtención de los extractos es un proceso de bajo precio y sencillo acceso, el verdadero potencial terapéutico necesita ser evaluado en entornos biológicos más complejos.

Los ensayos proporcionan información crucial sobre cómo los extractos interactúan con los organismos vivos, sus efectos en sistemas biológicos y su seguridad a largo plazo. La falta de ensayos *in vivo* demuestra que la comprensión o alcance actual de los extractos de

plantas se encuentra incompleta. Aunque la investigación en laboratorio puede ofrecer pistas prometedoras, la validación en entornos biológicos más complejos es necesaria para su comprensión.

Por otra parte, los aceites esenciales (AE), son líquidos oleosos aromáticos y lipófilos obtenidos a partir de una materia prima natural de origen vegetal, que consisten en una mezcla de compuestos volátiles de bajo peso molecular (Gouvea et al., 2017). Estos se relacionan con la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos o insecticidas (Bakkali et al., 2008). La naturaleza lipofílica de los AE les proporciona la capacidad de atravesar la membrana celular de las bacterias y mitocondrias, lo que afecta su integridad e incrementa su permeabilidad (Oussalah et al., 2006). Esto conduce a la alteración de procesos celulares, incluidos aquellos que están relacionados con el transporte de la membrana, lo que resulta en la pérdida de funciones vitales (Tariq, 2019).

En este sentido, algunos AE han demostrado tener capacidad inhibitoria sobre varios tipos de organismos. Por ejemplo, *Piper carpunya* (guaviduca), originaria de los Andes y la Amazonía (Sinche Serra y Vargas Jentzsch, 2019) ha mostrado actividad inhibitoria frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Bacillus subtilis*. Este efecto se lo puede relacionar a componentes químicos como el carvacol y timol, que se asocian a la lisis celular de este tipo de organismos.

En relación con la capacidad antimicrobiana del aceite de *Lavandula angustifolia* (lavanda) y el aceite de *Rosmarinus officinalis* (romero), ambos provenientes de plantas mediterráneas (López, 2008; Dobros, 2022), han demostrado ser eficaces contra cepas de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Kytococcus* spp. y *Candida albicans* (Ksouri, 2017; Noori et al., 2019). Asimismo, las plantas de romero contienen monoterpenos como 1,8-cineol, borneol, pineno, limoneno, canfeno, alcanfor y mirceno, mientras que la lavanda contiene linalol, acetato de linalilo y componentes alifáticos no terpenoides (Dan et al., 2012; Borges, 2019; Dobros, 2022). Por otro lado, el aceite de árbol de té, que comparte propiedades antimicrobianas con el aceite de lavanda y romero, contiene terpinen-4-ol como su componente más importante, con actividad biocida contra varias especies de microorganismos, incluidas algunas algas como *Prototheca zoopfi* y *P. wickerham* (Scalvenzi, 2016; Corona, 2022).

En cuanto al aceite de albahaca, planta originaria del Sudeste Asiático y África Central, contiene varios compuestos antimicrobianos como el isoestragol, humuleno, eucaliptol, β -linalol, cis- β -ocimeno y alcanfor, además de compuestos fenólicos como el carnosol (Rivas, 2015; Calderón, 2021). En ese contexto, mantiene actividad antibacteriana significativa

contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (Rojas et al., 2012; Mestanza, 2014).

Igualmente, se ha identificado la actividad antimicrobiana en diferentes familias de plantas. Por ejemplo, las familias Lauraceae y Asteraceae mantienen relación taxonómica con el aguacate (*Persea americana*) y la chilca (*Baccharis latifolia*), respectivamente. (Galindo, 2013). Los productos metabólicos de estas plantas se encuentran acumulados principalmente en sus hojas. Estos compuestos incluyen flavonoides, fenoles y terpenos, los cuales exhiben actividad antimicrobiana o antioxidante (Ortuño, 2019; Pérez et al., 2020). En este sentido, se ha evidenciado que extractos de *Baccharis latifolia* y *Persea americana* tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y Gram negativas, incluyendo a *Escherichia coli* y diversas especies de *Pseudomonas* (Ortuño, 2019; Ávila, 2023).

Con base en los antecedentes arriba mencionados, cabe resaltar que, previamente, no se han realizado indagaciones relacionadas con el uso de extractos vegetales o aceites esenciales como biocontroladores del desarrollo de *Prototheca bovis*. Sin embargo, existen diferentes investigaciones en las que se ha comprobado la actividad inhibitoria de diferentes aceites esenciales frente a distintas cepas de otras especies del género *Prototheca*. Por ende, en esta investigación se pretendió evaluar el efecto inhibitorio, *in vitro*, de extractos y aceites esenciales de plantas frente a *Prototheca bovis*. Los resultados alcanzados constituyen una herramienta útil para el diseño de potenciales tratamientos, terapéuticos o preventivos de la mastitis causada por esta especie de microalga.

Por lo tanto, esta propuesta de investigación procuró dar respuesta a las siguientes interrogantes: 1) ¿Los extractos vegetales y aceites esenciales de las plantas tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Prototheca bovis*?, 2) ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos vegetales y aceites esenciales contra *P. bovis*? 3) ¿Si la combinación de distintos extractos vegetales o aceites esenciales genera un efecto sinérgico sobre la inhibición de *P. bovis*?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el potencial inhibitorio de extractos vegetales derivados de laurel, semilla de aguacate, chilca y aceites esenciales de guaviduca, árbol de té, lavanda, albahaca, y romero frente a *Prototheca bovis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Evaluar el efecto individual de los aceites esenciales y extractos vegetales sobre el crecimiento de cepas de *P. bovis*.
- b) Identificar los efectos del uso combinado de extractos vegetales y aceites esenciales sobre el crecimiento de *P. bovis*.
- c) Determinar la CMI de los extractos vegetales y aceites esenciales sobre el crecimiento de *P. bovis*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es de tipo experimental, ya que se manipulan múltiples variables como el efecto individual o combinado de extractos vegetales y aceites esenciales sobre el desarrollo de *Prototheca bovis*. Asimismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria, de tales productos, respecto del desarrollo de esta especie de microalga. La experimentación se llevó a cabo bajo condiciones controladas, con el propósito de obtener resultados reproducibles.

3.2 CEPA DE MICROALGA, ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS VEGETALES EVALUADOS

La cepa de *Prototheca bovis*, previamente aislada a partir de ubres de vacas diagnosticadas con mastitis, que se incluyó en este estudio fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), en crioviales congelados a -20 °C. La cepa se reactivó en caldo BHI a 37 °C durante 48 horas. A este cultivo se le adicionó glicerol con una concentración final de 20% y alícuotas de 1 mL que se dispensaron en 5 microtubos cónicos. Para confirmar la viabilidad y pureza del cultivo se realizaron subcultivos en agar PDA, con pH ajustado a 5,2 que se incubaron a 37°C, por 48 a 72 horas, esperando observar un solo morfotipo colonial.

Por otra parte, el Laboratorio de Alimentos y Bioquímica de la PUCE proporcionó los extractos alcohólicos (utilizando etilenglicol o etanol como vehículo) o acuosos obtenidos mediante percolación de viruta de laurel (*Laurus nobilis*), chilca (*Baccharis latifolia*) y semilla de aguacate (*Persea americana*). De igual manera, se suministraron aceites esenciales de guaviduca (*Piper Carpunya*), árbol de té (*Melaleuca alternifolia*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), albahaca (*Ocimum basilicum*) y romero (*Rosmarinus officinalis*), obtenidos por destilación por arrastre de vapor.

3.3 TAMIZAJE DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES SOBRE *Prototheca bovis*.

Con el propósito de sublimar los solventes, los extractos alcohólicos fueron liofilizados. Para esto, 30 mL de los extractos vegetales fueron colocados en tubos cónicos estériles y congelados a -80°C . Posteriormente, fueron ubicados en la cámara de liofilización por 48 horas. Finalmente, se reconstituyó en agua tipo II purificada estéril alcanzando el mismo volumen de extracto antes de la desecación.

Los extractos vegetales de semilla de aguacate, chilca y laurel fueron, previamente, esterilizados por filtración en una membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro. Por otra parte, colonias de *Prototheca bovis* con 24 horas de incubación a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en PDA con un pH de 5,6 se suspendieron en caldo BHI y su concentración se ajustó visualmente a escala McFarland 2. Utilizando un hisopo, empapado en esta suspensión, se inoculó la superficie de cajas Petri conteniendo 20 mL de medio de cultivo (profundidad $4 \pm 1\ \text{mm}$). Luego, alícuotas de $60\ \mu\text{L}$ de los distintos extractos vegetales y aceites esenciales, se dispensaron en pocillos perforados en el medio de cultivo. En el caso de los aceites se perforó un pocillo ubicado en uno de los cuadrantes de la caja, mientras que, en los extractos vegetales se perforaron dos pocillos en posiciones equidistantes. Posteriormente, estas fueron incubadas durante un período de 48 horas a temperatura constante de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Brulé Guíñez, 2014).

Para determinar la susceptibilidad de la cepa de *Prototheca bovis* frente a los extractos vegetales o aceites esenciales se realizaron mediciones de los halos de inhibición formados alrededor de cada uno de los pocillos de las placas. La actividad inhibitoria se expresa como la media de los diámetros de los halos (\pm desviación estándar) medidos en milímetros/centímetros (Zajmi et al., 2015).

3.4 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL USO COMBINADO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES FRENTE A *Prototheca bovis*

Con los productos que en el apartado anterior presentaron actividad inhibitoria, se realizaron combinaciones para explorar posibles efectos sinérgicos. Siguiendo la metodología detallada en el apartado 3.3 e incluyendo una variación, que consistió en la combinación de dos productos, de los que se aplicó $30\ \mu\text{L}$ de cada uno de los compuestos

seleccionados para la mezcla, dando una alícuota total de 60 μL que se dispensó en un pocillo perforado ubicado en uno de los cuadrantes del medio de cultivo. La selección de los distintos componentes se basó en el promedio de los diámetros de los halos formados alrededor de los pocillos.

3.5 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES SOBRE EL DESARROLLO DE *Prototheca bovis*.

Las preparaciones que en el apartado 3.3 y 3.4, exhibieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. bovis* fueron seleccionadas para evaluar la CMI de cada formulación. Para esto, 200 mg de cada uno de los aceites fueron diluidos en 40 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). A esta preparación, se agregaron 2,5 mL de caldo TSB estéril para generar una solución madre con una concentración de 80 mg/mL de cada producto. A partir de esta preparación, en placas de 96 pocillos, se realizaron diluciones seriadas dobladas, de 1:2 a 1:128 en 100 μL de caldo TSB estéril con un pH de 5,2. Inmediatamente, en cada uno de los pocillos, se inocularon 10 μL de una suspensión celular de *P. bovis* con una concentración de 6×10^8 UFC/mL, determinada utilizando la escala McFarland 2, mediante la suspensión de colonias en solución salina hasta alcanzar la turbidez especificada.

Como control positivo, se utilizó gentamicina a una concentración de 100 mcg/mL, además se empleó 100 μL de caldo TSB estéril como control negativo. La viabilidad en cada uno de los pocillos fue determinada por turbidez comparada con aquella del control positivo (Bouari *et al.*, 2010; Radaelli *et al.*, 2016). Las microplacas inoculadas se incubaron a 35 ± 2 °C durante 48 horas. La concentración de la primera dilución, en orden ascendente, en la que no se observó desarrollo, se consideró como la concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto para *P. bovis*.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos y cada uno de los ensayos se ejecutaron por triplicado. Las medias de los diámetros de los halos, formados por los diferentes aceites esenciales y sus combinaciones, fueron comparadas mediante un análisis de varianza ANOVA unidireccional, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas. A partir de esto, las diferencias específicas, entre los tratamientos, se identificaron mediante la prueba *post hoc* de Tukey. El nivel de significancia se estableció en 0,05 para las dos pruebas.

4. RESULTADOS

4.1 TAMIZAJE DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES SOBRE *Prototheca bovis*

Como resultado de los ensayos para evaluar el efecto inhibitorio de los extractos vegetales y aceites esenciales respecto del desarrollo de *Prototheca bovis*, se observó que, de los ocho compuestos evaluados, los extractos vegetales, en todas las formulaciones probadas, no mostraron capacidad de inhibición (Figura 1 y 2). En contraste, la exposición a aceites esenciales condujo a distintos niveles de inhibición *in vitro* del cultivo (Figura 3). Por ejemplo, los halos de menor tamaño ($1,00 \pm 0,10$ cm) fueron los resultantes del tratamiento con AL, en tanto que el aceite que tuvo mayor capacidad de inhibición fue AG, al generar halos con un diámetro correspondiente a $5,27 \pm 0,23$ cm. Junto con este último, el efecto inhibitorio de AT fue significativamente superior al de los demás aceites evaluados.

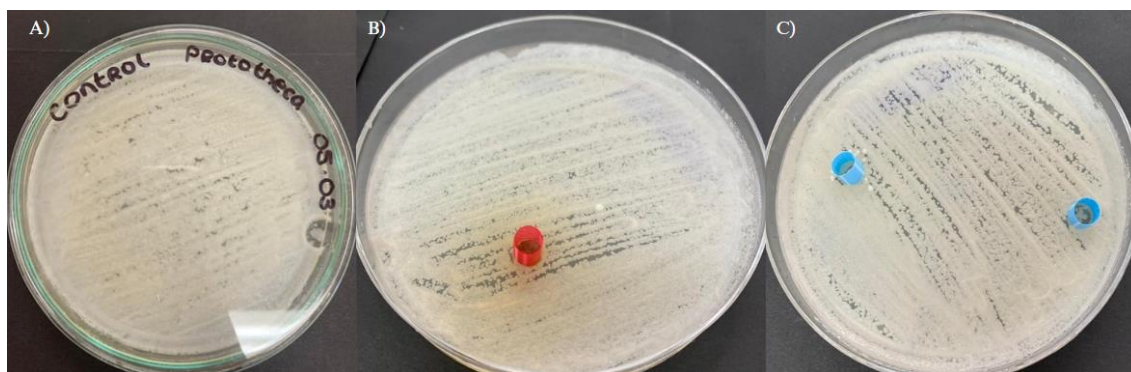


Figura 1. Fotografías de la capacidad inhibitoria de los extractos vegetales en formulación acuosa de pepa de aguacate y viruta de laurel frente a *Prototheca bovis*. A) Control positivo de crecimiento de *P. bovis* B) Efecto del extracto vegetal acuoso de pepa de aguacate. Crecimiento de la microalga alrededor del pocillo. C) Efecto del extracto vegetal acuoso de viruta de laurel. Crecimiento de la microalga dentro del pocillo perforado.

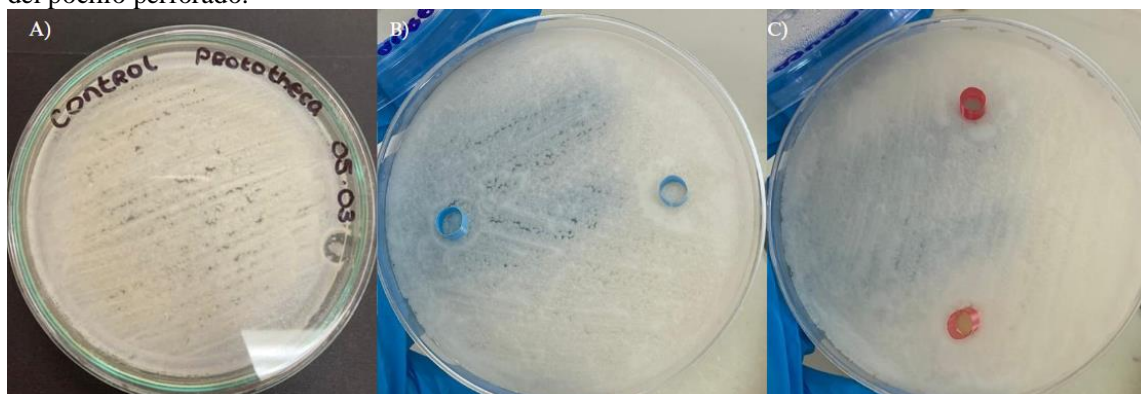


Figura 2. Fotografías de la capacidad inhibitoria de los extractos vegetales en formulación alcohólica de pepa de aguacate (etilenglicol) y viruta de laurel (etilenglicol) frente a *P. bovis*. A) Control positivo de crecimiento de *P. bovis*; B) Efecto de extracto vegetal de etilenglicol de pepa de aguacate. Crecimiento de la microalga dentro del pocillo perforado C) Efecto de extracto vegetal de etilenglicol de viruta de laurel. Crecimiento de la microalga alrededor del pocillo perforado.

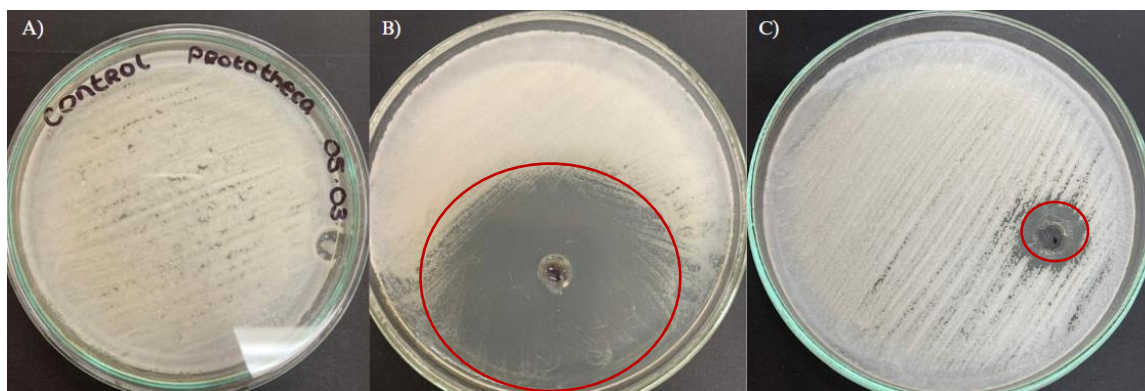


Figura 3. Fotografías de la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales de guaviduca y lavanda frente a *P. bovis*. A) Control positivo de crecimiento de *P. bovis*; B) Efecto del aceite esencial de guaviduca sobre la microalga. En rojo se encuentra representada el área de inhibición. C) Efecto del aceite esencial de romero sobre la microalga alrededor del pocillo. En rojo se representa el área de inhibición.

4.2 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL USO COMBINADO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES FRENTE A *Prototheca bovis*.

Debido a que los extractos vegetales no mostraron capacidad de inhibición, no fueron considerados para este apartado. Por otra parte, se seleccionó a los tres aceites esenciales (Figura 5) que mostraron el mayor promedio de diámetro del halo de inhibición. Los resultados se determinaron visualmente y mediante la medida de los halos formados alrededor de los pocillos (Figura 4). En concordancia con esto, la capacidad de inhibición de las combinaciones osciló entre $2,03 \pm 0,06$ cm para AT-AA y $4,00 \pm 0,10$ cm para AG-AT. En ninguno de los casos, las combinaciones de aceites condujeron a un incremento del efecto inhibitorio comparado con aquél de los tratamientos en los que se utilizó únicamente un tipo de aceite. De hecho, los halos de inhibición mostraron una reducción considerable en comparación con los valores individuales, existiendo una disminución de la mitad del valor por parte de AG – AA con $2,67 \pm 0,29$ cm y AT – AA con $2,03 \pm 0,06$ cm. Sin embargo, la mezcla AG – AT frente a AT mostró valores más cercanos entre sí con $4,00 \pm 0,10$ cm y $4,93 \pm 0,95$ cm respectivamente. A pesar de que se seleccionaron aceites con significancia estadística para las combinaciones, los resultados combinados no fueron suficientemente distintivos para diferenciarlos de los aceites que mostraron la media más baja, es decir AL y AR (Figura 5).

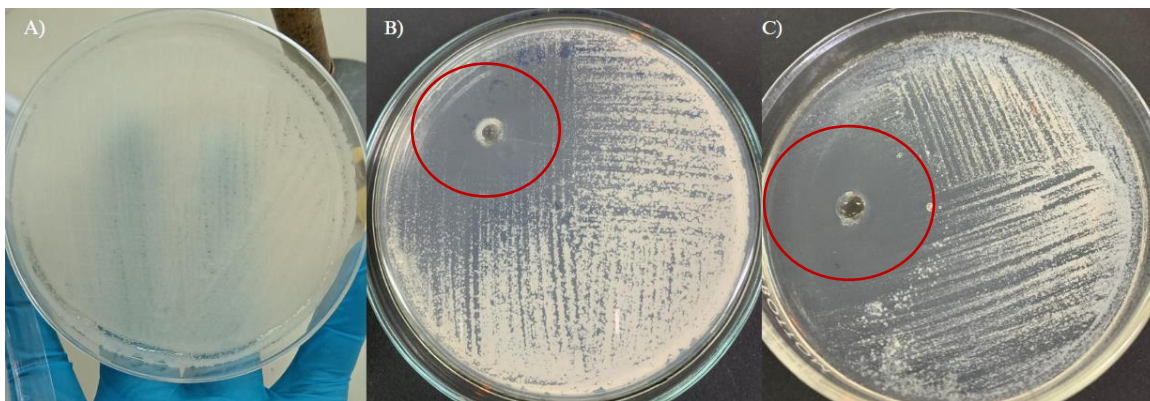


Figura 4. Fotografías de la capacidad inhibitoria de las combinaciones de los aceites esenciales frente a *P. bovis*. A) Control positivo de crecimiento de *P. bovis*; B) Efecto de la combinación de AG - AA sobre la microalga. En rojo, área de inhibición. C) Efecto de la combinación de AG - AT sobre la. En rojo, área de inhibición.

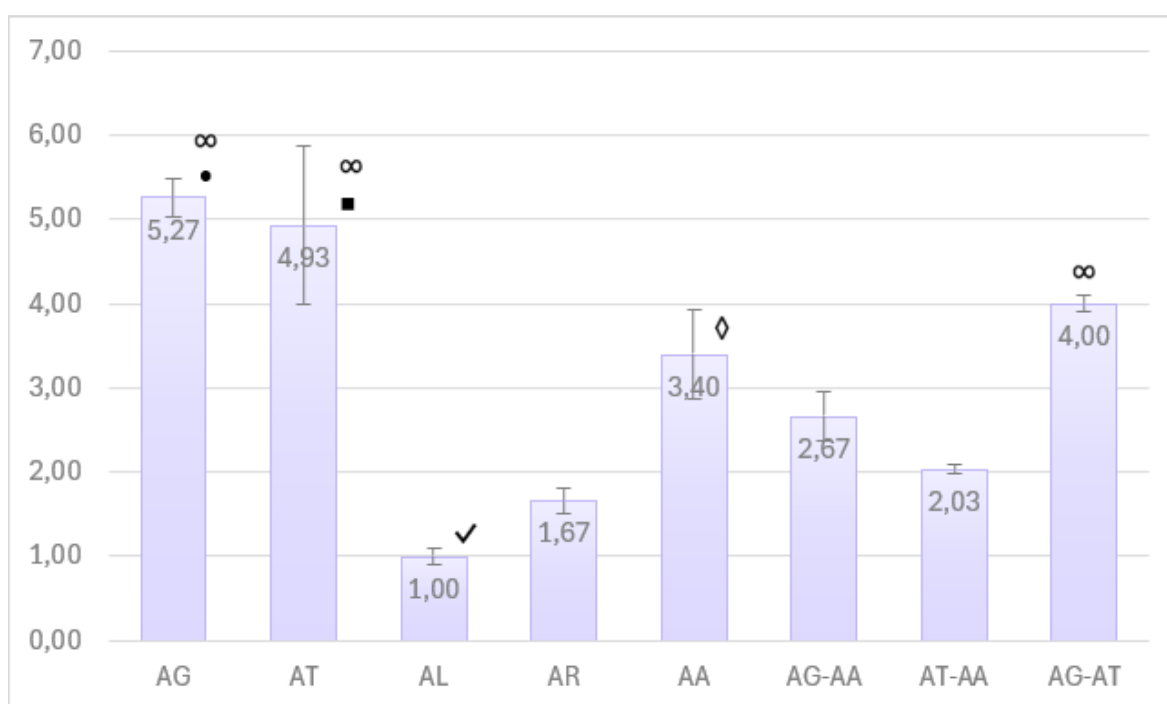


Figura 5. Medición de la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales y combinaciones frente a *P. bovis*. Las columnas representan la media aritmética del diámetro de halo en cm de las tres réplicas por cada aceite evaluado, las barras de error hacen referencia a la desviación estándar que existe entre las réplicas.

- El valor de inhibición es significativamente superior ($p < 0,05$) al de todos los aceites y combinaciones evaluadas, con excepción de AT.
- El valor de inhibición es significativamente superior ($p < 0,05$) al de todos los aceites, con excepción de AG.
- ◇ Presenta valores significativamente altos únicamente en comparación con AL y AR,
- ✓ El valor de inhibición es significativamente inferior ($p < 0,05$) a todos los aceites evaluados, menos a AR.
- ∞: En la mezcla de AG - AT frente a AG demostró una diferencia significativa entre ellos, en cambio, al comparar la misma mezcla con AT no se encuentra una diferencia estadísticamente significativa.

4.3 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES SOBRE EL DESARROLLO DE *Prototheca bovis*.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se consideró únicamente a los aceites esenciales debido al efecto de inhibición observado. Se encontró que AT demostró la mayor actividad antimicrobiana contra los aislados de *P. bovis* con una CMI equivalente a 40 mg/mL. Por otro lado, AG y AA requirieron de una concentración mínima de 80 mg/mL para inhibir el desarrollo de esta especie de microalga. En contraste, AL y AR exhibieron una actividad microbiana más baja, pero con una CMI indefinida, ya que *P. bovis* pudo desarrollarse en presencia de todas las concentraciones evaluadas de estos aceites.

Tabla 1. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (mg/mL) de aceites esenciales

Aceite esencial	Concentración
Guaviduca	80 mg/mL
Árbol de té	40 mg/mL
Albahaca	80 mg/mL
Lavanda	NC
Romero	NC

Nota: Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales basada en el desarrollo de *P. bovis* en TSB + DMSO en placas de 96 pocillos; NC: no se pudo determinar la CMI, por el desarrollo de *P. bovis* en las concentraciones establecidas.

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Conforme los resultados obtenidos en el presente estudio, en función de la medición de la capacidad de inhibición tanto de los extractos vegetales como de los aceites esenciales respecto del crecimiento de *Prototheca bovis*, se determinó el potencial biocontrol de los compuestos evaluados. Durante las pruebas *in vitro* contra *P. bovis*, se observó que los extractos vegetales, en todas las formulaciones evaluadas, no mostraron capacidad de inhibición, algo inesperado, dado que estos extractos son conocidos por las propiedades antimicrobianas que proporcionan los compuestos bioactivos que contienen, como flavonoides, taninos, o alcaloides, teniendo la capacidad de actuar contra el desarrollo de una amplia gama de microorganismos (Scalvenzi et al., 2016; Borges et al., 2022).

Sin embargo, la eficiencia de los extractos vegetales puede variar dependiendo de diversos factores, desde la especie de microorganismo utilizado para el enfrentamiento, la resistencia intrínseca hasta la concentración y composición del extracto vegetal (Cowan, 1999; Cushnie, 2005; Ríos, 2005).

En el caso específico de *Prototheca bovis*, la resistencia a los extractos vegetales puede ser explicado por distintas características de la microalga. Entre estas se destaca una pared celular gruesa, compuesta por glucanos y proteínas, permitiéndole proteger a la célula de los compuestos tóxicos (Rivas, 1987). Otro aspecto para tomar en cuenta es la resistencia intrínseca (esporangios) y extrínseca (formación de biopelículas) que evita que los compuestos activos de los extractos vegetales actúen como lo harían frente a otros organismos causantes de mastitis bovina (Jánosil et al., 2001; Gonçalves et al., 2015).

Adicionalmente, en el estudio realizado por Guaña Tarco y Guevara (2022), se destaca que la eficacia antimicrobiana de los extractos vegetales varía significativamente según la formulación y método de obtención, dado que dicha eficacia está directamente influenciada por la concentración del extracto. Además, las complejas mezclas de los compuestos pueden no favorecer la sinergia e interferir con la actividad de los compuestos individuales frente a diferentes microorganismos (Gutiérrez, 2008). Junto con estos factores, la diferencia en la obtención y solubilidad de los extractos vegetales y los aceites esenciales juega un papel crucial en el efecto de estos compuestos sobre el desarrollo de *Prototheca bovis*. Es decir, los extractos vegetales obtenidos por percolación podrían no concentrar adecuadamente los compuestos volátiles y lipofílicos, mientras que, los aceites esenciales obtenidos por destilación son más eficaces para concentrar estos compuestos, los cuales suelen ser los responsables de la actividad antimicrobiana, debido a su mayor solubilidad en

lípidos, facilitando así su penetración en la membrana celular (Jara y Gómez, 2018; Cedeño, 2019).

Asimismo, Cuc (2021) documentó que algunos extractos vegetales pueden actuar como inhibidores o estimuladores de crecimiento sobre el desarrollo de algunas especies de *Prototheca*. Este hallazgo también ha sugerido que la respuesta de los productos no está determinada por la especie específica de microalga, lo cual es crucial para la realización de estudios relacionados con este tema, dada la limitada información disponible al respecto.

Esta investigación reveló, principalmente, un efecto antimicrobiano de los aceites esenciales en el crecimiento de la microalga, cuya capacidad de inhibición varió significativamente entre los diferentes aceites y sus combinaciones. Los aceites esenciales que exhibieron la mayor capacidad de inhibición fueron guaviduca, árbol de té y albahaca. En este sentido, previamente se ha descrito la relación de la caracterización química de los aceites con la su actividad antimicrobiana (Beltrán, 2013; Espinoza y Pincay, 2022; Jaramillo, 2020). Estos aceites contienen varios compuestos antimicrobianos importantes, entre ellos, monoterpenos oxigenados e hidrocarbonados, terpinen-4-ol, linanolol y eugenol, que poseen diversos mecanismos antimicrobianos (Rojas, 2012; Salamanca y Galiano, 2016).

En el presente estudio, AG demostró el mayor grado de inhibición ($5,27 \pm 0,23$ cm), como se evidencia en la comparación de las figuras previamente presentadas. Según los investigadores que obtuvieron el AG, el análisis mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas proporcionó información detallada sobre la composición química y la abundancia relativa de los componentes principales del aceite. La caracterización química reveló un alto contenido de monoterpenos oxigenados (54,97%) y monoterpenos hidrocarbonados (26,71%). De manera específica, la piperitona se identificó como el componente mayoritario (40,35%) seguido por el metil eugenol (8,98%), silvestreno (6,76%), limoneno (6,30%), eucaliptol (6,29%), α -terpinil acetato (3,37%) y espatulenol (2,37%) (Información no publicada). Estos hallazgos son consistentes con los reportados por Rondon (2016).

Investigaciones previas han demostrado que los monoterpenos tienen una notable actividad antimicrobiana al comprometer significativamente la integridad y función de la membrana celular (Lambert et al. 2001). Estos compuestos inducen efectos que incluyen cambios en el potencial de la membrana, liberación de componentes intracelulares y la inhibición de la respiración celular (Cox et al. 2000; Inoue et al. 2004; Lambert et al. 2001;

Xu et al. 2008; Greay, 2015). Asimismo, Mahboubi (2008) ha propuesto que piperitona puede generar una mayor permeabilidad a la membrana celular de los microorganismos.

Respecto del AT, en la investigación de Ossa-Tabares (2020) se menciona que sus principales componentes fueron el terpinen-4-ol (40 %), y-terpineno (22,6%), seguido del a-terpineno (10,5 %). El terpinen-4-ol ejerce su actividad antimicrobiana mediante la inhibición de ciertas enzimas clave en el metabolismo y replicación de los microorganismos, asimismo, interfiere con los sistemas de transporte de nutrientes y metabolitos, lo que afecta la capacidad de obtener nutrientes esenciales y eliminar desechos (López 2017). Además, se ha observado que este compuesto provoca fugas de iones de potasio y tiene la capacidad para desintegrar biopelículas (Cox et al. 2000; Cordeiro 2020). En concordancia con nuestra investigación, otros estudios han demostrado el potencial biocontrol de árbol de té en diferentes especies de *Prototheca* (*P. zopfii* y *P. wickerhamii*) logrando inhibiciones promedio de 3 cm y 3,2 cm respectivamente.

De manera similar, en el AA, los componentes mayoritarios son los monoterpenos oxigenados: linalol (37,39 %); eugenol (21,61%) y el 1,8-cineol, (5,26 %) (Rojas, 2012). El linalol causa daño estructural, provocando la fuga de macromoléculas intracelulares. Además, parece afectar la actividad de ciertas enzimas intracelulares, y además inhibe la ATPasa y deshidrogenasa de la cadena respiratoria (Guo, 2021). En la investigación de Ulanowska (2021) se ha mencionado que las propiedades antimicrobianas del eugenol se atribuyen al grupo OH libre en su estructura. También, se indica que se ha probado la eficiencia del eugenol en la eliminación de biopelículas bacterianas (Ulanowska, 2021).

Al considerar los compuestos principales de los aceites mencionados, tanto AG como AA comparten monoterpenos oxigenados como componentes principales, a diferencia del AT donde predomina un alcohol terpénico (Ossa-Tabares, 2020; Espinoza, H., y Pincay, 2021). Aunque todos los compuestos exhiben actividad antimicrobiana, el terpinen-4-ol y el eugenol se destacan por su amplio espectro de actividad y su eficacia bien documentada en estudios científicos (Carson, 2006; Nardoni, 2018; Ulanowska, 2021).

Ampliando el análisis, en virtud de los resultados obtenidos en el presente estudio, se aborda el trabajo de Grzesiak (2016), en el cual se reportó que los compuestos químicos más representativos en el AL son el linalol (34,1%) y acetato de linalilo (33,3%) Asimismo, en AR se identificaron 1,8 cineol (46,4 %), alcanfor (11,4 %) y apineno (11,0 %) (Grzesiak, 2016). Entre esos compuestos, el 1,8 cineol, también conocido como eucaliptol, ejerce su actividad antimicrobiana mediante la interferencia de procesos metabólicos clave como la biosíntesis de lípidos y proteínas, lo que afecta la capacidad del microorganismo para crecer

y reproducirse (Moo, 2021). Según los resultados mencionados anteriormente, tanto el AL como AR mostraron un menor grado de inhibición, con valores de $1,00 \pm 0,10$ cm y $1,67 \pm 0,15$ cm respectivamente. Estos hallazgos concuerdan con otros estudios, en donde se ha demostrado una actividad antibacteriana significativamente más baja en AL y AR (Lapinska, 2020).

La diferencia en el efecto inhibitorio de los AE podría radicar principalmente en que en aceites esenciales como AG, AT y AA, se ha encontrado una correlación directa y positiva entre la actividad antimicrobiana y el alto contenido de ciertos componentes químicos específicos conocidos por sus fuertes propiedades antimicrobianas individuales, mientras que en el caso de AL y AR, es probable que su capacidad antimicrobiana se deba a la interacción sinérgica entre varios componentes presentes en el aceite (Soković, 2010; Lapinska, 2020).

No obstante, es crucial destacar que las concentraciones específicas de cada compuesto son determinantes sobre su efecto. Generalmente, se ha observado que, a mayor concentración de una molécula en el aceite, existe mayor capacidad para inhibir el crecimiento microbiano. Además, cada compuesto también tiene un umbral mínimo necesario para mostrar actividad antimicrobiana efectiva (Carson, 2006). Por lo tanto, la concentración de piperitona (40,35%), terpinen-4-ol (40%), linalol (37,39 %) y eugenol (21,61%,) en los respectivos aceites (guaviduca, árbol de té, albahaca) reflejan sus resultados comparativos.

Los hallazgos del presente estudio ($4,93 \pm 0,95$ cm) mostraron una inhibición ligeramente superior a la reportada por Cuc et al. (2021). La discrepancia en los resultados de inhibición entre estudios podría atribuirse a las condiciones del ensayo, incluyendo el volumen menor de aceite utilizado (50 μ L) y el diferente medio de cultivo empleado (Agar glucosa). El volumen de aceite aplicado determina la cantidad de compuestos activos presentes en el medio de cultivo, teóricamente, a mayor volumen más compuestos se encuentran disponibles para difundirse en el medio y ejercer su acción inhibitoria (Carson, 2006).

Los compuestos combinados pueden exhibir un efecto sinérgico, mostrando en algunos casos una actividad mayor que cuando se encuentran individualmente (Gouvea et al., 2017). Sin embargo, en los ensayos realizados no se observó sinergismo, sino antagonismo, donde el efecto combinado fue menor que cuando los compuestos se aplicaron por separado (Koroch, 2007). Este fenómeno puede atribuirse a los efectos antagónicos entre monoterpenos oxigenados (linalol, terpinen-4-ol, eugenol) y no oxigenados (piperitona)

(Martillo, 1999). De manera general, la reducción de la efectividad global de la mezcla también se relaciona a la interferencia entre componentes, donde ambos pueden competir por los receptores y mecanismos de acción, como la alteración de la membrana celular (Burt, 2004). Además, al mezclar extractos, existe el riesgo de que la concentración efectiva de cada componente disminuya, diluyéndose entre sí y, por tanto, no conseguir la misma concentración individual necesaria para maximizar la efectividad (Brulé, 2014).

En cuanto a la combinación de AG y AT, ambos muestran una capacidad significativa de inhibición de forma individual y estadísticamente no difieren entre sí ($p < 0,05$). Sin embargo, las combinaciones no mostraron resultados suficientemente distintivos en comparación con los aceites que exhibieron el promedio más bajo en el estudio. Bassolé (2012) también destacó la importancia de las interacciones entre componentes y aceites esenciales en la actividad antimicrobiana contra varios microorganismos. Por lo tanto, los resultados sugieren que AG podría limitar o neutralizar los efectos de AT en la actividad antimicrobiana combinada, debido a interacciones químicas y modo de acción.

Al determinar la mínima concentración requerida para inhibir el desarrollo de *P. bovis*, tanto AG como AA mostraron los mismos valores de CMI correspondientes a 80 mg/mL. Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio de Grzesiak (2016), utilizando *Prototheca zopfii*, revelaron diferencias significativas. El AA evaluado por ese autor, presentó valores de CMI entre 4,5 y 5,5 $\mu\text{l/ml}$, indicando una sensibilidad moderada de *P. zopfii*. En esa misma investigación, AL mostró actividad inhibitoria en concentraciones de 6,0 a 8,5 $\mu\text{l/ml}$, mientras que AR exhibió la actividad antimicrobiana más baja, con valores entre 8,5 y 10,5 $\mu\text{l/ml}$ (Grzesiak, 2016), a comparación de la presente investigación en donde *P. bovis* llegó a desarrollarse en presencia de todas las concentraciones evaluadas de estos aceites. Estas variaciones resaltan las diferencias en la respuesta microbiana según la especie de *Prototheca* evaluada. El aceite de árbol de té, en cambio mostró un valor de CMI equivalente a 40 mg/mL, destacándose por su alta actividad antimicrobiana. En contraste, Tortorano et al.(2008), reportaron valores de CMI de 0,06 mg/mL de este AE sobre *P. wickerhamii* y 0.06 mg/mL sobre *P. zopfii*. Las variaciones en los valores de CMI entre estudios pueden deberse a varios factores, incluyendo la diversidad de especies y cepas de *Prototheca* evaluadas, así como la composición variable de los aceites esenciales. Por ejemplo, componentes químicos específicos como monoterpenos, fenoles y alcoholes pueden contribuir significativamente a la actividad antimicrobiana observada. Además, la resistencia microbiana puede ser influenciada por características genéticas que hacen ciertas

especies o cepas más o menos sensibles a los compuestos naturales (Sánchez et al., 2011; Zúñiga, 2023).

Aunque durante el tamizaje no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de los halos entre los aceites de AG y AT, al determinar la CMI se encontró que el aceite de árbol de té requirió concentraciones más bajas para inhibir el desarrollo de *Prototheca bovis*. A pesar de que AG pueda generar halos más extensos Esto no garantiza una concentración suficiente de compuesto activo para alcanzar una CMI baja. Por otra parte, AT contiene compuestos activos más potentes, como el terpinen-4-ol, que permite alcanzar una CMI baja (Rojas, 2014; Salamanca, 2016). Estudios previos han demostrado que concentraciones alrededor del 30%-40% ofrecen la máxima eficacia contra una amplia gama de microorganismos (Ossa, 2020).

Por otra parte, en los ensayos de tamizaje, el AA mostró una actividad significativamente inferior a la de AG, pero ambos requirieron de la misma concentración en la prueba de CMI. El tamizaje evalúa la capacidad de difusión de un agente antimicrobiano en un medio de cultivo para crear zonas de inhibición, lo cual puede estar influenciado por la eficacia de difusión del aceite en el agar (Herrera, 1999). La igualdad en los valores de CMI puede indicar que, a pesar de su baja cantidad, el eugenol presente en AA muestra una notable actividad antimicrobiana y antioxidante (Juliani, 2009).

Finalmente, dentro del enfoque de las potenciales formulaciones, mediante las que se aplicarían estos AE, no solo la eficacia de los productos, en términos de CMI, debe ser considerada sino también los posibles efectos adversos que estos productos podrían tener en los pacientes. Por ejemplo, el aceite esencial de árbol de té, puro y natural, según la Unión Europea contiene elementos irritantes en dosis elevadas, por lo que es necesario concentraciones bajas para su manipulación. La norma ISO 4730 establece los criterios físicos y químicos que debe cumplir un aceite esencial del árbol de té que tenga el quimiotipo idóneo.

6. CONCLUSIONES

La protothecosis, junto con la resistencia del agente causal a distintos antimicrobianos, constituyen un problema sanitario emergente, por lo tanto, se requieren alternativas terapéuticas. En busca de estas, se exploró el potencial de compuestos naturales como biocontroladores. El presente estudio, evaluó la capacidad de inhibición de ocho compuestos frente al desarrollo de *Prototheca bovis*.

Los ensayos de tamizaje revelaron que los extractos vegetales, en todas las formulaciones probadas, no exhibieron actividad inhibitoria. En contraste, los aceites esenciales demostraron ser más prometedores. Específicamente, los aceites de árbol de té, guaviduca o albahaca mostraron las mayores capacidades inhibitorias. A pesar de explorarse combinaciones entre estos aceites, no se observó sinergismo en ningún ensayo.

En términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se determinó que el aceite de árbol de té exhibió la mayor actividad antimicrobiana contra los aislados de *P. bovis*, seguido por guaviduca y albahaca, que requirieron CMIs más altas. En contraste, el aceite de romero y lavanda no mostraron los efectos esperados, sugiriendo la necesidad de explorar otros aceites con diferentes perfiles químicos y considerar también otras especies de *Prototheca* para futuras investigaciones.

Este estudio destaca la importancia de explorar compuestos naturales como potenciales agentes antimicrobianos contra *Prototheca bovis*, resaltando la variabilidad en la efectividad entre distintos tipos de extractos y aceites esenciales, subrayando la necesidad continua de investigaciones para desarrollar tratamientos efectivos frente a esta patología emergente en la ganadería.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia Española de Cooperación Internacional Para el Desarrollo (AECID). (2021). **IMPORTANCIA DE LA LECHE Y LOS PRODUCTOS LÁCTEOS COMO ALIMENTOS BÁSICOS Y ECONÓMICOS PARA LA NUTRICIÓN Y SALUD DE LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA Y DEL CARIBE.**
- Alsheikh, H. M. A., Sultan, I., Kumar, V., Rather, I. A., Al-Sheikh, H., Jan, A. T., and Haq, Q. M. R. (2020). Plant-Based phytochemicals as possible alternative to antibiotics in combating bacterial drug resistance. *Antibiotics*, 9(8), 480. doi:10.3390/antibiotics9080480
- Amaguaña, F., y Churuchumbi, E. (2018). **ESTANDARIZACIÓN FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis*).** Universidad Politécnica Salesiana.
- Armijo, A., Altarejos, J., and Salido, S. (2017). Phytochemicals and Biological Activities of Laurel Tree (*Laurus nobilis*).
- Avello Lorca, M., López Canales, C., Gatica Valenzuela, C., Bustos Concha, E., Brieva Chait, A., Pastene Navarrete, E., & Bittner Berner, M. (2012). Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962012000100008&script=sci_arttext
- Ávila, N. de D., Tirado-Gallegos, J. M., Rios-Velasco, C., Luna Esquivel, G., Estrada Virgen, M. O., y Cambero Campos, O. J. (2023). Propiedades composicionales, estructurales y fisicoquímicas de las semillas de aguacate y sus potenciales usos agroindustriales. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 24(1). doi:10.21930/rcta.vol24_num1_art:2607
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Efectos biológicos de los aceites esenciales: una revisión. *Química de los alimentos. Toxico.* 2008, 46, 446–475
- Balouiri, M., M. Sadiki, and S.K. Ibsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharma. Anal.* 6(2):71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Barla, A., Topcu, G., Oksuz, S., Tumen, G., and Kingston, D.G.I. (2007). Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. *Food Chemistry*, 104, 1478–1484
- Bassolé, I. H. N., and Juliani, H. R. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 17(4), 3989-4006. doi: 10.3390/molecules17043989
- Beltrán Cifuentes, M. C., Cantillo Maldonado, M. P., y Vivas Castaño, A. M. (2013). Actividad antibacteriana de los aceites obtenidos de *Ocimum basilicum* L. var. *cinammom*, *O. album*, *O. thyrsoflorum*, para uso potencial en fitocosmética. *Investigaciones Andina*, 15(27), 798-810. [fecha de Consulta 23 de junio de 2024]. ISSN: 0124-8146. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=239028092006>

- Bermúdez-Vásquez, M. J. (2019). *Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de Psidium guajava y Cymbopogon citratus*. Recuperado de: https://www.redalyc.org/journal/437/43757673010/html/#redalyc_43757673010_ref4
- Borges, R. M., Perera, O. F., Hernández, E. A., Abascal, V. L., Arana, O. E., y Queral, G. B. (2022). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de Moringa oleifera Lam. cultivada en Cuba. *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*. Recuperado de: <https://doaj.org/article/e8ef0270fe1043f5b92146e61d0d0d4a>
- Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., and Carvalho, J. C. T. (2019). Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of ethnopharmacology*, 229, 29–45. doi:[10.1016/j.jep.2018.09.038](https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038)
- Bouari, C., Catoi, C., Nicodim, F., Sorin, R., Nadas, G., Pompei, B., Taulescu, M., Gal, A., Tabaran, F., Nagy, A., Borza, G., and Moussa, R. (2010). The Inhibitory Effect of Some Natural Essential Oils upon Prototheca Algae in vitro Growth. *Veterinary Medicine*, 67(1).
- Brassel, F., Hidalgo, F., Ruiz, P., Chauveau, C., Cadena, M., Mayorga, M., Salgado, V., Mosquera, M., y Castro, J. (2007). *LIBRE COMERCIO Y LÁCTEOS: LA PRODUCCIÓN DE LECHE EN EL ECUADOR ENTRE EL MERCADO NACIONAL Y LA GLOBALIZACIÓN* (SIPAE).
- Brulé Guiñez, P. A. (2014). *ACTIVIDAD INHIBITORIA IN VITRO DE ACEITES ESENCIALES FRENTE AL ALGA PROTOTHECA SPP., PERTENECIENTE A LA FAMILIA CHLORELLACEAE*. [Tesis de Grado]. Universidad Austral de Chile.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal Of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022)
- Calderón H, Vera N, Zura L, Muñoz L. Basil seeds as a novel food, source of nutrients and functional ingredients with beneficial properties: A review. *Foods*. 2021; 10: 1467.
- Calvinho, L., y Gianre, V. (2013, 20 mayo). *Mastitis por prototheca zopfii: características principales, diagnóstico y control*. Engormix. Recuperado de: https://www.engormix.com/lecheria/mastitis-infecciones-ubre/mastitis-prototheca-zopfii-caracteristicas_a30165/
- Caneschi, A., Bardhi, A., Barbarossa, A., and Zaghini, A. (2023). Plant Essential Oils as a Tool in the Control of Bovine Mastitis: An Update. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 8). MDPI. doi:[10.3390/molecules28083425](https://doi.org/10.3390/molecules28083425)
- Carson, C. F., Hammer, K. A., and Riley, T. V. (2006). Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical microbiology reviews*, 19(1), 50–62. doi:[10.1128/CMR.19.1.50-62.2006](https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006)
- Cecilia, M., Cifuentes, B., Pía, M., Maldonado, C., Maritza, A., and Castaño, V. (2013). Antibacterial activity of oils from Ocimum basilicum L. var. cinammom, O. album O.

thyriflorum, for potential use in phytocosmetics. *Resumen INVESTIGACIONES ANDINA*. No, 27, 15–134.

- Cedeño, A., Moreira, C., Muñoz, J., Muñoz, A., Pillasaguay, S., y Riera, M. A. (2019). COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE DESTILACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO. *Revista Colón Ciencias, Tecnología Y Negocios*, 6(1), 1–13. Recuperado a partir de https://revistas.up.ac.pa/index.php/revista_colon_ctn/article/view/472
- Corona-Gómez, L., Hernández-Andrade, L., Mendoza-Elvira, S., Suazo, F. M., Ricardo-González, D. I., and Quintanar-Guerrero, D. (2022). In vitro antimicrobial effect of essential tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*), thymol, and carvacrol on microorganisms isolated from cases of bovine clinical mastitis. *International journal of veterinary science and medicine*, 10(1), 72–79. doi:10.1080/23144599.2022.2123082
- Cortés, M. V., Schang, S., y Daglio, M. C. (2015). Descripción de un caso de mastitis bovina por *Prototheca* spp. en un tambo de la cuenca Mar y Sierras [Tesis de grado]. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
- Cowan M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564–582. doi:10.1128/CMR.12.4.564
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., and Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*, 88(1), 170–175. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x
- Cuc, c., Cătoi, c., Fiț, n., Răpuntean, s., Nadăș, g., Bolfă, p., Taulescu, m., Gal, a., Tăbăran, f., Nagy, a., Borza, g., and Moussa, r. (2021). The Inhibitory Effect of Some Natural Essential Oils upon *Prototheca* Algae in vitro Growth. *Veterinary Medicine*, 67(1). Recuperado de: https://www.academia.edu/60747541/The_Inhibitory_Effect_of_Some_Natural_Essential_Oils_upon_Prototheca_Algae_in_vitro_Growth
- Cuéllar G, O., y Guerrero A, G. (2012). Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, *Theobroma cacao* L. *Revista MVZ Córdoba*, 17(3), 3176-3183.
- Cushnie, T. P., and Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343–356. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002
- Danh, L. T., Triet, N. D. A., Han, L. T. N., Zhao, J., Mammucari, R., and Foster, N. R. (2012). Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender essential oil extracted by supercritical CO₂. *The Journal Of Supercritical Fluids*, 70, 27-34. doi: 10.1016/j.supflu.2012.06.008
- Dobros, N., Zawada, K. D., and Paradowska, K. (2022). Phytochemical Profiling, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Plants Belonging to the *Lavandula* Genus. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(1), 256. doi:10.3390/molecules28010256

- Espinoza, H., y Pincay, G. (2022). RELACIÓN DEL EXTRACTO DE Piper carpunya Y Momordica charantia SOBRE LA INHIBICIÓN DE PATÓGENOS IN VITRO Y EL TIPO DE INTERACCIÓN.
- Freitas, CH, Mendes, JF, Villarreal, PV, Santos, PR, Gonçalves, CL, Gonzales, HL, Nascente, PS, 2018. Identificación y perfil de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis bovina en granjas lecheras de Pelotas, Rio Grande do Sul. Braz. J. Biol. 78, 661–666.
- Galindo Tovar, M. E., Lee Espinosa, H. E., Murguía González, J., Leyva Ovalle, O. R., y Landero Torres, I. (2013). Domesticación y distribución geográfica de *Persea americana* Mill. en la época precolombina. Revista de Geografía Agrícola, (50-51), 65-70.
- Gonçalves, J. L., Lee, S. H. I., De Paula Arruda, E., Galles, D. P., Caetano, V. C., De Oliveira, C. A. F., Fernandes, A. M., and Santos, M. V. D. (2015). Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. Journal Of Dairy Science, 98(6), 3613-3621. doi:10.3168/jds.2014-9248
- Gouvea, F., Rosenthal, A., Ferreira, EH, 2017. Extracto de plantas y aceites esenciales añadidos como antimicrobianos para los quesos: una revisión. Ciencia. Rural 47, e20160908.
- Greay, S.J., Hammer, K.A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. Phytochem Rev 14, 1–6 (2015). doi: 10.1007/s11101-011-9212-6
- Grzesiak, B., Głowacka, A., Krukowski, H., Lisowski, A., Lassa, H., and Sienkiewicz, M. (2016). The In Vitro Efficacy of Essential Oils and Antifungal Drugs Against *Prototheca zopfii*. Mycopathologia, 181(7-8), 609-615. doi:10.1007/s11046-016-9994-6
- Guaña Tarco, G. T., y Guevara, J. (2022, 12 diciembre). Aplicación de extractos obtenidos a partir de chilca (*baccharis latifolia*) y pumin (*salvia squalenss*) para reducir microorganismos patógenos. Recuperado de: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/10150>
- Guo, F., Chen, Q., Liang, Q., Zhang, M., Chen, W., Chen, H., Yun, Y., Zhong, Q., and Chen, W. (2021). Antimicrobial Activity and Proposed Action Mechanism of Linalool Against *Pseudomonas fluorescens*. Frontiers in microbiology, 12, 562094. doi: 10.3389/fmicb.2021.562094
- Hemeg, H. A., Moussa, I. M., Ibrahim, S., Dawoud, T. M., Alhaji, J. H., Mubarak, A. S., Kabli, S. A., Alsubki, R. A., Tawfik, A. M., and Marouf, S. A. (2020). Efecto antimicrobiano de diferentes extractos de plantas a base de hierbas contra diferentes poblaciones microbianas. *PubMed Central*, 27(12), PMC7714981. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.08.015
- Herencia, D. S., and Mamani-Mango, G. (2022). Mastitis subclínica bovina y factores de riesgo ambientales en pequeños productores de ganado lechero criado en alta montaña. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 33(1), e20466. doi: 10.15381/rivep.v33i1.20466
- Hernández-Barrera J, Angarita-Merchán M, Benavides-Sánchez D, Prada-Quiroga C. Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá. *Revista Investig.Salud Univ. Boyacá*. 2015;2:162-176.

Hillerton, JE; Kliem, KE Tratamiento eficaz de la mastitis clínica por *Streptococcus Uberis* para minimizar el uso de antibióticos. *J. Ciencia láctea*. 2002,85, 1009-1014.

Huilca-Ibarra, M. P., Vasco-Julio, D., Ledesma, Y., Guerrero-Freire, S., Zurita, J., Castillejo, P., Blasco, F. B., Yanez, L., Changoluisa, D., Echeverría, G. A., Bastidas-Caldes, C., and De Waard, J. H. (2022). High prevalence of *Prototheca bovis* infection in dairy cattle with chronic mastitis in Ecuador. *Veterinary Sciences*, 9(12), 659. doi:10.3390/vetsci9120659

Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H., and Shimada, J. (2004). The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS microbiology letters*, 237(2), 325–331. doi:10.1016/j.femsle.2004.06.049

International Organization for Standardization. ISO 4730:2004. Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil). International Organization for Standardization, Geneva: WHO; 2004. Disponible en <https://www.sis.se/api/document/preview/905205/>

Jánosil, S., Szigeti, G., Rátz, F., Laukó, T., Kerényi, J., Tenk, M., Katona, F., Huszenicza, A., Kulcsár, M., and Huszenicza, G. (2001). Epidemiology: *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. *The Veterinary Quarterly*, 23(2), 80-83. doi:10.1080/01652176.2001.9695087

Jara, A. V. C., y Gómez, C. R. G. (2018). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. En *instname:Universidad de Cuenca*. Recuperado de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2483>

Jaramillo, V. (2020). Evaluación de propiedades antibacterianas y antifúngicas de aceites esenciales.

Juliani, H.R.; Koroch, A.R.; Simon, J.E. Chemical Diversity of Essential Oils of *Ocimum* species and Their Associated Antioxidant and Antimicrobial Activity. In *Essential Oils and Aromas: Green Extractions and Applications*; Chemat, F., Varshney, V.K., Allaf, K., Eds.; Har Krishan Bhalla and Sons: Dehradun, India, 2009

Kher, MN; Sheth, NR; Bhatt, VD Evaluación antibacteriana in vitro de *Terminalia Chebula* como alternativa a los antibióticos contra la mastitis subclínica bovina. *Animación. Biotecnología*.2019,30, 151-158.

Koroch, A.; Juliani, H.R.; Zygadlo, J.A. Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In *Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*; Berger, R.G., Ed.; Springer Verlag: Berlin, Germany, 2007; pp. 87–115

Kruze, J. (2015). *Patógenos mamarios emergentes: Mycoplasma y Prototheca, con especial referencia a Chile*.

Ksouri, S., Djebir, S., Bentorki, A. A., Gouri, A., Hadeif, Y., and Benakhla, A. (2017). Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal de mycologie medicale*, 27(2), 245–249. doi:10.1016/j.mycmed.2017.03.004

- Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., and Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453–462. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x
- Lapinska, B., Szram, A., Zarzycka, B., Grzegorzczak, J., Hardan, L., Sokolowski, J., and Lukomska-Szymanska, M. (2020). An In Vitro Study on the Antimicrobial Properties of Essential Oil Modified Resin Composite against Oral Pathogens. *Materials* (Basel, Switzerland), 13(19), 4383. doi:10.3390/ma13194383
- Lopes, T. S., Fontoura, P. S., Oliveira, A., Rizzo, F. A., Silveira, S., and Streck, A. F. (2020). Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 131, pp. 186–193). Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.04.025
- López Luengo, T. (2008). El romero. Planta aromática con efectos antioxidantes. *Elsevier*, 27(7), 60-63. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-el-romero-planta-aromatica-con-13124840#:~:text=Este%20arbusto%2C%20propio%20de%20zonas,son%20Espa%C3%BA%20Marruecos%20y%20T%C3%BAnez>.
- López Medina, D. C. (2022). *Plantas andinas y amazónicas del Ecuador con actividad antimicrobiana*. Universidad Técnica de Ambato.
- López-Mata, M.A., Valbuena-Gregorio, E., Quihui-Cota, L., Morales-Figueroa, G.G., Ruiz-Cruz, S., Campos-García, J. C., Díaz-Meza, E., y Pablos-Rodríguez, D.E.. (2017). Efecto de Microemulsiones de Aceites Esenciales Sobre el Eritrocito Humano y Bacterias Patógenas. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 38(1), 247-254. doi:10.17488/rmib.38.1.19
- Mahboubi, M., and Haghi, G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of ethnopharmacology*, 119(2), 325–327. doi:10.1016/j.jep.2008.07.023
- Marques S., Silva E., Carvalheira J., Thompson G. Short communication: Temperature sensibility of *Prototheca blaschkeae* strains isolated from bovine mastitic milk. *Journal of Dairy Science* Vol. 93 No. 11, 2010. Págs. 5110- 5113. Recuperado de: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(10\)00551-5/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(10)00551-5/fulltext)
- Martillo, KA; Carson, CF; Riley, TV Actividad antimicrobiana de aceites esenciales y otros extractos de plantas. *J. Aplica. Microbiol.* 1999 , 86 , 985–990.
- Mestanza, J., y Armas, E. (2014). Efecto del extracto acuoso de la *Ocimum basilicum* L. (albahaca) en el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*. *Revista ECI Perú*, 10(2).
- Moo, CL., Osman, M.A., Yang, SK. et al. Antimicrobial activity and mode of action of 1,8-cineol against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* 11, 20824 (2021). doi:10.1038/s41598-021-00249-y
- Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Pérez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordóñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., and Zaragoza-Bastida, A. (2023). Bovine mastitis, a Worldwide impact Disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Veterinary and Animal Science*, 21, 100306. doi:10.1016/j.vas.2023.100306

- Mora-Villa, A., Serrano-Parrales, R., Lira-Saade, R., Jiménez-Estrada, M., y Hernández-Delgado, T. (2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de *leucaena esculenta* y *leucaena leucocephala* recolectadas en Tlayacapan, Morelos, México. *Polibotánica*, 0(52). doi:10.18387/polibotanica.52.12
- Nardoni, S., Pisseri, F., Pistelli, L., Najar, B., Luini, M., and Mancianti, F. (2018). In Vitro Activity of 30 Essential Oils against Bovine Clinical Isolates of *Prototheca zopfii* and *Prototheca blaschkeae*. *Veterinary sciences*, 5(2), 45. doi:10.3390/vetsci5020045
- Noori, S., Rahchamani, R., Kohsar, J. B., and Binabaj, F. B. (2019). Efecto antibacteriano de los aceites esenciales de *Lavandula stoechas* y *Origanum majorana* contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*, 11(1), 35-41. doi: 10.22067/veterinary.v1i11.77679
- Ortuño, W. (2019). DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*) PARA EL CONTROL DE LA *Xanthomona sp.*, EN CONDICIONES *in vitro*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Ossa-Tabares, J. C., Llanos, C. J., and García, A. M. (2020). Evaluation of tea tree oil physicochemical features and its antimicrobial activity against *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC 6919. Evaluación de las características fisicoquímicas y de la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té contra *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC 6919. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 40(4), 693–701. doi:10.7705/biomedica.5122
- Oussalah, M., Caillet, S., and Lacroix, M. (2006). Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory Essential Oils against Cell Membranes and Walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal Of Food Protection*, 69(5), 1046-1055. doi:10.4315/0362-028x-69.5.1046
- Pasca, C.; METROarghitas,, Los Ángeles; Dezmirean, D.; Bob es., O.; Bonta, V.; METROargaOan, R.; Chirila,F.; Fit, N. Evaluación de la actividad antibacteriana de algunos extractos de plantas en la microflora normal y patógena de la leche. *Ciencia. Papilla. Animación. Ciencia. Biotecnología*. 2015,48, 166-172.
- Pérez, B. R., Martínez, M. M. C., Penieres-Carrillo, J. G., y Sánchez, T. A. C. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, 30, 1-30. doi:10.15174/au.2020.2435
- Proskurnicka, A., Żupnik, K., Bakula, Z., Iskra, M., Rösler, U., and Jagielski, T. (2023). Drug susceptibility profiling of *Prototheca* species isolated from cases of human protothecosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(4). doi:/10.1128/aac.01627-22
- Quílez A, Berenguer B, Gilardoni G, Souccar C, de Mendonça S, Oliveira LFS, et al. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of 78 several fractions isolated from *Piper carpubunya* Ruiz & Pav. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;128(3):583-9.

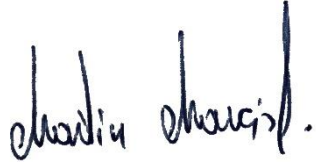
- Quintana Guillén, K. E. (2013). *Evaluación de la Actividad Gastroprotectora de los Extractos de Achillea (Achillea millefolium) y Guaviduca (Piper carpunya Ruiz & Pav.) en Ratas (Rattus norvegicus) con Lesiones Gástricas Inducidas* [Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Recuperado de: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2601>
- Radaelli, M., Da Silva, B. P., Weidlich, L., Hoehne, L., Flach, A., Da Costa, L. A. M. A., and Ethur, E. M. (2016). Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 47(2), 424-430. doi: 10.1016/j.bjm.2015.10.001
- Ramírez, P. (2013). *EL CACAO: AYER, HOY Y SIEMPRE EN EL DESARROLLO SOCIOECONÓMICO Y CULTURAL DEL MUNDO, NORTE DE SANTANDER Y CÚCUTA COCOA: YESTERDAY, TODAY AND ALWAYS IN THE SOCIO-ECONOMIC DEVELOPMENT AND CULTURAL WORLD OF NORTE DE SANTANDER AND CÚCUTA*. Recuperado de: http://www.edualter.org/material/explotacion/unidad5_2.htm
- Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N. R., ... Marques, A. (2012). *Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel Laurus nobilis Linnaeus (Lauraceae) from Portugal*. *Natural Product Research*, 26(6), 518–529. doi:10.1080/14786419.2010.531478
- Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N. R., ... Marques, A. (2012). *Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel Laurus nobilis Linnaeus (Lauraceae) from Portugal*. *Natural Product Research*, 26(6), 518–529. doi:10.1080/14786419.2010.531478
- Ríos, J. L., and Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 80–84. doi:10.1016/j.jep.2005.04.025
- Rivas, K., Rivas, C., y Gamboa, L. (2015). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Multiciencias*, 15(3), 281-289.
- Rója E., Gagoś, M., y Dobrzyńska-Inger, A. (2012). Cost optimization of extract production in supercritical extraction process with the use of CO₂ - A novel approach. *Procedia Engineering*, 42, 323–328. doi:10.1016/j.proeng.2012.07.423
- Rojas Fernández, Miriam M., Corzo López, Mylene, Sánchez Pérez, Yaima, Brito, Deyamín, Montes de Oca, Rodney, Martínez, Yadira, y Pino Pérez, Oriela. (2014). Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Revista de Protección Vegetal*, 29(3), 197-203. Recuperado en 24 de junio de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000300006&lng=es&tlng=es.
- Rojas, M. M., Sánchez, Y., Abreu, Y., Espinosa, I., Correa Ii, T. M., y Pino, O. (2012). Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *genovese* L. In *Rev. Protección Veg* (Vol. 27, Issue 2).

- Rojas, Miriam M, Sánchez, Yaíma, Abreu, Yudith, Espinosa, Ivette, Correa, Teresa M, y Pino, Oriela. (2012). Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *genovese* L.. *Revista de Protección Vegetal*, 27(2), 130-134. Recuperado en 21 de junio de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000200010&lng=es&tlng=es.
- Rojie, M., Hussain, N., and Rukayadi, Y. (2023, 2 agosto). *Effects of Candida Sp. and Blastobotrys sp. starter on fermentation of cocoa (Theobroma cacao L.) beans and its antibacterial activity - Journal of Pure and Applied Microbiology*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. <https://microbiologyjournal.org/effects-of-candida-sp-and-blastobotrys-sp-starter-on-fermentation-of-cocoa-theobroma-cacao-l-beans-and-its-antibacterial-aactivity/>
- Rondon, M., Velasco, J., Cornejo, X., and Morocho, V. (2016). Chemical composition and antibacterial activity of *Piper lenticillosum* C.D.C essential oil collected in. . . ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/307619832_Chemical_composition_and_antibacterial_activity_of_Piper_lenticillosum_CDC_essential_oil_collected_in_Ecuador
- Sánchez, Y., Correa, T. M., Abreu, Y., Martínez, B., Duarte, Y., y Pino, O. (2011). CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper marginatum* Jacq. *Revista de Protección Vegetal*, 26(3), 170-176. Recuperado de <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/150>
- Scalvenzi L, Yaguache B, Cabrera P, and Guerrini A. (2016). Actividad antifúngica in vitro de aceites esenciales de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. y *Piper aduncum* L.. *Bioagro*, 28(1), 039-046. Recuperado en 19 de abril de 2024, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612016000100005&lng=es&tlng=es.
- Scalvenzi, L., Yaguache, B., Guerrini, A., Radice, M., y Chiurato, M. (2016). Efectos de los aceites esenciales amazónicos de *Citrus limon* y *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos. *Revista Amazónica. Ciencia y Tecnología*, 5(3), 206-217. Recuperado de: <https://revistas.uea.edu.ec/index.php/racyt/article/view/70/73>
- Sinche Serra, S. S. M., y Vargas Jentsch, V. J. P. (2019). *PII-DCN-2019-01 - Estudio del efecto de la irradiación sobre las características físico-químicas y la actividad biológica de aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas cultivadas en Ecuador*. Recuperado de: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/24087>
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., and van Griensven, L. J. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules* (Basel, Switzerland), 15(11), 7532–7546. doi:10.3390/molecules15117532
- Subirats, J.; Domingues, A.; Topp, E. ¿El consumo dietético de antibióticos por parte de los seres humanos promueve la resistencia a los antibióticos en el microbioma intestinal? *Prot. de Alimentos*.2019,82, 1636-1642.
- Sykes, J. E. (2023). Prototecosis y Clorolosis. En *Enfermedades infecciosas del perro y el gato de Greene* (5.ª ed.). Jane E. Sykes. doi:10.1016/C2014-0-03934-2

- Tan, MC, Tan, CP, Ho, CW, 2013. Efectos del sistema de extracción con disolvente, tiempo y temperatura sobre el contenido fenólico total de la henna (*Lawsonia inermis*) tallos. En t. Res.alimentaria. J. 20, 3117–3123.
- Tariq, S.; Wani, S.; Rasool, W.; Shafi, K.; Bhat, MA; Prabhakar, A.; Shalla, AH; Más bien, MA Una revisión completa del potencial antibacteriano, antifúngico y antiviral de los aceites esenciales y sus componentes químicos contra patógenos microbianos resistentes a los medicamentos. *Microbio. Pato.*2019,134, 103580
- Tashakkori, N., Rahmani, H. K., and Khoramian, B. (2022). Genotypic and phenotypic diversity of *Prototheca spp.* recovered from bovine mastitis in terms of antimicrobial resistance and biofilm formation ability. *BMC Veterinary Research*, 18(1). doi:10.1186/s12917-022-03546-4
- Tomar, O., Akarca, G., Gök, V., and Ramadan, M. F. (2020). Composition and antibacterial effects of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(2), 414-421. doi:10.1080/0972060x.2020.1768903
- Tortorano, A. M., Prigitano, A., Dho, G., Piccinini, R., Dapra, V., and Viviani, M. A. (2008). In vitro activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy/Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1312-1314. doi: 10.1093/jac/dkn107
- Ulanowska, M., and Olas, B. (2021). Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol-A Review. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3671. doi: 10.3390/ijms22073671
- Universidad Técnica de Machala [UTMACH]. (2019). Mastitis Bovina (1.a ed.) [Publicación digital]. UTMACH. Recuperado de: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15205/1/MASTITIS-BOVINA.pdf>
- Vissio, C., Agüero, D., Raspanti, C. G., Odierno, L. M., and Larriestra, A. (2015). Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 47(1), 7-14. doi:10.4067/s0301-732x2015000100003
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S., and Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology*, 47(3), 174–179. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x
- Yang, W.-T.; Ke, C.-Y.; Wu, W.-T.; Lee, RP; Tseng, Y.-H. Tratamiento eficaz de la mastitis bovina con infusión intramamaria de extractos de *Angelica Dahurica* y *Rheum Officinale* Complemento basado en Evid. Alternativo. *Medicina. ECAM*2019,2019, 7242705.
- Zúñiga Carrasco, I. R., y Caro Lozano, J. (2023). Prototecosis: un padecimiento olvidado por el personal de salud. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 36(1), 7–10. doi:10.35366/110807
- Zúñiga CIR, Caro LJ. Prototecosis: un padecimiento olvidado por el personal de salud. *Rev Latin Infect Pediatr.* 2023;36(1):7-10. doi:10.35366/110807

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Abigail VR', is positioned above a horizontal line. The signature is written in a cursive style with a large initial 'A' and a stylized 'VR' at the end.

Firma de la estudiante
Lydia Abigail Vinueza Brazales
Quito, 28/06/2024



Firma del director/a de disertación

Dr. Martín Sebastián Marcial Coba

Quito, 28/06/2024

Firma de la coordinadora de carrera

Dra. Diana Astorga

Quito, 28/06/2024