

Universidad Nacional de Río Cuarto  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE**  
*Minthostachys verticillata* **FRENTE A**  
*Paenibacillus larvae*,  
**AGENTE CAUSAL DE LOQUE AMERICANA**

**Tesis de grado**  
**Denise Virginia Pérez**  
**2010**

El presente Trabajo Final realizado en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, se presenta como requerimiento para optar el título de MICROBIÓLOGA.

Presentado por: **Denise Virginia Pérez**

Directora: **Mónica Finola**

Codirectora: **María Juliana González**

Aprobado por el jurado:

**Daniela Lombardo**

**Juan Miguel Marioli**

## Agradecimientos

- *A Dios y a mis padres por darme la vida y brindarme los consejos más sabios para vivirla.*
- *A mi madre, que a pesar de todas las adversidades que nos ha tocado vivir, nunca bajó los brazos y me dió su apoyo en todo momento.*
- *A Diego, por darme las fuerzas para seguir adelante estando siempre a mi lado y por ser esa persona maravillosa a la que amo tanto.*
- *A la familia Capriccio, a quien considero mi segunda familia, por tolerar en cada encuentro, interminables charlas sobre bacterias y parásitos escuchándome con mucha paciencia.*
- *A mi hermana Verónica, por haberme enseñado el mundo de la Microbiología y lo importante que es el desafío de estudiar en una universidad ;como así también por haberme permitido disfrutar del crecimiento de sus hijos.*
- *A mi amiga Victoria, por ser mi amiga de toda la vida, compartiendo junto a mí pequeños y grandes momentos.*
- *A mis amigas y compañeras de estudio, Noelia, Estefanía, Romina, Claudia, Ayelen, Betiana y Natalia por haber seguido conmigo el largo y difícil camino hacia este momento tan feliz para mí.*
- *A mi Directora y Co-directora por haberme brindado sus conocimientos y experiencias para el desarrollo de este trabajo final, además de ser excelentes personas para conmigo.*
- *Al los miembros del jurado por haber hecho posible este escrito a través de su evaluación y honrarme con su presencia en este día.*
- *A la Universidad Nacional de Río Cuarto por haberme otorgado la posibilidad de formarme y capacitarme académicamente.*
- *A San Expedito, el santo de las causas justas y urgentes, por haber escuchado mis oraciones y agradecimientos durante todos estos años.*

*Eternamente agradecida a todos.*

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.1 ABEJAS	1
1.1.1 CARACTERISTICAS:	1
1.1.2 CICLO DE VIDA DE UNA ABEJA:	2
1.1.3 ENFERMEDADES DE LAS ABEJAS:	3
1.2 LOQUE AMERICANA	4
1.2.1 CARACTERISTICAS:	4
1.2.2 PATOGENIA:	4
1.2.3 SINTOMAS:	5
1.2.4 AGENTE CAUSAL:	7
1.2.5 DIAGNOSTICO:	8
1.2.6 TRATAMIENTO Y PROFILAXIS:	10
1.3 PLANTAS AROMATICAS DE USO MEDICINAL:	12
1.3.1 DEFINICION:	12
1.3.2 LAS PLANTAS AROMATICAS A TRAVES DEL TIEMPO:	12
1.3.3 USOS DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS:	13
1.4 <i>Minthostachys verticillata</i>	14
1.4.1 DESCRIPCION DE LA ESPECIE VEGETAL:	14
1.4.2 PRINCIPALES COMPONENTES QUÍMICOS:	15
1.4.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y USOS:	15
1.5 ANTECEDENTES DEL TEMA DE TRABAJO:	16
<b>2. HIPOTESIS:</b>	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVOS:</b>	<b>17</b>
3.1 Objetivo General:	17
3.2 Objetivos Específicos:	17
<b>4. MATERIALES:</b>	<b>18</b>
4.1 Medio de cultivos para aislamiento de <i>Paenibacillus larvae</i>	18
4.2 Reactivos para la identificación de <i>Paenibacillus larvae</i>	18
4.2.1 Colorantes para coloración de Gram	18
4.2.2 Reactivos y materiales para Tinción Negativa	18
4.2.3 Reactivo para prueba de catalasa	18
4.3 Cepas de <i>Paenibacillus larvae</i>	19
4.4 Solventes para la obtención de los extractos vegetales	19
4.5 Diluyente de los extractos y AE utilizado en ensayos de actividad antibacteriana	19
4.6 Cromatografía de capa delgada (TLC)	19
4.7 Reactivos para revelar cromatofolios:	20
4.8 Colorante utilizado en el ensayo de Bioautografía:	20
<b>5. METODOLOGIA:</b>	<b>21</b>
5.1 <i>Paenibacillus larvae</i>	21
5.1.1 Identificación	21
5.1.2 Mantenimiento y conservación de cepas	22
5.2 <i>Minthostachys verticillata</i>	22
5.2.1 Recolección y procesamiento del material vegetal	22
5.2.2 Obtención de extractos vegetales	22
5.2.3 Obtención de Aceite esencial (AE) (De Feo et al., 1998)	23
5. 3 Ensayo de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales y aceite esencial	24
5.4 Ensayo de Cromatografía en capa delgada (TLC)	25
5.5 Ensayo de Bioautografía	25
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
6.1 <i>Paenibacillus larvae</i> :	27



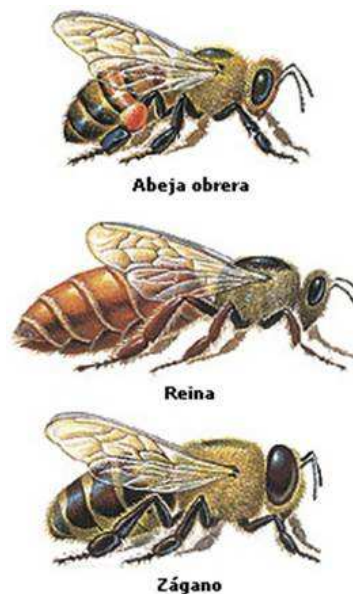
6.1.1 Identificación de <i>Paenibacillus larvae</i> :	27
6.1.2 Mantenimiento y conservación de cepas:	28
6.2 <i>Minthostachys verticillata</i>	29
6.2.1 Recolección y procesamiento del material vegetal	29
6.2.2 Obtención de productos vegetales	31
6.2.3 Obtención de Aceite esencial (AE)	31
6.3 Ensayo de la actividad antibacteriana de extractos vegetales de <i>M. verticillata</i> :	32
6.4 Ensayo de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> :	42
6.5 Ensayos de Cromatografía en capa delgada (TLC) y Bioautografía	44
<b>6. CONCLUSIONES:</b>	<b>49</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA:</b>	<b>51</b>

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 ABEJAS

### 1.1.1 CARACTERISTICAS:

Las abejas son insectos sociales de la especie *Apis mellifera* perteneciente al Orden Hymenoptera (Jean-Prost, et al., 2007). Antiguamente como se creía que la abeja transportaba la miel de las plantas a la colmena, se la denominó “mielífera” o melífera (que lleva miel). Estudios posteriores demostraron que la abeja produce la miel a partir del néctar de las flores, por lo que el término más correcto sería “melífica” (que produce miel). Es un insecto que no puede sobrevivir mucho tiempo solo si no forma parte de una colonia o familia. El hogar de las abejas se llama colmena. Sus habitantes son: una sola abeja reina (hembra), los zánganos (machos) y las abejas obreras (hembras) (Figura 1).



**Figura 1:** Habitantes de una colmena de *Apis mellifera*..

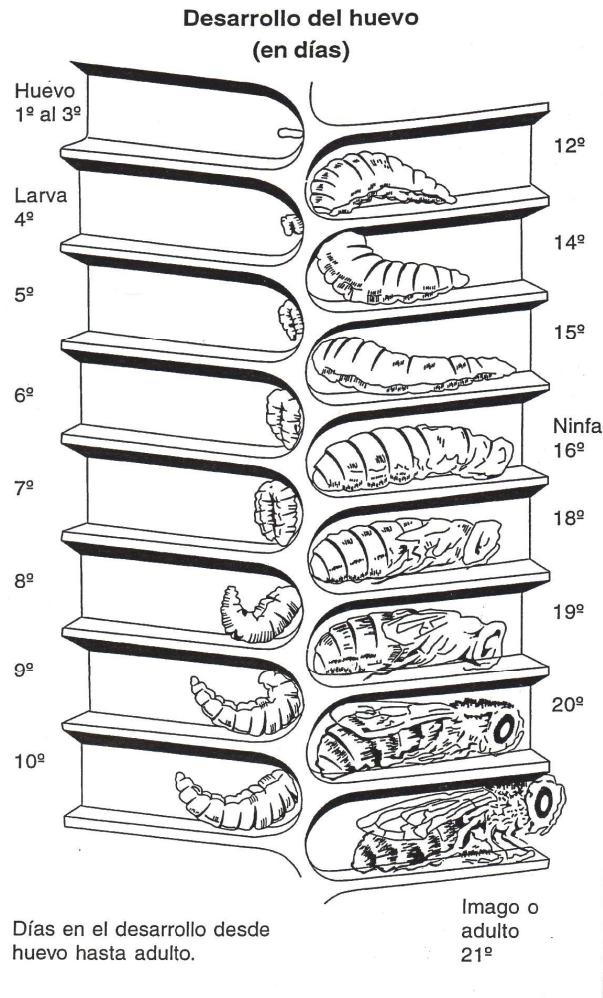
Las obreras se encargan de pecorear (recolectar los alimentos de las flores). Las restantes trabajan dentro de la colmena, en su mayoría alimentando a las crías. Como la reina es la única hembra que queda fecundada, es la única madre de las abejas obreras (hembras con los órganos sexuales atrofiados, por lo que no pueden ser fecundadas) y de

otras reinas, criadas para reemplazarla. Los zánganos nacen de huevos no fecundados de reina (esto se llama “partenogénesis”, que significa “nacido de virgen”).

### **1.1.2 CICLO DE VIDA DE UNA ABEJA:**

La abeja reina es la única que pone huevos, éstos pueden ser fecundados (lo cuales dan origen a las hembras) o no fecundados que dan origen a los machos. El huevo que deposita la reina se transforma en larva y posteriormente en ninfa. Cuando concluye esta etapa, nace la abeja alada (Figura 2).

- **Huevo:** es un cilindro de 0,3 mm de diámetro y 1,5 mm de longitud. La reina introduce el huevo en la celda, de modo que el extremo mas afilado queda tocando el fondo de la celda. El otro extremo del huevo tiene un orificio, el micropilo, por donde pasa un espermatozoide cuando es fecundado. El huevo permanece vertical el primer día, se inclina el segundo y al tercer día está horizontal. Al final de este periodo, nace la larva.
- **Larva:** al principio la larva parece un gusano sin patas ni ojos, blanco y anillado, curvado levemente, acostado en el fondo de la celda sobre los alimentos. Durante su rápido crecimiento, la larva se curva cada vez más hasta tocarse sus extremos. Al tercer día desde que es larva (sexto en total) se enrosca lentamente y gira en redondo en su celda. Cuando el tamaño de la larva enroscada excede la capacidad de la celda, la larva se extiende y queda en forma vertical; su parte anterior llega casi hasta el borde. Esto ocurre al sexto día como larva (novenos desde la puesta del huevo). Cuando la larva finaliza su crecimiento, parece ocupar toda la celda. Finalmente, durante un día y medio hila con su boca un capullo de seda, quedando ella dentro del mismo. Mientras tanto, las obreras tapan la celda en forma progresiva, con una capa porosa hecha de cera y polen (opérculo).
- **Ninfa:** no ingiere alimentos durante esta etapa. En él transcurre la metamorfosis (el gusano se va transformando en abeja). Al día siguiente de la operculación (cierre de la celda) la larva se inmoviliza dentro de su capullo y pasa a ser una ninfa en metamorfosis. A los 12 días de la operculación (3 semanas desde la puesta del huevo), la joven obrera se mueve, roe la cubierta de su celda y sale. La reina será ayudada por obreras desde afuera que también irán abriendo el opérculo.
- **Abeja:** lo primero que hace la abeja al nacer es aplacar su ayuno pasado como ninfa y quitarse los restos de capullo. A las 2 horas comienza las tareas correspondientes a su edad de adulta. (Mendizábal, 2005).



**Figura 2:** Desarrollo en días de una abeja desde la postura del huevo hasta adulto.

### 1.1.3 ENFERMEDADES DE LAS ABEJAS:

Las abejas de miel domésticas y salvajes sufren el ataque de numerosos parásitos y agentes patógenos, incluidos ácaros, escarabajos, hongos, protozoos, virus y bacterias. Estos agentes pueden afectarlas como abejas adultas, como larvas o en ambos estadios. Entre las enfermedades más importantes se encuentran: Loque Americana, Loque Europea, Nosemosis y Varroasis (Morse y Flottum, 1997).



## **1.2 LOQUE AMERICANA**

### **1.2.1 CARACTERISTICAS:**

Loque Americana es una de las enfermedades más serias e infecciosas de las colmenas por su alto grado de patogenicidad y virulencia. Esta enfermedad es más conocida mundialmente por su denominación inglesa como “American Foulbrood” (AFB). Afecta a la abeja doméstica (*Apis mellifera* L.) durante el estado larval, siendo las abejas adultas portadoras asintomáticas pasivas o activas (INTA Balcarce, 2004).

La distribución de esta enfermedad es mundial, aunque algunos países de América del Sur y del continente africano no reportan su presencia (Nixon, 1982). En nuestro país se detectó en el año 1989 (Alippi y Nuñez, 1991; Alippi, 1992) y se sugiere que probablemente el origen de esta enfermedad fue el ingreso de material vivo, importado de los EE.UU. Datos posteriores indican una diseminación de esta enfermedad, en la mayoría de las provincias de mayor importancia en producción Apícola, con incidencias hasta del 30% descriptas en el Partido de Tandil (Del Hoyo et al., 1998). Esta enfermedad constituye una seria amenaza para la industria apícola en general y limita la comercialización de sus productos (INTA Balcarce, 2004).

### **1.2.2 PATOGENIA:**

Aunque las larvas de las abejas obreras, de los zánganos y de las reinas son susceptibles a la infección, las larvas de las reinas y los zánganos infectadas se observan raramente en condiciones naturales. La susceptibilidad de las larvas a Loque Americana disminuye cuando aumenta la edad (Woodrow, 1941); las larvas no pueden ser infectadas transcurridas 53 horas después de que el huevo ha eclosionado. La dosis media infectiva ( $ID_{50}$ = dosis de spora de *Paenibacillus larvae* con la cual un 50% de las larvas mueren) necesaria para el inicio de la infección, aunque muy variable, es 8.49 esporas para las larvas que tienen entre 24 y 48 horas de vida (Hansen y Brodsgaard, 1999).

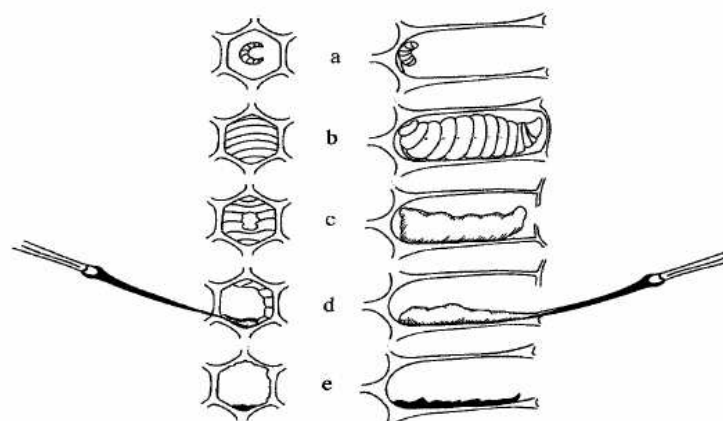
Las esporas ingresan en la colmena por medio de abejas pecoreadoras que las traen en sus buches melarios, abejas pilladoras de colmenas infectadas, herramientas del apicultor, por la introducción de cuadros con crías infectadas, por la alimentación con miel contaminada y debido a cualquier intercambio de material proveniente de colmenas enfermas. Una vez dentro de la colmena, las esporas son llevadas a la cría por medio de las abejas nodrizas que las depositan junto con el alimento en las celdas. Las larvas ingieren estas esporas que adoptan sus formas vegetativas, dadas las condiciones adecuadas que tiene el intestino, como pH, tenor de oxígeno, nutrientes y temperatura. Cuando la larva deja de ser tal y

alcanza su estado de prepupa, las bacterias que aún no fueron eliminadas por las heces, migran introduciéndose, gracias a sus flagelos, en las células endoteliales del intestino, llegan a la hemolinfa y se reproducen hasta provocar la muerte por septicemia generalizada en este estado o en uno posterior (pupa) (De la Sota y Bacci, 2004).

Luego de transcurridos varios días la larva se deshidrata y va adquiriendo paulatinamente una coloración cada vez más oscura debido a la pigmentación propia de *P. larvae*. En esta etapa se denomina “escama” y tiene un muy alto poder infectivo. Esta “escama” puede llegar a contener hasta 2,5 billones de esporas (Bailey y Ball, 1991). A partir de la formación de las “escamas” el material se torna muy infectivo y las mismas son una importantísima fuente de diseminación de las esporas (INTA Balcarce, 2004).

### 1.2.3 SINTOMAS:

Los cuadros de las crías de las colmenas afectadas presentan características particulares de la enfermedad. Una larva sana tiene un color blanco perla brillante. Primero se desarrolla en forma de C en el fondo de la celda y posteriormente crece erguida hasta llenar la celda. Las larvas infectadas mueren en esta posición erecta y cambian de color, primero a marrón cremoso y, eventualmente, a marrón oscuro (Figura 3) (De la Sota y Bacci, 2004; Manual de la OIE, 2004).



**Figura 3:** Progresión de la enfermedad: (a) Punto de infección. (b) Desarrollo de la larva hasta la etapa prepupal. (c) Se reduce el contenido de las celdas y la operculación se hace hacia dentro o es perforada. (d) El contenido de las celdas se vuelve glutinoso. (e) Escama residual fuertemente adherida a la base de la celda.

En colonias seriamente afectadas, los panales se observan con cría salteada debido a una combinación de crías operculadas sanas, celdas no operculadas con restos de larvas enfermas y celdas vacías (Figura 4a). Los opérculos pierden su color café característico para

tornarse castaño oscuro, casi negro. Transcurridos unos 10 o 15 días desde la muerte de la larva, aparece la característica patognomónica de la enfermedad, un material viscoso que al introducir un palillo dentro de la celda que lo contiene y luego al retirarlo, se estira hasta una longitud que supera los 2,5 cm, de ahí el nombre que se le ha dado a este material: “chicle”, éste corresponde a los restos de las larvas muertas (Figura 4b). (De la Sota y Bacci, 2004; Manual de la OIE, 2004).



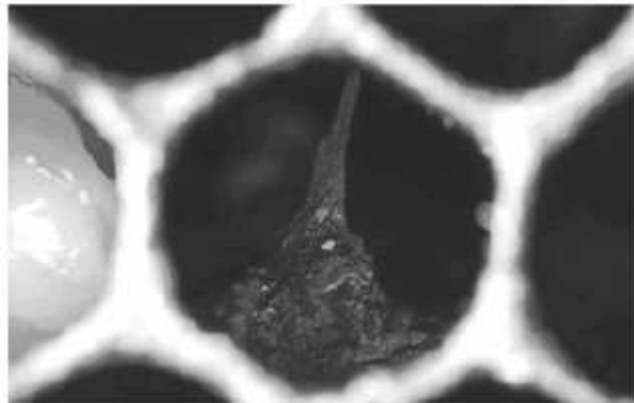
**Figura 4a:** Observación típica de crías salteadas en cuadros de colmenas afectados por Loque Americana.



**Figura 4b:** Aspecto “chicloso” y amarronado de las larvas de *A. mellifera* infectadas por Loque Americana.

En algunas ocasiones se puede percibir en la colmena la presencia de un olor desagradable similar al de la cola de carpintero, que es emanado por las larvas muertas que se hallan en las celdas afectadas; pero como no siempre se presenta no debe tenerse en

cuenta para el diagnóstico. Finalmente, después de un mes o más, los restos de las crías enfermas se secan formando las típicas escamas oscuras y duras que son frágiles y se adhieren fuertemente a las paredes bajas de la celda. Si la muerte tiene lugar durante el estado pupal, la formación de la lengua pupal, una protuberancia que va desde la cabeza pupal atravesando la parte superior de la celda, es uno de los signos más característicos de la enfermedad, aunque esto raramente se puede ver (Figura 5). La lengua puede persistir también en la escama seca (Bounous y Boga, 2005; Manual de la OIE, 2004).



**Figura 5:** Formación de lengua pupal en larvas de *A. mellifera* muertas por Loque Americana.

#### **1.2.4 AGENTE CAUSAL:**

En 1906 se describió la especie *Bacillus larvae*, como el agente patógeno de AFB. Cuarenta y cuatro años mas tarde, en 1950, se describe una especie estrechamente relacionada, *Bacillus pulvificiens*, también aislada de larvas de abejas, pero en asociación con una enfermedad rara llamada "escama pulverulenta" (de Graaf et al., 2006). Ambas especies fueron transferidas a un nuevo género *Paenibacillus* (Ash et al., 1993) y posteriores revisiones taxonómicas los describieron como pertenecientes a la misma especie, *P. larvae*, pero separadas a nivel de subespecie, por ejemplo, *P. larvae ssp larvae (Pll)* (anteriormente *Bacillus larvae*) y *P. larvae ssp pulvificiens (Plp)* (anteriormente *Bacillus pulvificiens*) (Heyndrickx et al. 1996). Mediante la publicación de la reclasificación propuesta en el Diario Oficial del Comité Internacional de Sistemática de Procariotas, la eliminación del epíteto subespecies de *P. larvae* es ahora válido (Genersch et al. 2006). En consecuencia, *P. larvae* se debe considerar la designación completa y correcta para el agente patógeno de AFB (de Graaf et al., 2006).

*P. larvae* es un bacilo Gram positivo esporulado. Sus formas vegetativas miden entre 2,3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 0,5 a 0,6  $\mu\text{m}$  de ancho y puede estar solo o en cadenas cortas. Es móvil mediante flagelos peritricos, microaerófilo, catalasa negativo, hidrólisis del almidón y



caseína positivo, hidrólisis de gelatina negativo y citrato de Simmons negativo. Sus esporas son ovaladas, miden entre 1,3 -1,5 por 0,6 -0,7  $\mu\text{m}$  y pueden visualizarse al microscopio sus movimientos brownianos, mediante la técnica de la gota pendiente (Hanging Drop) modificada, característica que diferencia a las esporas de esta especie de otros bacilos esporulados que afectan a las abejas (De la Sota y Bacci, 2004). Estas esporas tienen tolerancia a muy altas temperaturas, resisten 30 minutos a 100 °C y 15 minutos a 120 °C. Resisten la acción de desinfectantes químicos como el cloro, productos basados en yodo y radiación ultravioleta durante 20 minutos de exposición. Estas características hacen que las esporas puedan sobrevivir en panales con crías putrefactas y restos de larvas durante décadas (se han desarrollado esporas al cabo de 67 años). Solo las esporas son infectivas y responsables del inicio del ciclo de la enfermedad (De la Sota y Bacci, 2004; INTA Balcarce, 2004).

### **1.2.5 DIAGNOSTICO:**

Esta enfermedad es tan típica que su detección puede efectuarse directamente en el campo, aunque con la ayuda del laboratorio se puede obtener una confirmación inequívoca del diagnóstico. Su determinación en el campo puede realizarse al localizar cuadros de cría con el aspecto y los síntomas clásicos de Loque Americana que fueron descritos anteriormente. Se extrae una de las larvas afectadas de apariencia viscosa y se la macera con un palillo. Al estirla se forma un largo filamento de 2,5 hasta 4 cm que tiene el aspecto y consistencia de un "chicle". Si se abre la colmena en los casos avanzados de esta enfermedad, es muy notable percibir un fuerte olor pútrido y penetrante que es similar al de la cola de carpintero. Una vez que se detecta la clásica enfermedad en el campo, lo ideal es que se tomen las correspondientes muestras para su posterior confirmación en el laboratorio de bacteriología. Son muchas las muestras que se pueden analizar, entre ellas, restos larvales, muestras de miel, polen, abejas adultas, cera y escombros de panales (INTA Balcarce, 2004).

Las técnicas de identificación de *P. larvae* más utilizadas son el cultivo en medios sólidos semi-selectivos, microscopía y análisis del perfil bioquímico de *P. larvae*. Actualmente, existen otras técnicas que son muy útiles para el diagnóstico de esta enfermedad como Nested PCR (Lauro et. al, 2003) que permite el análisis directo de muestras de miel y colmenas. Esta prueba es extremadamente sensible al ADN de *P. larvae* y podría, en consecuencia, identificar los niveles de éste que se encuentren por debajo de las probabilidades de ser importantes para la enfermedad (de Graaf et al, 2006). En la tabla 1 se resumen las técnicas de diagnóstico disponibles para *P. larvae*.

**Tabla 1:** Técnicas de diagnóstico para *P. larvae* (de Graaf et al, 2006).

TECNICA	PRINCIPIO	MUESTRAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>CULTIVO</b>	Germinación y crecimiento de esporas de <i>P. larvae</i> en medios sólidos.	Larvas, miel, abejas adultas, polen, cera, escombros de colmena.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detección de larvas en productos de la colmena.</li> <li>• Facilita el rastreo de fuentes de infección.</li> <li>• Muy adecuado para los programas de detección de AFB.</li> <li>• Permite la cuantificación de la carga de las esporas y su viabilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere el paso adicional de identificación de colonias sospechosas de <i>P. larvae</i>.</li> <li>• Usualmente se requieren medios semi-selectivos para evitar la contaminación con otras bacterias.</li> </ul>
<b>PERFIL BIOQUIMICO</b>	Identificación de la especie basado en el perfil de acidificación de carbohidratos, test de Catalasa y test de hidrólisis de caseína en placa.	Colonias bacterianas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es un enfoque tradicional microbiológico que se puede realizar en la mayoría de los laboratorios.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere un primer paso de aislamiento y cultivo de la bacteria.</li> <li>• Los resultados de un perfil completo están disponibles en 2-3 semanas.</li> </ul>
<b>TEST DE SENSIBILIDAD A BACTERIOFAGOS</b>	Formación de placas en un medio sólido como resultado de la lisis de células bacterianas.	Colonias bacterianas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prueba fácil y sencilla de realizar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere un primer paso de aislamiento y cultivo de la bacteria.</li> </ul>

## Continuación

<b>PCR</b>	Amplificación de ADN bacteriano específico usando un set de primers simples.	Colonias bacterianas, miel, larvas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite la rápida confirmación sin el paso de cultivo, partiendo de larvas enfermas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesita equipamiento sofisticado.</li> </ul>
<b>NESTED-PCR</b>	Amplificación de ADN bacteriano específico usando primers externos e internos.	Larvas, miel, abejas adultas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite una confirmación rápida partiendo de diversas muestras.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesita equipamiento sofisticado.</li> </ul>
<b>MICROSCOPIA</b>	Identificación de la morfología de las esporas de <i>P. larvae</i> .	Larvas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los frotis pueden realizarse en el campo y enviarse al laboratorio para su examen.</li> <li>• Rápido diagnóstico de AFB.</li> <li>• Bajo costo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solo sirve para la confirmación de larvas clínicamente enfermas.</li> </ul>
<b>INMUNOTECNICAS</b>	Diferentes herramientas para la identificación basada en la interacción específica de Ag-Ac	Larvas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El dispositivo comercializado de flujo lateral permite una rápida confirmación de la clínica de AFB en el campo.</li> <li>• Diagnóstico rápido de AFB.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La utilidad de cada prueba depende en gran medida de la especificidad de la preparación de Anticuerpos utilizada.</li> </ul>

**1.2.6 TRATAMIENTO Y PROFILAXIS:**

Por las características propias de la enfermedad, una vez que Loque Americana se detecta en una región muy difícilmente pueda ser erradicada por completo de dicha zona. Cualquiera de los métodos nombrados a continuación deben complementarse indefectiblemente con un programa intensivo de revisiones periódicas de los apiarios (en un intervalo de 90 días como mínimo), incluida la época invernal, ya que una sola colonia abandonada en el campo puede destruir el trabajo de varios años de control ([www.apinetla.com.ar/ar/sanidad](http://www.apinetla.com.ar/ar/sanidad)). Los pasos que implica el control son (Bounous y Boga, 2005):


 **Eliminación del foco**

- ⇒ Matanza de las abejas
- ⇒ Combustión del material contaminado

 **Cuarentena del apiario**

 **Esterilización de materiales**

- ⇒ Parafinado
- ⇒ Flameado
- ⇒ Autoclave
- ⇒ Lavado con soda cáustica
- ⇒ Lavado con amonio cuaternario
- ⇒ Radiación Gamma

 **Medidas intermedias**

- ⇒ Cepillado doble
- ⇒ Cepillado simple
- ⇒ Tratamiento quimioterápico

Con respecto al tratamiento quimioterápico, los antibióticos más utilizados en esta enfermedad son el clorhidrato de oxitetraciclina (Terramicina®, PFIZER) y el tartrato de tilosina (Tylan®, ELANCO) (INTA Balcarce, 2004). Sin embargo, son varios los problemas asociados con el uso prolongado de antibióticos (Genersch, E, 2009):

- Los antibióticos no son efectivos contra las esporas infecciosas, por lo tanto, sólo pueden suprimir o enmascarar los síntomas clínicos de la enfermedad, pero no curarla.
- Pueden persistir residuos químicos en la miel afectando su calidad y la seguridad para el consumo humano (Lodesani y Costa, 2005; Martel et al., 2006).
- Los antibióticos suministrados a las larvas y las abejas adultas pueden afectar la vitalidad y longevidad de las mismas (Peng et al., 1992).
- La resistencia a la oxitetraciclina en *P. larvae* se ha extendido haciendo que sean necesarias nuevas búsquedas de antibióticos alternativos (Peng et al., 1996; Williams et al., 1998; Miyagi et al., 2000; Mussen, 2000; Kochansky et al., 2001; Piccini y Zunino, 2001; Evans, 2003; Gallardo et al., 2004; Alippi et al., 2005; Kochansky y Pettis, 2005; Lodesani y Costa, 2005).

En nuestro país existen experiencias acerca de la efectividad de la oxitetraciclina sobre *P. larvae* (Alippi, 2000) en las cuales de 58 muestras bacterianas analizadas, 23 (40%)



presentaron resistencia a dicho antibiótico. Esta resistencia sería producto del uso irracional de los antibióticos tanto para la prevención como para el control de Loque Americana.

Por lo tanto, resulta necesario desarrollar estrategias alternativas de tratamiento, que hasta la fecha siguen tres direcciones (Genersch, 2006):

- Mejora genética de las abejas que muestra un incremento individual o social en la respuesta inmune frente a AFB (Spivak y Reuter, 2001; Wedenig et al., 2003; Evans, 2004).
- Control biológico a través de bacterias antagónicas (Alippi y Reynaldi, 2006; Evans y Armstrong, 2005; Evans y Armstrong, 2006; Evans y López, 2004; Olofsson y Vázquez, 2008).
- Tratamiento con sustancias antibacterianas naturales como los aceites esenciales y extractos de diferentes plantas aromáticas o el propóleo (Eguaras et al., 2005; Fuselli et al, 2006; Fuselli et al., 2007; Antunez et al., 2008; Bastos et al., 2008; Fuselli et al, 2008; Gende et al. 2008; Fuselli et al, 2009; Gende et al., 2009).

### **1.3 PLANTAS AROMATICAS DE USO MEDICINAL:**

#### **1.3.1 DEFINICION:**

Las plantas aromáticas de uso medicinal son aquellos vegetales con metabolitos (principios activos) que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial para el organismo vivo. Las hojas constituyen uno de los órganos más interesantes de las plantas medicinales, pues es en ellas donde se realiza la mayor parte de los procesos metabólicos. Los principios activos son sustancias cuya principal utilidad es la de servir como droga o medicamento para aliviar la enfermedad o reestablecer la salud; son entonces, los que confieren las propiedades terapéuticas a las plantas (Litter, 1980; Núñez y Cantero, 2000).

#### **1.3.2 LAS PLANTAS AROMATICAS A TRAVES DEL TIEMPO:**

El uso medicinal de las plantas aromáticas se remonta a los tiempos más antiguos de la humanidad, aproximadamente 3.000 años A.C., siendo importante para la obtención de remedios cuya aplicación se relacionaba con las creencias y tradiciones de diversos pueblos como Sumeria, Egipto, China, India, Persia, Caldea y Asiria, entre otros (Ratera y Ratera, 1980).

Durante el periodo Neolítico el hombre comenzó a usar estas plantas con fines culinarios; ya sea para saborizar sus alimentos, como para conservar carnes rojas y pescado. Luego fue adquiriendo conocimientos acerca de las propiedades de las hierbas y los transmitió en forma oral de generación en generación. Con el paso del tiempo y la evolución de las culturas, estos conocimientos fueron manejados especialmente por hechiceros o

chamanes que eran, generalmente, personas de edad avanzada consideradas por ello más sabias (Ratera y Ratera, 1980).

Actualmente, a pesar de todos los avances tecnológicos destinados a la producción sintética de medicamentos, ha surgido la utilización de las plantas aromáticas principalmente para uso medicinal. Esto es debido, por un lado, a la necesidad de tener medicamentos nuevos, ya que el uso indiscriminado de los productos sintéticos elaborados hasta el momento ha provocado resistencia en los microorganismos; y por otro lado, a que la posibilidad de hallar un compuesto más efectivo contra los microorganismos a partir de fuentes naturales es mayor que la creación de uno completamente nuevo (Núñez y Cantero, 2000).

### **1.3.3 USOS DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS:**

Los diferentes usos de las plantas aromáticas se deben a la presencia de ciertas sustancias o principios activos en ellas, tales como alcaloides, resinas, glucósidos, saponinas y aceites esenciales, entre otros. La cantidad de dichos principios activos depende especialmente de factores ecológicos del lugar donde se desarrolla el vegetal, tales como suelo, temperatura y humedad (Ratera y Ratera, 1980).

- **En medicina humana:** es amplia la variedad de usos medicinales mencionados. Hay una alta frecuencia de uso digestivo, para el hígado, para curar el “empacho”, para la acidez, etc. También hay especies para tratar la tos, gripe, resfrío; las que están asociadas a los aspectos reproductivos, que van desde afrodisíacas a abortivas, pasando por aquéllas que regulan el ciclo menstrual. Es común el uso de plantas como sedante, para tratar golpes e infecciones, para uso dérmico y para problemas renales. Las formas más habituales de consumo de plantas medicinales son en infusión o “té” (Arias Toledo, 2009).
- **En medicina veterinaria:** el uso de las plantas en la medicina veterinaria, se basó en combatir enfermedades animales similares a las del hombre con las mismas especies vegetales que se usaban en medicina humana, pero a diferentes dosis e incluyéndolas en su dieta. Con el avance de la investigación científica se comenzaron a encontrar medicamentos que son empleados exclusivamente para tratar enfermedades en animales.
- **Como plaguicida o herbicida natural:** en la década del 90, los aceites esenciales de plantas aromáticas y sus constituyentes, los terpenos, generaron gran interés debido a la demostración de sus actividades insecticidas. Por esto, el aceite esencial se convirtió en un método natural para el control de plagas y es una alternativa a los

pesticidas sintéticos. Por otra parte, los aceites esenciales son fácilmente biodegradados en el medio ambiente y poseen poca o ninguna toxicidad frente a peces, aves, y mamíferos (Misra y Pavlostathis, 1997; Stroh et al, 1998; Isman, 2006; Palacios et al, 2009).

- **Como condimentos de uso culinario:** La presencia de los diferentes “platos típicos” alrededor del mundo se lo debemos al uso de plantas aromáticas en la cocina, las cuales se han empleado para aromatizar y brindar un sabor particular a los alimentos. Como en cada región geográfica existe la predominancia de determinadas hierbas aromáticas, éstas son las que han determinando las características distintivas de los platos típicos de cada región y país. Es por ello que las mismas son consideradas en muchos países como patrimonio natural y se ha legislado para evitar su extinción (OMS, 2003).
- **En la industria:** las plantas son utilizadas ampliamente tanto en la industria farmacéutica como en la cosmética para la elaboración de medicamentos, perfumes y jabones naturales respectivamente; siendo la industria farmacéutica la más desarrollada a nivel mundial.

## 1.4 *Minthostachys verticillata*

### 1.4.1 DESCRIPCION DE LA ESPECIE VEGETAL:

*Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling es un miembro de la familia Lamiaceae (Alkire et al., 1994; Gupta, 1995; Bocco et al., 1997). El género *Minthostachys* es conocido por la población local con nombres regionales diferentes. Es conocido como "muña" en la zona del centro de Perú a Bolivia, como "peperina" en Argentina, como "poleo" y "tipo" en Ecuador y "chancua" en el norte de Perú (Schmidt-Lebuhn, 2008).

El género *Minthostachys* está ampliamente distribuido en los Andes desde Venezuela y Colombia a Argentina, donde se encuentra en las provincias de Salta, Jujuy, Catamarca, Tucumán, La Rioja (noroeste), San Luis y Córdoba (centro-oeste). Es en las sierras de Córdoba, sin embargo, donde el comercio de estas plantas alcanza su mayor proporción (Alkire et al., 1994; Gupta, 1995; Bocco et al., 1997).

*M. verticillata* es una planta perenne, aromática semi-arbusto de 0,30-2.0 m de altura. Tiene flores tubulares blancas en verano y su aroma es similar a la menta. La especie ha sido incluida en la Farmacopea Nacional Argentina desde su sexta edición.

#### 1.4.2 PRINCIPALES COMPONENTES QUÍMICOS:

El interés científico por esta especie fue iniciada en 1913, cuando fueron descritas la explotación y utilización de la especie y se publicaron protocolos para la destilación de su aceite esencial (Doering, 1913). La composición de aceites esenciales (AE) varía acorde a factores intrínsecos y extrínsecos. Dentro de los extrínsecos se destacan las condiciones climáticas (precipitaciones, luminosidad, altura) y composición de los distintos suelos (porcentaje de oligoelementos, pH, humedad). Dentro de los intrínsecos se encuentra la variabilidad genética de cada especie vegetal lo que define los llamados quimiotipos (Ybarra et al., 2005). Diferentes investigaciones (Fester et al., 1947; Fester y Martinuzzi, 1949, Fester y Martinuzzi 1952; Fester, 1958), demostraron que mentona y pulegona son los principales componentes del aceite esencial de *M. verticillata*, y en algunos casos se registraron niveles de mentona cerca del 50-60% de la mezcla. Posteriormente, mejores métodos de análisis hicieron posible la identificación de los componentes menores, en particular isomenthona, limoneno (Fester y Martinuzzi, 1950; Fester et al., 1956), mentol (Fester et al., 1948), y  $\beta$ -pineno (Fester et al., 1960); como así también sustancias que están presentes en cantidades muy pequeñas, entre ellos carvona,  $\alpha$ -pineno, piperitenone, sabineno, mirceno, y (E)  $\beta$ -ocimeno (De Feo et al., 1998).

#### 1.4.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y USOS:

*M. verticillata* se utiliza principalmente en infusiones como digestivo estomacal, sedativo, antiespasmódico, antidiarréico, antiemético, carminativo, broncodilatador, antirreumático, insecticida, antimicrobiano y antiparasitario. También es utilizado en el tratamiento de bronquitis, asma y dolor de cabeza (White, 1982). También se emplea para aromatizar y fabricar licores, bebidas refrescantes y yerbas compuestas (Dimitri, 1980; Ratera y Ratera, 1980; Sorau y Bandoni, 1994; De Feo et al, 1998). Además, se la utiliza como condimento de comidas regionales y en la conservación de papas almacenadas (Ugarte Ochoa et al., 1984).

Un estudio realizado en el área de Virología de la UNRC demostró que el extracto etanólico de *M. verticillata* posee efectos inhibitorios sobre la actividad citocidal del virus *Herpes suis* (Zanón y Ceriatti, 1999). Además, el aceite esencial y la decocción de *M. verticillata* han demostrado tener actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram (+) y propiedades antivirales sobre el virus *Herpes simplex* tipo 1 (VHS-1) y el virus de la pseudorrabia (VPR) cepa RC/79 (Primo y Rovera, 2001).

## 1.5 ANTECEDENTES DEL TEMA DE TRABAJO:

Actualmente el uso de extractos vegetales ha ganado popularidad e interés científico para el tratamiento de enfermedades microbianas (Tepe et al., 2005). Es por esto que la búsqueda de compuestos antimicrobianos naturales se ha intensificado con el propósito de ser aplicados en el control de los mismos. Por su parte los aceites esenciales, las decocciones, las infusiones y los extractos provenientes de plantas aromáticas constituyen una importante alternativa para el tratamiento de enfermedades microbianas, ya que se ha estudiado en ellos la actividad antimicrobiana y han demostrado ser efectivas contra bacterias Gram positivo, Gram negativo y hongos (Pérez et al., 1999; Agnese et al., 2001; Sridhar et al., 2003; Friedman et al., 2004; Mimica-Dukic et al., 2004).

Se ha demostrado que algunos aceites esenciales de plantas aromáticas poseen actividad antibacteriana contra *P. larvae* (Calderone et al., 1994). Ocho aceites esenciales fueron evaluados in vitro en su actividad antibacteriana contra ocho cepas de *P. larvae* aisladas de distintos lugares de Argentina y se demostró que el aceite esencial de citronela (*Cymbopogon citratus*) y el de tomillo (*Thymus vulgaris*) son inhibidores efectivos de *P. larvae* (Alippi et al., 1996). Floris y Carta (1990), demostraron que el aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) también fue efectivo en la inhibición del crecimiento de *P. larvae*.

Debido a las propiedades de *M. verticillata* encontradas y que no existen investigaciones realizadas sobre el uso de extractos o aceites esenciales de la misma en el tratamiento contra *P. larvae*, se propone evaluar la actividad antibacteriana de la misma contra diferentes cepas de *P. larvae*. Con estas nuevas medidas profilácticas que se están investigando y evaluando, se espera poder disminuir aún más la incidencia de esta enfermedad y lograr un producto apto para el consumo humano, libre de residuos y sin restricciones para la exportación.

## **2. HIPOTESIS:**

Diferentes extractos y el aceite esencial de *Minthostachys verticillata* poseen actividad antibacteriana frente a *Paenibacillus larvae*, agente causal de Loque Americana, siendo ésta una alternativa natural que podría ser utilizada para el control de dicha enfermedad, ya que el uso de antibióticos ha generado la aparición de cepas bacterianas resistentes, y que su aplicación está restringida debido a los residuos que dejan en la miel y otros productos de la colmena.

## **3. OBJETIVOS:**

### **3.1 Objetivo General:**

- Evaluar la actividad antibacteriana de diferentes extractos de *Minthostachys verticillata* frente a *Paenibacillus larvae*.

### **3.2 Objetivos Específicos:**

- Aislar, conservar e identificar cepas de *P. larvae* a partir de colmenas infectadas de Loque Americana.
- Recolectar *M. verticillata* en la zona serrana de la provincia de Córdoba.
- Obtener los diferentes extractos de *M. verticillata* a partir del vegetal recolectado.
- Analizar la actividad antibacteriana contra *P. larvae* de los extractos obtenidos.



## **4. MATERIALES:**

### **4.1 Medio de cultivos para aislamiento de *Paenibacillus larvae***

#### **Medio MYPGP**

Extracto de levadura -----	1,5 g
Medio Mueller-Hinton caldo -----	1 g
Glucosa -----	0,2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	0,3 g
Piruvato de sodio -----	0,2 g
Agua destilada -----	100 ml
pH final -----	7

Para medio sólido agregar

Agar -----	2 g
------------	-----

Para medio semisólido

Agar -----	0,6 g
------------	-------

### **4.2 Reactivos para la identificación de *Paenibacillus larvae***

#### **4.2.1 Colorantes para coloración de Gram**

Violeta de genciana

Lugol (I<sub>3</sub>K)

Alcohol

Fucsina básica o safranina

#### **4.2.2 Reactivos y materiales para Tinción Negativa**

Parafilm

Grilla recubierta con película de Formvar o de Carbono

Acido Fosfotúngstico al 2%

#### **4.2.3 Reactivo para prueba de catalasa**

Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 10%

### **4.3 Cepas de *Paenibacillus larvae***

Las cepas bacterianas utilizadas se aislaron de cuadros de colmenas con síntomas de Loque Americana (Alippi, 1990), de la zona Sur de la provincia de Córdoba. Además, se utilizaron cepas del mismo microorganismo provistas por el INTA Balcarce, provincia de Buenos Aires.

### **4.4 Solventes para la obtención de los extractos vegetales**

- Etanol
- Hexano
- Benceno
- Éter
- Acetato de Etilo

### **4.5 Diluyente de los extractos y AE utilizado en ensayos de actividad antibacteriana**

- Dimetil Sulfoxido (DMSO)

### **4.6 Cromatografía de capa delgada (TLC)**

- Cromatofolios de Sílica gel con indicador de fluorescencia 254 nm (Fluka).
- Fases móviles empleadas en TLC (Tabla 2).

**Tabla 2:** Fases móviles empleadas en Cromatografía de capa delgada (TLC)

<b>Solventes</b>	<b>Relación</b>
acetato de etilo / cloroformo	1 : 1
acetato de etilo / diclorometano	1 : 1
acetona / cloroformo	1 : 1
acetona / benceno	1 : 1
acetona / diclorometano	1 : 1
benceno / acetato de etilo	1 : 1
benceno / acetato de etilo	7 : 3
hexano / acetona	1 : 1
hexano / acetona	6 : 4
hexano / acetona	7 : 3
hexano / acetato de etilo	1 : 1

*Continuación*

hexano / acetato de etilo	7 : 3
cloroformo / éter etílico	1 : 1
cloroformo / éter etílico	7 : 3
éter etílico / benceno	1 : 1
éter etílico / hexano	1 : 1
éter etílico / hexano	6 : 4
éter etílico / hexano	7 : 3
diclorometano / éter etílico	1 : 1
diclorometano / éter etílico	6 : 4
diclorometano / éter etílico	7 : 3

**4.7 Reactivos para revelar cromatofolios:**

- Yodo

**4.8 Colorante utilizado en el ensayo de Bioautografía:**

- Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) al 5% p/v en agua destilada estéril.

## **5. METODOLOGIA:**

### **5.1 *Paenibacillus larvae***

#### **5.1.1 Identificación**

##### **🚦 Coloración de Gram**

Se empleó la técnica de Gram-Hucker. Sobre un portaobjetos, a partir de un cultivo de 72 h crecido en medio de cultivo MYPGP agarizado, se resuspendió en una gota de agua destilada una colonia sospechosa de *P. larvae* y se fijó con calor. Posteriormente se realizó la coloración de Gram.

##### **🚦 Tinción Negativa**

1. Se realizó una suspensión densa de *P. larvae* 7 en solución fisiológica estéril. Se situó una gota de la suspensión bacteriana sobre una superficie impermeable (parafilm).
2. Se colocó una grilla recubierta con película de Formvar o de Carbono, con la cara brillante sobre la gota. Se dejó actuar 5 minutos y se eliminó cuidadosamente la gota con la ayuda de papel de filtro.
3. Se lavó la grilla dejando caer agua destilada sobre el borde de la pinza y luego se realizaron pasajes sucesivos en tres vasos de agua destilada.
4. Se depositó una gota de ácido fosfotúngstico al 2% sobre la superficie de trabajo y se colocó la grilla con la suspensión del lado de la cara brillante sobre la gota del contrastante. Se dejó un minuto y se eliminó la gota con la ayuda de papel de filtro.
5. Se lavó la grilla dejando caer nuevamente agua destilada sobre el borde de la pinza y luego se realizaron pasajes sucesivos en tres vasos de agua destilada. Se dejó secar la grilla y se observó al microscopio electrónico de transmisión.

##### **🚦 Prueba de la catalasa**

A partir de un cultivo de 72 h crecido en medio de cultivo MYPGP agarizado, en un portaobjetos limpio y seco se colocaron 2 gotas de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 10% y una colonia sospechosa. La reacción se consideró positiva por la aparición de burbujas, originadas por la acción de la enzima catalasa sobre el peróxido de hidrógeno. En cambio, la reacción fue negativa cuando no se observó desprendimiento de burbujas de oxígeno.

### **5.1.2 Mantenimiento y conservación de cepas**

Las cepas de *P. larvae* fueron mantenidas en cajas de Petri con medio de cultivo MYPGP agarizado a 4 °C, realizando pasajes en medio de cultivo fresco cada semana (González, 2005). Para un tiempo mayor de conservación, las cepas se preservaron a -20 °C en caldo MYPGP con la adición de 20% de glicerol como criopreservador.

## **5.2. *Minthostachys verticillata***

### **5.2.1 Recolección y procesamiento del material vegetal**

*Minthostachys verticillata* se recolectó de forma manual en época de floración en Río Ceballos, provincia de Córdoba. Una muestra del vegetal fue depositada en el Herbario de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto. En el laboratorio se seleccionaron hojas, tallos finos, flores y/o frutos del vegetal, se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel grafito, removiéndolo periódicamente para favorecer la aireación. Una vez seco se lo conservó en condiciones adecuadas de temperatura y humedad hasta la obtención de los diferentes productos.

### **5.2.2 Obtención de extractos vegetales**

1. Se pesaron 150 g de vegetal seco y se maceraron con Etanol:Agua (EtOH:H<sub>2</sub>O) (1:1) hasta agotar el material vegetal, renovando el extractante periódicamente (La maceración se realizó durante 45 días).
2. El macerado se filtró en papel Whatman N° 2. Se obtuvo un extracto hidroalcohólico, el que posteriormente fue concentrado a presión reducida para evaporar el Etanol (EtOH), obteniéndose un Extracto Acuoso (EA).
3. Finalmente, a dicho extracto se le realizó una extracción líquido-líquido en forma sucesiva (Figura 6) con solventes de distinta polaridad (Hexano, Benceno, Éter Etílico y Acetato de Etilo). De esta manera se obtuvieron los extractos de hexano (EH), de benceno (EB), de éter etílico (EE) y de acetato de etilo (EAE).



**Figura 6:** Extractor líquido-líquido para solventes menos densos que el agua

### **5.2.3 Obtención de Aceite esencial (AE) (De Feo et al., 1998)**

La extracción del AE se realizó mediante destilación por arrastre con vapor utilizando una trampa tipo Clevenger (Figura 7).

1. Se pesaron 200 g de vegetal y se lo colocó en las canastas de la columna extractora del hidroddestilador.
2. Se encendió el equipo, y se esperó que el agua llegara a ebullición para que comenzara la extracción. En esas condiciones, los vapores de agua arrastraron los componentes volátiles al atravesar el material vegetal contenido en las canastas de la columna.
3. El AE presente en la muestra vegetal fue arrastrado por el vapor de agua y condensado.
4. Los líquidos inmiscibles (aceite-agua) fueron separados por decantación.
5. Una vez extraído el AE, se lo recolectó y se lo conservó en frascos de vidrio color caramelo a 4 °C hasta su uso.





**Figura 7:** Hidrodestilador con trampa tipo Clevenger para la extracción de AE

### **5. 3 Ensayo de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales y aceite esencial**

1. Se preparó un inóculo de *P. larvae* a partir de un cultivo fresco desarrollado en medio de cultivo MYPGP agarizado con 72 h de incubación a 37 °C en una estufa (Innova CO-48 CO<sub>2</sub> incubator) con atmósfera de microaerofilia con una tensión de CO<sub>2</sub> del 5%. Se tomaron colonias de *P. larvae* de las placas y se suspendieron en solución fisiológica estéril ajustando la concentración hasta escala 0,5 de Mac Farland.
2. A partir de soluciones madres de los extractos vegetales y del AE de *M. verticillata* se realizaron diluciones seriadas factor 2 en DMSO.
3. Se sembró con espátula de Drigalsky 0,1 ml de la suspensión de *P. larvae* en placas de Petri que contenían medio de cultivo MYPGP agarizado.
4. Con la ayuda de un sorbete estéril se realizó un orificio de 5 mm en la superficie del agar.
5. En los orificios realizados en cada placa, se colocaron 50 µl de las diluciones de los extractos vegetales y del AE a ensayar, dejándose unos minutos las placas a temperatura ambiente para permitir la difusión.
6. Se llevaron las placas a incubar a 37 °C en microaerofilia durante 72 h.

Todas las diluciones se efectuaron por triplicado. Además, se realizó un control positivo sin antimicrobiano para verificar la viabilidad del microorganismo y un control con DMSO para corroborar que este compuesto no producía inhibición del crecimiento de *P. larvae*.

#### **5.4 Ensayo de Cromatografía en capa delgada (TLC)**

Para este ensayo se preparó una solución madre del EH de *M. verticillata* en hexano con una concentración de 3 mg/ml. Se utilizaron cromatofolios de Sílica gel de 3 cm de ancho por 7 cm de alto. Se marcó la línea de siembra a los 0,7 cm de un extremo del cromatofolio.

1. Sobre la línea de siembra, con la ayuda de un capilar, se sembró el EH de *M. verticillata* obteniendo una banda de un 1 cm de ancho. Luego se colocaron los cromatofolios en una cuba para cromatografía previamente saturada con los vapores de la fase móvil.
2. Las fases móviles empleadas en las diferentes corridas cromatográficas fueron: acetona, acetato de etilo, éter etílico, diclorometano, hexano, cloroformo y benceno puros o en las mezclas mostradas en la Tabla 1.
3. Una vez que los cromatofolios fueron corridos con las diferentes fases móviles, fueron retirados de la cuba y colocados en papel absorbente para su secado.
4. Luego se colocaron bajo luz UV a 254 nm para la visualización de las bandas.
5. Posteriormente se seleccionaron aquellas cromatografías donde se visualizaban bandas separadas y definidas, correspondientes a diferentes compuestos presentes en el extracto y se midieron los R<sub>f</sub> de las mismas.
6. Las bandas que no se visualizaban con la luz UV fueron reveladas con Yodo. Para esto, se colocaron grageas de yodo alrededor de las placas de TLC que se encontraban dentro de placas de Petri, se taparon las placas y se mantuvieron a 30 °C durante 60 minutos. Luego de observadas las bandas, se registraron los valores de R<sub>f</sub> de las mismas.

#### **5.5 Ensayo de Bioautografía**

1. A las cromatografías que presentaron buena resolución de bandas, se las colocó en campana de flujo laminar con luz UV durante 60 minutos. Luego, las mismas se colocaron en placas de Petri estériles.
2. Se realizó una suspensión en solución fisiológica de la cepa 7 de *P. larvae* con una concentración equivalente al tubo 1 de la escala de Mac Farland.

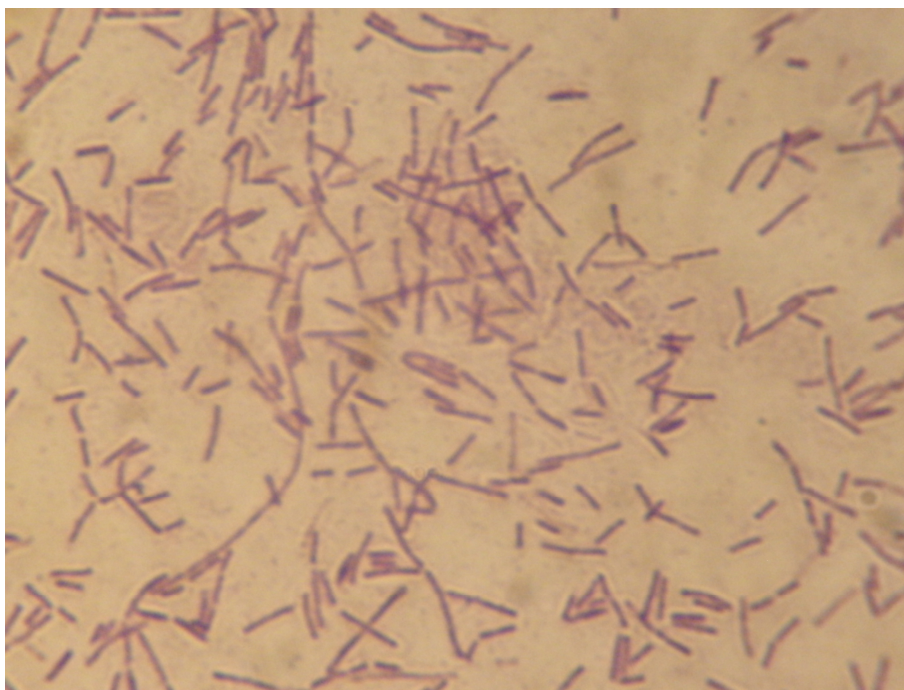
3. Se colocó 1 ml de la suspensión de *P. larvae* en un frasco que contenía 20 ml de medio de cultivo MYPGP al 0,6% de agar fundido a 42 °C y luego se agitó para lograr una mejor homogenización.
4. En condiciones de esterilidad, se volcó el medio de cultivo que poseía el inóculo sobre las placas de Petri que contenían las cromatografías.
5. Al cabo de 24 h se les agregó a las placas 1 ml de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) al 5% p/v en agua estéril. Se dejó incubar 24 h más en las mismas condiciones antes mencionadas.
6. Transcurrido el tiempo de incubación se visualizaron zonas de inhibición del crecimiento alrededor de las bandas separadas por TLC. Se registraron los R<sub>f</sub> de las zonas de inhibición para su posterior comparación con los R<sub>f</sub> de las placas de cromatografía.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 *Paenibacillus larvae*:

#### 6.1.1 Identificación de *Paenibacillus larvae*:

A las cepas aisladas se les realizó la tinción de Gram-Hucker y la prueba de Catalasa con el objetivo de confirmar que los microorganismos ensayados eran efectivamente *Paenibacillus larvae*. Al observar los preparados teñidos se pudo visualizar la morfología y su comportamiento tintorial. Se advirtieron bacilos Gram positivos esporulados, sus esporas eran de ubicación subterminal y no deformantes del soma bacteriano. Los bacilos eran largos y se encontraban agrupados de a pares, en cadenas cortas o solos (Figura 8).

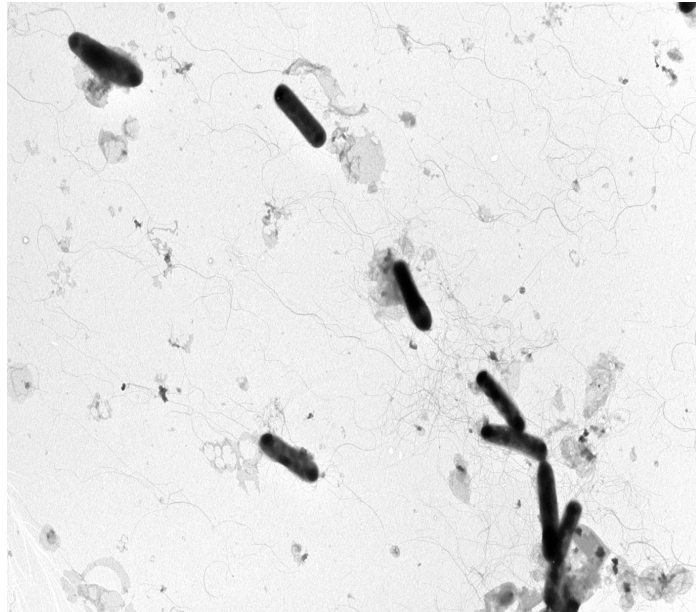


**Figura 8:** Tinción de Gram-hucker de *Paenibacillus larvae*.

Cuando se realizó la prueba de catalasa se observó que las cepas eran catalasa negativo, lo cual indica que los microorganismos estudiados se encuentran dentro del género correspondiente. Anteriormente en el grupo de trabajo, los microorganismos habían sido identificados con otras pruebas bioquímicas como técnica de la gota pendiente (movimiento browniano), hidrólisis de caseína (+), reacción de Voges-Proskauer (-), hidrólisis de almidón (+) e hidrólisis de gelatina (-) (González, 2005).

Con el objetivo de observar la morfología externa de *Paenibacillus larvae* con más detalle se le realizó una tinción negativa, se observó en Microscopio Electrónico de Transmisión y se demostró la presencia de esporas de ubicación terminal. Además se pudo visualizar que el microorganismo estudiado es móvil, ya que presenta flagelos de ubicación

perítrica, lo cual concuerda con la bibliografía consultada (De la Sota y Bacci, 2004). La mayoría de los microorganismos se observaron agrupados de a pares o solos (Figuras 9 a y b).



**Figura 9a:** Tinción negativa de *P. larvae* observado en Microscopio Electrónico de Transmisión (3597X).



**Figura 9b:** Tinción negativa de *P. larvae* observado en Microscopio Electrónico de Transmisión (7750X).

### **6.1.2 Mantenimiento y conservación de cepas:**

Las cepas se mantuvieron y conservaron óptimamente en las placas de Petri con medio cultivo MYPGP. Luego de los repiques se observaron colonias pequeñas color blanquecino, transparentes, de aspecto mucoso, pegadas al agar y de bordes definidos (Figura 10).



**Figura 10:** Colonias de *Paenibacillus larvae* crecidas en Medio MYPGP.

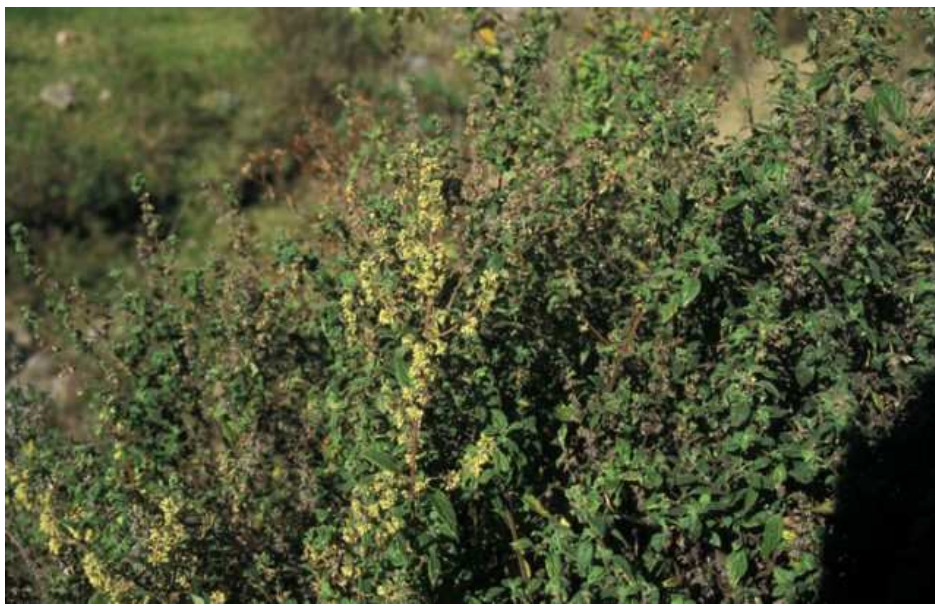
## **6.2 *Minthostachys verticillata***

### **6.2.1 Recolección y procesamiento del material vegetal**

*Minthostachys verticillata* fue fácilmente reconocida a campo durante la recolección. Morfológicamente se la describe como un sub-arbusto aromático y trepador de 0,30 hasta 2 m de altura, perenne, de gran capacidad de rebrote, con olor semejante a la menta (Figura 11). Las hojas son decusadas, enteras, redondeadas y con textura de felpa; las flores son pequeñas y arregladas en verticilos generalmente densos; los cálices bilabiados y las corolas son blancas, a menudo con puntos lilas (Bocco et al., 1997, De Feo et al., 1998) (Figura 12).

Luego de la recolección, una muestra de la especie vegetal fue depositada en el Herbario de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto bajo el número de identificación: 507.





**Figura 11:** Planta de *Minthostachys verticillata*



**Figura 12:** Flor de *Minthostachys verticillata*

### **6.2.2 Obtención de productos vegetales**

Los extractos estudiados de *Minthostachys verticillata* fueron obtenidos y cedidos gentilmente por la Microbióloga María Juliana Gonzalez perteneciente a la cátedra Microbiología General del departamento de Microbiología e Inmunología de la U.N.R.C. Luego de realizar la extracción líquido-líquido en forma sucesiva se obtuvieron 446,7 mg de EH; 125,7 mg de EB; 222,4 mg de EE y 169,4 mg EAE. (Figura 13).



**Figura 13:** Extracto Hexánico de *M. verticillata*

### **6.2.3 Obtención de Aceite esencial (AE)**

Luego de someter al vegetal a una destilación por arrastre con vapor, se obtuvo el AE cuyo rendimiento fue del 0,625 % v/p (Figura 14). Este valor puede considerarse un buen rendimiento ya que con poco material vegetal se puede obtener una buena cantidad de AE.



**Figura 14:** Aceite esencial de *M. verticillata*



### 6.3 Ensayo de la actividad antibacteriana de extractos vegetales de *M. verticillata*:

Luego de realizada la técnica de pozo para ensayar la actividad antibacteriana de los extractos (EH, EB, EE, EAE), se pudo determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada uno de ellos.

#### Extracto de hexano:

Luego de transcurrido el tiempo de incubación de las placas, se visualizaron importantes halos de inhibición del crecimiento alrededor de los pozos realizados en el agar que contenían las diferentes diluciones del EH. Esto indica que el extracto posee actividad antibacteriana. Posteriormente, se midieron los diferentes halos de inhibición y se pudo determinar de esta manera la CIM correspondiente a cada cepa. Debido a que los ensayos de actividad antibacteriana del EH de *M. verticillata* se realizaron por triplicado para cada una de las cepas de *P. larvae* se calculó el diámetro promedio en milímetros de los halos de inhibición y su desviación estándar (Tabla 3).

**Tabla N°3:** Actividad antibacteriana del EH de *M. verticillata* frente a *P. larvae*.

Cepas	Concentraciones del Extracto de hexano de <i>M. verticillata</i> (mg/ml)						
	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,032	0,016
1	16,7±2,1	14,0±2,0	11,3±2,5	9,7±0,6	8,7±2,1	NI	NI
2	19,7±1,1	15,0±1,4	12,0±1,4	9,5±0,7	7,5±0,7	NI	NI
3	18,3±0,6	15,7±1,1	13,7±0,6	10,0±1,0	7,3±0,6	NI	NI
4	ND	13,7±0,6	10,0±0,0	7,7±0,6	7,0±0,0	NI	NI
5	ND	12,7±0,6	10,7±1,1	8,7±0,6	7,0±0,0	NI	NI
6	17,3±0,6	14,5±0,7	14,0±1,0	11,3±0,6	7,3±0,6	NI	NI
7	21,5±0,7	17,3±0,6	14,5±0,7	12,0 ±2,8	8,5±0,7	NI	NI
8	21,7±1,5	14,7±2,3	11,7±1,5	8,3±1,1	8,0±1,0	NI	NI
9	16,7±0,6	12,3±0,6	10,3±0,6	8,0±1,0	NI	NI	NI
10	17,3±0,6	15,3±1,1	11,0±1,0	8,7±0,6	NI	NI	NI
11	18,0±1,0	17,3±1,5	14,3±3,5	12,7±3,8	9,3±1,5	8,3±0,6	NI

**NI:** No inhibe el crecimiento

**ND:** No determinado

Como podemos ver en la tabla, las CIM de las cepas estudiadas se encuentran entre 0,125 y 0,032 mg/ml. De las cepas ensayadas, la cepa 11 fue la mas sensible con un valor de CIM de 0,032 mg/ml (Figura 15) mientras que las cepas mas resistentes fueron las cepas 9 y 10 con una CIM de 0,125 mg/ml (Figura 16). La CIM de las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 fue de 0,063 mg/ml.

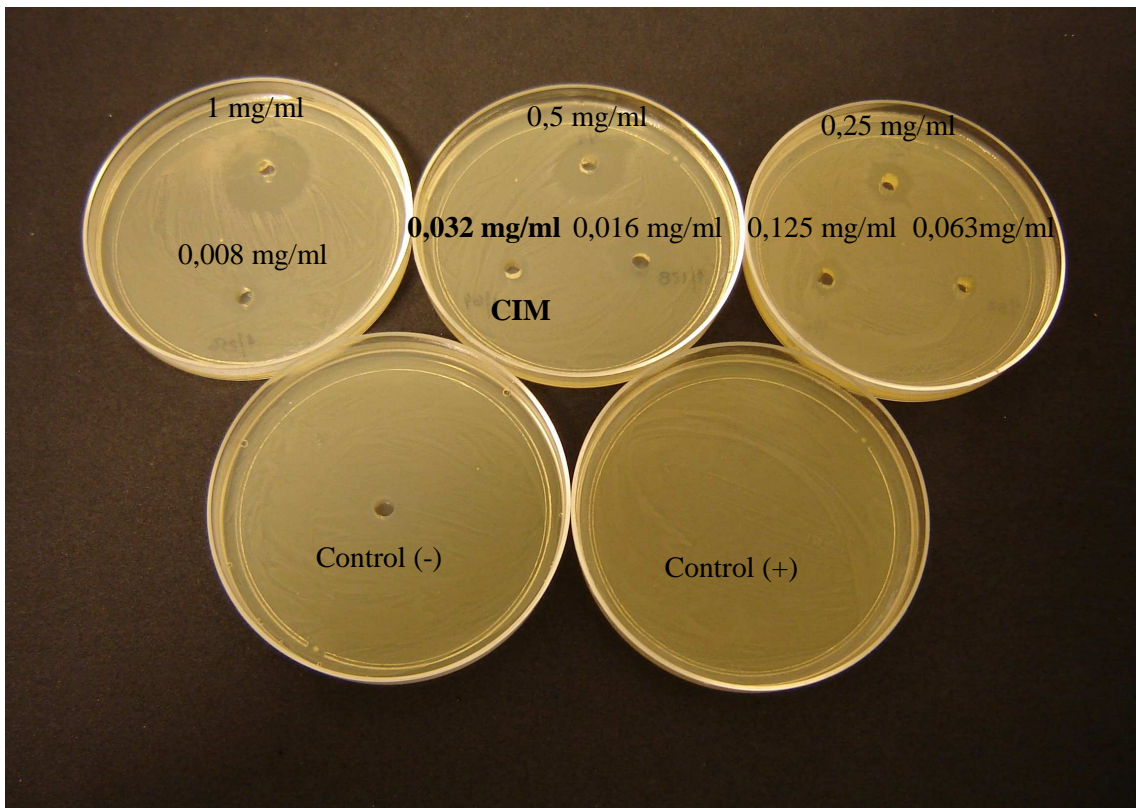


Figura 15: Actividad antibacteriana de EH de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 11.

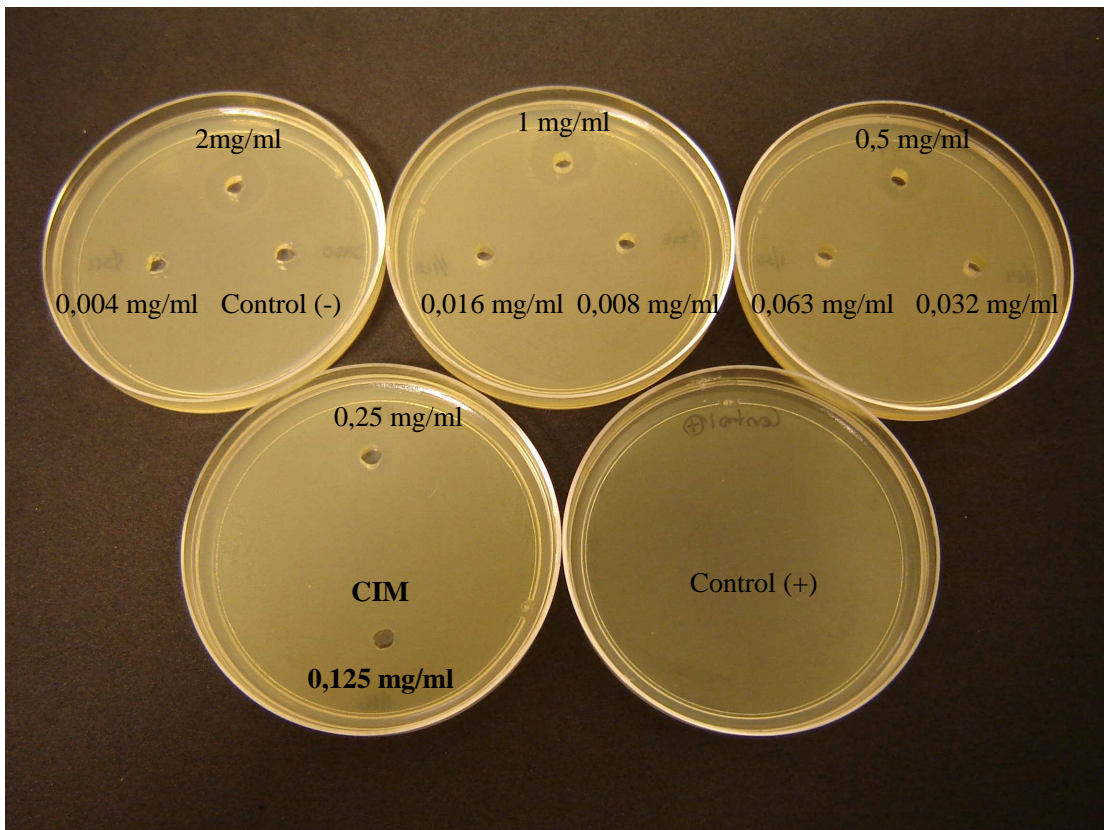
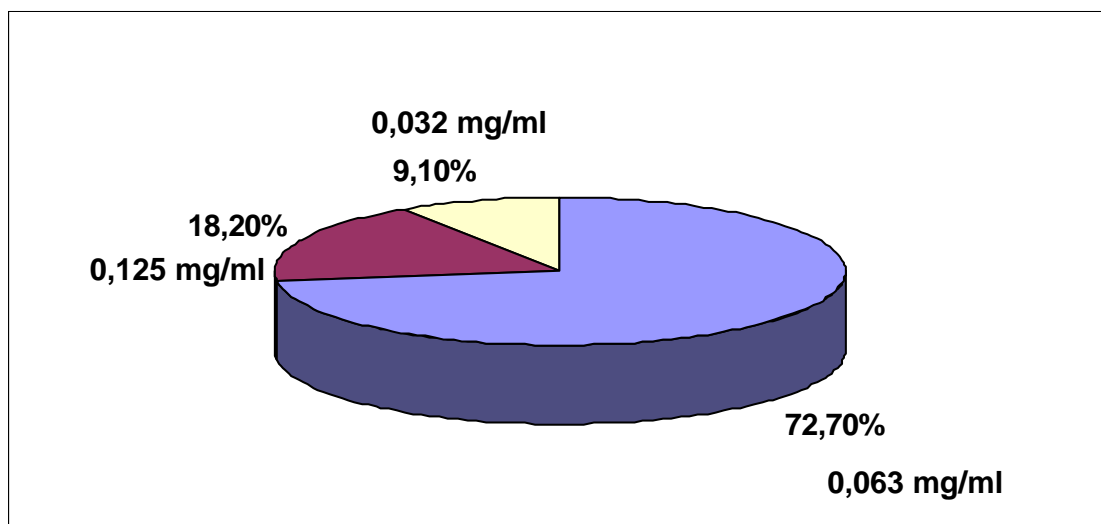


Figura 16: Actividad antibacteriana de EH de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 9.

Como podemos observar en el gráfico 1 hay un gran porcentaje (72,70 %) de cepas de *P. larvae* que poseen una CIM de 0,063 mg/ml. El 18,20 % de las cepas alcanzaron un valor de CIM de 0,125 mg/ml, mientras que solo el 9,10 % de las cepas posee una CIM de 0,032 mg/ml. Esto indica que la gran mayoría de las cepas puede ser inhibida por el EH de *M. verticillata* a concentraciones relativamente bajas.

**Gráfico N°1** : CIM de las cepas de *P. larvae* con el EH de *M. verticillata*



Extracto de benceno:

Con respecto a la actividad antibacteriana del EB de *M. verticillata*, luego de realizada la técnica de difusión en pozo, se observó que posee menor actividad que el EH. Esto se ve reflejado en el tamaño de los halos de inhibición del crecimiento y en los valores de CIM para cada una de las cepas ensayadas. La tabla 4 muestra los valores promedio y la desviación estándar de los halos de inhibición del crecimiento de cada una de las cepas de *P. larvae* frente al EB de *M. verticillata*.



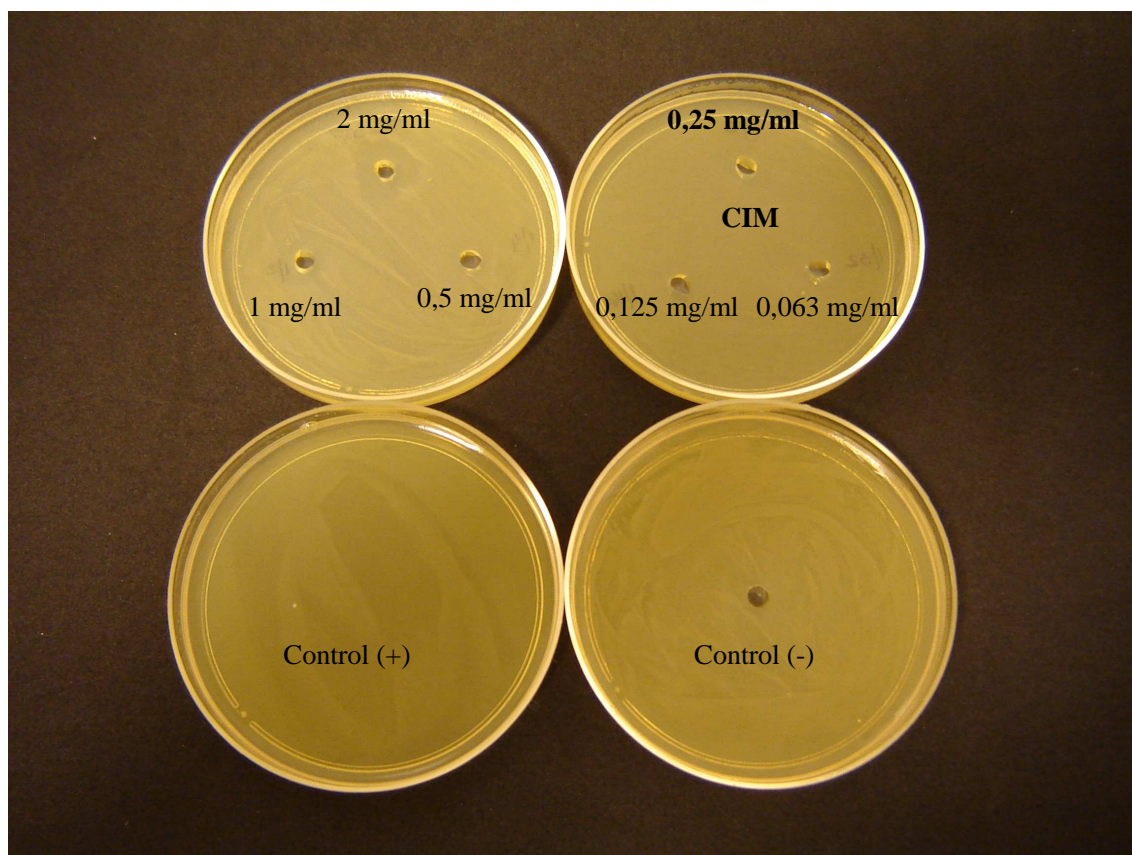
**Tabla N° 4:** Actividad antibacteriana del EB de *M. verticillata* frente a *P. larvae*.

Cepas	Concentraciones del Extracto de benceno de <i>M. verticillata</i> (mg/ml)						
	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,032
1	9,3±0,6	8,7±1,1	7,7±1,1	NI	NI	NI	NI
2	15,7±2,1	10,3±0,6	7,7±0,6	7,3±0,6	NI	NI	NI
3	ND	10,3±0,6	7,7±0,6	NI	NI	NI	NI
4	10,3±0,6	7,7±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI	NI
5	11,0±1,4	8,7±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI	NI
6	11,0±0,0	9,3±1,5	7,0±0,0	NI	NI	NI	NI
7	10,0±1,7	9,5±0,7	7,7±0,6	NI	NI	NI	NI
8	17,0±2,6	10,3±1,5	7,7±0,6	NI	NI	NI	NI
9	ND	8,3±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI	NI
10	9,3±0,6	7,7±1,1	7,5±0,7	NI	NI	NI	NI
11	9,7±0,6	7,7±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI	NI

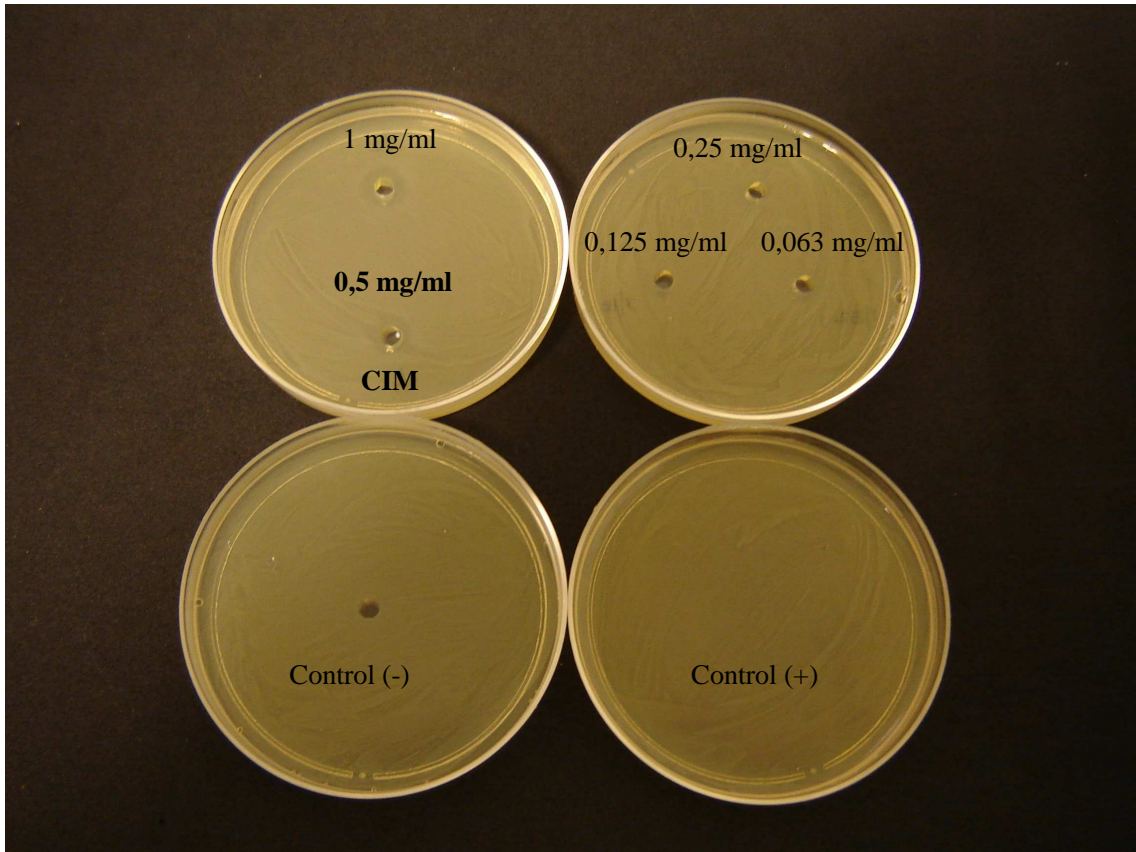
**NI:** No inhibe el crecimiento

**ND:** No determinado

La CIM de las cepas estudiadas varía dentro de un intervalo de concentración: 0,5-0,25 mg/ml. La cepa 2 demostró ser la más sensible al EB de *M. verticillata* ya que logró una CIM de 0,25 mg/ml (Figura 17), mientras que el resto de las cepas obtuvieron el mismo valor de CIM que fue de 0,5 mg/ml (Figura 18).



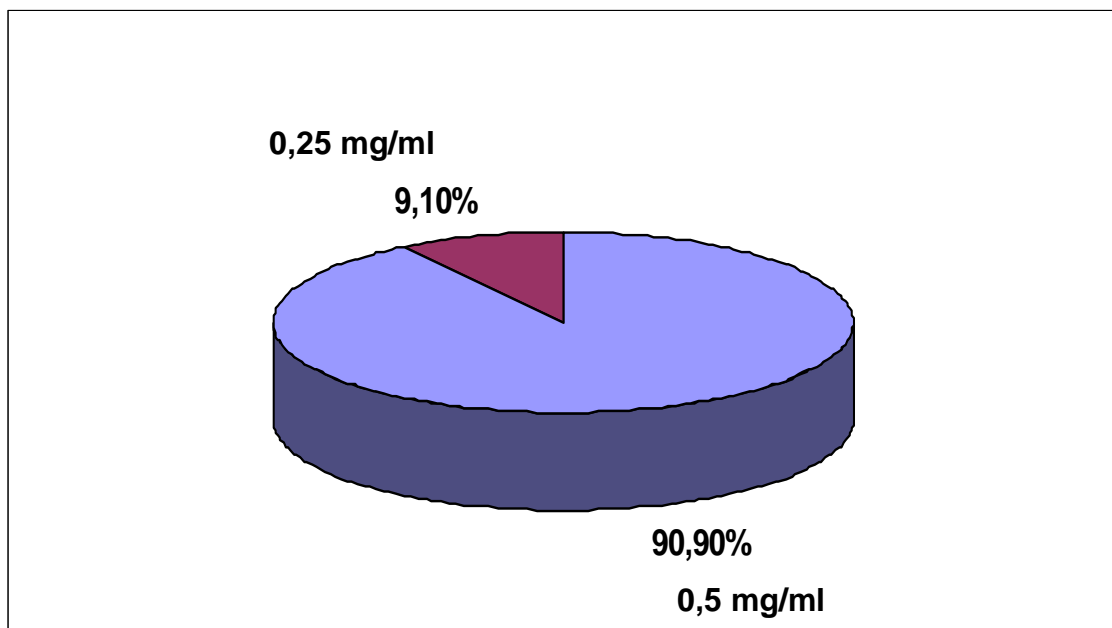
**Figura 17:** Actividad antibacteriana de EB de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 2.



**Figura 18:** Actividad antibacteriana de EB de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 3.

El gráfico 2 muestra que existe un porcentaje muy bajo (9,90%) de cepas que poseen el valor de CIM de 0,25 mg/ml. Por el contrario, el 90,90% de las cepas tiene una CIM de 0,5 mg/ml. Esto indica que para inhibir el crecimiento de la mayoría de las cepas de *P. larvae* con el EB se necesitan concentraciones más altas.

**Gráfico N°2 :** CIM de las cepas de *P. larvae* con el EB de *M. verticillata*



Extracto de éter etílico:

La tabla 5 muestra los valores promedio en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento y sus desviaciones estándar para todas las cepas ensayadas de *P. larvae* frente al EE de *M. verticillata*.

**Tabla N°5:** Actividad antibacteriana del EE de *M. verticillata* frente a *P. larvae*.

Cepas	Concentraciones del Extracto de éter etílico de <i>M. verticillata</i> (mg/ml)						
	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,032
1	9,7±0,6	9,0±1,0	7,3±0,6	6,5±0,7	NI	NI	NI
2	11,3±0,6	9,0±1,0	7,3±0,6	6,0±0,0	NI	NI	NI
3	9,7±0,6	8,7±0,6	7,3±0,6	6,5±0,7	NI	NI	NI
4	11,0±1,7	8,7±0,6	7,7±0,6	6,7±0,6	NI	NI	NI
5	12,3±1,5	8,7±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI	NI
6	11,3±1,1	9,3±1,1	7,3±0,6	6,5±0,7	NI	NI	NI
7	11,0±1,0	8,3±0,6	7,7±0,6	6,0±0,0	NI	NI	NI
8	10,7±1,1	8,0±0,0	6,7±0,6	NI	NI	NI	NI
9	12,0±1,0	9,0±0,0	7,3±0,6	6,0±0,0	NI	NI	NI
10	10,3±0,6	8,7±0,6	6,3±0,6	6,0±0,0	6,0±0,0	NI	NI
11	11,3±0,6	8,7±0,6	7,7±0,6	8,0±0,0	6,0±0,0	NI	NI

**NI:** No inhibe el crecimiento

En la misma se observa que los valores de CIM de las cepas estudiadas varían en el intervalo de 0,5-0,125 mg/ml. Las cepas más resistentes fueron las cepas 5 y 8 con una CIM de 0,5 mg/ml (Figura 19). Por el contrario, las cepas 10 y 11 fueron las más sensibles y su CIM fue de 0,125 mg/ml (Figura 20). La CIM de las cepas 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 9 fue de 0,25 mg/ml. En el caso del EE se puede observar que posee mayor actividad que el EB, debido a que produce inhibición del crecimiento de *P. larvae* a concentraciones más bajas (0,25-0,125 mg/ml), aun cuando el tamaño de los halos de inhibición es más pequeño.



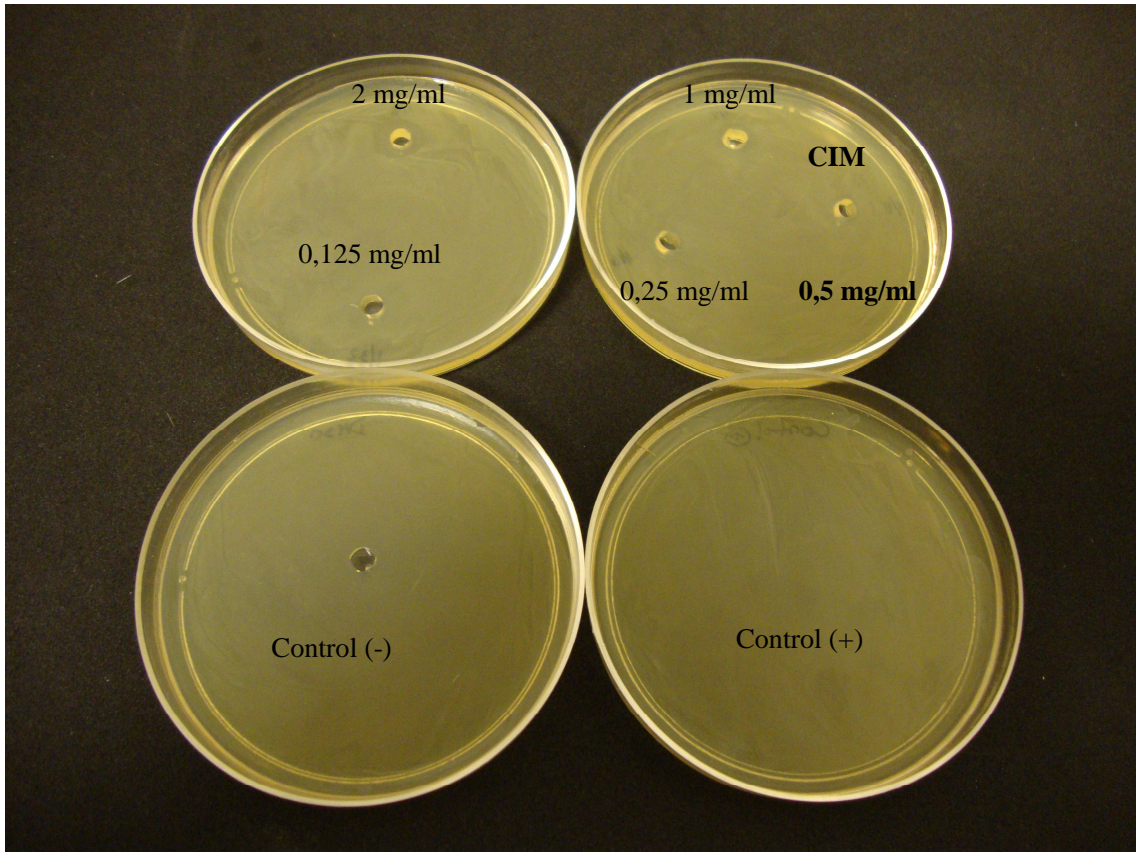


Figura 19: Actividad antibacteriana de EE de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 5.

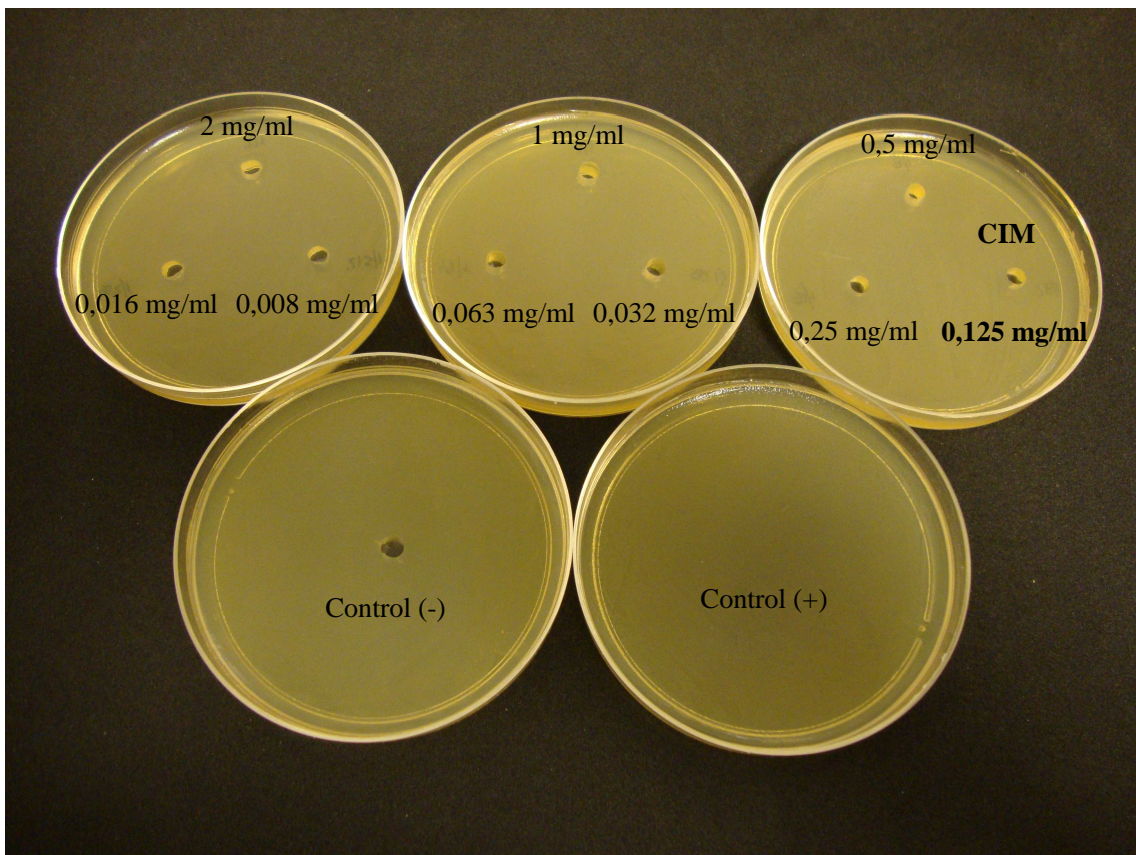
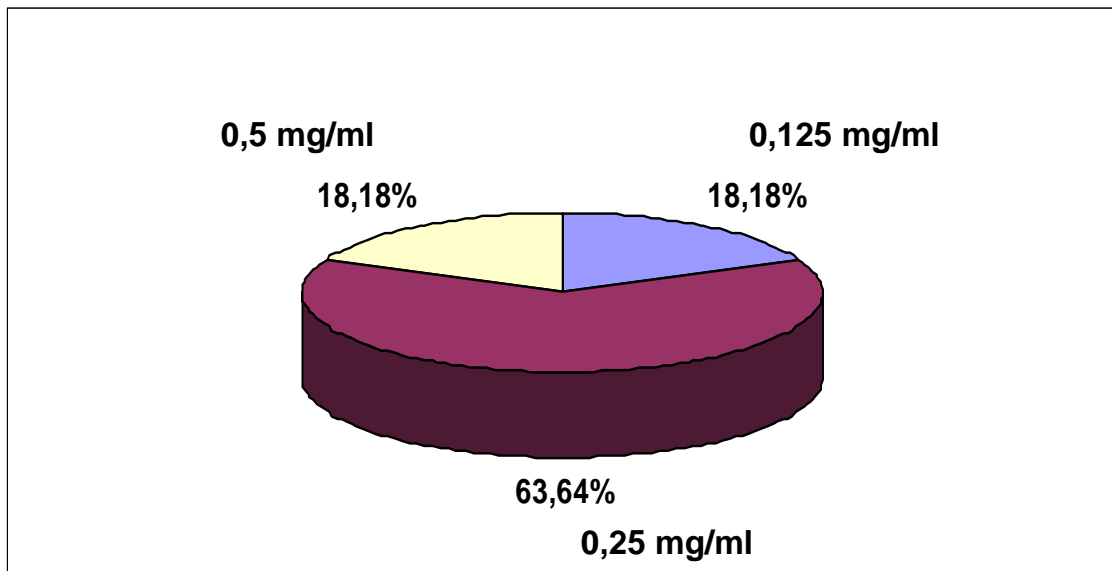


Figura 20: Actividad antibacteriana de EE de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 10.

En el gráfico 3 podemos visualizar que un 63,64% de las cepas obtuvo una CIM de 0,25 mg/ml, mientras que existe un igual porcentaje de cepas (18,18%) con una CIM de 0,5 y de 0,125 mg/ml. Por lo tanto, la mayoría de las cepas ensayadas fue inhibida por el EE en concentraciones relativamente bajas.

**Gráfico N°3** : CIM de las cepas de *P. larvae* con el EE de *M. verticillata*



Extracto de acetato de etilo:

Cuando se realizó la técnica de difusión en pozo con el EAE, se debió utilizar una solución madre del extracto más concentrada que las ensayadas anteriormente debido a que se notó que poseía menor actividad antibacteriana que los demás extractos. En la tabla 6 se muestran los valores promedios y la desviación estándar de los halos de inhibición del crecimiento de cada una de las cepas de *P. larvae* frente al EAE de *M. verticillata*.



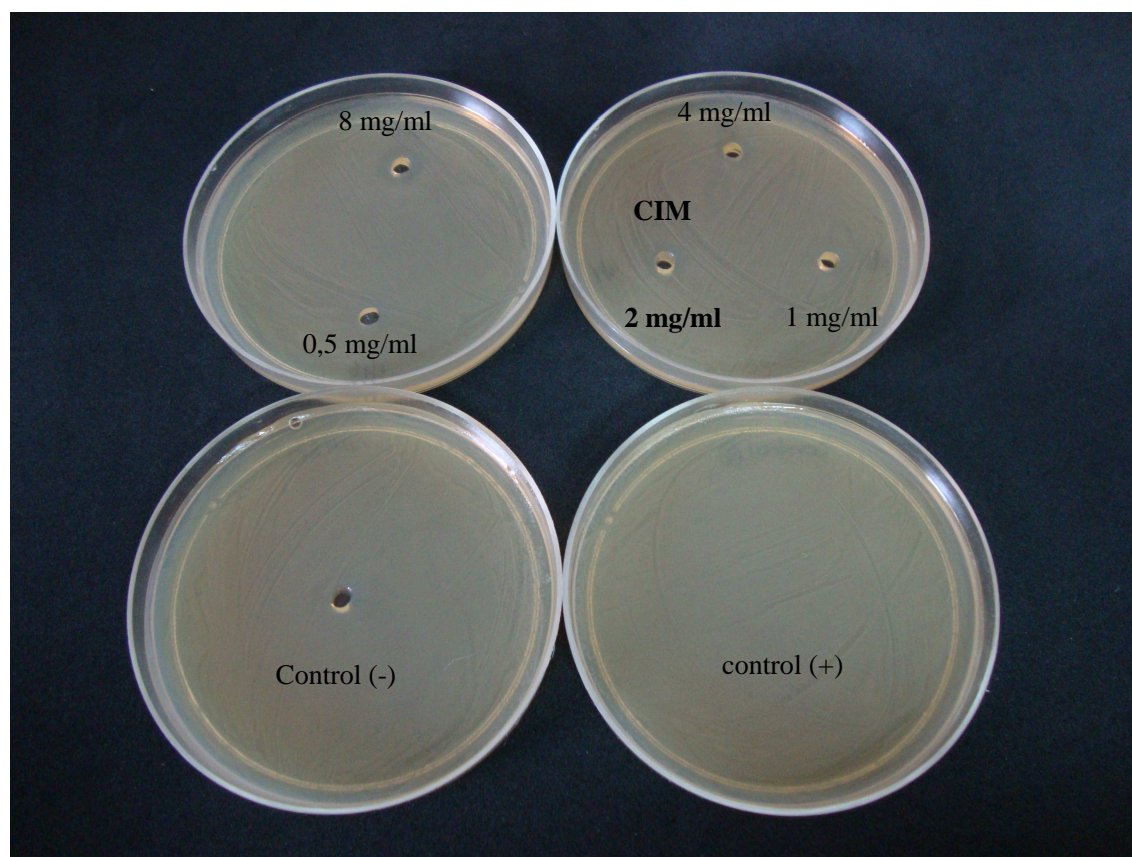
**Tabla N°6:** Actividad antibacteriana del EAE de *M. verticillata* frente a *P. larvae*.

Cepas	Concentraciones del Extracto de acetato de etilo de <i>M. verticillata</i> (mg/ml)						
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
1	ND	7,3±0,6	6,5±0,7	NI	NI	NI	NI
2	10,7±0,6	9,0±1,7	7,5±0,7	NI	NI	NI	NI
3	9,7±0,6	9,3±0,6	7,0±1,0	NI	NI	NI	NI
4	8,7±0,6	8,7±1,1	7,3±0,6	NI	NI	NI	NI
5	9,3±0,6	8,0±1,0	6,7±1,1	NI	NI	NI	NI
6	9,7±0,6	7,7±0,6	6,7±0,6	NI	NI	NI	NI
7	8,7±0,6	8,3±0,6	7,7±0,6	NI	NI	NI	NI
8	9,0±1,7	7,0±0,0	6,0±0,0	NI	NI	NI	NI
9	9,0±0,0	7,3±0,6	6,3±0,6	NI	NI	NI	NI
10	9,3±0,6	7,3±0,6	6,0±0,0	NI	NI	NI	NI
11	9,7±0,6	9,7±0,6	7,0±1,0	NI	NI	NI	NI

**NI:** No inhibe el crecimiento

**ND:** No determinado

Como muestra la tabla, el valor de CIM para todas las cepas estudiadas de *P. larvae* fue 2 mg/ml, es decir que la totalidad de las cepas tuvieron el mismo comportamiento frente al EAE de *M. verticillata* (Figura 21). Se puede observar a partir de estos resultados que el EAE fue el menos activo de todos los extractos de *M. verticillata*, debido a que se necesitó una concentración de 2 mg/ml para inhibir el crecimiento de todas las cepas de *P. larvae*.

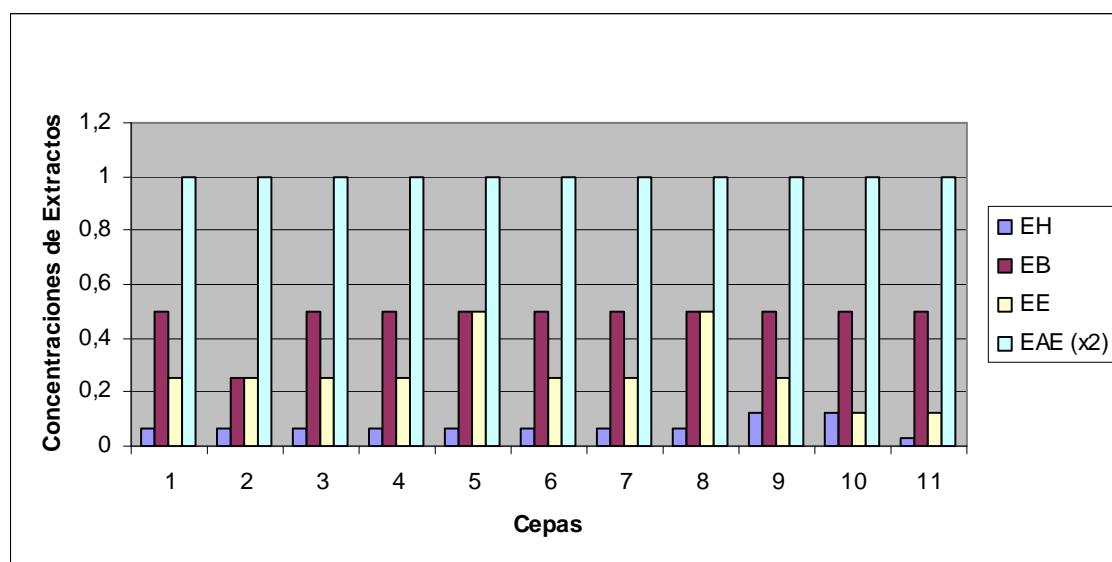


**Figura 21:** Actividad antibacteriana de EAE de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 2.

COMPARACION DE TODOS LOS EXTRACTOS

Luego de analizar las tablas correspondientes a cada extracto se puede decir que el EH de *M. verticillata* fue el más activo de todos, tal como se muestra en el gráfico 5, debido a que los valores de CIM de dicho extracto son los más bajos. Esto indica que para inhibir el crecimiento de las cepas estudiadas de *P. larvae* se necesitan concentraciones bajas del EH. Asimismo, el extracto menos activo fue el EAE, ya que se observó que debieron utilizarse altas concentraciones (2 mg/ml) del mismo para producir inhibición del crecimiento de *P. larvae*.

**Gráfico 5:** Comparación de los valores de CIM de las cepas de *P. larvae* con todos los extractos de *M. verticillata*



Las cepas 1, 3, 4, 6, 7 y 9 tuvieron prácticamente el mismo comportamiento frente a los extractos ensayados. El EH fue el más activo frente a estas cepas, en segundo lugar se encuentra el EE, luego el EB y por último el EAE. Si bien este comportamiento se observó en las 6 cepas anteriormente mencionadas se notó que la cepa 9 necesitó una concentración un poco mayor del EH (125 mg/ml) para inhibir su crecimiento, que el resto de las cepas indicadas.

En el caso de las cepas 2, 5 y 8, el extracto más activo también fue el EH mientras que el extracto que presentó menor actividad fue el EAE. Por otro lado, tanto el EB como el EE tuvieron prácticamente la misma actividad antibacteriana contra dichas cepas. Si bien esto último se observó en las tres cepas mencionadas, se notó que la cepa 2 necesitó concentraciones más bajas de ambos extractos para la inhibición de su crecimiento.

El EH fue el más activo frente a las cepas 10 y 11, mientras que el que presentó menor actividad fue el EAE. En el caso del EE y el EB, el primero fue el que presentó mayor poder de inhibición del crecimiento de estas cepas de *P. larvae*. Si bien el EH fue el más activo frente a estas 2 cepas, se notó que la cepa 11 fue aún más sensible a este extracto que la cepa 10, ya que se necesitaron concentraciones menores del extracto para inhibir su crecimiento.

Existen investigaciones sobre la actividad antibacteriana de aceites esenciales de manzanilla silvestre, tomillo andino, canela y sus componentes mayoritarios, frente a diferentes cepas de *P. larvae* (Fuselli et. al., 2005; Gende et. al., 2008) en los cuales se obtuvieron valores de CIM que fueron superiores a los que se alcanzaron en este trabajo; esto indicaría que los extractos de *M. verticillata*, en especial el EH, podrían ser utilizados en el tratamiento de Loque Americana debido a que se necesitan concentraciones muy bajas de los mismos para inhibir el crecimiento de las cepas de *P. larvae*, agente causal de esta enfermedad.

#### **6.4 Ensayo de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *M. verticillata*:**

Luego de determinar la actividad antibacteriana del AE de *M. verticillata* a través de la técnica de difusión en pozo, pudo observarse que los halos de inhibición del crecimiento eran de mayor tamaño que los producidos por los extractos vegetales. Sin embargo, los halos de inhibición no eran bien definidos y su medición no fue fácil. Esto puede deberse a que el AE es un compuesto poco polar y los medios de cultivo son polares, por lo que se vería dificultada la óptima difusión del aceite.

En la tabla 7 se muestran los valores promedios y la desviación estándar de los halos de inhibición del crecimiento de cada una de las cepas de *P. larvae* frente al AE de *M. verticillata*.

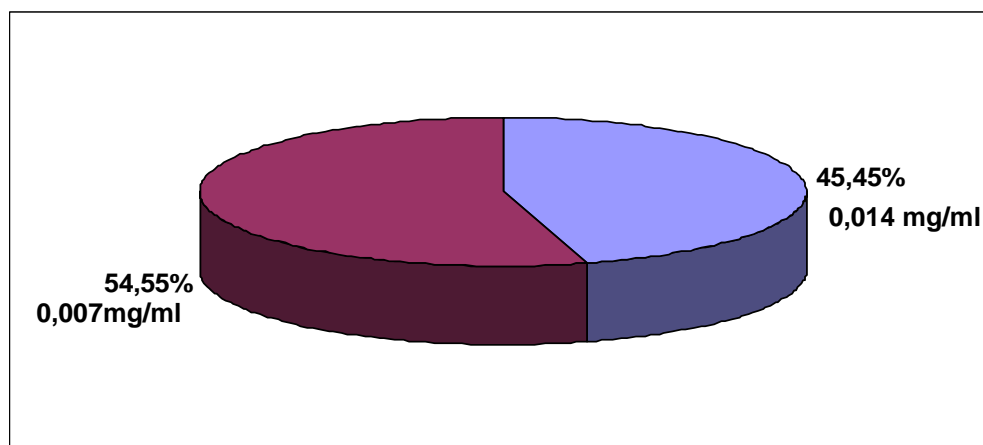
**Tabla N°7:** Actividad antibacteriana del AE de *M. verticillata* frente a *P. larvae*.

Cepas	Concentraciones del aceite esencial de <i>M. verticillata</i> (mg/ml)							
	0,435	0,218	0,109	0,054	0,027	0,014	0,007	0,003
1	12,7±4,6	12,0±2,6	14,3±4,0	10,7±1,1	9,5±0,7	8,5±0,7	NI	NI
2	12,3±2,1	10,0±1,0	13,3±0,6	10,0±0,0	8,0±1,4	7,5±0,7	NI	NI
3	12,0±4,4	22,0±1,7	17,3±1,5	10,7±1,5	8,0±0,0	7,3±0,6	7,0±0,0	NI
4	22,7±9,3	18,7±2,3	15,0±0,0	12,7±1,5	10,7±3,0	8,3±1,5	NI	NI
5	15,7±3,0	10,3±0,6	14,3±3,5	8,7±0,6	8,0±0,0	7,0±0,0	7,3±0,6	NI
6	13,5±3,5	14,0±0,0	14,3±1,1	9,3±0,6	8,3±0,6	7,0±0,0	7,0±0,0	NI
7	14,0±3,5	12,0±2,0	13,0±1,7	9,3±2,9	7,7±0,6	8,0±1,0	8,0±1,4	NI
8	14,7±2,1	14,3±3,2	15,3±2,1	11,0±2,0	8,3±1,1	7,7±0,6	8,3±0,6	NI
9	14,0±3,0	15,0±1,7	13,7±0,58	12,3±2,1	11,3±2,5	9,0±1,0	7,0±0,0	NI
10	11,3±0,6	12,3±2,9	13,5±0,7	13,5±0,7	10,0±2,0	9,5±2,1	NI	NI
11	15,0±1,4	8,0±0,0	11,3±1,1	12,5±0,7	9,0±1,0	7,7±1,1	NI	NI

**NI:** No inhibe el crecimiento

Como indica la tabla 7, las CIM de las diferentes cepas de *P. larvae* se encuentran dentro de un intervalo de 0,014-0,007 mg/ml. La CIM de las cepas 1, 2, 4, 10 y 11 fue de 0,014 mg/ml, mientras que el valor de la CIM de las cepas 3, 5, 6, 7, 8 y 9 fue 0,007 mg/ml.

**Gráfico N°4 :** CIM de las cepas de *P. larvae* con el AE de *M. verticillata*.



En el gráfico 4 se puede observar que la distribución de la CIM de las cepas es casi homogénea, el 54,55% posee un valor de CIM de 0,007 mg/ml y el 45,45% tiene una CIM de 0,014 mg/ml.

### 6.5 Ensayos de Cromatografía en capa delgada (TLC) y Bioautografía

Luego de realizar los ensayos de actividad antibacteriana de los extractos vegetales de *M. verticillata*, se observó que de todos los extractos, el de mayor actividad contra todas las cepas de *P. larvae* fue el EH. Con el objetivo de separar los principales componentes presentes en el EH se realizó un ensayo de cromatografía en capa delgada (TLC). Las fases móviles que proporcionaron una buena resolución de bandas fueron la fase de éter / hexano (7:3) y diclorometano / éter (7:3). En las TLC donde se utilizó como fase móvil éter / hexano, cuando se las colocó bajo luz UV (254 nm), se visualizaron 11 bandas bien definidas (Figura 22) y cuando se utilizó diclorometano / éter se observaron 8 bandas (Figura 23). En ambos casos se midieron los Rf de cada banda presente en los cromatofolios.

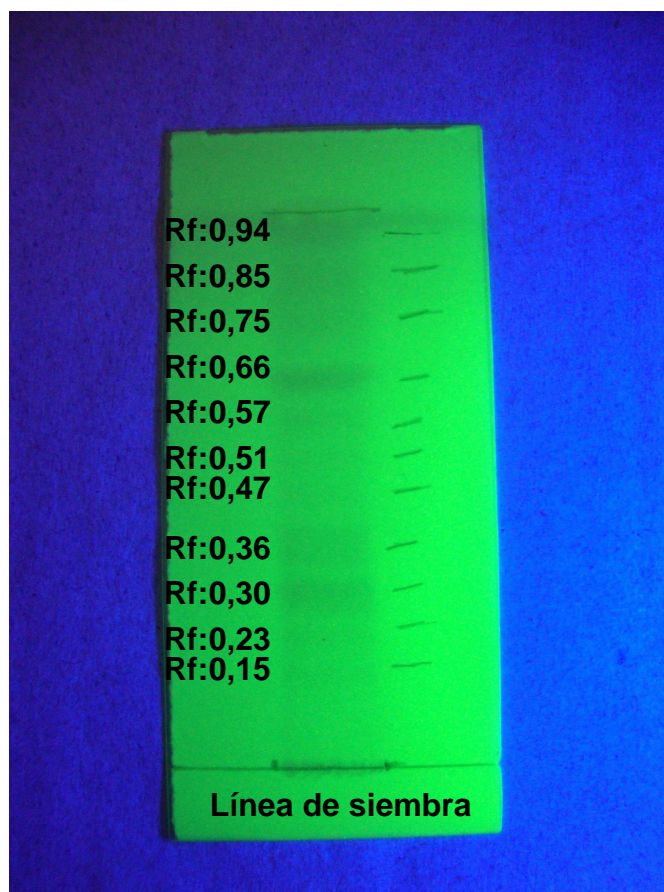
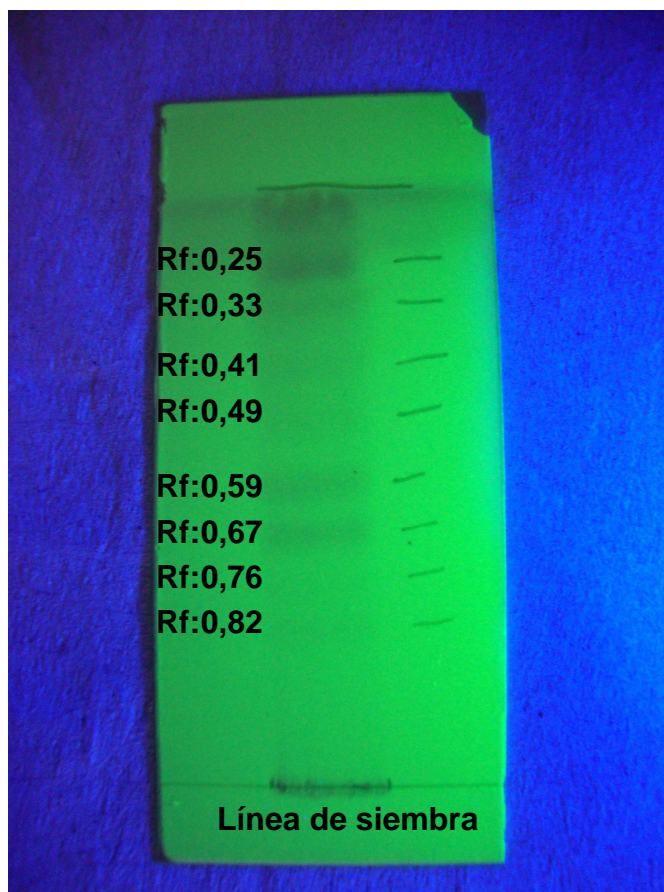


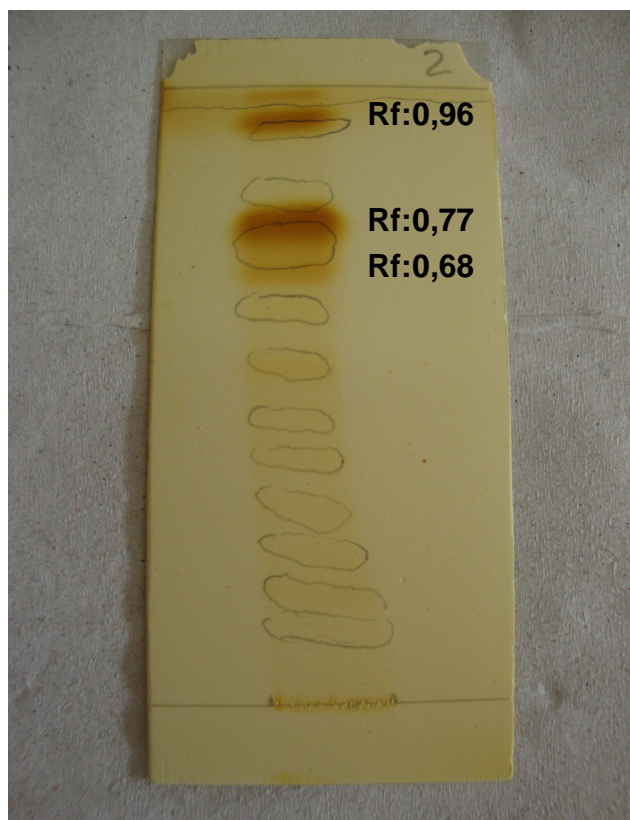
Figura 22: TLC con la fase móvil éter / hexano (7:3)



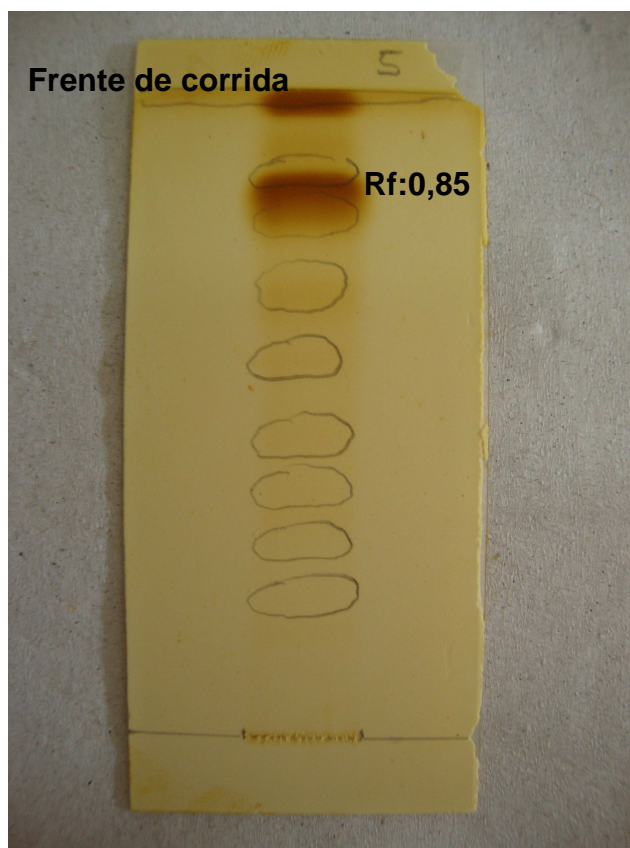


**Figura 23:** TLC con la fase móvil diclorometano / éter (7:3)

Para poder visualizar posibles bandas en los cromatofolios que no hubiesen sido reveladas bajo la luz UV, se agregaron grageas de yodo dentro de placas de Petri que contenían los cromatofolios. En los cromatofolios que fueron separados por la fase móvil éter / hexano se visualizaron 3 bandas nuevas con los siguientes Rf: 0,68; 0,77; 0,96 (Figura 24). Cuando fueron revelados los cromatofolios separados con diclorometano / éter se observaron 2 bandas nuevas, una de ellas coincidía con el frente de corrida y la otra poseía un Rf de 0,85 (Figura 25).



**Figura 24:** TLC con la fase móvil éter / hexano (7:3) revelada con yodo



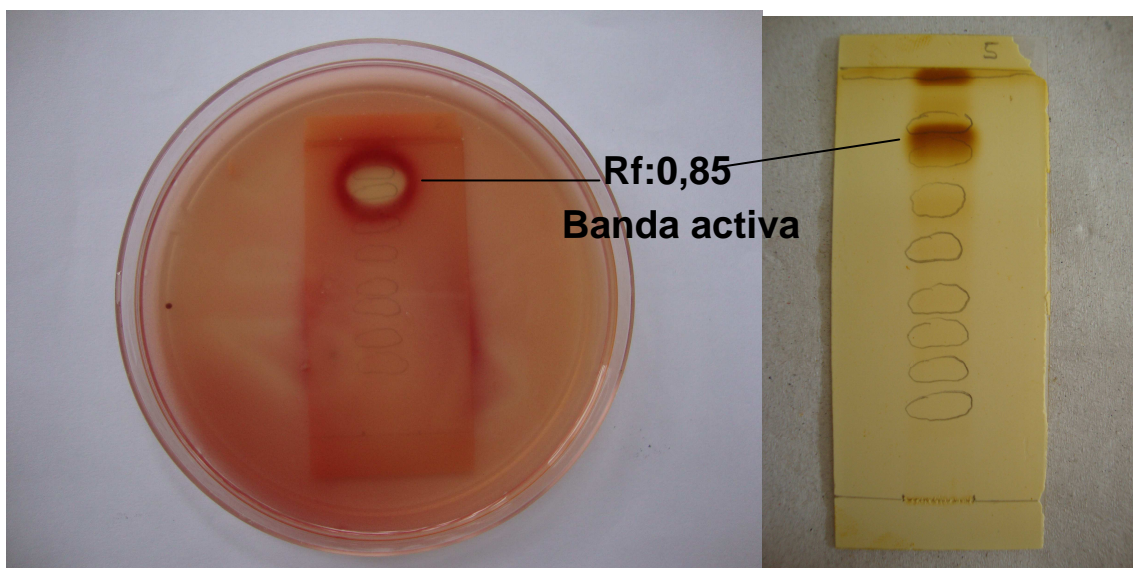
**Figura 25:** TLC con la fase móvil diclorometano / éter (7:3) revelada con yodo.

Con el objetivo de identificar cuál era la banda responsable de la actividad antibacteriana, se realizó el ensayo de Bioautografía. Esta técnica permite evaluar concentraciones mínimas del compuesto responsable de la actividad biológica observándose a simple vista la zona de inhibición del crecimiento (Marquez et. al., 2003). Para este ensayo se eligió el cromatofolio corrido con la fase móvil diclorometano / éter. Para poder visualizar las zonas de inhibición del crecimiento se utilizó el colorante vital cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio al 5% (TTC), la concentración óptima del colorante para que pueda ser reducido por las cepas de *P. larvae* (Gende, et. al., 2008). Luego del tiempo de incubación fue agregado 1 ml de TTC a las placas y se visualizó una amplia zona de inhibición del crecimiento de la cepa 7 de *P. larvae*. El Rf de dicha zona fue 0,85 (Figura 26). Este valor fue comparado con los valores de Rf de los cromatofolios y se observó que coincidía perfectamente con una banda que fue revelada con yodo (Figura 27). Esto estaría indicando que existe uno o más compuestos en el EH de *M. verticillata* que serían los responsables de la actividad antibacteriana contra *P. larvae*.



**Figura 26:** Ensayo de bioautografía del EH de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 7





**Figura 27:** Comparación de ensayo de bioautografía del EH de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 7 y cromatofolio revelado con yodo

Con estos resultados se podría plantear como proyección de este trabajo, identificar los compuestos presentes en el EH de *M. verticillata* que son los responsables de la actividad antibacteriana.

## 6. CONCLUSIONES:

- La tinción negativa permitió visualizar con claridad, la morfología externa, ubicación de esporas, flagelos y agrupación de las cepas de *P. larvae* estudiadas.
- Las diferentes cepas de *P. larvae* se conservaron óptimamente en medio de cultivo agarizado MYPGP a 4 °C, demostrando ser mejor método de conservación de las cepas que con glicerol al 20%.
- Todos los extractos y el aceite esencial de *M. verticillata*, fueron capaces de inhibir a la totalidad de las cepas de *P. larvae* estudiadas.
- De todos los extractos de *M. verticillata* ensayados, el EH fue el que presentó mayor actividad antibacteriana.
- El extracto de *M. verticillata* menos activo fue el EAE, ya que se debieron utilizar altas concentraciones (2 mg/ml) del mismo para producir inhibición del crecimiento de *P. larvae*.
- El 100% de las cepas ensayadas tuvieron la misma CIM frente al EAE (2 mg/ml).
- La medición de los halos de inhibición del crecimiento del aceite esencial de *M. verticillata* fue dificultosa debido a que no eran bien definidos. Esto pudo deberse a que el aceite, por su carácter apolar, no pudo difundir correctamente en el medio de cultivo.
- En los ensayos de cromatografía en capa delgada (TLC), las fases móviles que proporcionaron mejor resolución de bandas fueron las fases de éter / hexano (7:3) y diclorometano / éter (7:3).
- Los cromatofolios que fueron separados con éter / hexano (7:3) presentaron, bajo la luz UV, 11 bandas bien definidas.
- Los cromatofolios que fueron separados con diclorometano / éter (7:3) presentaron, bajo la luz UV, 8 bandas bien definidas.
- Cuando se reveló con yodo, en los cromatofolios separados con diclorometano / éter se observaron 2 bandas nuevas, una de ellas que coincidía con el frente de corrida y la otra poseía un Rf de 0,85.
- En el ensayo de Bioautografía se utilizó el cromatofolio corrido con diclorometano / éter, en el cual se observó una zona de inhibición con un Rf de 0,85.
- El Rf de la zona de inhibición del ensayo de Bioautografía coincide perfectamente con el Rf de una banda que fue revelada con yodo, lo cual estaría indicando que existen uno o más compuestos en el EH de *M. verticillata* responsables de inhibir el crecimiento de *P. larvae*.

- Con estos resultados se podría plantear como proyección de este trabajo, la identificación de los compuestos presentes en el EH de *M. verticillata* que son los responsables de la actividad antibacteriana.

## 7. BIBLIOGRAFÍA:

- **Agnese, A.; Pérez, C.; Cabrera, J. L. (2001).** *Adesmia aegiceras*: antimicrobial activity and chemical study. *Phytomedicine*, 8: 389-394.
- **Alippi, A. M. (1990)** Técnicas de laboratorio para el aislamiento e identificación de *Bacillus larvae* White, agente causal de la Loque Americana. Comisión de Investigaciones Científicas, provincia de Bs. As. Serie difusión. Año 2, N° 6.
- **Alippi, A. M.; Nuñez, L. (1991).** Loque Americana en Argentina. *Vida Apícola* 49: 20-24.
- **Alippi, A. M. (1992).** Detección de *Bacillus larvae* en poblaciones mixtas de esporas bacterianas a partir de restos larvales. *Microbiología SEM* 8: 115-118.
- **Alippi, A. M.; Ringuelet, J. A.; Cerimele, E. L.; Re, M. S.; Henning, C. P. (1996).** Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 4: 9-16.
- **Alippi, A. M. (2000).** Diversas ponencias presentadas en el XXXVI Congreso Internacional de Apicultura. *Ciencia y Abejas* 35: 6-7.
- **Alippi, A. M.; Albo, G. N.; Reynaldi, F. J.; De Giusti, M. R. (2005).** In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin. *Vet. Microbiol.* 109: 47–55.
- **Alippi, A. M.; Reynaldi, F. J. (2006).** Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *J. Invertebr. Pathol.* 91: 141–146.
- **Alkire, B. H.; Tucker, O. T.; Maciarelo, M. J. (1994).** Tipo, *Minthostachys mollis* (Lamiaceae): an Ecuadorian mint. *Economic Botany* 48: 60–64.
- **Antunez, K.; Harriet, J.; Gende, L.; Maggi, M.; Eguaras, M.; Zunino, P. (2008).** Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Vet. Microbiol.* 131: 324–331.
- **Apinetla.** [www.apinetla.com.ar/ar/sanidad](http://www.apinetla.com.ar/ar/sanidad)
- **Arias Toledo, B. (2009).** Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Vol. 8, Núm. 5, pp. 389-401. Sociedad Latinoamericana de Fotoquímica, Chile.
- **Ash, C.; Priest, F. G.; Collins, M. D. (1993).** Molecular identification of ribosomal RNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test –

proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64: 253–260.

- **Bailey, L.; Ball, B. V. (1991).** Honey Bee Pathology. Academic Press; London, UK, segunda edición 193pp.
- **Bastos, E. M. A. F.; Simone, M.; Jorge, D. M.; Soares, A. E. E.; Spivak, M. (2008).** In vitro study of the antimicrobial activity of brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 273–281.
- **Bocco M. E.; Vischi N.; Montani N. (1997).** Relevamiento de las plantas medicinales espontáneas del Departamento Río Cuarto (Córdoba, Argentina). *Parodiana* 10(1-2), 11-18.
- **Bounous, C.; Boga, V. (2005).** Fundamentos para el control de Varroa y Loque Americana. Editado por la Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA la Estancuela (Andes 1365, Piso 12, Montevideo- Uruguay) en el Boletín de divulgación, 87: 1-41.
- **Calderone, N. W.; Shimanuki, H.; Allen-Warden, G. (1994).** An in vitro evaluation of botanical compounds for the control of the honeybee pathogens *Bacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the secondary invader *B. alvei*. *Journal of Essential Oils Research*, 6: 279-287.
- **De Feo, V.; Ricciardi, A.; Biscardi, D. (1998).** Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epl. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research* 10, 61–65.
- **de Graaf, D. C.; Alippi, A. M.; Brown, J. D.; Evans, M.; Feldlaufer, A.; Gregorc, M.; Hornitzky, S. F.; Pernal, D. M. T.; Schuch, D.; Titéra, V. T.; Ritter, W. (2006).** Diagnosis of American Foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology* 43, 583–590.
- **De la Sota, M.; Bacci, M. (2004).** Manual de procedimientos: Enfermedades de las Abejas. Dirección Nacional de Sanidad Animal, Buenos Aires. 9-14.
- **Del Hoyo M.; Basualdo, M.; Torres, J.; Bedascarrasbure, E. L. (1998).** Use of DHT-equipment disinfection of AFB-contaminated Beehive materials in Argentina. *Am. Bee. J.* 138 (10): 738-740.
- **Dimitri, M. J. (1980).** Descripción de las especies cultivadas en la Argentina. En: Dimitri MJ (Ed), *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, Editorial ACME, Buenos Aires, p. 925.
- **Doering, A. (1913).** Sobre la esencia de la menta Argentina (*Bystropogon*). *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias* 19, 379–391.
- **Eguaras, M. J.; Fuselli, S.; Gende, L.; Fritz, R.; Ruffinengo, S. R.; Clemente, G.; Gonzalez, A.; Bailac, P. N.; Ponzi, M. I. (2005).** An in vitro evaluation of *Tagetes*

*minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. J. Ess. Oil Res. 17, 336–340.

- **Evans, J. D. (2003).** Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. J. Invertebr. Pathol. 83, 46–50.
- **Evans, J. D. (2004).** Transcriptional immune response by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. J. Invertebr. Pathol. 85, 105–111.
- **Evans, J. D.; Lopez, D. L. (2004).** Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol. 97, 752–756.
- **Evans, J. D.; Armstrong, T. N. (2005).** Inhibition of the American Foulbrood bacterium, *Paenibacillus larvae larvae*, by bacteria isolated from honey bees. J. Apic. Res. 44, 168–171.
- **Evans, J. D.; Armstrong, T. N. (2006).** Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. BMC Ecol. 6, 4.
- **Fester, G. A.; Gargallo, M. A.; Martinuzzi, E. A. (1947).** Algunas esencias volátiles de San Luís y Córdoba. Anales de Sociedad Científica Argentina 144, 457–471.
- **Fester, G. A.; Martinuzzi, E. A.; Gargallo, M. A. (1948).** Algunas esencias volátiles de San Luís y Córdoba. vol. 15, Revista de la Facultad de Química Industrial y Agrícola, Santa Fe, Argentina, pp. 3–20.
- **Fester, G. A.; Martinuzzi, E. A. (1949).** La esencia de peperina. Anales de la Asociación Química Argentina 37, 197–207.
- **Fester, G. A.; Martinuzzi, E. A. (1950).** La esencia de peperina. 2a comunicación. Anales de la Asociación Química Argentina 38, 255–267.
- **Fester, G. A.; Martinuzzi, E. A. (1952).** Sobre un ácido cristalino encontrado en la esencia de peperina. Anales de la Asociación Química Argentina 40, 246–248.
- **Fester, G. A.; Martinuzzi, E. A.; Retamar, J. A.; Ricciardi, A. I. A. (1956).** Estudios de esencias volátiles de Córdoba y San Luís. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias. Córdoba 39, 375–416.
- **Fester, G. A. (1958).** Substancias raras en esencias volátiles argentinas. Anales de la Asociación Química Argentina 46, 15–19.
- **Fester, G. A.; Martinuzzi, E. A.; Retamar, J. A.; Ricciardi, A. I. A. (1960).** Estudios sobre esencias volátiles argentinas, vol. 29, Revista de la Facultad Ing Quim, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, pp. 21–44.
- **Floris, L.; Carta, C. (1990).** In vitro activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil against *Bacillus larvae* White. Apicultura 6: 57-61.

- **Friedman, M.; Henika, P.; Levin, E.; Mandrell, R. (2004).** Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 52: 6042-6048.
- **Fuselli, S. R.; Gende, L. B.; García de la Rosa, S. B.; Eguaras, M. J., Fritz, R. (2005).** Short communication. Inhibition of *Paenibacillus larvae* Subs. *Larvae* by the essential oils of two wild plants and their emulsifying agents. *Spanish Journal of Agricultural Research* 3 (2), 220-224.
- **Fuselli, S. R.; García de la Rosa, S. B.; Gende, L. B.; Eguaras, M. J.; Fritz, R. (2006).** Antimicrobial activity of some argentinean wild plant essential oils against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American Foulbrood (AFB). *J. Apic. Res.* 45, 2–7.
- **Fuselli, S. R.; Garcia de la Rosa, S. B.; Eguaras, M. J.; Fritz, R.; Ndagijimana, M.; Vannini, L.; Guerzoni, M. E. (2007).** Efficacy of indigenous plant essential oil andean thyme (*Acantholippia seriphioides* A. Gray) to control American Foulbrood (AFB) in honey bee (*Apis mellifera* L.) hives. *J. Ess. Oil Res.* 19, 514–519.
- **Fuselli, S. R.; García de la Rosa, S. B.; Eguaras, M. J.; Fritz, R. (2008)a.** Chemical composition and antimicrobial activity of citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2067–2072.
- **Fuselli, S. R.; García de la Rosa, S. B.; Eguaras, M. J.; Fritz, R. (2008)b.** Susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* to essential oils distilled from exotic and indigenous argentinean plants. *J. Ess. Oil Res.* 20, 464–470.
- **Fuselli, S. R.; Maggi, M. D.; García de la Rosa, S. B.; Principal, J.; Eguaras, M. J.; Fritz, R. (2009).** In vitro antibacterial and antiparasitic effect of citrus fruit essential oils on the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* and the parasitic mite *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.* 48, 77–78.
- **Gallardo, G. L.; Pena, N. I.; Chacana, P.; Terzolo, H. R.; Cabrera, G. M. (2004).** L-tenuazonic acid, a new inhibitor of *Paenibacillus larvae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 609–612.
- **Gende, L. B.; Floris, I.; Fritz, R.; Eguaras, M. J. (2008).** Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentina. *Bull. Insectol.* 61, 1–4.
- **Gende, L. B.; Maggi, M. D.; Fritz, R.; Eguaras, M. J.; Bailac, P. N.; Ponzi, M. I. (2009).** Antimicrobial activity of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* essential oils against *Paenibacillus larvae*. *J. Ess. Oil Res.* 21, 91–93.
- **Genersch, E.; Forsgren, E.; Pentikaäinen, J.; Ashiralieva, A.; Rauch, S.; Kilwinski, J.; Fries, I. (2006).** Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and

- Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int J Syst Evol Microbiol 56, 501–511.
- **González, M. J. (2005).** Actividad antimicrobiana de extractos y/o productos vegetales de plantas aromáticas contra *Paenibacillus larvae* subespecie *larvae*. Tesis de grado para optar al título de Microbióloga. Universidad Nacional de Río Cuarto.
  - **Gupta, M. P. (1995).** Plantas medicinales iberoamericanas. Convenio Andrés Bello. CYTED. Bogotá, Colombia.
  - **Hansen, H.; Brodsgaard, C. J. (1999).** American Foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, 80 (1), 5–23.
  - **Heyndrickx, M.; Vandemeulebroecke, K.; Hoste, B.; Janssen, P.; Kersters, K.; De Vos, P.; Logan, N. A.; Ali, N. et al. (1996).** Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp *larvae* and *P. larvae* subsp *pulvifaciens*. Int J Syst Bacteriol 46, 270–279.
  - **INTA Balcarce (2004).**  
<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/alter/apic/loque.htm>
  - **Isman, M. B. (2006).** Botanical Insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* 51:45–6
  - **Jean-Prost, P.; Medori, P.; Y. Le Conte (2007).** Apicultura. Conocimiento de la abeja. Manejo de las colmenas. 4ª edición. Madrid. Pagina 47.
  - **Kochansky, J.; Knox, D. A.; Feldlaufer, M.; Pettis, J. S. (2001).** Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* 32, 215–222.
  - **Kochansky, A.; Pettis, J. (2005).** Screening additional antibiotics for efficacy against American Foulbrood. *J. Apic. Res.* 44, 24–28.
  - **Lauro, F. M.; Favaretto, M.; Covolo, L.; Rassu, M.; Bertoloni, G. (2003).** Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int J Food Microbiol* 81, 195–201.
  - **Litter, M. (1980).** Farmacología experimental y clínica. 6ta edición. Ed. El Ateneo. 1953p.
  - **Lodesani, M.; Costa, M. (2005).** Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues. *Bee World* 86, 102–109.
  - **Manual de la OIE. (2004).**  
[http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.9.02\\_Loque\\_america.pdf](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.9.02_Loque_america.pdf)



- **Marquez, B.; Cardenas, A.; Morales, C.; Verde Star, M. (2003).** Identificación de compuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium Aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. Ciencia UANL, vol VI, n3, p 333-338.
- **Martel, A. C.; Zeggane, S.; Drajnudel, P.; Faucon, J. P.; Aubert, M. (2006).** Tetracycline residues in honey after hive treatment. Food Addit. Contam. 23, 265–273.
- **Mendizábal, F. M. (2005).** Abejas, Editorial Albatros, Primera edición, Bs.As. 11-36.
- **Mimica-Dukic, N.; Bozin, B.; Sokovic, M.; Simin, N. (2004).** Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L (Lamiaceae) essential oil. Journal of Agricultural and Food chemistry, 52: 2485-2489.
- **Misra, G.; Pavlostathis, S.G. (1997).** Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and in soil-slurry system. Appl Microbiol Biotechnol 47:572–577
- **Miyagi, T.; Peng, C. Y. S.; Chuang, R. Y.; Mussen, E. C.; Spivak, M. S.; Doi, R. H. (2000).** Verification of oxytetracycline-resistant American Foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. J. Invertebr. Pathol. 75, 95–96.
- **Morse, R. A.; Flottum, K.; (1997).** In: Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. A.I. Root Co, Medina, Ohio, p. 718
- **Mussen, E. C. (2000).** Antibiotic-resistant American Foulbrood. Am. Bee J. 140, 300–301.
- **Nixon, M. (1982).** Preliminary world maps of honeybee diseases and parasites. Bee World 63 (1):23-42.
- **Núñez, C; Cantero, J. J. (2000).** Las plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. Ed. Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto. 1-144
- **Olofsson, T. C.; Vasquez, A. (2008).** Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. Curr. Microbiol. 57, 356–363.
- **Organización Mundial de la Salud (2003).** Directrices de la OMS sobre Buenas Practicas Agrícolas y de Recolección (BPAR) de plantas medicinales. 1-87.
- **Palacios, S.; Bertoni, A.; Rossi, Y.; Santander, R.; Urzúa, A. (2009).** Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.). Parasitol Res (2009) 106:207–212.
- **Peng, C. Y. S.; Mussen, E. C.; Fong, A.; Montague, M. A.; Tyler, T. (1992).** Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared in vitro. J. Invertebr. Pathol.60, 127–133.
- **Peng, C. Y. S.; Mussen, E. C.; Fong, A.; Cheng, P.; Wong, G.; Montague, M. A. (1996).** Laboratory and field studies on the effect of the antibiotic tylosin on honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) development and prevention of American Foulbrood disease. J. Invertebr. Pathol. 67, 65–71.

- **Pérez, C.; Agnese, A. M.; Cabrera, J. L. (1999).** The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): chemical composition and antimicrobial activity tests. *Journal of Ethnopharmacology*, 66: 91-96.
- **Piccini, C.; Zunino, P. (2001).** American Foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 176–177.
- **Primo, V; Rovera, M. (2001).** Determinación de la actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. *Revista Argentina de Microbiología*; 33: 113-117.
- **Ratera, E. L.; Ratera, M. O. (1980).** Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular, 1°Ed, Editada en Bs. As. Por Hemisferio Sur S.A. 1-189.
- **Schmidt-Lebuhn, A. N. (2008).** Revision of the genus *Minthostachys* (Labiatae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 98, 1–77.
- **Sorau, S. B.; Bandoni, A. L.; Labiadas. En: Sorau, S. B.; Bandoni, A. L. (1994)** *Plantas de la Medicina Popular Argentina*. Ed. Albatros, Buenos Aires, p. 62-64.
- **Spivak, M. S.; Reuter, G. S. (2001).** Resistance to American Foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 32, 555–565.
- **Sridhar, R. S.; Rajagopal, R. V.; Rajavel, R.; Masilamani, S.; Narasimhan, S. (2003).** Antifungal activity of some essential oils. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 51: 7596-7599.
- **Stroh, J.; Wan, M. T.; Isman, M. B.; Moul, D. J. (1998).** Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. *Bull Environ Contam Toxicol* 60:923–930
- **Tepe, B.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Sokmen, M.; Polissiou, M. (2005).** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Savia tomentosa* Millar (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90: 333-340.
- **Ugarte Ochoa, M. A.; Alencastre Medrano, L.; Sicos Huamán, A. (1984).** La Muña en el conocimiento popular Andino. In: Caballero Osorio, A.A., Ugarte, M.A. (Eds.), *Muña: investigación y proyección social*. Instituto de Investigaciones UNSAAC—NUFFIC, Cuzco, pp. 5–16.
- **Wedemig, M.; Riessberger-Galle, U.; Crailsheim, K. (2003).** A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus larvae larvae*. *Apidologie* 34, 43 51.
- **White, A. (1982).** *Herbs of Ecuador*. Ediciones Libri Mundi, Quito, Ecuador.
- **Williams, J. R.; Peng, C. Y. S.; Chuang, R. Y.; Doi, R. H.; Mussen, E. C. (1998).** The inhibitory effect of azadirachtin on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood in the honeybee, *Apis mellifera* L. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 252–257.

- **Woodrow, A. W. (1941).** Susceptibility of honey bee larvae to American Foulbrood. *Gleanings Bee Cult.*, **69**,148–151.
- **Ybarra, F.; Oliva, M.; Daghero, J.; Zanon, S.; Sabini, L.; Zygadlo, J.; Demo, M. (2005).** Composición química de aceites esenciales de *Minthostachys verticillata* (Argentina) recolectadas en distintas épocas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* v.12 n.1 Ciudad de la Habana. Enero.-marzo. 2007
- **Zanón, S. M.; Ceriatti, F. S. (1999).** Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*; 41 (2): 59-62.