

69521

GONZALEZ, M. J
Caracterización de A

2011

69521



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Tesis Doctoral

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**"CARACTERIZACIÓN DE ALGUNOS PRODUCTOS
NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
CONTRA *Paenibacillus larvae*, AGENTE CAUSAL
DE LOQUE AMERICANA"**

María Juliana González

Septiembre de 2011

69521

MFN:
Clasif: V-707



Universidad Nacional De Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Microbiología e Inmunología

Departamento de Química

Director:

.....
Dr. Juan Miguel Marioli

Codirectora:

.....
Dra. Alicia Mariel Agnese

Miembros de la Comisión de Tesis:

.....
Dra. Mónica Garrido
.....
Dra. Graciela Savoy
.....
Dr. Julio Zygaldo

A mi Papá y a mi Mamá

Haber recorrido este camino y llegar a la cima alcanzando la meta propuesta, es una buena razón para detener la marcha, aunque sea por un momento, y aprovechar esta parada para mirar hacia atrás el camino recorrido, celebrar lo alcanzado y agradecer profundamente a todos aquellos que caminaron conmigo...

Juan, mi director, siempre me alentaste para no bajar los brazos y seguir adelante; por la paciencia, los consejos y la confianza depositada en mí.

Mariel, mi codirectora, por el tiempo y la dedicación que me brindaste, la distancia no impidió que aprendiera de tu experiencia y de tus aportes.

Los miembros de la comisión de tesis, Mónica, Graciela y Julio, por los consejos, las sugerencias y la buena disposición.

Mamá y Papá fueron y son los pilares más fuertes que me sostienen. Por la confianza, la libertad y el empuje que me dan para salir y seguir siempre hacia adelante. Nunca me van a alcanzar las palabras para agradecerles todo y lo tanto que me dan día a día.

Mariano y Ana, desde acá y desde allá... siempre conmigo. Con ustedes aprendo mejor que con nadie que la distancia no es ausencia... Por ese regalo... el mejor regalo que podían hacerme: Jero sos mi vida entera!!!

Abuela Irma, tío Carlos, tía Nelly y Marianela, por acompañarme en cada etapa de mi vida.

Vero, Rebe, Pauli, Iris y Ana, cuántas veces he pensado y dicho que si no hubiese sido microbióloga, no las hubiese conocido... Hoy puedo afirmar que es totalmente al revés... que si no las hubiese conocido, no sería la persona que soy ni hubiese podido llegar hasta acá.

Mari, mi compañera de viaje, mi sostén, mi oído y mucho más. Compartirlo con vos hizo que los obstáculos fueran más fáciles de superar, el trabajo más liviano de hacer, y que la alegría y los buenos momentos se duplicaran por mil.

Gabi, por ser esa persona que me tranquiliza y me alienta siempre para seguir, desde la simpleza y con la fortaleza que te caracterizan.

Vale, siempre con optimismo y con tanta generosidad, tu compañía también fue muy importante para transitar este camino.

Queridas amigas, son lo más valioso que me llevo de este tramo del camino!!!

Mis amigas de toda la vida, las que están desde siempre, Vale, Marilú, Ana Pauli, Gabi, Marce y Romi, por estar en todo momento cerca mío, aunque pasan los años y cada una tomó su rumbo, siempre están acompañándome; también Agus, Dani, José, Mari y Noe.

Pato y Lau, que de ser mis vecinas se transformaron en esas amigas y compañeras de tantas charlas, mates, caminatas, terrazas y mucho más.

Emi, Lilo, Valen, Luquis, Jero, Franche y Emi... estos bajitos son mis grandes razones de vivir! Gracias por pintar mis días de colores y llenarlos con su inocencia y alegría.

Ceci, porque además de compartir ese sol que tenemos de sobrino, compartimos tantas cosas más... tus charlas y compañía me hacen tan bien.

Diego, fuiste un gran compañero de ruta, guardo cada uno de los momentos compartidos y vividos.

Moni, porque siempre, desde el comienzo, estuviste cerca mio, acompañándome y dándome ese empujoncito cuando lo necesitaba. Por tu gran fortaleza... Te admiro! Como siempre te digo... sos mi mamá académica!!!

Mis chicas, Juli, Denise, Adri y Aye... y las que también fueron un poquito más, Clau, Estefi, Andre Vale, Evange y Majo, porque me dejaron caminar a su lado y ser partícipe de sus caminos, haberlas visto alcanzar sus metas me llena de satisfacción. Fue recíproco y aprendí mucho de y con ustedes.

Susi, Ceci, Dani y Lauri, las chicas de Alimentos, porque me hacen sentir una más... Por dejarme elegir las... Cuánto aprendo con ustedes!!!!

Mirta, Mechi, Nico y Cari, los vecinos y compañeros de laboratorio, que desde "al lado" me escucharon y me brindaron todo el apoyo en los buenos y en los malos momentos.

Ceci, Vivi, Claudia, Mirta, Lili y Elina, sus consejos siempre llegaron en el momento justo y preciso.

Shana, Bruno, Clau, Sabri y Andrés, por los buenos momentos compartidos, no sólo en el laboratorio... Que continúen através del tiempo y la distancia!!!

Y cuantas personas más que también estuvieron acompañándome a lo largo del camino... Gracias por todo!!!

Detenerse por un momento para después retomar el camino y seguir recorriéndolo, puede ser la mejor forma de descansar para encarar mejor lo que sigue, de prepararse para el siguiente desafío y también la oportunidad de premiarse por los obstáculos dejados atrás...

*Todo lo que sabes
todo lo que eres
todo lo que haces
todo lo que tienes
todo lo que crees
todo te ha servido para llegar hasta aquí...*

*¿Cómo seguir?
¿Cómo hacer para ir más allá?*

*Es tiempo de usar
todo lo que todavía no sabes
todo lo que aún no eres
todo lo que por ahora no haces
todo lo que afortunadamente no tienes
todo aquello en lo que no crees...*

JB

La Loque Americana es una enfermedad bacteriana que afecta el estado larval de la abeja doméstica (*Apis mellifera*). Es causada por *Paenibacillus larvae*, bacilo Gram positivo cuya principal característica es la de formar esporas muy resistentes. El control de la enfermedad se realiza con tratamiento quimioterápico con el empleo de antibióticos. Sin embargo, el uso indiscriminado de éstos induce la aparición de cepas bacterianas resistentes; además, pueden dejar residuos en la miel y en otros productos de la colmena. Es por ello que esta problemática señala la necesidad de disponer de una metodología adecuada para controlar el estado sanitario de las colmenas mediante procedimientos ecológicamente limpios. El uso de extractos de vegetales se presenta como un tratamiento alternativo interesante y no contaminante para combatir la enfermedad. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que extractos de diferentes especies vegetales, poseen actividad antibacteriana frente a *P. larvae*. Entre éstos, *Achyrocline satureioides* y *Minthostachys verticillata*, dos especies nativas muy usadas en medicina naturista y popular, fueron las más efectivas.

Por ello, y dado que no existen investigaciones realizadas sobre el uso de estas especies en el tratamiento contra Loque Americana, se propone determinar los compuestos con actividad antimicrobiana sobre *P. larvae* en diferentes extractos y el aceite esencial de *A. satureioides* y de *M. verticillata*.

Se emplearon cepas de *P. larvae* aisladas de colmenas del Dpto. Río Cuarto y cepas provistas por INTA Balcarce. *A. satureioides* y *M. verticillata* fueron recolectadas en las sierras de Córdoba de las cuales se obtuvieron: aceite esencial (AE) mediante destilación por arrastre con vapor de agua utilizando un hidrodstilador con trampa tipo Clevenger, y extractos de hexano (EH), benceno (EB), éter etílico (EE) y acetato de etilo (EAE) mediante una extracción líquido-líquido en forma sucesiva. La bioactividad se evaluó por las técnicas de microdilución en caldo y difusión en pozo, siendo los EH de ambas especies, quienes presentaron mayor actividad antibacteriana. La separación mediante cromatografía en capa delgada (CCD) de los componentes de los AE y de los EH, mostró la presencia de 11 bandas con diferentes Rf para el AE y 9 bandas con diferentes Rf para el EH de *A. satureioides*, mientras que para *M. verticillata*, la CCD mostró la presencia de 5 bandas con diferentes Rf para el AE y 14 bandas con diferentes Rf para el EH. De estas bandas, 10 del AE y 4 del EH de *A. satureioides* evidenciaron actividad antibacteriana cuando se las estudió mediante la técnica de bioautografía. Para *M. verticillata*, 4 bandas del AE y 1 banda del EH evidenciaron actividad antibacteriana cuando se las estudió mediante la misma técnica. Finalmente, la identificación de los componentes se realizó mediante cromatografía gaseosa y cromatografía líquida de alta eficacia, determinando que 1,8-cineol, α -copaeno, β -cariofileno, calacoreno, óxido de β -cariofileno, cubenol y cadinol son los componentes responsables de la actividad antibacteriana del AE de *A. satureioides*, mientras que los componentes activos del AE de *M. verticillata* son 1,8-cineol, ocimeno, mentona, isomentona, mentol, α -terpineol, pulegona, carvona, mentil acetato y trans-isolimoneno.

Estos resultados constituyen la primer evidencia del uso de *A. satureioides* y *M. verticillata* como agentes antibacterianos frente a *P. larvae* e indican la elevada sensibilidad que presenta dicha bacteria frente a productos naturales. Es así como se propone el uso de extractos vegetales como tratamiento alternativo y natural para controlar el estado sanitario de las colmenas, incrementando la producción y la calidad de sus productos.

American Foulbrood (AFB) is a common bacterial disease of the honey bee (*Apis mellifera*) brood. AFB is produced by the Gram positive, spore-forming bacterium *Paenibacillus larvae*. Different antibiotics have been used to control AFB, but concerns still remain regarding the emergence of resistant strains or the residues that they may leave in beehive products. Thus, the development of new strategies to treat AFB infected honey bee colonies is necessary. Essential oils and extracts from plants are known to retard or inhibit the growth of *P. larvae*. Previous studies in our research group showed that extracts from different vegetal species possess antibacterial activity against *P. larvae*. Among these, *Achyrocline satureioides* and *Minthostachys verticillata*, two native species widely used in natural and popular medicine, were the most effective. Therefore, and since in our literature search we could not find much information on the use of these species in the treatment of AFB, the aim of this study was to identify compounds with antimicrobial activity against *P. larvae* in different extracts and essential oils of *A. satureioides* and *M. verticillata*.

Strains of *P. larvae* were isolated from apiaries exhibiting clinical symptoms of the disease in the Río Cuarto department in Córdoba. We also used strains of *P. larvae* kindly provided by INTA Balcarce. *A. satureioides* and *M. verticillata* species were collected from southern Córdoba. Different extracts were obtained from them: essential oils (EO) by hydro-distillation in Clevenger type apparatus, and hexane (HE), benzene (BE), ethyl ether (EE) and ethyl acetate extracts (EAE) by liquid-liquid extraction. The bioactivity was evaluated by broth microdilution methods and agar diffusion methods, being the EH of both species the extract who had the greater antibacterial activity. Separation of the components of the EO and the HE of *A. satureioides* by thin layer chromatography (TLC) showed the presence of 11 and 9 bands for the EO and the HE, respectively. On the other hand, the analysis by TLC of the EO and the HE of *M. verticillata* showed the presence of 5 and 14 bands for the EO and the HE, respectively. Bioautography analysis showed that 10 bands of the EO and 4 of the HE of *A. satureioides* possessed antibacterial activity against *P. larvae*. A similar analysis for *M. verticillata* extracts showed that 4 bands of the EO and 1 band of the HE presented antibacterial activity against *P. larvae*. Finally, the components of the EO were performed by gas chromatography, while preliminary identification of HE components was tried by high performance liquid chromatography. 1,8-cineole, α -copaene, β -caryophyllene, calacorene, β -caryophyllene oxide, cadinol and cubenol are the compounds responsible for antibacterial activity of EO of *A. satureioides*, while the active compounds of the EO of *M. verticillata* are 1,8-cineole, ocimene, menthone, isomenthone, menthol, α -terpineol, pulegone, carvone, menthyl acetate and trans-isolimonene.

These results provide the first evidence of the use of *A. satureioides* and *M. verticillata* as antibacterial agents against *P. larvae* and indicate the high sensitivity that showed by these bacteria to natural products. Thus, we propose the use of plant extracts as natural and alternative treatments to control the health of the beehives, increasing the production and the quality of their products.

INTRODUCCIÓN

1- Plantas Medicinales	31
1.1- Definición	31
1.2- Las especies vegetales en la historia de la medicina.....	31
1.3- Aceites esenciales y extractos vegetales	32
1.3.1- Formas de obtención de aceites esenciales y extractos vegetales.....	33
1.3.2- Formas de análisis de aceites esenciales y extractos vegetales	34
1.4- Actividad antimicrobiana de aceites esenciales y extractos vegetales	35
1.4.1- Técnicas de análisis de la actividad antimicrobiana.....	36
2- Enfermedades de las abejas.....	38
3- Loque Americana	39
3.1- Características de la enfermedad.....	39
3.2- Agente causal	40
3.3- Patogenia	41
3.4- Sintomatología.....	43
3.5- Diagnóstico de laboratorio	46
3.6- Control de la enfermedad	47
3.6.1- Tratamiento quimioterápico convencional	48
3.6.2- Tratamiento quimioterápico alternativo.....	49
4- <i>Achyrocline satureioides</i>	50
4.1- Descripción general de la especie vegetal	50
4.2- Principales componentes químicos	51
4.3- Usos y propiedades biológicas	51
5- <i>Minthostachys verticillata</i>	51
5.1- Descripción general de la especie vegetal	51
5.2- Principales componentes químicos	53
5.3- Usos y propiedades biológicas	53
HIPÓTESIS	57
OBJETIVOS.....	61
MATERIALES Y MÉTODOS	
1- <i>Paenibacillus larvae</i>.....	65
1.1- Aislamiento, cultivo e identificación de cepas.....	65
1.2- Mantenimiento y conservación de cepas.....	68
2- Especies vegetales	68
2.1- Recolección y procesamiento del material vegetal.....	68
2.2- Obtención de productos vegetales	69

3- Actividad antibacteriana	71
3.1- Ensayo de la actividad antibacteriana del AE de <i>A. saturoioides</i> por la técnica de microdilución en caldo.....	71
3.2- Ensayo de la actividad antibacteriana de los extractos de <i>A. saturoioides</i> y de <i>M. verticillata</i> por la técnica de difusión en pozo.....	71
3.3- Visualización del efecto del EH de <i>A. saturoioides</i> y de <i>M. verticillata</i> mediante microscopía electrónica de transmisión	72
4- Cromatografía en capa delgada	73
5- Bioautografía	73
6- Cromatografía gaseosa	74
7- Cromatografía líquida de alta eficacia	75
8- Oxitetraciclina	75

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1- <i>Paenibacillus larvae</i>	79
1.1- Aislamiento, cultivo e identificación de cepas.....	79
1.2- Mantenimiento y conservación de cepas.....	85
2- Especies vegetales	86
2.1- Recolección y procesamiento del material vegetal.....	86
2.2- Obtención de productos vegetales.....	86
3- Actividad antibacteriana	88
3.1- Ensayo de la actividad antibacteriana por la técnica de microdilución en caldo	88
3.1.1- Ensayo de la actividad antibacteriana del AE de <i>A. saturoioides</i>	88
3.2- Ensayo de la actividad antibacteriana por la técnica de difusión en pozo.....	91
3.2.1- Ensayo de la actividad antibacteriana del EH de <i>A. saturoioides</i>	91
3.2.2- Ensayo de la actividad antibacteriana del EB de <i>A. saturoioides</i>	92
3.2.3- Ensayo de la actividad antibacteriana del EE de <i>A. saturoioides</i>	94
3.2.4- Ensayo de la actividad antibacteriana del EAE de <i>A. saturoioides</i>	96
3.2.5- Ensayo de la actividad antibacteriana del AE de <i>M. verticillata</i>	98
3.2.6- Ensayo de la actividad antibacteriana del EH de <i>M. verticillata</i>	100
3.2.7- Ensayo de la actividad antibacteriana del EB de <i>M. verticillata</i>	101
3.2.8- Ensayo de la actividad antibacteriana del EE de <i>M. verticillata</i>	103
3.2.9- Ensayo de la actividad antibacteriana del EAE de <i>M. verticillata</i>	104
3.3- Visualización del efecto del EH de <i>A. saturoioides</i> y de <i>M. verticillata</i> mediante microscopía electrónica de transmisión	107
4- Cromatografía en capa delgada	110
5- Bioautografía	115

6- Cromatografía gaseosa	122
7- Cromatografía líquida de alta eficacia	137
8- Oxitetraciclina	140
CONCLUSIONES	145
ANEXO I.....	149
ANEXO II.....	157
BIBLIOGRAFÍA	175

Figura 1: Esporas de <i>Paenibacillus larvae</i>	40
Figura 2: Pupa sana y pupa afectada con Loque Americana.....	42
Figura 3: Progresión de la enfermedad.....	43
Figura 4: Sintomatología de la enfermedad.....	44
Figura 5: Crías muertas por Loque Americana. Formación de la lengua pupal en larvas de <i>A. mellifera</i>	45
Figura 6: <i>Achyrocline satureioides</i>	50
Figura 7: <i>Minthostachys verticillata</i>	52
Figura 8: Hidrodestilador y trampa tipo Clevenger para la extracción de AE.....	69
Figura 9: Obtención de extractos con solventes menos denso que el agua y de polaridad creciente.....	70
Figura 10: Cuadros con síntomas de Loque Americana.....	79
Figura 11: Colonias de <i>Paenibacillus larvae</i> desarrolladas en medio de cultivo MYPGP agarizado	80
Figura 12: Coloración de Gram de <i>Paenibacillus larvae</i> observado en microscopio óptico.....	81
Figura 13: Tinción negativa de <i>Paenibacillus larvae</i> observado en microscopio electrónico de transmisión	82
Figura 14: Pruebas de Identificación bioquímica de <i>Paenibacillus larvae</i>	83
Figura 15: EH de <i>A. satureioides</i> obtenido por extracción líquido-líquido.....	87
Figura 16: AE de <i>M. verticillata</i> obtenido por destilación por arrastre de vapor de agua utilizando una trampa tipo Clevenger	88
Figura 17: Actividad antibacteriana del AE de <i>A. satureioides</i> frente a <i>Paenibacillus larvae</i> 1 y 11.....	90
Figura 18: Actividad antibacteriana del AE de <i>A. satureioides</i> frente a <i>Paenibacillus larvae</i> 4 y 9.....	90
Figura 19: Actividad antibacteriana del EH de <i>A. satureioides</i> frente a <i>Paenibacillus larvae</i> 4.....	92
Figura 20: Actividad antibacteriana del EB de <i>A. satureioides</i> frente a <i>Paenibacillus larvae</i> 5.....	94
Figura 21: Actividad antibacteriana del EE de <i>A. satureioides</i> frente a <i>Paenibacillus larvae</i> 5.....	95
Figura 22: Actividad antibacteriana del EAE de <i>A. satureioides</i> frente a <i>Paenibacillus larvae</i> 8.....	96
Figura 23: Actividad antibacteriana del AE de <i>M. verticillata</i> frente a <i>Paenibacillus larvae</i> 6.....	100
Figura 24: Actividad antibacteriana del EH de <i>M. verticillata</i> frente a <i>Paenibacillus larvae</i> 3.....	101

Figura 25: Actividad antibacteriana del EB de <i>M. verticillata</i> frente a <i>Paenibacillus larvae 2</i>	103
Figura 26: Actividad antibacteriana del EE de <i>M. verticillata</i> frente a <i>Paenibacillus larvae 5</i>	104
Figura 27: Actividad antibacteriana del EAE de <i>M. verticillata</i> frente a <i>Paenibacillus larvae 2</i>	106
Figura 28: Efecto del EH de <i>A. saturoioides</i> sobre <i>Paenibacillus larvae</i> observado en microscopio electrónico de transmisión	108
Figura 29: Efecto del EH de <i>M. verticillata</i> sobre <i>Paenibacillus larvae</i> observado en microscopio electrónico de transmisión	109
Figura 30: CCD del AE de <i>A. saturoioides</i> . Fase Móvil: tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5) revelada con luz UV a 254 nm	111
Figura 31: CCD del EH de <i>A. saturoioides</i> . Fase Móvil: hexano/acetona (7:3) revelada con luz UV a 254 nm	112
Figura 32: CCD del EH de <i>A. saturoioides</i> . Fase Móvil: hexano/acetona (7:3) revelada con ClFe_3	112
Figura 33: CCD del AE de <i>M. verticillata</i> . Fase Móvil: tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5) revelada con luz UV a 254 nm	113
Figura 34: CCD del EH de <i>M. verticillata</i> . Fase Móvil: éter etílico/hexano (7:3) revelada con luz UV a 254 nm	114
Figura 35: CCD del EH <i>M. verticillata</i> . Fase Móvil: éter etílico/hexano (7:3) revelada con yodo	115
Figura 36: Bioautografía del AE de <i>A. saturoioides</i> frente a <i>P. larvae 7</i> . Fase Móvil: tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5)	116
Figura 37: Comparación de los Rf de las zonas de inhibición del crecimiento del ensayo de bioautografía con el cromatofolio revelado con luz UV	117
Figura 38: Bioautografía del EH de <i>A. saturoioides</i> frente a <i>P. larvae 7</i> . Fase Móvil: hexano/acetona (7:3)	117
Figura 39: Comparación de los Rf de las zonas de inhibición del crecimiento del ensayo de bioautografía con el cromatofolio revelado con ClFe_3	118
Figura 40: Bioautografía del AE de <i>M. verticillata</i> frente a <i>P. larvae 7</i> . Fase Móvil: tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5)	119
Figura 41: Comparación de los Rf de las zonas de inhibición del crecimiento del ensayo de bioautografía con el cromatofolio revelado con luz UV	119
Figura 42: Bioautografía del EH de <i>M. verticillata</i> frente a <i>P. larvae 7</i> . Fase Móvil: éter etílico/hexano (7:3)	120
Figura 43: Comparación de los Rf de las zonas de inhibición del crecimiento del ensayo de bioautografía con el cromatofolio revelado con luz yodo	121
Figura 44: Perfil cromatográfico del AE de <i>A. saturoioides</i>	123

Figura 45: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,40 del AE de <i>A. saturoioides</i>	124
Figura 46: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,45 del AE de <i>A. saturoioides</i>	125
Figura 47: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,52 del AE de <i>A. saturoioides</i>	126
Figura 48: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,60 del AE de <i>A. saturoioides</i>	127
Figura 49: Perfil cromatográfico del AE de <i>M. verticillata</i>	129
Figura 50: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,33 del AE de <i>M. verticillata</i>	131
Figura 51: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,43 del AE de <i>M. verticillata</i>	133
Figura 52: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,60 del AE de <i>M. verticillata</i>	134
Figura 53: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,72 del AE de <i>M. verticillata</i>	135
Figura 54: Perfil cromatográfico del EH de <i>A. saturoioides</i>	137
Figura 55: Perfil cromatográfico del EH de <i>M. verticillata</i>	139

Tabla 1: Fases móviles.....	154
Tabla 2: Pruebas de identificación de <i>P. larvae</i>	83
Tabla 3: Identificación molecular de las cepas de <i>P. larvae</i> mediante ARNr 16S.....	85
Tabla 4: Actividad antibacteriana del AE de <i>A. saturoioides</i>	99
Tabla 5: Actividad antibacteriana del EH de <i>A. saturoioides</i>	91
Tabla 6: Actividad antibacteriana del EB de <i>A. saturoioides</i>	93
Tabla 7: Actividad antibacteriana del EE de <i>A. saturoioides</i>	94
Tabla 8: Actividad antibacteriana del EAE de <i>A. saturoioides</i>	96
Tabla 9: Actividad antibacteriana del AE de <i>M. verticillata</i>	99
Tabla 10: Actividad antibacteriana del EH de <i>M. verticillata</i>	100
Tabla 11: Actividad antibacteriana del EB de <i>M. verticillata</i>	102
Tabla 12: Actividad antibacteriana del EE de <i>M. verticillata</i>	103
Tabla 13: Actividad antibacteriana del EAE de <i>M. verticillata</i>	105
Tabla 14: Componentes del AE de <i>A. saturoioides</i>	123
Tabla 15: Componentes de la banda con Rf 0,40 del AE de <i>A. saturoioides</i>	125
Tabla 16: Componentes de la banda con Rf 0,45 del AE de <i>A. saturoioides</i>	126
Tabla 17: Componentes de la banda con Rf 0,52 del AE de <i>A. saturoioides</i>	127
Tabla 18: Componentes de la banda con Rf 0,60 del AE de <i>A. saturoioides</i>	128
Tabla 19: Componentes del AE de <i>M. verticillata</i>	130
Tabla 20: Componentes de la banda con Rf 0,33 del AE de <i>M. verticillata</i>	132
Tabla 21: Componentes de la banda con Rf 0,43 del AE de <i>M. verticillata</i>	133
Tabla 22: Componentes de la banda con Rf 0,60 del AE de <i>M. verticillata</i>	134
Tabla 23: Componentes de la banda con Rf 0,72 del AE de <i>M. verticillata</i>	135
Tabla 24: Actividad antibacteriana de OTC.....	140

Esquemas

Esquema 1: Clasificación de métodos de extracción34

Esquema 2: Métodos para determinar la susceptibilidad de un microorganismo
a un antimicrobiano.....36

Gráficos

Gráfico 1: Actividad antibacteriana de EH, EB, EE y EAE obtenidos de
Achyrocline satureioides97

Gráfico 2: Actividad antibacteriana de EH, EB, EE y EAE obtenidos de
Minthostachys verticillata106

Introducción

1- Plantas medicinales

1.1- Definición

Las plantas medicinales son aquellos vegetales con metabolitos o principios activos que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial para el organismo vivo. 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).

1.2- Las especies vegetales en la historia de la medicina

La documentación existente sobre el uso de plantas se remota a la antigüedad. Gente de todos los continentes desde la prehistoria ha aplicado cataplasmas y ha bebido infusiones de miles de plantas ya que la mayoría de los medicamentos se obtenían de fuentes naturales (Núñez y Cantero, 2000). Desde tiempos muy remotos, hierbas y especias han sido agregadas a diferentes tipos de alimentos para incrementar su sabor y sus propiedades organolépticas (Mimica-Dukic *et al.*, 2004). Con el transcurrir del tiempo se han aislado de estas plantas sus principios activos y se han realizado estudios químicos, fisiológicos y médicos. Muchos de estos productos naturales se fueron incorporando a las farmacopeas, continuando todavía hoy el uso de ellos en medicina (Núñez y Cantero, 2000).

Existen innumerables especies vegetales con propiedades terapéuticas, desde plantas superiores hasta algas y líquenes. Algunas familias botánicas son tradicionalmente fuentes de productos aromáticos, como las Pináceas, Verbenáceas, Mirtáceas, Lamiáceas, Rutáceas, Lauráceas, Piperáceas, Apiáceas y Asteráceas (Bamba *et al.*, 1993). Sin embargo, el universo de las plantas aromáticas es muchísimo mayor, si se considera su origen biológico y su significación comercial. La variabilidad genética de las plantas es una de sus más valiosas virtudes, al aportar una infinita riqueza de posibilidades (Bandoni, 2000).

En los últimos años hubo una revalorización de los productos naturales como fuente de sustancias de interés médico, veterinario, cosmético y agroquímico. La utilización creciente de estos productos ha sido estimulada, en parte, por la fuerte tendencia del retorno a lo natural. En la actualidad aproximadamente el 25% de las

drogas que se lanzan al mercado proviene de una droga vegetal. Dentro del reino vegetal se conocen aproximadamente 250.000 especies, aunque el número total de ejemplares existentes es mucho mayor. Sin embargo, sólo el 1% de estas especies ha sido estudiado exhaustivamente en cuanto a su composición química y uso terapéutico, por lo que aún existe un enorme potencial de moléculas bioactivas para ser descubiertas (Mongelli *et al.*, 1995).

1.3- Aceites esenciales y extractos vegetales

El uso de aceites esenciales y extractos vegetales ha ganado popularidad e interés científico en estos últimos años por su utilidad comercial, ocupando un papel importante en los mercados de la industria farmacéutica, perfumería, cosmetología y la agro-industria. Es sabido que sus componentes tienen un considerable rango de aplicaciones y que los mismos son conocidos por poseer propiedades multifuncionales y una amplia variedad de actividades biológicas (antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antioxidantes, anti-inflamatorios, entre otros) (Bruneton, 1991; Barrio Alonso *et al.*, 2001; Tepe *et al.*, 2005).

Una misma planta aromática puede aportar más de un producto comercialmente importante, dependiendo de diversos factores, algunos intrínsecos a la especie vegetal, y otros dependientes del medio ambiente (cantidad de lluvias, luminosidad, altura) o de los procesos extractivos empleados. A todos estos factores debe agregarse la variabilidad genética de las plantas; las plantas aromáticas suelen presentar una notable variación en cuanto a calidades. Esto se debe fundamentalmente a la presencia de los llamados quimiotipos, es decir individuos de una misma especie que se diferencian entre sí por una distinta composición química (Barrio Alonso *et al.*, 2001).

Además de los factores extrínsecos e intrínsecos que modifican la integridad y la calidad de una planta aromática, hay que considerar las posibles modificaciones surgidas por la tecnología aplicada a la planta. Tanto el manejo agrícola (densidad de plantación, riegos, abonos, agroquímicos, tiempo de cosecha, edad de la planta) como el de poscosecha (tiempo de oreado, desecado, almacenamiento, descontaminación, molienda, clasificación), y finalmente el procesado industrial (método de extracción empleado, temperatura, tiempo de extracción), son nuevas variables que se suman a la gran heterogeneidad apuntada a partir de una misma especie vegetal, y que en conjunto determinan su calidad aromática (Fuentes Fiallio *et al.*, 2001).

1.3.1- Formas de obtención de aceites esenciales y extractos vegetales

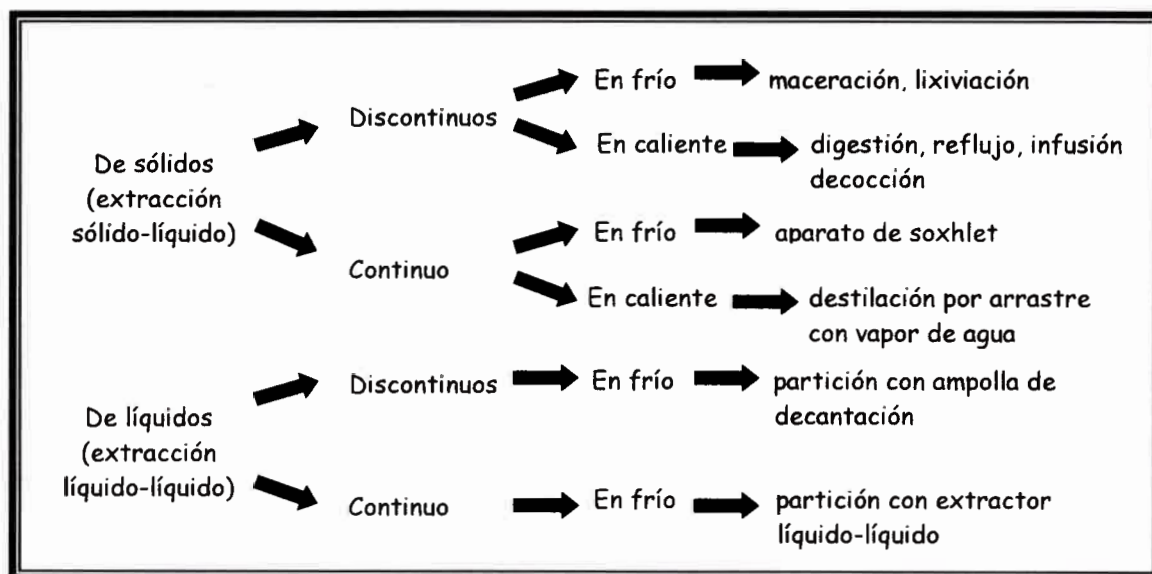
La obtención de productos vegetales se realiza mediante diferentes técnicas de extracción, que dependen de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos de interés; entre ellas se incluyen coeficientes de partición en solventes orgánicos o agua, la polaridad relativa y la estabilidad de la molécula a la luz o a la oscuridad, como así también la temperatura empleada durante el proceso de extracción (Cseke *et al.*, 2006).

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios que constituyen la fracción volátil de los principios activos contenidos en una planta, compuesta por monoterpenos, sesquiterpenos y derivados del benceno entre otros, por lo tanto, muchos de ellos se obtienen mediante técnicas de destilación, en la que se volatilizan estos principios por calor, se condensan en frío y se recogen (Bisset, 1994; Bruneton, 2001; Palomino, 2001).

Por otro lado, los extractos vegetales se definen como un concentrado de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca, obtenidos por el tratamiento con solventes apropiados. Estos extractos consisten en la fracción no volátil de los principios activos, es decir, aquellos que por no ser volatilizables o ser inestables con la temperatura, no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante otras técnicas de extracción. Los compuestos solubles en agua y las proteínas se extraen en agua o buffers, mientras que los compuestos insolubles en agua se extraen en etanol u otros solventes orgánicos (Bisset, 1994; Bruneton, 2001; Palomino, 2001; Ahmad *et al.*, 2006; Cseke *et al.*, 2006).

En el Esquema 1 se muestra una clasificación de los métodos de extracción, según se apliquen para extraer compuestos químicos de un sólido o de un líquido. Los métodos de extracción de sólidos consisten en poner en contacto una droga cruda con un disolvente, que en el caso ideal disolverá el principio activo de interés que se quiere extraer del material vegetal, permaneciendo sin disolver los demás compuestos químicos. Esta situación ideal raramente ocurre, en general, se obtiene una mezcla de sustancias disueltas en el disolvente utilizado llamado extracto crudo. Al finalizar el proceso de extracción se obtiene un material vegetal agotado, llamado marco o residuo por un lado y por el otro, el extracto. La elección del disolvente como del método extractivo viene determinada por la naturaleza físico-química de la sustancia

que se desea aislar, con la condición importante que el proceso no debe alterarla químicamente (Villar del Fresno, 1999; Samuelsson, 1999).



Esquema 1: Clasificación de métodos de extracción

Un proceso de extracción es continuo cuando funciona en forma ininterrumpida con el mismo volumen de disolvente y no necesita ser repetido; mientras que los discontinuos necesitan ser repetidos con un nuevo volumen de disolvente por que éste se satura y es necesario extraer todo el principio activo, agotando el material vegetal. En los métodos de extracción en frío, el disolvente extrae a temperatura ambiente; en cambio, en los métodos en caliente el disolvente extrae a una temperatura por encima de la ambiente (Villar del Fresno, 1999; Samuelsson, 1999).

1.3.2- Formas de análisis de aceites esenciales y extractos vegetales

La cromatografía es uno de los métodos más utilizados para separar, purificar e identificar mezclas de compuestos. Por ejemplo, cromatografía líquida (CL), cromatografía gaseosa (CG), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), entre otras, son técnicas empleadas para el aislamiento y análisis de productos naturales. Por otro lado, las herramientas más útiles para dilucidar las estructuras presentes en dichos productos son, la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectrometría de masas (EM) y la espectrofotometría UV visible (UV-Vis) e infrarrojo (IR) (Ahmad *et al.*, 2006; Cseke *et al.*, 2006).

En general, la fracción volátil o aceite esencial se analiza mediante CG, ya que esta técnica es válida para compuestos volatilizables. Es la técnica más selectiva y la recomendada por las Farmacopeas como el método estándar para el análisis de los mismos. Es un método cuantitativo y cualitativo, que acoplado con espectrometría de Masas (CG-EM), permite obtener el espectro de masas de cada componente, con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Existen bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes. Recientemente se han desarrollado fases estacionarias quirales para la separación de componentes ópticamente activos por cromatografía.

Los extractos de compuestos no volátiles, como heterósidos, alcaloides, lípidos, esteroides, glúcidos, flavonoides, proteínas y vitaminas, se analizan principalmente por HPLC, ya que esta técnica es válida para sustancias no volatilizables o termolábiles (Bisset, 1994; Bruneton, 2001; Palomino, 2001; Ahmad *et al.*, 2006).

1.4- Actividad antimicrobiana de aceites esenciales y extractos vegetales

Actualmente el uso de compuestos antimicrobianos naturales se ha intensificado con el propósito de ser aplicado en la conservación de alimentos y para el control de enfermedades de origen microbiano. La solubilidad lipídica de los aceites esenciales y su posibilidad de interactuar con las partes hidrofóbicas de las células puede influenciar en el metabolismo de los microorganismos dando así una explicación de su actividad biológica. Un estudio acerca del mecanismo bioquímico ha sugerido que el aceite esencial ejerce impacto sobre diferentes caminos debido a que inhibe el transporte de electrones de la célula, la síntesis de proteínas, y la biosíntesis de poliaminas. Además causa la disrupción de las mitocondrias y la membrana celular e influye sobre enzimas celulares, canales y receptores. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es asignada a sus componentes terpénicos y fenólicos, los cuales en forma pura han demostrado tener también dicha actividad. La composición de los aceites varía de acuerdo a las condiciones climáticas y ambientales y como consecuencia ellos tienen diferentes bioactividades (Zygadlo y Juliani, 2000).

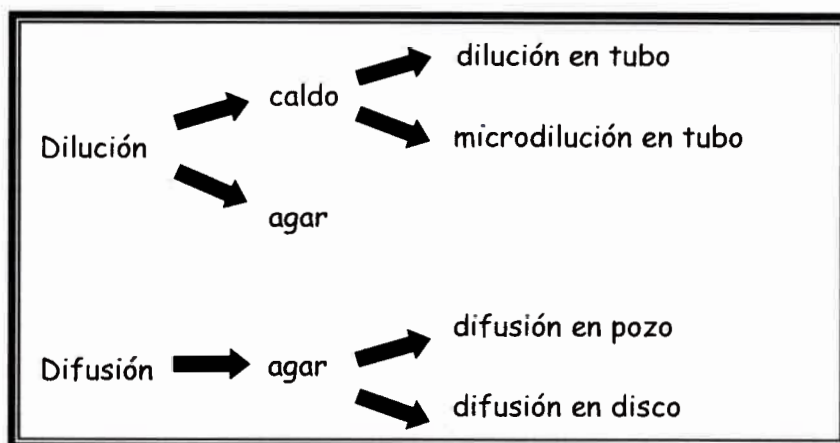
Desde el punto de vista científico, las investigaciones se desarrollan principalmente en búsqueda de sustancias activas para el control de microorganismos patógenos, ya que muchos de ellos se han vuelto resistentes a los medicamentos. El uso de aceites esenciales y extractos provenientes de plantas aromáticas constituyen

una importante alternativa para el tratamiento de enfermedades microbianas. Así, se ha estudiado la actividad antimicrobiana de las decocciones, infusiones, extractos y de aceites esenciales de diferentes especies vegetales que demostraron ser efectivas contra bacterias Gram positivo, Gram negativo, virus, hongos y levaduras (Pérez *et al.*, 1999; Agnese *et al.*, 2001; Sridhar *et al.*, 2003; Friedman *et al.*, 2004; Mimica-Dukic *et al.*, 2004; Wong y Kitts, 2006; Reichling *et al.*, 2009).

1.4.1- Técnicas de análisis de la actividad antimicrobiana

El principal propósito de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos es orientar en la elección del agente apropiado para un tratamiento determinado. Además de utilizarse como trabajo de rutina en el laboratorio clínico, estas pruebas se utilizan para evaluar la actividad *in vitro* de nuevos agentes. La susceptibilidad puede informarse de forma cualitativa como sensible o resistente, y de forma cuantitativa en términos de la concentración del agente que inhibe el crecimiento del microorganismo (Collins *et al.*, 1999).

En la actualidad, los principales métodos que se utilizan para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano, comprenden las pruebas de dilución en caldo, como los métodos de dilución y microdilución en tubo, y pruebas de dilución en agar; y por otro lado, las pruebas de difusión en agar, como los métodos de difusión en pozo y de difusión en disco (Esquema 2) (Finelgold y Baron, 1992; Ahmad *et al.*, 2006).



Esquema 2: Métodos para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano

La prueba de susceptibilidad de dilución en caldo fue una de las primeras en desarrollarse y aún sirve como método de referencia. Se realizan diluciones seriadas del agente antimicrobiano y después se le agrega una suspensión bacteriana estandarizada. Al término del período de incubación, los tubos son examinados a simple vista con el fin de observar turbidez, la que indica que el crecimiento bacteriano no ha sido inhibido por la concentración del antimicrobiano contenida en el medio (Koneman, 1999; Ahmad *et al.*, 2006). En los últimos años, esta prueba se ha modificado y se ha elaborado un sistema de microdilución, siendo el principio de esta prueba idéntico al método nombrado anteriormente, sólo que se realiza en pequeñas placas de plástico con 96 pocillos que originalmente estaban destinadas a procedimientos serológicos, y puede evaluarse por espectrofotetría o utilizando indicadores de viabilidad celular como resazurina o sales de tetrazolio. Esta prueba se hizo tan común y está tan bien estudiada que se convirtió en el estándar de referencia en muchas investigaciones (Finelgold y Baron, 1992; Koneman, 1999; Ahmad *et al.*, 2006).

El procedimiento de dilución en agar es el segundo método de referencia. En esta técnica se siembra una suspensión estandarizada de bacterias sobre la superficie de una serie de cajas de Petri con agar, cada una de las cuales contiene una concentración diferente de antimicrobiano. Luego de la incubación se observa presencia o ausencia del crecimiento microbiano en relación a los controles (Koneman, 1999; Ahmad *et al.*, 2006).

Sin embargo, las pruebas utilizadas con mayor frecuencia para orientar un tratamiento quimioterápico son las pruebas de difusión, especialmente la de difusión en disco, conocida como la prueba de Bauer-Kirby. En estas técnicas se siembra una suspensión estandarizada de bacterias sobre la superficie de cajas de Petri con agar y sobre ellas, dependiendo el método que se emplee, se colocan discos previamente impregnados con diferentes concentraciones del antimicrobiano, o se realizan orificios a los cuales, luego se les agregan diluciones seriadas del antimicrobiano a evaluar. Transcurrido el período de incubación, se observa presencia o ausencia de halos de inhibición del crecimiento alrededor del disco o del pozo (Koneman, 1999; Ahmad *et al.*, 2006; Cseke *et al.*, 2006).

En todas las pruebas, ya sea de dilución o difusión, la concentración mínima del antimicrobiano que no muestra crecimiento manifiesto, es la medida del efecto bacteriostático del agente sobre la bacteria y se denomina concentración inhibitoria mínima (CIM). En las pruebas de dilución en caldo, se puede determinar el efecto

bactericida de un antimicrobiano, o sea la concentración bactericida mínima (CBM) que es la menor concentración que produce la muerte de más del 99,9% de las bacterias (Finelgold y Baron, 1992; Collins *et al.*, 1999; Koneman, 1999).

Cada método tiene sus ventajas y sus limitaciones, las pruebas de dilución tienen la ventaja que proporcionan información cuantitativa; además, con la técnica de microdilución se pueden probar gran número de bacterias de un modo simple contra un amplio panel de antimicrobianos. Sin embargo, el principal impedimento para su uso rutinario ha sido el trabajo intenso que requiere la preparación de las placas con múltiples pocillos. La técnica de dilución en agar tiene como desventaja, el gran volumen de antimicrobiano que se necesita para su evaluación. Las pruebas de difusión proporcionan más información cualitativa que cuantitativa, y esa imposibilidad de producir resultados cuantitativos es considerada como una desventaja, no obstante son las pruebas utilizadas con mayor frecuencia para orientar un tratamiento quimioterápico dada su sencillez, su bajo costo y que se pueden probar gran número de antimicrobianos de un modo simple (Collins *et al.*, 1999; Koneman, 1999; Ahmad *et al.*, 2006).

Otro método empleado en la actualidad para evaluar sustancias antimicrobianas es la técnica de bioautografía, que consiste en incluir los cromatogramas obtenidos por cromatografía en capa delgada (CCD) en un medio de cultivo, permitiendo por un lado, describir el perfil químico de una muestra y sus componentes, y por otro, relacionar la actividad antimicrobiana de los componentes bioactivos. Esta técnica ha sido considerada como el ensayo más eficiente para la detección de componentes antimicrobianos, porque permite la localización de dicha actividad y por lo tanto permite un directo aislamiento de los constituyentes activos (Pereira *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006).

2- Enfermedades de las abejas

Las abejas son insectos sociales de la especie *Apis mellifera* L. perteneciente al Orden Hymenoptera (Jean-Prost, *et al.*, 2007). En óptimas condiciones ecológicas las abejas son muy resistentes a las enfermedades, pero bajo situaciones climáticas adversas se hacen muy sensibles a los patógenos, y éstos pueden llegar a exterminar a todas las colmenas de un apiario, o a difundirse por completo en una región. Además de los factores no controlables por el hombre, como los climáticos, influyen otros que pueden ser controlados, como el manejo de la correcta regulación del

espacio de cría en la colmena según la época del año; la nutrición de la colmena, que debe contar con reservas abundantes de polen y miel, sobre todo en épocas críticas; la selección de reinas jóvenes de buena y probada ascendencia y la sanidad, detectando y controlando enfermedades que pueden ocasionar pérdidas poblacionales y por ende, de producción. Esas enfermedades son causadas por numerosos parásitos y agentes patógenos, incluidos los ácaros, escarabajos, hongos, protozoos, virus y bacterias, que pueden afectar a las abejas adultas, a las larvas o a ambos estadios. Entre las enfermedades más importantes se encuentran: Loque Americana, Loque Europea, Nosemosis y Varroasis (Morse y Flottum, 1997; Genersch, 2010).

3- Loque Americana

3.1- Características de la enfermedad

La Loque Americana es una de las enfermedades bacterianas más serias e infecciosas de las colmenas por su alto grado de patogenicidad y virulencia, afecta a los estadios de larva y de pupa de la abeja. Puede matar a una colmena y diseminarse a otras después de años de creerla erradicada, causando severos daños económicos al sector apícola en muchos países productores de miel (Shimanuki, 1990; Alippi *et al.*, 2006; Genersch, 2010).

Esta enfermedad es conocida mundialmente por su denominación inglesa como "American Foulbrood". Afecta a la abeja doméstica (*A. mellifera*) durante el estado larval, siendo las abejas adultas portadoras asintomáticas pasivas o activas, pudiendo permanecer latente y aparecer de forma repentina debido a factores de estrés, condiciones externas, resistencia genética o causas desconocidas (Alippi, 1995).

El origen geográfico se desconoce, pero la distribución de la enfermedad es mundial, ya que se ha encontrado en todas las regiones apícolas del mundo (Mathenson, 1993). En nuestro país fue detectada durante el otoño de 1989 en colmenas del área de Tandil, provincia de Buenos Aires, el foco surgió en un grupo de abejas italianas que sufrieron una mortandad del 53% y se sugiere que probablemente el origen fue el ingreso de material vivo importado proveniente de Estados Unidos (Alippi, 1992; Alippi, 1997). Debido a la falta de controles adecuados se ha diseminado a todas las provincias, probablemente por el traslado de colmenas (trashumancia) y compraventa de reinas y núcleos sin control sanitario. Esta enfermedad constituye una

sería amenaza para la industria apícola en general y limita la comercialización de sus productos (Alippi, 1995).

3.2- Agente causal

La enfermedad es producida por un bacilo Gram positivo denominado *Paenibacillus larvae*, este microorganismo posee forma de bastón, de aproximadamente 2,3 a 5 μm de largo por 0,5 a 0,7 μm de ancho, se encuentra agrupado de a pares, solo o en cadenas cortas y es móvil con flagelos peritricos. Su característica principal es la de formar esporas muy resistentes (Figura 1).

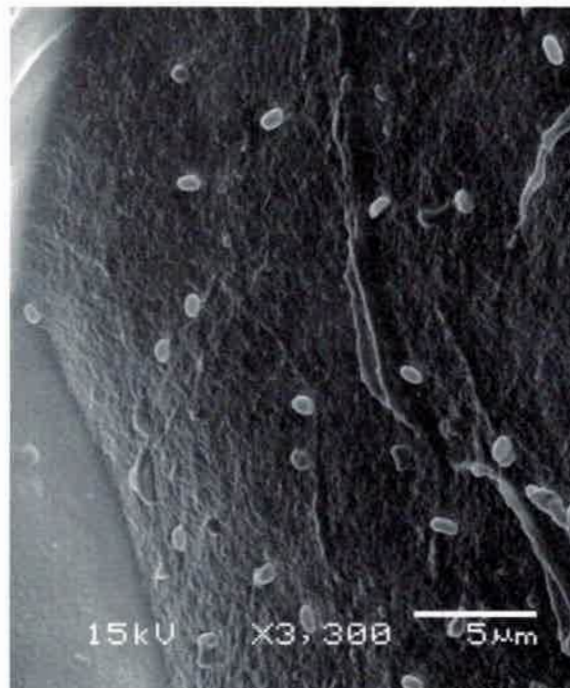


Figura 1: Esporas de *Paenibacillus larvae*

Las esporas son elipsoidales, centrales o terminales, tienen tolerancia a muy altas temperaturas, también resisten la acción de desinfectantes químicos como el cloro, productos basados en el yodo y radiación ultravioleta. Además, las esporas pueden permanecer infectivas por más de 40 años, siendo las responsables del inicio del ciclo de la enfermedad. Presentan la particularidad física fundamental de poseer movimiento browniano, por lo tanto cuando se observan al microscopio óptico se mueven constantemente permitiendo así una mejor identificación (Haseman, 1961;

Bailey, 1984; Shimanuki, 1990; Alippi, 1990; Alippi, 1995; De la Sota y Bacci, 2004; Bounous y Boga, 2005; Genersch *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007).

En 1906, White fue quien describió la especie *Bacillus larvae*, como el agente patógeno de Loque Americana. Años más tarde, en 1950, Katznelson describe una especie estrechamente relacionada, *Bacillus pulvifaciens*, también aislada de larvas de abejas, pero en asociación con una enfermedad rara llamada "escama pulverulenta". Ambas especies fueron asignadas a un nuevo género *Paenibacillus*, y posteriores revisiones taxonómicas los describieron como pertenecientes a la misma especie, *Paenibacillus larvae*, pero separadas a nivel de subespecie como *P. larvae* subespecie *larvae* (anteriormente *Bacillus larvae*) y como *P. larvae* subespecie *pulvifaciens* (anteriormente *Bacillus pulvifaciens*). 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 válido, en consecuencia, *P. larvae* se considera la designación completa y correcta para el agente patógeno y causal de Loque Americana (Ash *et al.*, 1993; Heyndrickx *et al.*, 1996; De Graaf *et al.*, 2006b; Genersch *et al.*, 2006; Genersch, 2010).

3.3- 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 su edad, las mismas no pueden ser infectadas transcurridas 53 horas después de que el huevo ha eclosionado. La dosis media infectiva (ID_{50} = dosis de esporas con la cual un 50% de las larvas mueren) necesaria para el inicio de la infección, es de entre 8 y 9 esporas, aproximadamente, 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, alimentación con miel contaminada y 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, tales como pH y tenor de oxígeno,

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, estado de pupa (Figura 2) (Hansen y Brodsgaard, 1999; De la Sota y Bacci, 2004; Genersch, 2010). Luego de transcurridos varios días, la pupa se deseca 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, puede llegar a contener hasta 2,5 billones de esporas, siendo una importantísima fuente de diseminación de las mismas (Bailey y Ball, 1991).



Figura 2: Pupa sana (izquierda) y pupa afectada con Loque Americana (derecha)

Se han aislado e identificado diez proteínas secretadas por *P. larvae*, que además de cumplir diferentes funciones en la célula, como transcripción, metabolismo, transporte, movilidad, entre otras, también estarían implicadas en la patogenicidad de dicha bacteria. Se determinó que una de esas proteínas, la enolasa, producida dentro de la célula bacteriana, secretada al medio y que puede detectarse en la superficie de las esporas, posee alta toxicidad y es inmunogénica para las larvas de *A. mellifera*; porque también se produce in vivo durante la infección degradando las mismas. Estos resultados demuestran su papel como factor de virulencia en la patogenicidad de *P. larvae*. (Antúnez *et al.*, 2010; Antúnez *et al.*, 2011).

3.4- Sintomatología

La Loque Americana se puede identificar claramente observando los marcos de cría de los panales afectados ya que 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 consistencia y color, primero a marrón cremoso y, eventualmente, a marrón oscuro. Durante estos cambios la larva se va achicando y finalmente se adhiere hacia uno de los lados de la celda, hasta adquirir un aspecto de costra o "escama". (Figura 3) (Bruno, 1999).

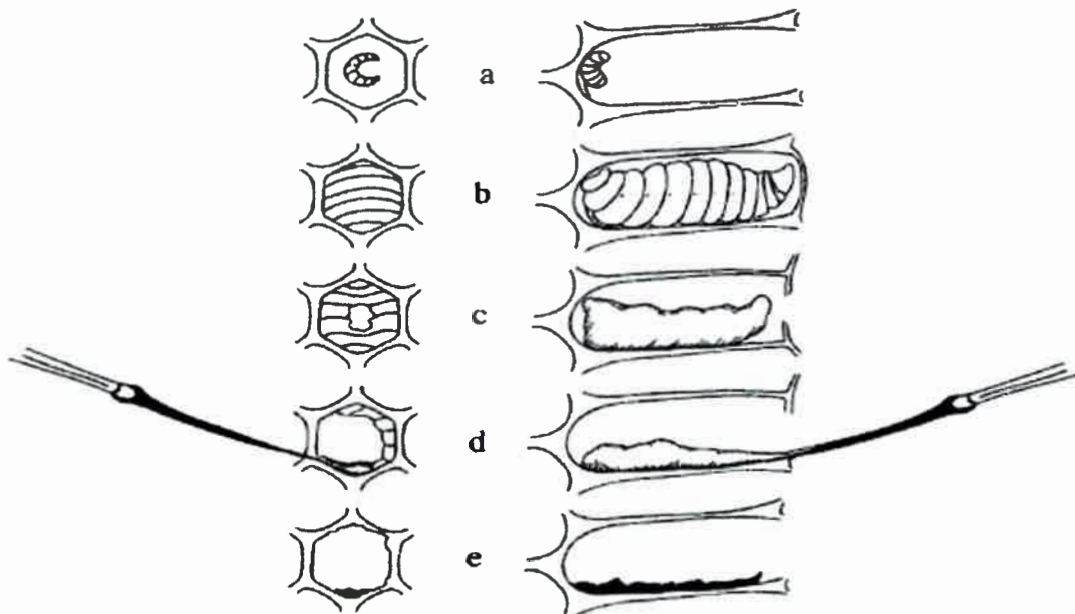


Figura 3: Progresión de la enfermedad: **(a)** Punto de infección. **(b)** Desarrollo de la larva hasta la etapa prepupal. **(c)** Se reduce el contenido de las celdas y la operculación se hace hacia dentro o es perforada. **(d)** El contenido de las celdas se vuelve glutinoso. **(e)** Escama residual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

Cuando se presenta la enfermedad, los marcos poseen una distribución irregular de la cría, se pueden detectar celdas infectadas no operculadas, celdas sanas operculadas y celdas vacías en el mismo panal, presentando un aspecto de mosaico, lo que a campo se describe como panales de "aspecto de cría salteada". Los opérculos pierden su color café característico para tornarse castaño oscuro, casi negro (Figura 4a). Transcurridos unos 10 ó 15 días desde la muerte de la larva, aparece una

característica muy particular de la enfermedad, un material de apariencia viscosa que al introducir un palillo dentro de la celda que lo contiene y luego al retirarlo, se estira y se forma un filamento 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). Además, si se abre la colmena en los casos avanzados de la enfermedad, es muy notable percibir un fuerte olor pútrido y penetrante que es similar al de la cola de carpintero (De la Sota y Bacci, 2004; Bounous y Boga, 2005).

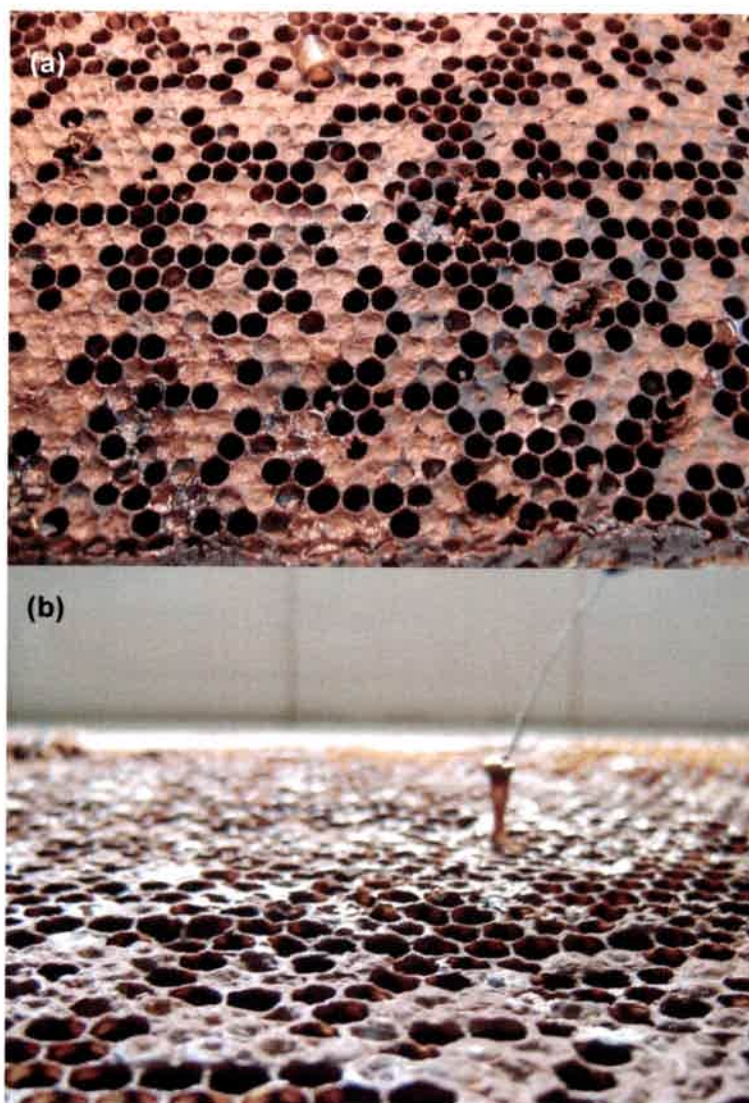


Figura 4: Sintomatología de la enfermedad: **(a)** Marco con distribución irregular de la cría, presentando aspecto de mosaico o aspecto de cría salteada. **(b)** Extracción de una larva afectada con apariencia viscosa; con aspecto y consistencia de "chicle"

Finalmente, después de un mes o más, los restos de las crías enfermas se secan formando las típicas escamas oscuras y duras que 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 5a y 5b). La lengua puede persistir también en la escama seca (De la Sota y Bacci, 2004; Bounous y Boga, 2005).

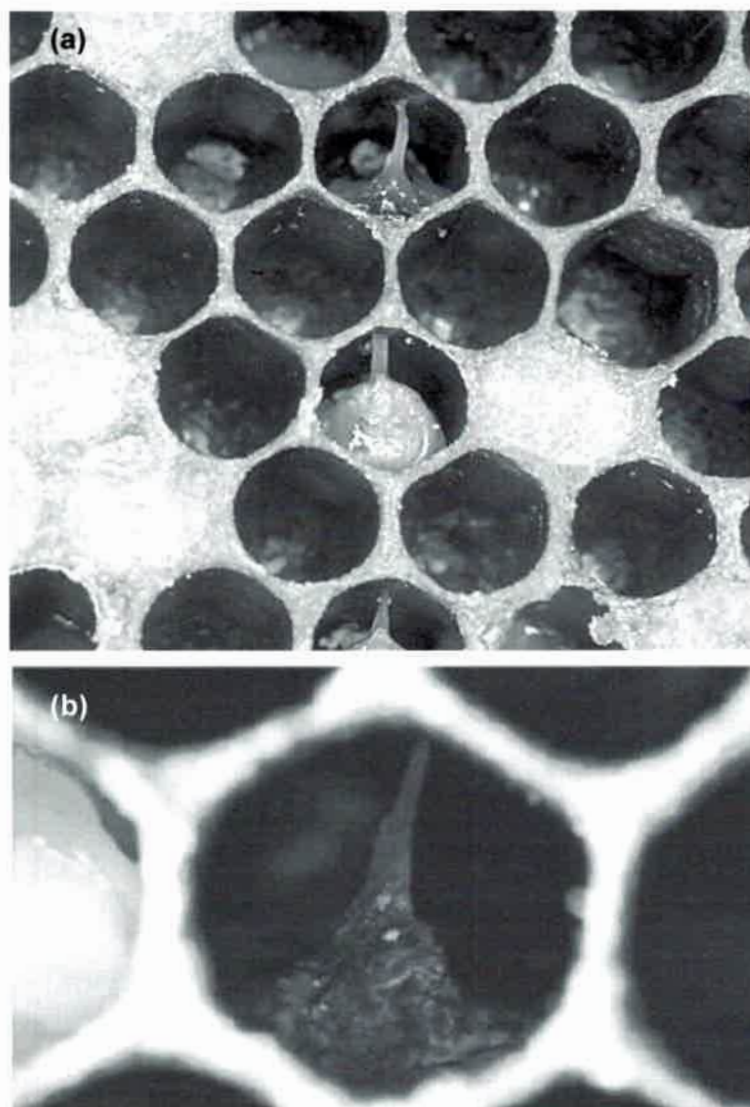


Figura 5: (a) Crías muertas por Loque Americana. (b) Formación de la lengua pupal en larvas de *A. mellifera*.

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 (Bailey y Ball, 1991).

3.5- Diagnóstico de laboratorio

Una vez que se detecta la enfermedad en el campo, lo ideal es que se tomen las correspondientes muestras para su posterior confirmación en el laboratorio de bacteriología. Los cuadros afectados se pueden remitir al laboratorio tomando la precaución de envolverlos con papel o envases de cartón, para evitar la diseminación de las esporas. El diagnóstico de laboratorio utiliza técnicas para detección, aislamiento e identificación de *P. larvae* a partir de cultivos realizados con restos larvales, muestras de miel, polen, abejas adultas y cera (Alippi, 1990).

Las técnicas de identificación de *P. larvae* más utilizadas son el cultivo en medios sólidos semi-selectivos, microscopía y análisis del perfil bioquímico mediante pruebas específicas como la de catalasa e hidrólisis de la caseína, entre otras, que sugiere el Manual de Bacteriología Sistemática Bergey (Sneath, 1989). Dado que el *P. larvae* es un agente patógeno altamente especializado de la larva de la abeja, las esporas sólo pueden germinar y desarrollar formas vegetativas in vitro mediante el empleo de medios de cultivo sólidos o líquidos muy ricos en elementos nutritivos. De hecho, una característica diferencial de este microorganismo es su incapacidad para desarrollar en medios de cultivo simples, los mismos deben ser suplementados con sustancias tales como tiamina, purinas, yema de huevo, extracto de carne, extracto de levadura y peptonas (Stalhy *et al.*, 1992).

También se han desarrollado diferentes técnicas basadas en anticuerpos, como pruebas de inmunodifusión, donde los anticuerpos interactúan con el antígeno bacteriano durante un proceso de difusión doble, dejando líneas de precipitación (Peng y Peng, 1979), o técnicas de anticuerpos fluorescentes, donde estos anticuerpos se conjugan con un fluorocromo y *P. larvae* se tiñe específicamente como una bacteria fluorescente sobre un fondo oscuro (Toshkov *et al.*, 1970; Zhavnenko, 1971; Otte, 1973). Las técnicas basadas en anticuerpos son útiles mientras no se demuestren reacciones cruzadas con otros bacilos, por ejemplo, contra *Paenibacillus alvei*. Existe un enzimoimmunoensayo en el que se utiliza un anticuerpo monoclonal específico para *P. larvae* (Olsen *et al.*, 1990). También existen técnicas moleculares que son muy útiles para el diagnóstico de esta enfermedad, el primer ensayo de PCR

fue desarrollado por Govan y colaboradores en el año 1999 y se basó en el secuenciamiento mediante ARNr 16S. Luego se comenzaron a utilizar otras herramientas moleculares que permiten la identificación del agente causal de Loque Americana, mediante el análisis directo de muestras de miel y colmenas, pruebas altamente sensibles al ADN de *P. larvae* (Lauro *et al.*, 2003; De Graaf *et al.*, 2006a).

3.6- Control de la enfermedad

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. 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

3.6.1- Tratamiento quimioterápico convencional

Pese a que actualmente se ha reducido significativamente el uso de antibióticos, la administración de los mismos, sobre todo en forma preventiva, continúa siendo una práctica común en el apiario. En nuestro país, el tratamiento quimioterápico más difundido consiste en la aplicación de antibióticos como la Oxitetraciclina, la Tilosina o el Sulfatiazol sódico, los cuales eliminan los síntomas porque controlan las formas vegetativas bacterianas pero no las esporas, responsables del contagio y diseminación de la enfermedad (Morse y Shimanuki, 1990; Alippi *et al.*, 1996; Alippi *et al.*, 1999; Hansen y Brodsgaard, 1999; Miyagi *et al.*, 2000; Alippi *et al.*, 2007; Antúnez *et al.*, 2008).

Esta enfermedad causa severos daños económicos al sector apícola en muchos países productores de miel, ya que la presencia de antibióticos en la miel y en otros productos de la colmena ha generado preocupación en los consumidores debido a los riesgos de toxicidad, influyendo negativamente al momento de su comercialización y exportación (Thompson *et al.*, 2007). Por otro lado, existe la posibilidad de la aparición de resistencia por parte de los microorganismos patógenos, esto es debido a tratamientos incompletos o a una sobredosificación. Se han encontrado cepas de *P. larvae* resistentes a Oxitetraciclina en Estados Unidos, Canadá y Argentina (Alippi *et al.*, 1999; Miyagi *et al.*, 2000; Evans, 2003; Alippi *et al.*, 2007; Reynaldi *et al.*, 2008).

Es por ello que esta problemática señala la necesidad de disponer de una metodología adecuada para controlar el estado sanitario de las colmenas mediante procedimientos ecológicamente limpios. Por lo tanto, resulta necesario desarrollar estrategias alternativas de tratamiento, que hasta la fecha siguen tres direcciones (Genersch, 2010). Por un lado, el mejoramiento genético de las abejas, que muestra un incremento en la respuesta inmune frente a Loque Americana (Spivak y Reuter, 2001; Wedenig *et al.*, 2003; Evans, 2004;), por otro, el control biológico a través de bacterias antagónicas (Evans y López, 2004; Evans y Armstrong, 2005; Evans y Armstrong, 2006; Alippi y Reynaldi, 2006; Olofsson y Vázquez, 2008), y por último el tratamiento con sustancias antibacterianas naturales como jalea real, miel, propóleo, aceites esenciales y extractos de diferentes plantas aromáticas (Bilikova *et al.*, 2001; Bachanova *et al.*, 2002; Wedenig *et al.*, 2003; Eguaras *et al.*, 2005; Fuselli *et al.*, 2006a; Fuselli *et al.*, 2006b; Fuselli *et al.*, 2007; Antúnez *et al.*, 2008; Bastos *et al.*,

2008; Fuselli *et al.*, 2008a; Fuselli *et al.*, 2008b; Gende *et al.*, 2008; Fuselli *et al.*, 2009; Gende *et al.*, 2009; Flesar *et al.*, 2010).

3.6.2- Tratamiento quimioterápico alternativo

Se ha demostrado en tests *in vitro* que las decocciones y aceites esenciales de algunas plantas aromáticas poseen actividad antimicrobiana frente a diferentes enfermedades de la colmena (Colin *et al.*, 1989; Di Mayuga y Keer-García, 1991; Floris y Carta, 1990; Ruffinengo *et al.*, 2006). En ese sentido, han sido evaluados aceites esenciales para el control de la Cría Yesificada, enfermedad producida por el hongo *Ascosphaera apis* (Colin *et al.*, 1989; Albo *et al.*, 2003; Eguaras *et al.*, 2005; Albo *et al.*, 2008) y de la Varroasis, causada por el parásito *Varroa jacobsoni* (Kraus *et al.*, 1994; Imdorf *et al.*, 1994; Eguaras *et al.*, 2005; Ruffinengo *et al.*, 2005; Fuselli *et al.*, 2009). También se ha demostrado que decocciones, extractos etanólicos y aceites esenciales de plantas aromáticas poseen actividad antibacteriana contra *P. larvae* (Colin *et al.*, 1989; Floris y Carta, 1990; Calderone *et al.*, 1994; Alippi *et al.*, 1996; Eguaras *et al.*, 2005; Fuselli *et al.*, 2005; Fuselli *et al.*, 2006a; Fuselli *et al.*, 2006b; Fuselli *et al.*, 2007; Fuselli *et al.*, 2008a; Fuselli *et al.*, 2008b; Gende *et al.*, 2008; Gende *et al.*, 2009; González y Marioli, 2010; Flesar *et al.*, 2010; Cesari, 2011).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que decocciones, aceites esenciales y aguas remanentes de la destilación por arrastre con vapor de agua, de diferentes especies vegetales como *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., *Chenopodium ambrosioides* L., *Eucalyptus cinerea* F. Muell. Ex Benth., *Gnaphalium gaudichaudianum* DC., *Lippia turbinata* Griseb., *Marrubium vulgare* L., *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, *Origanum vulgare*, *Tagetes minuta* L. y *Thymus vulgaris* L. poseen actividad antibacteriana sobre *P. larvae*. (González, 2005; González y Marioli, 2010). Entre los vegetales evaluados, *A. satureioides* y *M. verticillata* fueron los más efectivos, por ello, y dado que no existen investigaciones realizadas sobre el uso de extractos o aceites esenciales de dichas especies en el tratamiento contra *P. larvae*, se propone evaluar la actividad antibacteriana de los mismos contra diferentes cepas de dicho microorganismo.

4- *Achyrocline satureioides*

4.1- Descripción general de la especie vegetal

Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. de la familia Asteraceae, es una hierba aromática anual de Sudamérica, está ampliamente distribuida en Argentina, el sur de Brasil y Paraguay, constituye una de las plantas nativas más usadas en la medicina naturista y en la medicina popular (Parrillo *et al.*, 1999; Núñez y Cantero, 2000; Polydoro *et al.*, 2004). Es conocida vulgarmente como “marcela”, “marcela hembra”, “marcela del campo”, “macela do campo”, “marcela blanca”; “marcelita”, “bira-bira”, “vira-vira”, “mirabira”, “yateí-caá” e “ipoty ju” (Amat y Yajía, 1998; Gattuso *et al.*, 2008). En un sub-arbusto de hasta 30-40 cm de altura, ramoso y erecto. Tallo cubierto de pelos (tomentoso) que le dan una coloración blanquecina. Hojas alternas, sésiles, densamente tomentosas en el envés, lineales a lineal-lanceoladas, agudas, enteras, lámina hasta 5 cm de largo y hasta 4 mm de ancho. Capítulos numerosos, cilíndricos, dispuestos en densos glomérulos terminales de color gris-amarillento o amarillo dorado. Su fruto es un aquenio provisto de un pappus blanco (Figura 6) (Amorín, 1988; Bocco *et al.*, 1997; Gattuso *et al.*, 2008).



Figura 6: *Achyrocline satureioides*

4.2- Principales componentes químicos

Los tallos, hojas y flores contienen diferentes compuestos químicos como resinas, aceites esenciales y taninos, algunos de los cuales han sido estudiados para tratar de determinar su relación con respecto a las propiedades que se le han adjudicado a la planta (Barboza *et al.*, 2006). Se ha determinado que β -cariofileno, 1,8-cineol, cis- β -ocimeno, trans- β -ocimeno y α -pineno son los componentes mayoritarios de su aceite esencial. Estudios posteriores determinaron que α -humuleno, borneol, limoneno, α -terpineol, δ -cadineno, α -cadinol, sabineno y α -copaeno también son componentes presentes en su esencia (Lamaty *et al.*, 1991; Petenatti *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2006; Gillij *et al.*, 2008; Retta *et al.*, 2010). En extractos de las partes aéreas de esta especie se ha identificado la presencia de flavonoides, entre ellos luteolina, quercetina y sus derivados, y de diferentes ácidos fenólicos tales como el cafeico, el clorogénico y el isoclorogénico (Broussalis *et al.*, 1989; De Souza *et al.*, 2002; Polydoro *et al.*, 2004).

4.3- Usos y propiedades biológicas

Se le atribuyen propiedades digestiva, sedativa, antiinflamatoria, expectorante, tónica febrífuga, antioxidante, hipoglucemiante, colagoga y antihelmíntica (Broussalis *et al.*, 1989; Martínez, 2005; Taylor, 2005; Consolini *et al.*, 2007; De Souza *et al.*, 2007; Arias Toledo, 2009). Existen bebidas comercializadas en Argentina que la contienen como saborizante. Extractos de esta especie han sido ensayados para determinar su actividad antitumoral, antiviral y protectora del estrés oxidativo (Zanon *et al.*, 1999; Arredondo *et al.*, 2004). Sus extractos poseen actividad antiparasitaria frente a *Giardia lamblia* (Brandelli *et al.*, 2009). También se estudió su actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Aspergillus niger* (Anesini y Pérez, 1993; Calvo *et al.*, 2006).

5- *Minthostachys verticillata*

5.1- Descripción general de la especie vegetal

El género *Minthostachys* (Benth.) Spach pertenece a la familia Lamiaceae y se encuentra distribuido en Colombia, Venezuela, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia y

Argentina. En nuestro país, habita en las sierras de Córdoba, Catamarca, Tucumán, La Rioja, Salta y Jujuy (De Feo *et al.*, 1998; Ojeda *et al.*, 2001). El origen del nombre proviene del latín *minthos* = menta y *stachis* = una hierba semejante al puerro. Este género contiene 12 especies de hierbas aromáticas (Alkire *et al.*, 1994), aunque en las últimas investigaciones llegan a ser 20 las especies de hierbas aromáticas (Schmidt-Lebuhn, 2008a). Entre ellas *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, de nombre vulgar “peperina”, “pipirina”, “peperita” o “piperita”, ampliamente distribuida en la zona serrana de la provincia de Córdoba. Es una planta aromática y medicinal perenne, semi-arbustiva de 0,30 hasta 2 m de altura, con gran capacidad de rebrote. Las hojas son decusadas, enteras, redondeadas y con textura de felpa, las flores son pequeñas, tubulares y arregladas en verticilos generalmente densos; los cálices bilabiados y las corolas son blancas, a menudo con puntos lilas (Figura 7) (Bocco *et al.*, 1997; De Feo *et al.*, 1998). Florece en verano, época en la que se cosecha y fructifica en marzo y abril (Bandoni, 2000). La especie ha sido incluida en la Farmacopea Nacional Argentina desde su sexta edición (Schmidt-Lebuhn, 2008b).



Figura 7: *Minthostachys verticillata*

5.2- Principales componentes químicos

Algunos estudios fueron efectuados sobre la composición química de diferentes especies del género *Minthostachys*, determinándose, que la esencia se encuentra en toda la planta (Retamar, 1988; Pomar, 1993; Alkire *et al.*, 1994; Rojas y Usubillaga, 1995; Senatore y De Feo, 1995; Fournet *et al.*, 1996). Diferentes investigaciones demostraron que los componentes mayoritarios del aceite esencial son pulegona y mentona entre otros terpenos. Posteriormente, mejores métodos de análisis hicieron posible la identificación de los componentes minoritarios, en particular isomentona, limoneno, mentol, 1,8-cineol y β -pineno, como así también otros componentes que están presentes en cantidades muy pequeñas, entre ellos carvona, α -pineno, piperitenona, sabineno, mirceno, y β -ocimeno (Fester *et al.*, 1950; Fester y Martinuzzi, 1950; Fester y Martinuzzi, 1952, Fester *et al.*, 1956; Fester, 1958; Fester *et al.*, 1960; Zygadlo *et al.*, 1996; De Feo *et al.*, 1998; Toloza *et al.*, 2006; Oliva, 2007; Schmidt-Lebuhn, 2008b).

5.3- Usos y propiedades biológicas

Esta especie se utiliza principalmente en infusión como digestivo, sedativo, antiespasmódico, antidiarreico, antiherético, carminativo, broncodilatador, antirreumático, insecticida, antimicótico y antiparasitario. También se emplea para aromatizar y fabricar licores, bebidas refrescantes, golosinas, té y yerbas compuestas (Dimitri, 1980; Ratera y Ratera, 1980; Toursarkissian, 1980; Soraru y Bandoni, 1994; Bocco *et al.*, 1997; De Feo *et al.*, 1998; Schmidt-Lebuhn, 2008b).

Presenta propiedades inmunomoduladoras, mitogénicas y antialérgicas (Maldonado *et al.*, 2001; González Pereyra *et al.*, 2005; Caridi *et al.*, 2005; Caridi *et al.*, 2007; Caridi *et al.*, 2009). Se ha probado la actividad de sus extractos como insecticida contra larvas de mosquitos y de la mosca doméstica (Ciccía *et al.*, 2000; Palacios *et al.*, 2009). También se ha estudiado la actividad antimicrobiana de esta especie frente a virus como el Herpes suis y el HSV-1, y frente a bacterias, entre éstas *Bacillus cereus*, *Salmonella tiphy*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli* (De Feo *et al.*, 1998; Zanon *et al.*, 1999; Primo *et al.*, 2001; Ybarra, 2004; Oliva, 2007; Sabini *et al.*, 2010; Vogt *et al.*, 2010). El aceite esencial es efectivo contra hongos filamentosos y levaduras; ha sido utilizado como preservador de alimentos y puede ser usado como método adicional para el

control de patógenos, ya que el mismo fue investigado sobre importantes microorganismos patógenos de alimentos (Tassou *et al.*, 1995; Oliva, 2007).

Con estas nuevas medidas profilácticas que se están investigando y evaluando, se espera poder obtener un producto con potencial aplicación en el control de Loque Americana, mejorando el estado sanitario de las colmenas, incrementando la producción y la calidad de sus productos, a través de un tratamiento alternativo y natural.

Hipótesis

Diferentes extractos y aceites esenciales de *Achyrocline satureioides* y *Mhintostachys 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 por otro lado, su aplicación está restringida debido a los residuos que dejan en la miel y en otros productos de la colmena.

Objetivos

Objetivo General

Determinar los compuestos con actividad antimicrobiana sobre *Paenibacillus larvae* en diferentes extractos y el aceite esencial de *Achyrocline satureioides* y *Minthostachys verticillata*.

Objetivos Específicos

- 1- Aislar, conservar e identificar cepas de *Paenibacillus larvae*, a partir de colmenas infectadas con Loque Americana de la zona sur de la provincia de Córdoba.
- 2- Recolectar las especies vegetales y obtener los extractos (E) y aceites esenciales (AE) correspondientes.
- 3- Determinar la actividad antimicrobiana de los diferentes E y AE.
- 4- Estudiar químicamente los E y AE que resulten activos a fin de identificar los componentes responsables de la acción.

Materiales y Métodos

1- Paenibacillus larvae

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

1.1- Aislamiento, cultivo e identificación de cepas (Alippi, 1990)

Método directo: Técnica de la gota pendiente

A partir de las escamas y/o del material viscoso de los cuadros con síntomas de Loque Americana, se preparó un frotis sobre un cubreobjetos, se homogeneizó con una gota de agua destilada y se fijó a la llama. Paralelamente se colocó aceite de inmersión sintético sobre un portaobjetos, en una superficie algo mayor a la que ocupaba el cubreobjetos. El frotis fijado en el cubreobjetos se coloreó con fucsina fenicada de Ziehl durante 15-20 segundos. Se lavó y se colocó aún húmedo sobre el portaobjetos con el aceite de modo que la superficie coloreada se contacte con el mismo. La parte superior del cubreobjetos se secó suavemente con papel absorbente y se observó al microscopio con el objetivo de inmersión, colocando previamente una gota de aceite entre el cubreobjetos y el objetivo. Se observaron las áreas donde el agua había formado glóbulos.

Sólo las esporas de *P. larvae* presentan movimiento browniano. Las esporas de otras especies permanecen fijas al vidrio.

Cultivo en medio MYPGP agarizado

Se suspendieron las escamas y/o el material viscoso en tubos con 5 ml de caldo de cultivo MYPGP (Anexo I). Los tubos se calentaron en baño maría a 85-90 °C durante 20 minutos para provocar la germinación de las esporas, y luego se incubaron 24 h a 37 °C en atmósfera de microaerofilia, empleando una estufa de cultivo con 5% de CO₂, marca Innova, modelo CO48-230. A partir de cada tubo con turbidez, se tomó un inóculo con ansa estéril, y se sembraron las cajas de Petri que contenían medio de cultivo MYPGP agarizado (Anexo I), mediante estrías por agotamiento. Las mismas se incubaron en posición invertida a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 72 h.

Coloración de Gram

Se empleó la técnica de Gram-Hucker, a partir de las colonias aisladas desarrolladas en medio de cultivo MYPGP agarizado, preparando una delgada película bacteriana en agua destilada fijada con calor sobre un portaobjetos, y realizando luego la coloración de Gram.

Tinción Negativa

Se realizó una suspensión densa de *P. larvae* en solución fisiológica estéril a partir de las colonias aisladas desarrolladas en medio de cultivo MYPGP agarizado. Se situó una gota de dicha suspensión bacteriana sobre una superficie impermeable (parafilm), se colocó una grilla recubierta con película de Formvar o de Carbono con la cara brillante sobre la gota y se dejó actuar 5 minutos. Luego se eliminó cuidadosamente la gota con la ayuda de papel de filtro y se lavó la grilla dejando caer agua destilada sobre el borde de la pinza, luego se realizaron pasajes sucesivos en tres vasos de agua destilada. Posteriormente 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 1 minuto y se eliminó la gota con la ayuda de papel de filtro. Finalmente, se lavó la grilla dejando caer nuevamente agua destilada sobre el borde de la pinza, 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

Se efectuó a partir de cultivos de 48-72 h desarrollados en medio de cultivo MYPGP agarizado. En un portaobjetos seco se colocaron 2 gotas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10% y una colonia sospechosa. Una reacción positiva se evidencia por la aparición de burbujas, originadas por la acción de la catalasa sobre el peróxido de hidrógeno. En caso de reacción negativa no debe observarse desprendimiento de burbujas de oxígeno.

Reacción de Voges-Proskauer

Se sembraron las colonias desarrolladas en medio de cultivo MYPGP agarizado en tubos conteniendo 5 ml de caldo de cultivo MYPGP. A las 48-72 h de incubación a 37 °C en atmósfera de microaerofilia, se probó la producción de acetil metil carbinol mezclando 1 ml de cultivo con 0,6 ml de solución de α -naftol (5% p/v en

alcohol absoluto) y 0,2 ml de hidróxido de potasio al 40%. Luego de una incubación de 30 minutos a 37 °C, se observó la coloración que se produjo en el tubo. Coloración rojiza, reacción positiva, coloración amarillo-verdoso, reacción negativa.

Hidrólisis del almidón

Se sembró una estría de las colonias sospechosas en medio de cultivo MYPGP modificado (Anexo I). Al cabo de 48-72 h de incubación a 37 °C en atmósfera de microaerofilia, se reveló la presencia de la enzima amilasa agregando a la caja de Petri una solución de lugol el cual reacciona con el almidón dando un color azul. Si se observa un halo claro alrededor de la estría se considera amilasa positivo, ya que el microorganismo degradó el almidón y éste no reacciona con el lugol. La ausencia de halo, y el color azul en la placa indica que el microorganismo es amilasa negativo.

Hidrólisis de la gelatina

Las colonias sospechosas se inocularon en tubos conteniendo el medio de gelatina (Anexo I). Se incubaron a 28 °C en atmósfera de microaerofilia y se observaron cada 4 días, durante 4 semanas. Antes de la observación, los tubos se colocaron a 4°C para permitir que la gelatina no hidrolizada se endurezca. Un microorganismo productor de gelatinasa es capaz de hidrolizar la gelatina, observando que el medio permanece en estado líquido.

Hidrólisis de la caseína

Se sembró una estría de las colonias sospechosas en medio de cultivo MYPGP modificado (Anexo I). Al cabo de 48-72 h de incubación a 37 °C en atmósfera de microaerofilia, se reveló la utilización de la caseína observando un halo claro alrededor de la estría de siembra. La ausencia de halo, indica que el microorganismo no hidroliza la caseína.

Utilización del citrato

Se sembraron las colonias sospechosas en el medio comercial citrato de Simmons (Anexo I). Se incubó durante 48-72 h a 37 °C en atmósfera de microaerofilia. Al término de dicho período se analizó el resultado considerando como positivo aquellos tubos que presentaron color azul, lo cual indica que el microorganismo utiliza la sal de amonio, los tubos que presentaron color verde se consideraron negativos.

Caracterización genotípica

Para la identificación y confirmación molecular, las cepas fueron enviadas a Macrogen, Corea, para su secuenciamiento mediante ARNr 16S. Los datos obtenidos fueron incorporados a la base de datos del GenBank para obtener el valor E y los porcentajes de cobertura y de similitud para cada cepa estudiada.

1.2- Mantenimiento y conservación de cepas

Las cepas 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 del 20% de glicerol como criopreservador.

2- Especies vegetales

2.1- Recolección y procesamiento del material vegetal

Achyrocline satureioides

A. satureioides se recolectó de forma manual en época de floración en Villa Jorcoricó, provincia de Córdoba (32° 41' 38" S, 64° 42' 16" O). Una muestra del vegetal fue depositada en el Herbario de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Minthostachys verticillata

M. verticillata se recolectó de forma manual en época de floración en Río Ceballos, provincia de Córdoba (31° 9' 45" S, 64° 20' 7" O). 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 de ambas especies vegetales y con el material fresco de cada vegetal se obtuvo aceite esencial. La otra parte de los vegetales recolectados se dejaron secar a temperatura ambiente

sobre papel grafito y removiéndolas periódicamente para favorecer el aireamiento. Una vez secos se los conservó en condiciones adecuadas de temperatura y humedad hasta la obtención de los diferentes extractos.

2.2- Obtención de productos vegetales

- Aceite esencial (AE) (De Feo *et al.*, 1998)

La extracción del AE se realizó mediante destilación por arrastre con vapor de agua utilizando un hidrodestilador con trampa tipo Clevenger marca Figmay (Figura 8). Para ello, se pesaron 300 g de vegetal fresco, y se lo colocó en las canastas de la columna extractora del hidrodestilador. 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. El AE presente en la muestra vegetal fue arrastrado por el vapor de agua, y condensado. Los líquidos inmiscibles (aceite-agua) fueron separados por decantación. Una vez extraído el AE, se lo recolectó en frasco de vidrio color caramelo, al que se le agregó Na_2SO_4 anhidro en exceso para extraer el agua remanente y se lo conservó a 4 °C hasta su uso.

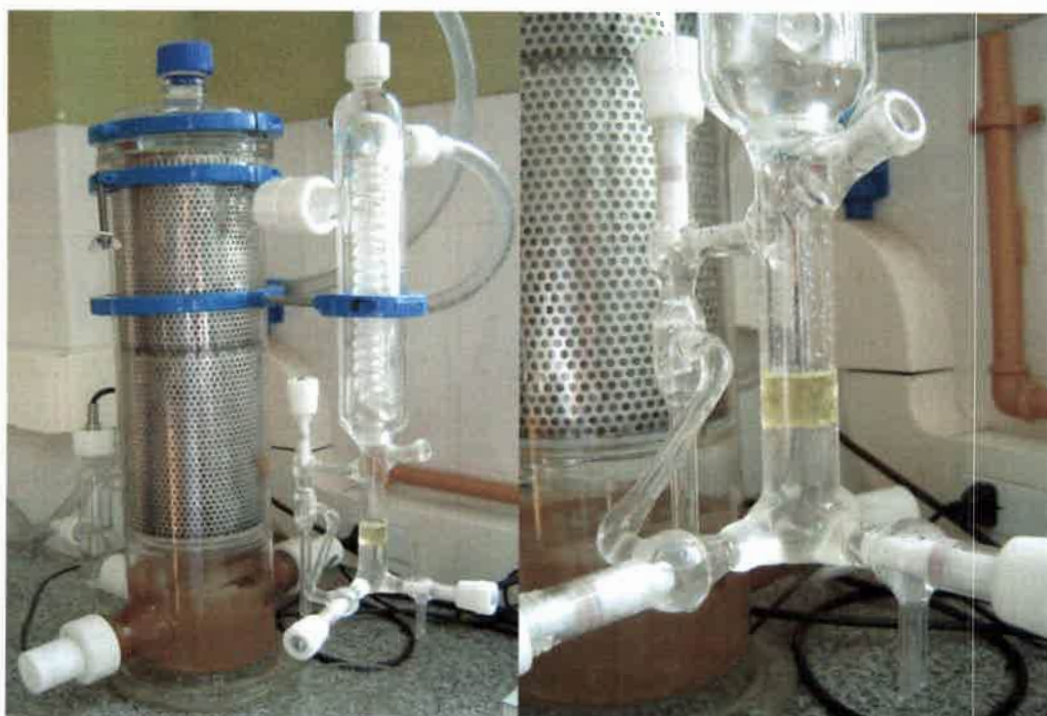


Figura 8: Hidrodestilador y trampa tipo Clevenger para la extracción de AE

- Extracto de hexano (EH), de benceno (EB), de éter etílico (EE) y de acetato de etilo (EAE)

Se pesaron 150 g de vegetal seco y se maceraron con etanol/agua (EtOH/H₂O) (1:1) hasta agotar el material vegetal renovando el extractante periódicamente. El macerado se filtró por papel Whatman N° 2 (Figura 9a) obteniendo un extracto hidroalcohólico, el que posteriormente fue concentrado a presión reducida para evaporar el etanol (EtOH) en un evaporador rotatorio marca IKA, modelo RV 10 (Figura 9b), así se obtuvo un extracto acuoso (EA) (Figura 9c). Finalmente, a dicho extracto se le realizó una extracción líquido-líquido en forma sucesiva (Figura 9d) con solventes menos densos que el agua y de polaridad creciente (hexano, benceno, éter etílico y acetato de etilo). De esta manera se obtuvieron, los extractos de hexano (EH), de benceno (EB), de éter (EE) y de acetato de etilo (EAE).

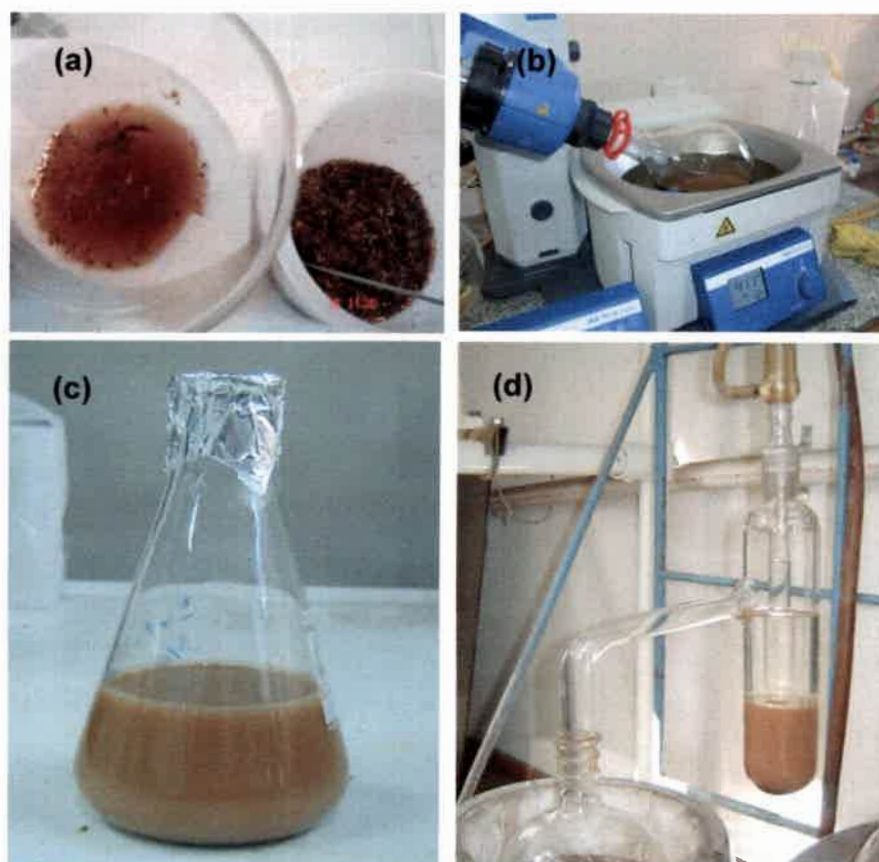


Figura 9: Obtención de extractos con solventes menos densos que el agua y de polaridad creciente **(a)** maceración con etanol/agua (EtOH/H₂O) (1:1) y filtración **(b)** concentración a presión reducida. **(c)** extracto acuoso. **(d)** extractor líquido-líquido para solventes menos densos que el agua

3- Actividad antibacteriana

3.1- Ensayo de la actividad antibacteriana del AE de *A. saturoioides* por la técnica de microdilución en caldo (Mann y Markham, 1998)

La técnica utilizada en este ensayo fue parcialmente modificada con el objeto de adecuarla a las condiciones de trabajo debido al microorganismo en estudio.

Se preparó el inóculo a probar a partir de un cultivo desarrollado en medio de cultivo MYPGP agarizado con 72 h de incubación a 37 °C en atmósfera de microaerofilia, obteniéndose una dilución en solución fisiológica equivalente al tubo 0,5 de la escala de MacFarland. Se realizaron diluciones seriadas factor 2 del AE en una solución de agar-agar al 0,15%. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 170 µl del inóculo microbiano suplementado con agar-agar al 0,15% y se agregaron 20 µl de las diluciones a probar. El control positivo consistió en 170 µl del inóculo con 20 µl del diluyente sin el AE a probar (color rosa) y el negativo en 170 µl de medio de cultivo sin inóculo con 20 µl de las diluciones del AE a probar (color azul). La microplaca se incubó a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 14-15 h. Finalmente, se agregaron 10 µl de una solución de resazurina al 0,01% p/v y la microplaca fue nuevamente incubada durante 2 h a 37 °C. El ensayo fue realizado por triplicado.

La visualización se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos vivos de reducir la resazurina. El color azul indicará inhibición del crecimiento (estado oxidado) y el rosa presencia de crecimiento (estado reducido). Se considerará la CIM como la última dilución del aceite esencial o extracto que presente color azul.

3.2- Ensayo de la actividad antibacteriana de los extractos de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* por la técnica de difusión en pozo (De Feo *et al.*, 1998)

La técnica utilizada en este ensayo fue parcialmente modificada con el objeto de adecuarla a las condiciones de trabajo debido al microorganismo en estudio.

Se preparó el inóculo a probar a partir de un cultivo desarrollado en medio de cultivo MYPGP agarizado con 72 h de incubación a 37 °C en atmósfera de microaerofilia, obteniéndose una dilución en solución fisiológica equivalente al tubo 0,5 de la escala de MacFarland. Se colocaron 0,1 ml de la dilución anterior en cajas de Petri con medio de cultivo MYPGP agarizado, y la misma fue distribuída con espátula

de Drigalsky hasta que el inóculo fue absorbido. Sobre las cajas sembradas se realizó un orificio de 5 mm en la superficie del agar y se colocaron en el 50 μ l del producto vegetal (AE o extracto) puro a probar y diluciones seriadas factor 2 del mismo en Dimetilsulfóxido (DMSO). Finalmente, las cajas se incubaron a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 72 h. El ensayo fue realizado por triplicado. La medida del halo de inhibición del crecimiento de la dilución respectiva permitió calcular la CIM del extracto probado.

3.3- Visualización del efecto del EH de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

Se preparó el inóculo a probar a partir de un cultivo desarrollado en medio de cultivo MYPGP agarizado con 72 h de incubación a 37 °C en atmósfera de microaerofilia, obteniéndose una dilución en caldo de cultivo MYPGP equivalente al tubo 3 de la escala de MacFarland. Se colocaron 0,8 ml de la dilución anterior en tubos eppendorf que contenían 0,2 ml del EH (8mg/ml) y diluciones seriadas factor 2 del mismo en DMSO. El control positivo consistió en 0,8 ml de la dilución del inóculo bacteriano con 0,2 ml de DMSO. Los tubos se incubaron a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 72 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión bacteriana se fijó en glutaraldehído al 2,5 % en solución tampón S-collidine (0,2 M, pH 7,4) durante 3 h a 4°C. Se lavó dos veces con solución tampón S-collidine. Se refijó en tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó dos veces en solución tampón S-collidine y se deshidrató en concentraciones crecientes de acetona (1 pasaje en acetona 30%, 50%, 70% y 90% durante 5 minutos cada uno, y 3 pasajes en acetona 100% durante 5 minutos cada uno). La preinclusión se realizó en resina epoxi EMBED 812 1:1 en acetona 100%, durante toda la noche a temperatura ambiente. La inclusión se realizó con EMBED 812 a 56°C, durante 48 h. Entre cada paso la suspensión bacteriana fue centrifugada a 5500 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se retomó la experiencia con el sedimento.

A través de un ultramicrotomo manual, utilizando cuchillas de vidrio, se obtuvieron cortes semifinos ($\pm 0.25 \mu$ m) los que fueron teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio óptico para la elección de la zona de interés. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos (20-60 nm) con cuchilla de diamante, los que se colocaron sobre grillas de cobre de 250 mesh y se contrastaron con acetato de

uranilo durante 30 minutos y con citrato de plomo durante 8 minutos. La observación de la ultraestructura bacteriana se realizó a través de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Elmiskop 101 (Siemens) y la adquisición de imágenes mediante un microscopio electrónico de transmisión LEO (Carl Zeiss).

4- Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se cortaron cromatofolios de Sílica gel con indicador de fluorescencia 254 nm (Fluka) de 3 cm de ancho por 7 cm de alto, a los cuales se les marcó con lápiz la línea de siembra a 0,75 cm de la base. Con un capilar se realizó la siembra en banda, de un 1 cm de ancho, del AE y del EH de *A. satureioides* y de *M. verticillata*. Los cromatofolios se corrieron en una cámara de desarrollo previamente saturada con los vapores de la fase móvil.

Las fases móviles empleadas en las diferentes cromatografías fueron: acetona, acetato de etilo, éter etílico, diclorometano, hexano, tolueno, cloroformo y benceno puros o en las mezclas mostradas en la Tabla 1 (Anexo I).

Una vez que los cromatofolios fueron corridos con las diferentes fases móviles, se retiraron de la cámara de desarrollo, se dejaron secar y se observaron bajo luz ultravioleta (UV) a 254 nm. Los cromatofolios también se revelaron con yodo y con ClFe_3 . Para esto, se los colocó junto a grageas de yodo en cajas de Petri, y se mantuvieron a 30°C durante 60 minutos o se los asperjó con una solución de ClFe_3 al 40%.

Posteriormente, se seleccionaron aquellas cromatografías donde se visualizaban bandas separadas y definidas, correspondientes a diferentes compuestos presentes en el AE y en el EH de *A. satureioides* y de *M. verticillata* y se midieron los R_f de las mismas. Las placas se esterilizaron bajo luz UV durante 1 h y se conservaron bajo condiciones estériles para ser luego utilizadas en bioautografía.

5- Bioautografía

Ensayo de la actividad antibacteriana del AE y del EH de *A. satureioides* y de *M. verticillata* por la técnica de bioautografía (Gende *et al.*, 2008)

Se preparó el inóculo a probar a partir de un cultivo desarrollado en medio de cultivo MYPGP agarizado con 72 h de incubación a 37 °C en atmósfera de

microaerofilia, obteniéndose una dilución en solución fisiológica equivalente al tubo 1 de la escala de MacFarland. Se colocó 1 ml de la dilución anterior en 20 ml de medio de cultivo MYPGP agarizado al 0,6% (Anexo I) fundido a 40 °C y se vertió en una caja de Petri la cual contenía una CCD desarrollada como se describió en el punto 4. Una vez solidificado el medio de cultivo, las cajas se incubaron a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 24 h. Luego se asperjó 1 ml de una solución de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) en agua destilada al 5% p/v sobre la superficie del medio de cultivo. Las cajas se incubaron nuevamente a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 24-48 h. El ensayo fue realizado por triplicado.

La visualización se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos vivos de reducir el TTC en formazán. El color rosa indicó crecimiento bacteriano, mientras que las zonas sin coloración indicaron inhibición del crecimiento, éstas fueron comparadas con los Rf de las CCD correspondientes, permitiendo identificar la banda activa.

6- Cromatografía gaseosa (CG-EM)

La identificación de los componentes del AE de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* se realizó utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas marca Perkin Elmer, modelo Clarus 600. La energía utilizada en el espectrómetro de masa para la fragmentación de los componentes de las muestras fue de 70 eV. Para la separación de los componentes se empleó una columna J&W DB 5 de 60 m de longitud; 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película, empleando helio como gas de arrastre con una presión de 49,6 psi a una velocidad de flujo de 2,99 ml/minuto. Se utilizó el modo "Split" con una velocidad de flujo del "Split" de 20 ml/minuto. La temperatura inicial del horno fue de 60 °C, manteniéndose por 5 minutos, luego se aplicó una rampa de 5 °C por minuto hasta llegar a 240 °C y finalmente se mantuvo esta temperatura durante 10 minutos, dando un tiempo total de corrida de 51 minutos.

Se prepararon soluciones "stock" de los AE en proporción 1:4 v/v en hexano. Previos a ser inyectados en el cromatógrafo, los AE fueron diluidos nuevamente en hexano hasta una proporción 1:200 v/v. Los componentes de las bandas activas que mostraron los AE, a través de la técnica de bioautografía, también fueron identificadas mediante CG-EM, para ello se procedió como lo indica el punto 4, raspando dichas bandas y extrayendo con hexano los componentes adsorbidos.

Se tomó 1 µl de cada muestra como volumen de inyección. La identificación de los componentes se realizó por comparación con la biblioteca del programa Nist MS Search 2.0 luego de obtener los cromatogramas correspondientes (Anexo II).

7- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La identificación de los componentes del EH de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* se realizó utilizando un cromatógrafo líquido marca Waters, modelo e2695 alliance, acoplado a un detector de arreglo de diodos marca Waters, modelo 2998 y un soft de control EmpowerPro. Para la separación de los componentes se empleó una columna C18 marca Phenomenex, modelo Gemini NX, de 100 x 2 mm y 3 µm de diámetro de partícula, empleando metanol/acetoneitrilo/ácido acético (89:10:1) (solvente A) y H₂O/ácido acético (solvente B) como fases móviles. La separación fue hecha a una velocidad de flujo constante de 0,2 ml/minuto y gradiente de elución 96% de solvente B inicialmente, el que fue reducido a 5% en 30 minutos con retorno a 96% de solvente B después de 32 minutos.

Se prepararon soluciones "stock" de los EH de 1 mg/ml en metanol. Previos a ser inyectados en el cromatógrafo, los EH fueron microfiltrados. Los componentes de las bandas activas que mostraron los EH, a través de la técnica de bioautografía, también fueron identificadas mediante HPLC, para ello se procedió como lo indica el punto 4, raspando dichas bandas y extrayendo con metanol los componentes adsorbidos.

Se tomaron 20 µl de cada muestra como volumen de inyección. El monitoreo de los cromatogramas fue realizado con variación de la longitud de onda de 230 a 500 nm. La identificación de los componentes se realizó por comparación con espectros de absorción luego de obtener los cromatogramas correspondientes.

8- Oxitetraciclina

Ensayo de la actividad antibacteriana de (OTC) por la técnica de difusión en pozo (De Feo et al., 1998)

La técnica utilizada en este ensayo fue parcialmente modificada con el objeto de adecuarla a las condiciones de trabajo debido al microorganismo en estudio.

Se preparó el inóculo a probar a partir de un cultivo desarrollado en medio de cultivo MYPGP agarizado con 72 h de incubación a 37 °C en atmósfera de microaerofilia, obteniéndose una dilución en solución fisiológica equivalente al tubo 0,5 de la escala de MacFarland. Se colocaron 0,1 ml de la dilución anterior en cajas de Petri con medio de cultivo MYPGP agarizado, y la misma fue distribuida con espátula de Drigalsky hasta que el inóculo fue absorbido. Sobre las cajas sembradas se realizó un orificio de 5 mm en la superficie del agar y se colocaron en el 50 µl de una solución madre de OTC en agua destilada con una concentración de 0,1 mg/ ml y diluciones seriadas factor 2 de la misma en DMSO. Finalmente, las cajas se incubaron a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 72 h. El ensayo fue realizado por triplicado. El halo de inhibición del crecimiento de la dilución respectiva permitió calcular la CIM del extracto probado.

Resultados y Discusión

1- Paenibacillus larvae

1.1- Aislamiento, cultivo e identificación de cepas (Alippi, 1990)

La sintomatología típica de la enfermedad pudo observarse claramente en los cuadros analizados. Los mismos presentaban una distribución irregular de la cría, con celdas infectadas no operculadas, celdas sanas operculadas y celdas vacías en el mismo panal, con aspecto de mosaico, lo que comúnmente a campo se describe como panales de “aspecto de cría salteada”. Fue muy notable percibir un fuerte olor pútrido y penetrante, y al extraer una de las larvas afectadas, ésta tenía apariencia viscosa y al estirla se formaba un largo filamento con aspecto y consistencia de “chicle” (Bailey y Ball, 1991; Bruno, 1999; De la Sota y Bacci, 2004; Bounous y Boga, 2005) (Figura 10).

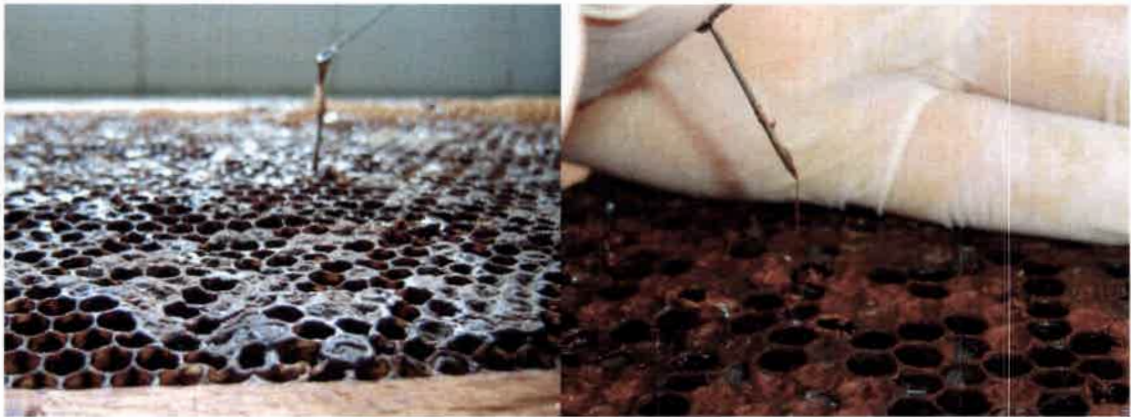


Figura 10: Cuadros con síntomas de Loque Americana - Extracción de una larva afectada con apariencia viscosa; con aspecto y consistencia de “chicle”

Método directo: Técnica de la gota pendiente

Esta técnica resultó ser un método de diagnóstico rápido y simple para detectar esporas de *P. larvae*, agente causal de Loque Americana, en cuadros con restos larvales.

Las esporas observadas en los cuadros analizados mostraron tener movimiento browniano, movimiento característico sólo de las esporas de *P. larvae*. Las esporas de otras especies de *Bacillus* permanecen fijas al vidrio. Ocasionalmente, algunas esporas bacterianas pueden aparentar cierto movimiento, entonces es importante considerar el tamaño de las mismas, dado que *P. larvae* es la especie patógena de abejas que posee las esporas más pequeñas (Alippi, 1990).

Cultivo en medio MYPGP agarizado

Se observó el desarrollo de colonias sospechosas de *P. larvae* en los cuadros analizados con síntomas de Loque Americana después de 72 h de incubación en medio de cultivo MYPGP a 37 °C en atmósfera de microaerofilia. Las colonias se observaron translúcidas, planas, de bordes algo irregulares, de aproximadamente 3 a 4 mm de diámetro, tendiendo a emerger juntas en áreas de gran crecimiento (Figura 11).



Figura 11: Colonias de *P. larvae* desarrolladas en medio de cultivo MYPGP agarizado

Dado que el *P. larvae* es un agente patógeno altamente especializado de la larva de la abeja, y sus esporas sólo pueden germinar y desarrollar formas vegetativas in vitro mediante el empleo de medios de cultivo muy ricos en elementos nutritivos, el medio de cultivo MYPGP que tiene como base al medio Müller-Hinton (Dingman y Stahly, 1983), resultó adecuado para el aislamiento de dicho microorganismo. De hecho, una característica diferencial de este microorganismo es su incapacidad para desarrollar en medios de cultivo simples, los mismos deben ser suplementados con sustancias tales como tiamina, purinas, yema de huevo, extracto de carne, extracto de levadura y peptonas (Stahly *et al.*, 1992). También se ha demostrado que el uso de una base rica como infusión cerebro-corazón (Goodwin, 1994), Columbia agar con el agregado de sangre de ovino (Heyndrickx *et al.*, 1996), agar base sangre con sangre equina (Nordström y Fries, 1995) y agar J (Dingman y Stahly, 1983), son adecuados

para el aislamiento de la bacteria. Los componentes indispensables para el crecimiento de *P. larvae* son la tiamina o vitamina B1, el extracto de levadura y varias peptonas. Para lograr la esporulación se requiere el agregado al medio de cultivo de glucosa y piruvato de sodio al 1%. Las esporas germinan y crecen mejor en condiciones de microaerofilia. La incubación de *P. larvae* se realiza en atmósfera de microaerofilia a 37 °C por un mínimo de 3 días (Hornitzky y Karlovskis, 1989). Se han diseñado también, medios de cultivo específicos y selectivos, especialmente desarrollados con ácido nalidíxico y ácido pipemídico para la búsqueda de *P. larvae* en muestras con bajo número de esporas y que están contaminadas con otras bacterias de la colmena (Alippi, 1996; Reynaldi y Alippi, 2006).

Coloración de Gram

Se realizó la coloración de Gram, a partir de las colonias desarrolladas en medio de cultivo MYPGP agarizado mencionadas en el punto anterior. Por medio de la misma se pudo comprobar que se trataban de bacilos Gram positivo, delgados de aproximadamente 2,3 a 5 μm de largo por 0,5 a 0,7 μm de ancho, agrupados de a pares, solos o en cadenas cortas, comportamiento tintorial y morfología típica que corresponde a la forma vegetativa del agente causal de Loque Americana (Figura 12).



Figura 12: Coloración de Gram de *P. larvae* observado en microscopio óptico (100x)

Tinción Negativa

Con el propósito de observar la morfología externa de *P. larvae* con más detalles se realizó la 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 peritrica, lo cual se corresponde con la bibliografía consultada (De la Sota y Bacci, 2004). La mayoría de los microorganismos se observan agrupados de a pares o solos (Figura 13).

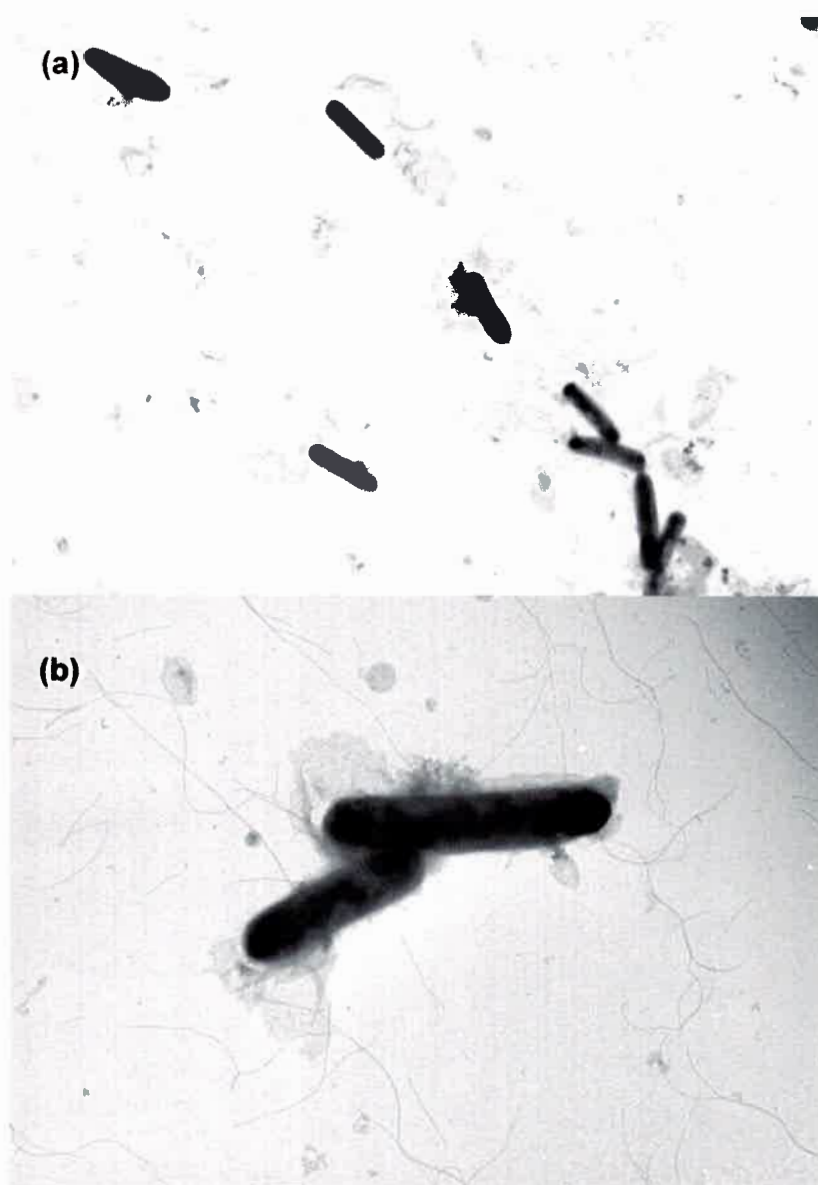


Figura 13: Tinción negativa de *P. larvae* observado en microscopio electrónico de transmisión; (a) Células bacterianas a 3597x. (b) Células bacterianas a 10000x

Identificación bioquímica

Los resultados obtenidos de la identificación bioquímica de las cepas aisladas a partir de los cuadros analizados, se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 2: Pruebas de identificación de *P. larvae*

PRUEBA	CATALASA	VOGES PROSKAUER	HIDR. DEL ALMIDÓN	HIDR. DE LA GELATINA	HIDR. DE LA CASEÍNA	UTIL. DE CITRATO
RESULTADO	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)

Referencias: (+): reacción positiva; (-): reacción negativa

Es de gran importancia destacar la utilidad del test de la catalasa para una diferenciación preliminar rápida de *P. larvae* de otras especies de *Bacillus* presentes en la colmena (Figura 14a). Los bacilos formadores de esporas que pueden estar presentes en la colmena son catalasa positivo, en tanto que el agente causal de Loque Americana es el único bacilo catalasa negativo (Alippi, 1990).

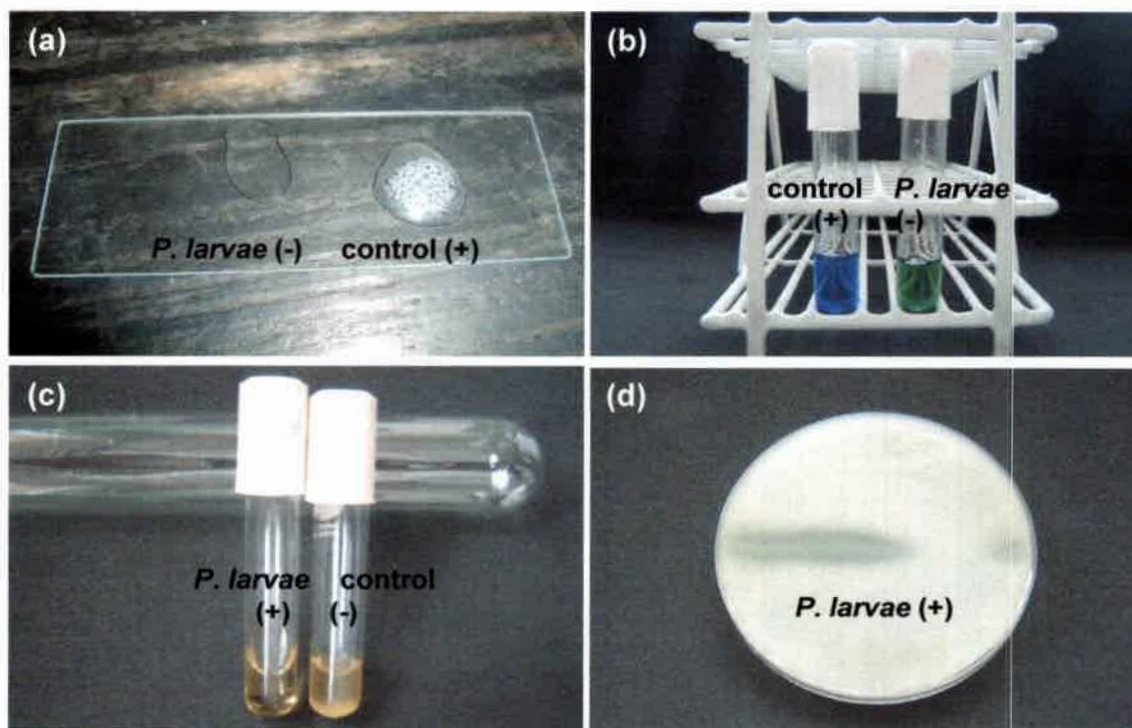


Figura 14: Pruebas de Identificación bioquímica de *P. larvae*: (a) Prueba de la catalasa. (b) Utilización de citrato. (c) Hidrólisis de la gelatina. (d) Hidrólisis de la caseína.

Por otro lado, estos resultados demuestran la utilidad de la técnica de la gota pendiente, una prueba directa, sencilla y económica para el diagnóstico de Loque Americana, ya que las pruebas de identificación de las cepas aisladas (Figura 14a, 14b, 14c y 14d) coinciden totalmente con los resultados de la técnica mencionada.

A pesar que la sintomatología de esta enfermedad es muy típica, y que su detección puede efectuarse directamente en el campo, con la ayuda del laboratorio se puede obtener una confirmación inequívoca del diagnóstico.

Caracterización genotípica

Para la identificación y confirmación molecular de las cepas, luego del secuenciamiento mediante ARNr 16S, los datos obtenidos fueron incorporados a la base de datos del GenBank obteniendo el valor E y los porcentajes de cobertura y de similitud para cada una de las cepas estudiadas.

En la tabla 3 se puede observar que las cepas estudiadas corresponden al perfil genético de la especie *Paenibacillus larvae*, con porcentajes de cobertura del 99% y del 100%. Los porcentajes de similitud fueron de 97% y 98% con cepas del microorganismo que fueron incorporadas a la base de datos con anterioridad. Todas las cepas presentaron 0,0 como valor E, éste es el dato más importante del alineamiento, ya que mientras más bajo es este valor, más significativo es, indicando que es muy poco probable que dicho alineamiento haya ocurrido al azar.

Tabla 3: Identificación molecular de las cepas de *P. larvae* mediante ARNr 16S

Cepa	Origen	Código de acceso en GenBank	Identificación por ARNr 16S	% Cobertura	% Similitud	Valor E
1	INTA Balcarce, Buenos Aires	AY530295	<i>Paenibacillus larvae</i>	100%	98% con <i>Paenibacillus larvae</i> cepa DSM 3615, ARNr 16S, secuencia completa	0,0
2	INTA Balcarce, Buenos Aires	AY530295	<i>Paenibacillus larvae</i>	100%	97% con <i>Paenibacillus larvae</i> cepa DSM 3615, ARNr 16S, secuencia completa	0,0
3	INTA Balcarce, Buenos Aires	DQ079623	<i>Paenibacillus larvae</i>	99%	98% con <i>Paenibacillus larvae</i> aislamiento 03-189, ARNr 16S, secuencia parcial	0,0
4	INTA Balcarce, Buenos Aires	DQ079623	<i>Paenibacillus larvae</i>	99%	98% con <i>Paenibacillus larvae</i> aislamiento 03-189, ARNr 16S, secuencia parcial	0,0
5	INTA Balcarce, Buenos Aires	DQ079623	<i>Paenibacillus larvae</i>	99%	98% con <i>Paenibacillus larvae</i> aislamiento 03-189, ARNr 16S, secuencia parcial	0,0
6	INTA Balcarce, Buenos Aires	AY530295	<i>Paenibacillus larvae</i>	99%	97% con <i>Paenibacillus larvae</i> cepa DSM 3615, ARNr 16S, secuencia completa	0,0
7	Río Cuarto, Córdoba	AY530295	<i>Paenibacillus larvae</i>	99%	97% con <i>Paenibacillus larvae</i> cepa DSM 3615, ARNr 16S, secuencia completa	0,0
8	Río Cuarto, Córdoba	AY530295	<i>Paenibacillus larvae</i>	100%	98% con <i>Paenibacillus larvae</i> cepa DSM 3615 ARNr 16S, secuencia completa	0,0
9	Río Cuarto, Córdoba	AY530295	<i>Paenibacillus larvae</i>	99%	98% con <i>Paenibacillus larvae</i> cepa DSM 3615, ARNr 16S, secuencia completa	0,0
10	Río Cuarto, Córdoba	DQ079623	<i>Paenibacillus larvae</i>	99%	97% con <i>Paenibacillus larvae</i> aislamiento 03-189, ARNr 16S, secuencia parcial	0,0
11	Río Cuarto, Córdoba	AY530295	<i>Paenibacillus larvae</i>	99%	97% con <i>Paenibacillus larvae</i> cepa DSM 3615, ARNr 16S, secuencia completa	0,0

1.2- Mantenimiento y conservación de cepas

Debido a la gran labilidad del microorganismo, la conservación a -20 °C, en medio de cultivo MYPGP adicionado con glicerol al 20% no resultó exitosa para las cepas aisladas, por lo tanto, las mismas fueron mantenidas a 4 °C, realizando sucesivos repiques en medio de cultivo MYPGP agarizado cada semana (González, 2005).

2- Especies vegetales

2.1- Recolección y procesamiento del material vegetal

Las salidas a campo fueron realizadas entre los meses de Diciembre y Marzo, periodo en el cual la planta se encuentra en época de floración. Esto es de gran importancia ya que una misma planta puede aportar diferencias en el mismo extracto dependiendo de factores extrínsecos o intrínsecos a la especie vegetal (Barrio Alonso *et al.*, 2001).

Achyrocline satureioides

A. satureioides fue fácilmente reconocida a campo por sus características morfológicas. Luego de la recolección, la especie vegetal fue identificada por el Ingeniero Agrónomo Cesar Núñez y una muestra de la misma fue depositada en el Herbario de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto bajo el número de identificación: 539.

Minthostachys verticillata

M. verticillata fue fácilmente reconocida a campo por sus características morfológicas. Luego de la recolección, la especie vegetal fue identificada por el Ingeniero Agrónomo Cesar Núñez y una muestra de la misma 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.

2.2- Obtención de productos vegetales

Achyrocline satureioides

- Aceite esencial (AE)

Luego de realizar la destilación por arrastre con vapor de agua utilizando una trampa tipo Clevenger, se obtuvo el AE cuyo rendimiento fue del 0,143% v/p.

- Extracto de hexano (EH), de benceno (EB), de éter etílico (EE) y de acetato de etilo (EAE)

Luego de realizar una extracción continua en un extractor líquido-líquido con solventes de polaridad creciente, se obtuvieron 773,8 mg de EH; 756,1 mg de EB; 252,7 mg de EE y 86,5 mg de EAE; con rendimientos de 0,52% p/p, 0,50% p/p, 0,17% p/p y 0,06% p/p respectivamente para cada extracto (Figura 15).



Figura 15: EH de *A. saturoioides* obtenido por extracción líquido-líquido

Minthostachys verticillata

- Aceite esencial (AE)

Luego de realizar la destilación por arrastre con vapor de agua utilizando una trampa tipo Clevenger, se obtuvo el AE cuyo rendimiento fue del 0,625% v/p (Figura 16).

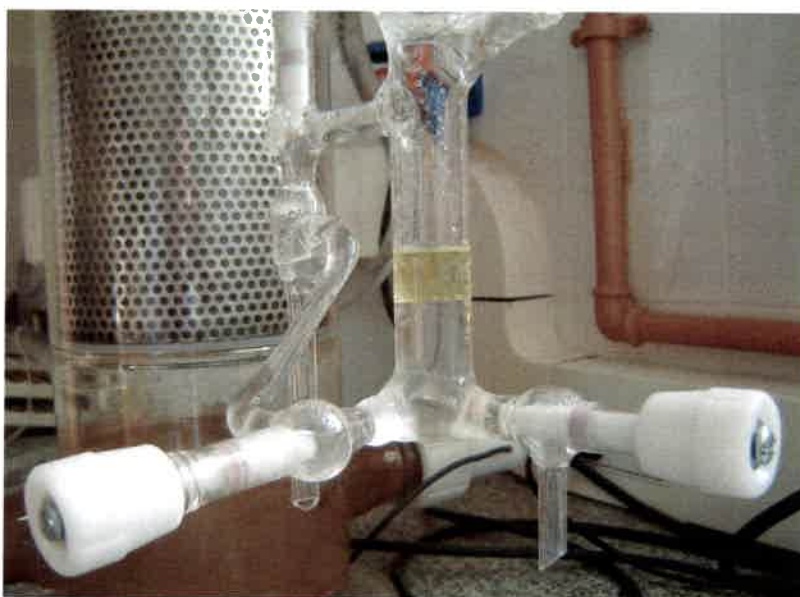


Figura 16: AE de *M. verticillata* obtenido por destilación por arrastre de vapor de agua utilizando una trampa tipo Clevenger

- Extracto de hexano (EH), de benceno (EB), de éter etílico (EE) y de acetato de etilo (EAE)

Luego de realizar una extracción continua en un extractor líquido-líquido con solventes de polaridad creciente, se obtuvieron 446,7 mg de EH; 125,7 mg de EB; 224 mg de EE y 169,4 mg de EAE; con rendimientos de 0,30% p/p, 0,08% p/p, 0,15% p/p y 0,11% p/p respectivamente para cada extracto.

3- Actividad antibacteriana

3.1- Ensayo de la actividad antibacteriana por la técnica de microdilución en caldo (Mann y Markham, 1998)

Achyrocline satureioides

3.1.1- Ensayo de la actividad antibacteriana del AE

La tabla 4 resume los resultados promedio de actividad antibacteriana del AE de *A. satureioides* sobre las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas, luego de realizar la técnica de microdilución en caldo.

Tabla 4: Actividad antibacteriana del AE de *A. saturoioides*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración del AE (mg/ml)						
	11,4	5,7	2,8	1,4	0,7	0,36	0,18
1	I	I	NI	NI	NI	NI	NI
2	I	I	NI	NI	NI	NI	NI
3	I	I	NI	NI	NI	NI	NI
4	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
5	I	I	NI	NI	NI	NI	NI
6	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
7	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
8	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
9	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
10	I	I	NI	NI	NI	NI	NI
11	I	I	NI	NI	NI	NI	NI

Referencias: I: Inhibición del crecimiento; NI: No inhibición del crecimiento

Estos resultados permiten afirmar que el AE posee actividad antibacteriana sobre dicho microorganismo con valores de CIM que oscilan en un intervalo de 5,7 a 11,4 mg/ml. Las cepas 1, 2, 3, 5, 10 y 11 mostraron ser las más sensibles con CIM de 5,7 mg/ml (Figura 17), mientras que las cepas restantes fueron las más resistentes con CIM de 11,4 mg/ml (Figura 18).

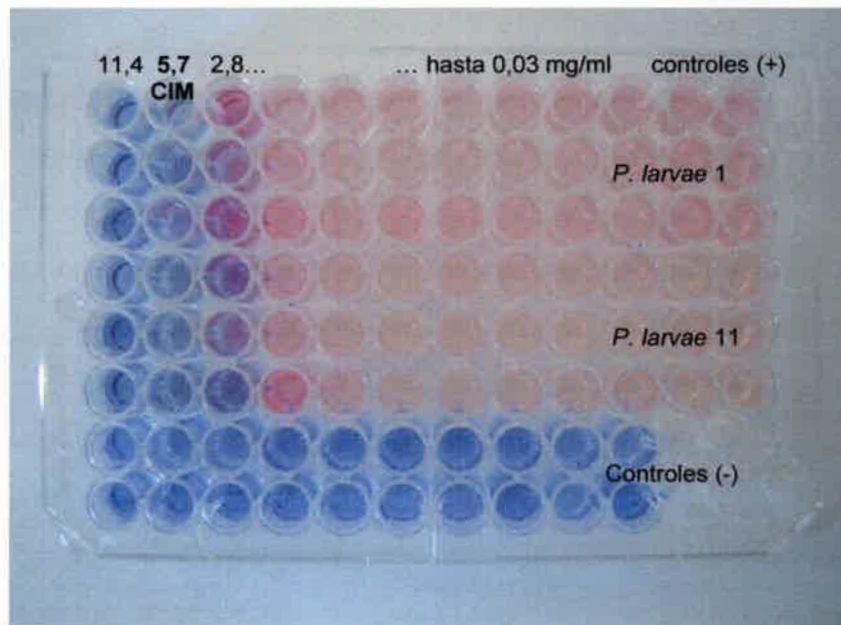


Figura 17: Actividad antibacteriana del AE de *A. saturoioides* frente a *P. larvae* 1 y 11

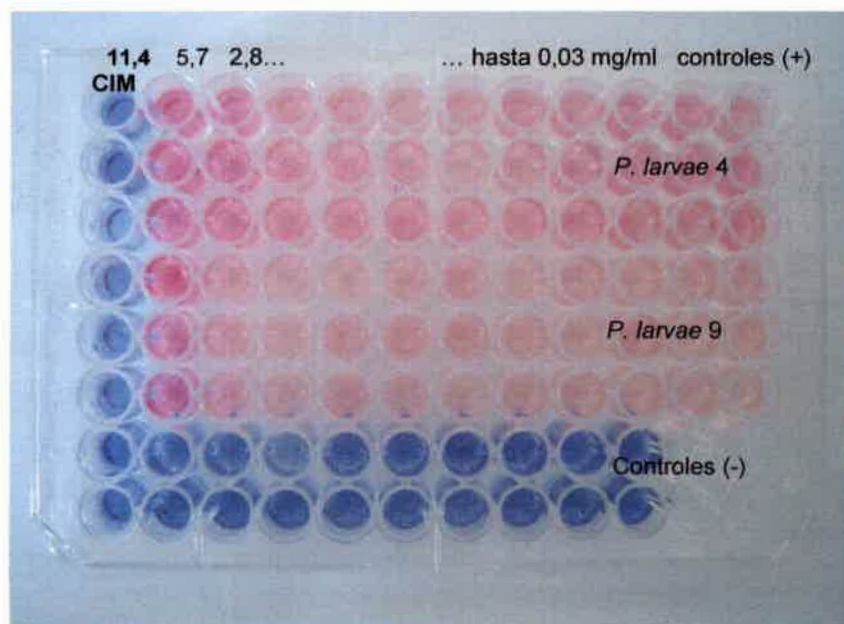


Figura 18: Actividad antibacteriana del AE de *A. saturoioides* frente a *P. larvae* 4 y 9

La bibliografía consultada, señala que la prueba utilizada con mayor frecuencia para orientar en el tratamiento de un antimicrobiano es la técnica de difusión en pozo. Sin embargo, no es el más apropiado para el análisis de muestras no polares o muestras que no son fáciles de difundir en agar. Es por ello que no pudo emplearse esta técnica para determinar la actividad antibacteriana del AE de *A. saturoioides*, ya que se vio dificultada la difusión de dicho extracto vegetal al ser una sustancia poco

polar y de escasa solubilidad, dando como resultado tamaños de halos de inhibición del crecimiento poco definidos y que no permitían calcular la CIM. No obstante, en los últimos años, ha comenzado a utilizarse la técnica de microdilución en caldo, la cual se hizo tan común y está tan bien estudiada que se convirtió en el estándar de referencia para muchas investigaciones. El principal motivo es que la misma utiliza volúmenes pequeños del antimicrobiano en estudio, y de que pueden probarse grandes cantidades de microorganismos de un modo económico (Mann y Markham, 1998; Koneman, 1999; Scorzoni *et al.*, 2007).

3.2- Ensayo de la actividad antibacteriana por la técnica de difusión en pozo (De Feo *et al.*, 1998)

Achyrocline satureioides

3.2.1- Ensayo de la actividad antibacteriana del EH

Tabla 5: Actividad antibacteriana del EH de *A. satureioides*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración del EH (mg/ml)						0,008
	0,50	0,25	0,125	0,063	0,032	0,016	
1	22,0±1,4	18,0±0,0	14,3±0,6	10,5±0,7	8,7±0,6	7,5±0,7	NI
2	13,6±3,7	11,0±1,8	7,8±0,5	7,6±0,8	NI	NI	NI
3	14,8±4,8	9,7±0,6	8,7±0,6	7,7±0,6	6,3±0,6	NI	NI
4	10,0±0,0	8,7±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI	NI
5	10,7±0,6	8,3±0,6	7,7±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI
6	13,3±0,0	11,7±0,6	9,7±0,6	7,7±0,6	NI	NI	NI
7	31,0±1,4	25,7±1,2	19,7±1,5	14,3±0,6	12,0±0,0	7,3±0,6	NI
8	9,0±0,0	8,3±0,6	7,3±0,6	NI	NI	NI	NI
9	14,0±0,0	11,7±0,6	10,5±0,7	8,3±0,6	7,0±0,0	NI	NI
10	8,1±1,0	8,7±0,6	7,7±1,2	7,0±0,0	NI	NI	NI
11	9,3±0,6	8,7±1,2	7,3±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI

Referencias: NI: No inhibición del crecimiento

La tabla 5 resume los resultados promedio y la desviación estándar obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas frente al EH de *A. saturoioides*.

La presencia de halos de inhibición del crecimiento en las 11 cepas estudiadas, luego de realizar la técnica de difusión en pozo, permite afirmar que el EH de *A. saturoioides* posee actividad antibacteriana. Los valores de CIM oscilan en un intervalo de 0,016 a 0,125 mg/ml. De las cepas ensayadas, las cepas 1 y 7 fueron las más sensibles con un valor de CIM de 0,016 mg/ml, mientras que las cepas más resistentes fueron las cepas 4 y 8 con un valor CIM de 0,125 mg/ml (Figura 19). La CIM de las cepas 3 y 9 fue de 0,032 mg/ml, y por último, las cepas 2, 5, 6, 10 y 11 presentaron una CIM de 0,063 mg/ml.

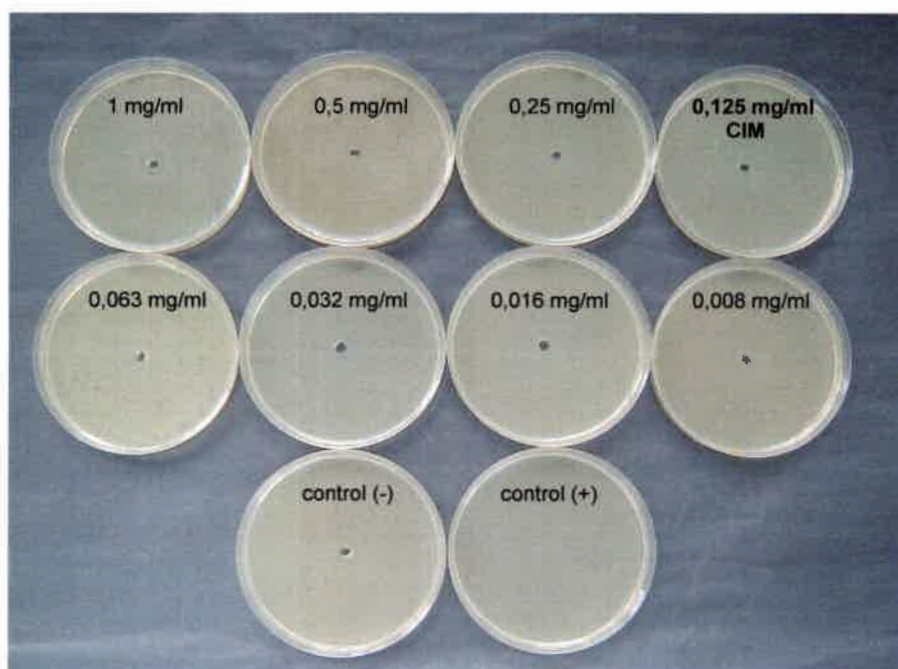


Figura 19: Actividad antibacteriana del EH de *A. saturoioides* frente a *P. larvae* 4

3.2.2- Ensayo de la actividad antibacteriana del EB

La tabla 6 resume los resultados promedio y la desviación estándar obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas frente al EB de *A. saturoioides*.

Tabla 6: Actividad antibacteriana del EB de *A. saturoioides*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración del EB (mg/ml)						0,016
	1	0,50	0,25	0,125	0,063	0,032	
1	12,7±0,6	10,7±0,6	10,0 ±0,0	8,7±0,6	7,3±0,6	NI	NI
2	11,7±0,6	9,7±1,2	8,3±0,6	7,3±0,6	7,0±0,0	NI	NI
3	11,0±1,0	9,7±0,6	8,7±0,6	7,3±0,6	7,0±0,0	NI	NI
4	10,0±0,0	8,3±0,6	7,3±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI
5	12,3±0,6	10,0±0,0	9,0±1,0	7,7±0,6	7,0±0,0	NI	NI
6	13,±0,0	11,7±0,6	9,3±0,6	8,3±0,6	7,0±0,0	NI	NI
7	10,3±0,6	9,3±0,6	8,3±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI
8	9,3±0,6	8,3±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI	NI
9	9,0±0,0	7,7±0,6	7,0±0,0	NI	NI	NI	NI
10	8,0±0,0	6,7±0,6	6,0±0,0	NI	NI	NI	NI
11	9,0 ±1,0	7,3±0,6	7,4±0,9	6,7±0,6	NI	NI	NI

Referencias: NI: No inhibición del crecimiento

Puede observarse la presencia de halos de inhibición del crecimiento en las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas, luego de realizar la técnica de difusión en pozo, lo que permite afirmar que el EB de *A. saturoioides* posee actividad antibacteriana. Los valores de CIM oscilan en un intervalo de 0,063 a 0,25 mg/ml. Las cepas 1, 2, 3, 5 y 6 demostraron ser las más sensibles al EB de *A. saturoioides* con una CIM de 0,063 mg/ml (Figura 20), mientras que las cepas más resistentes fueron las cepas 8, 9 y 10 con un valor CIM de 0,25 mg/ml. El resto de las cepas presentaron un valor de CIM correspondiente a 0,125 mg/ml.

Comparando el tamaño de los halos de inhibición del crecimiento y los valores de CIM para cada una de las 11 cepas ensayadas, cabe destacar que el EB posee menor actividad antibacteriana que el EH.

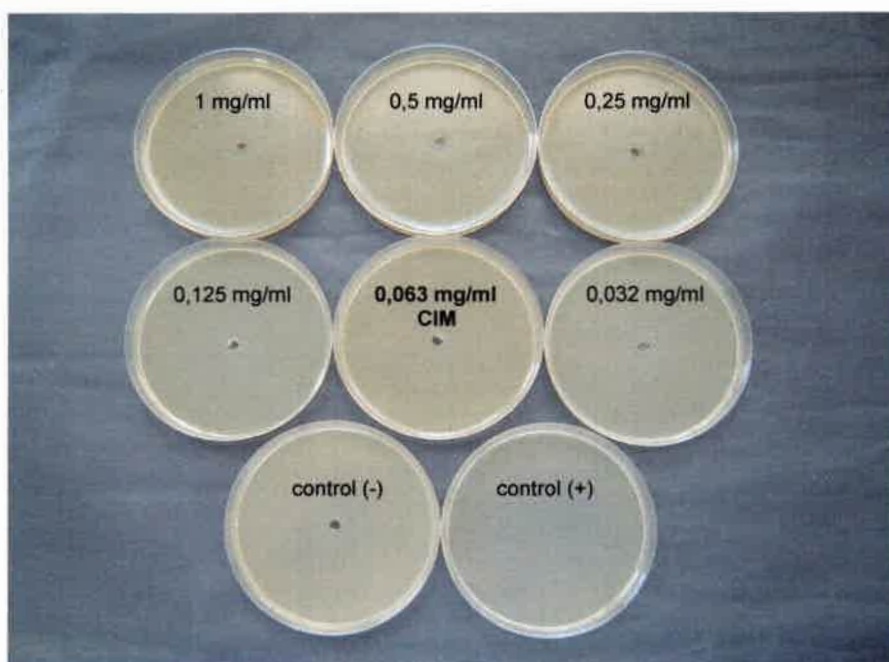


Figura 20: Actividad antibacteriana del EB de *A. saturoioides* frente a *P. larvae* 5

3.2.3- Ensayo de la actividad antibacteriana del EE

Tabla 7: Actividad antibacteriana del EE de *A. saturoioides*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración del EE (mg/ml)						
	4	2	1	0,50	0,25	0,125	0,063
1	9,7±0,6	8,0±1,0	7,0±0,0	NI	NI	NI	NI
2	9,7±0,6	8,0±0,0	7,0±0,0	6,3±0,6	NI	NI	NI
3	10,3±0,6	7,7±0,6	7,0±0,0	6,3±0,6	NI	NI	NI
4	9,7±1,2	8,0±0,0	7,3±0,6	NI	NI	NI	NI
5	10,7±0,6	8,5±0,7	7,5±0,7	7,0±0,0	NI	NI	NI
6	10,3±0,6	8,0±1,0	7,3±0,6	NI	NI	NI	NI
7	9,8±0,8	8,0±0,0	7,4±0,9	NI	NI	NI	NI
8	11,3±0,6	9,3±0,6	7,3±0,6	NI	NI	NI	NI
9	12,2±2,4	10,0±1,2	7,5±1,0	NI	NI	NI	NI
10	10,2±0,0	9,5±1,0	8,5±1,0	8,0±0,0	NI	NI	NI
11	11,0±0,7	9,7±1,2	8,7±0,6	7,7±0,6	NI	NI	NI

Referencias: NI: No inhibición del crecimiento

La tabla 7 resume los resultados promedio y la desviación estándar obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas frente al EE de *A. saturoioides*.

La presencia de halos de inhibición del crecimiento en las 11 cepas estudiadas, luego de realizar la técnica de difusión en pozo, permite afirmar que el EE *A. saturoioides* posee actividad antibacteriana. Los valores de CIM oscilan en un intervalo de 0,5 a 1 mg/ml. De las cepas ensayadas, las cepas 2, 3, 5, 10 y 11 fueron la más sensibles con un valor de CIM de 0,5 mg/ml (Figura 21) mientras que las demás cepas resultaron más resistentes con un valor CIM de 1 mg/ml.

Si comparamos el EB y EE, podemos observar que ambos poseen menor actividad antibacteriana que el EH, debido a que producen inhibición del crecimiento de *P. larvae* a concentraciones más altas.



Figura 21: Actividad antibacteriana del EE de *A. saturoioides* frente a *P. larvae* 5

3.2.4- Ensayo de la actividad antibacteriana del EAE

La tabla 8 resume los resultados promedio y la desviación estándar obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas frente al EAE de *A. saturoioides*.

Tabla 8: Actividad antibacteriana del EAE de *A. saturoioides*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración del EAE (mg/ml)						
	8	4	2	1	0,50	0,25	0,125
1	8,5±0,3	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2	8,0±0,6	NI	NI	NI	NI	NI	NI
3	8,3±1,2	NI	NI	NI	NI	NI	NI
4	7,6±0,6	NI	NI	NI	NI	NI	NI
5	9,5±0,6	7,7±0,0	NI	NI	NI	NI	NI
6	9,0±3,0	7,3±0,6	NI	NI	NI	NI	NI
7	7,7±0,6	NI	NI	NI	NI	NI	NI
8	9,6±1,2	7,7±0,0	NI	NI	NI	NI	NI
9	7,3±0,0	NI	NI	NI	NI	NI	NI
10	9,3±0,6	NI	NI	NI	NI	NI	NI
11	9,3±0,6	7,3±0,6	NI	NI	NI	NI	NI

Referencias: NI: No inhibición del crecimiento

Puede observarse la presencia de halos de inhibición del crecimiento en las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas, luego de realizar la técnica de difusión en pozo, lo que permite afirmar que el EAE de *A. saturoioides* posee actividad antibacteriana. Las cepas 5, 6, 8 y 11 demostraron ser las más sensibles al EAE de *A. saturoioides* con una CIM de 4 mg/ml (Figura 22), mientras que las cepas más resistentes fueron las cepas 1, 2, 3, 4, 7, 9 y 10 con un valor CIM de 8 mg/ml.

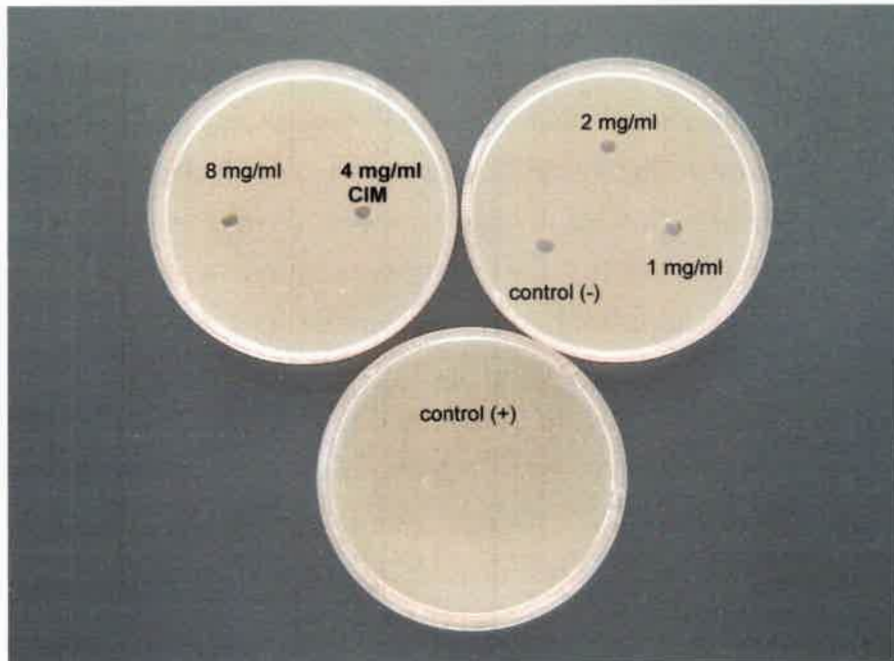
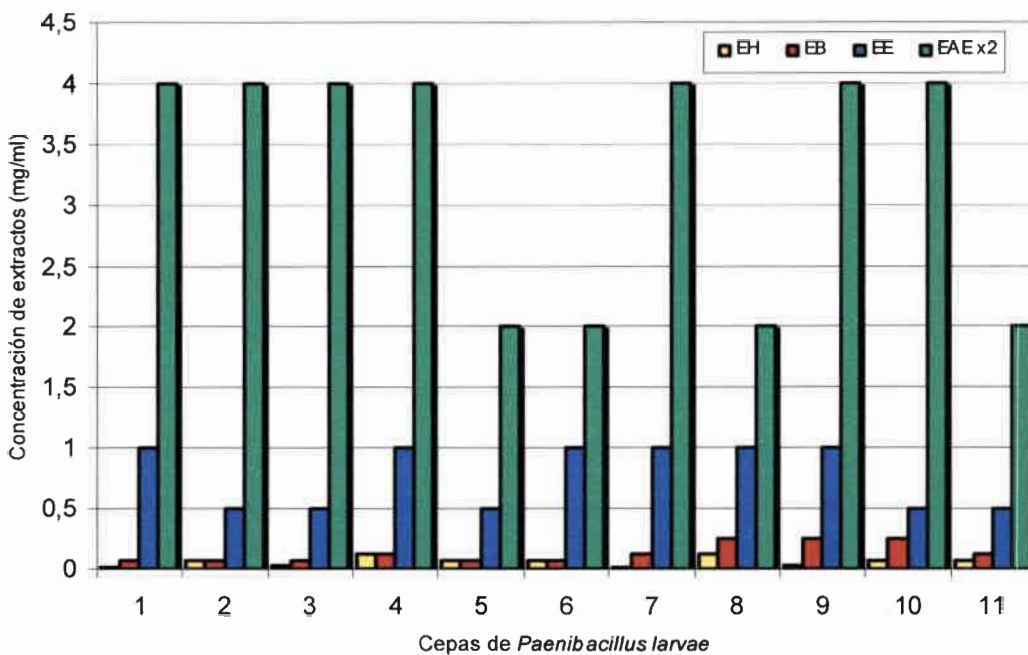


Figura 22: Actividad antibacteriana del EAE de *A. saturoioides* frente a *P. larvae* 8

El Gráfico 1 muestra y compara los valores de CIM de los extractos obtenidos mediante extracción líquido-líquido en forma sucesiva a partir de *A. saturoioides* (EH, EB, EE y EAE) evaluados frente a las 11 cepas de *P. larvae*.

Gráfico 1: Actividad antibacteriana de EH, EB, EE y EAE obtenidos de *A. saturoioides*



Se puede observar que el EH, con valores de CIM en un intervalo de 0,016 a 0,125 mg/ml, es el que posee mayor actividad antibacteriana. El EB y el EE también demostraron tener buena actividad frente a *P. larvae*, con valores de CIM en intervalos de 0,063 a 0,25 mg/ml y de 0,5 a 1 mg/ml respectivamente. Por último, el EAE con valores de CIM en un intervalo de 4 a 8 mg/ml, es el extracto que presenta la CIM más elevada, requiriendo por lo tanto mayores concentraciones del mismo para inhibir el crecimiento del microorganismo.

Las cepas 1, 2, 3, 4, 7, 9 y 10 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 EB, excepto para las cepas 2 y 4 que presentaron la misma CIM para ambos extractos, luego el EE, y por último el EAE con un valor de CIM de 8 mg/ml. Si bien este comportamiento se observó en las 7 cepas anteriormente mencionadas se notó que las cepas 1 y 7 necesitaron una concentración menor del EH (0,016 mg/ml) para inhibir su crecimiento, que el resto de las cepas indicadas.

Por otro lado, para las cepas 5, 6, 8 y 11, el EH también fue el extracto más activo, seguido por el EB, excepto para las cepas 5 y 6 que presentaron la misma CIM para ambos extractos, y el que presentó menor actividad fue el EAE, pero en este caso, con un valor de CIM de 4 mg/ml.

Minthostachys verticillata

3.2.5- Ensayo de la actividad antibacteriana del AE

La tabla 9 resume los resultados promedio y la desviación estándar obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para cada una de las cepas de *P. larvae* estudiadas frente al AE de *M. verticillata*.

Tabla 9: Actividad antibacteriana del AE de *M. verticillata*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración del AE (mg/ml)							
	435	217,5	108,8	54,4	27,2	13,6	6,8	3,4
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±0,6	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

Referencias: NI: No inhibición del crecimiento

La forma y el tamaño de los halos de inhibición del crecimiento no eran definidos y su medición no fue fácil, debido a que el AE es una sustancia poco polar y los medios de cultivo son polares, por lo que se vería dificultada la óptima difusión del aceite en el medio de cultivo. Algunas propiedades químicas de los AE, particularmente su escasa solubilidad y su alta volatilidad, generan significativos problemas a la hora de evaluar sus efectos biológicos, ya que los componentes del aceite no difunden a través del agar y esto ocasiona una inapropiada interpretación de los resultados (Donaldson *et al.*, 2005).

Sin embargo, pese a las consideraciones realizadas, la presencia de halos de inhibición del crecimiento en las 11 cepas estudiadas luego de realizar la técnica de difusión en pozo, permite afirmar que el AE de *M. verticillata*, en mayor o en menor medida, posee actividad antibacteriana. Los valores de CIM para el AE se encuentran en un intervalo de 6,8 a 13,6 mg/ml de AE (Figura 23).



Figura 23: Actividad antibacteriana del AE de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 6

3.2.6- Ensayo de la actividad antibacteriana del EH

Tabla 10: Actividad antibacteriana del EH de *M. verticillata*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración del EH (mg/ml)						
	1	0,50	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

Referencias: NI: No inhibición del crecimiento ND: No determinado

La tabla 10 resume los resultados promedio y la desviación estándar obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas frente al EH de *M. verticillata*.

La presencia de halos de inhibición del crecimiento en las 11 cepas estudiadas, luego de realizar la técnica de difusión en pozo, permite afirmar que el EH de *M. verticillata* posee actividad antibacteriana. Los valores de CIM oscilan en un intervalo de 0,032 a 0,125 mg/ml. De las cepas ensayadas, la cepa 11 fue la más sensible con un valor de CIM de 0,032 mg/ml, mientras que las cepas más resistentes fueron las cepas 9 y 10 con un valor CIM de 0,125 mg/ml. La CIM de las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 fue de 0,063 mg/ml (Figura 24).



Figura 24: Actividad antibacteriana del EH de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 3

3.2.7- Ensayo de la actividad antibacteriana del EB

La tabla 11 resume los resultados promedio y la desviación estándar obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas frente al EB de *M. verticillata*.

Tabla 11: Actividad antibacteriana del EB de *M. verticillata*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración del EB (mg/ml)						
	2	1	0,50	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

Referencias: NI: No inhibición del crecimiento ND: No determinado

Puede observarse la presencia de halos de inhibición del crecimiento en las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas, luego de realizar la técnica de difusión en pozo, lo cual permite afirmar que el EB de *M. verticillata* posee actividad antibacteriana. Las cepas demostraron ser sensibles con valores de CIM entre 0,25 y 0,5 mg/ml. La cepa 2 demostró ser la más sensible al EB de *M. verticillata* con una CIM de 0,25 mg/ml (Figura 25), mientras que el resto de las cepas obtuvieron el mismo valor de CIM correspondiente a 0,5 mg/ml.

Comparando el tamaño de los halos de inhibición del crecimiento y los valores de CIM para cada una de las 11 cepas ensayadas, cabe destacar que el EB posee menor actividad antibacteriana que el EH.



Figura 25: Actividad antibacteriana del EB de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 2

3.2.8- Ensayo de la actividad antibacteriana del EE

Tabla 12: Actividad antibacteriana del EE de *M. verticillata*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración del EE (mg/ml)						
	2	1	0,50	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	13,3±0,3	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±0,3	8,7±0,6	7,7±0,6	8,0±0,0	6,0±0,0	NI	NI

Referencias: NI: No inhibición del crecimiento

La tabla 12 resume los resultados promedio y la desviación estándar obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas frente al EE de *M. verticillata*.

La presencia de halos de inhibición del crecimiento en las 11 cepas estudiadas, luego de realizar la técnica de difusión en pozo, permite afirmar que el EE de *M. verticillata* posee actividad antibacteriana. Los valores de CIM oscilan en un intervalo de 0,125 a 0,5 mg/ml. De las cepas ensayadas, las cepas 10 y 11 fueron la más sensibles con un valor de CIM de 0,125 mg/ml, mientras que las cepas más resistentes fueron las cepas 5 y 8 con un valor CIM de 0,5 mg/ml (Figura 26). La CIM de las cepas 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 9 fue de 0,25 mg/ml.

Si comparamos el EB y EE, podemos observar que éste último posee mayor actividad antibacteriana, debido a que produce inhibición del crecimiento de *P. larvae* a concentraciones más bajas.

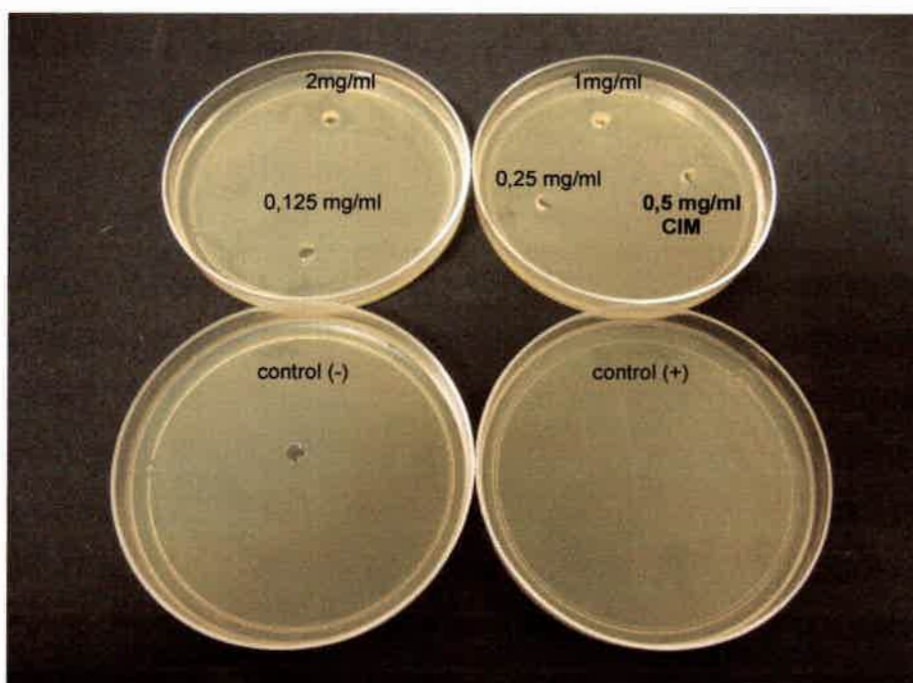


Figura 26: Actividad antibacteriana del EE de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 5

3.2.9- Ensayo de la actividad antibacteriana del EAE

La tabla 13 resume los resultados promedio y la desviación estándar obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas frente al EAE de *M. verticillata*.

Tabla 13: Actividad antibacteriana del EAE de *M. verticillata*

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración del EAE (mg/ml)						
	8	4	2	1	0,50	0,25	0,125
1	9,7±0,6	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

Referencias: NI: No inhibición del crecimiento

Puede observarse la presencia de halos de inhibición del crecimiento en las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas, luego de realizar la técnica de difusión en pozo, lo cual permite afirmar que el EAE de *M. verticillata* posee actividad antibacteriana. El valor de de CIM para todas las cepas fue de 2mg/ml (Figura 27).

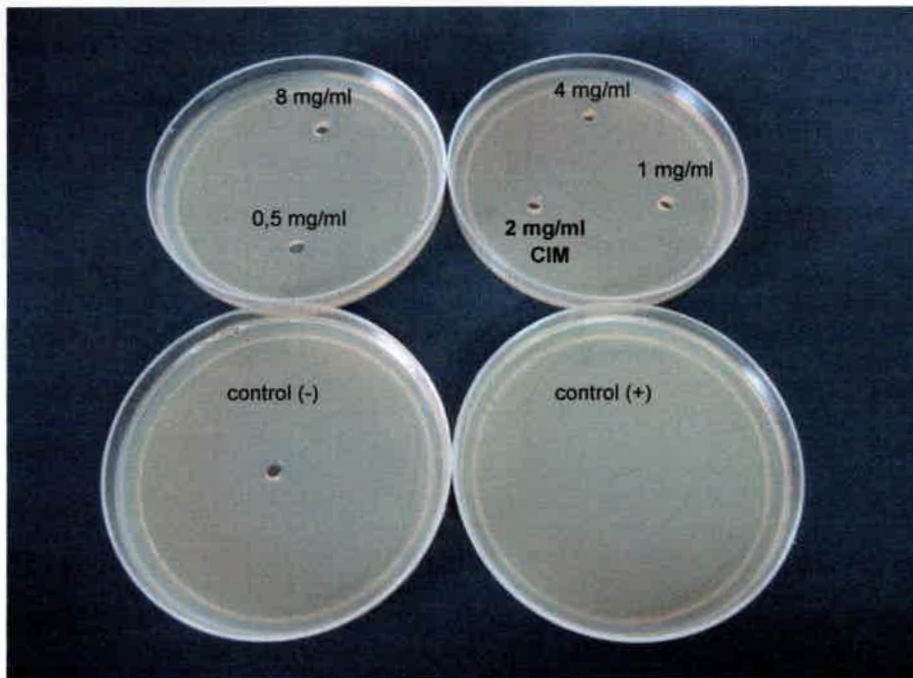
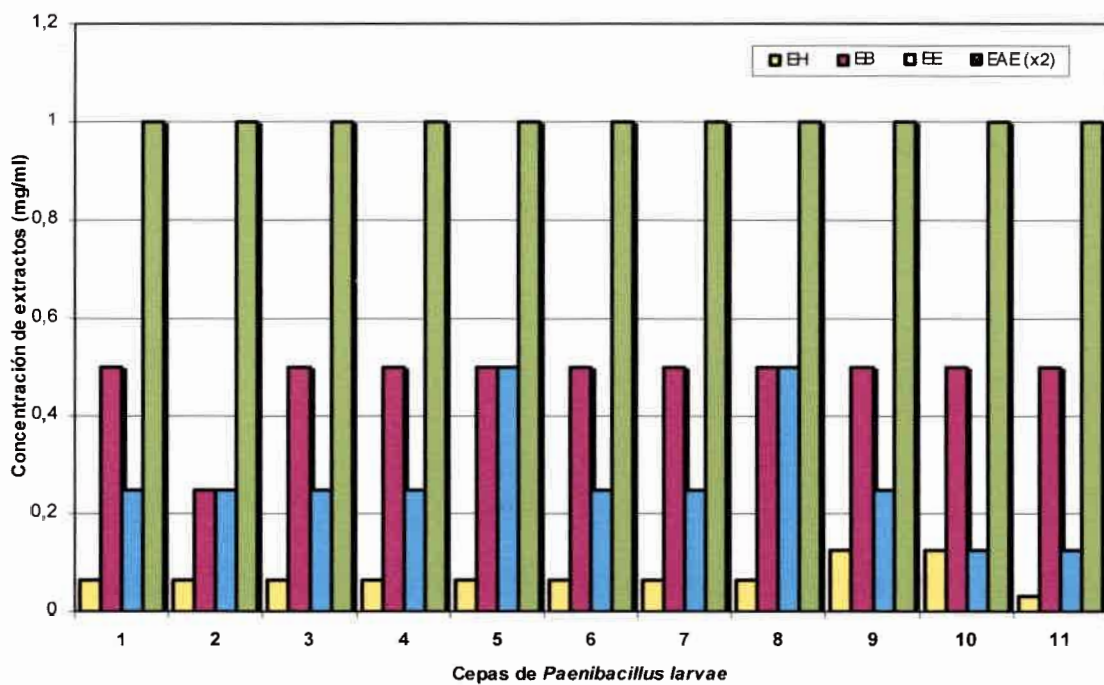


Figura 27: Actividad antibacteriana del EAE de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 2

El Gráfico 2 muestra y compara los valores de CIM de los extractos obtenidos mediante extracción líquido-líquido en forma sucesiva a partir de *M. verticillata* (EH, EB, EE y EAE) evaluados frente a las 11 cepas de *P. larvae*.

Gráfico 2: Actividad antibacteriana de EH, EB, EE y EAE obtenidos de *M. verticillata*



Se puede observar que el EH, con valores de CIM en un intervalo de 0,032 a 0,125 mg/ml, es el que posee mayor actividad antibacteriana. El EB y el EE también demostraron tener buena actividad frente a *P. larvae*, con valores de CIM en intervalos de 0,25 a 0,5 mg/ml y 0,125 a 0,5 mg/ml respectivamente. Por último, el EAE con un valor de CIM de 2mg/ml para la totalidad de las cepas, es el extracto que presenta la CIM más elevada, requiriendo por lo tanto mayores concentraciones del mismo para inhibir el crecimiento del microorganismo.

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.

Por otro lado, para las cepas 10 y 11, el EH fue el extracto más activo, 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 las cepas ensayadas. 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.

3.3- Visualización del efecto del EH de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

Con la finalidad de estudiar y visualizar el efecto del EH de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* sobre *P. larvae*, las células vegetativas del microorganismo fueron enfrentadas a distintas concentraciones de dichos extractos y posteriormente fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión.

En las Figuras 28 y 29, puede observarse que para ambas especies vegetales, el daño producido por los EH es mayor a medida que aumenta la concentración de dichos extractos (Figuras 28b, 28c, 28d, 29b, 29c y 29d) con respecto a las células control sin tratamiento (Figuras 28a y 29a).

Achyrocline satureioides

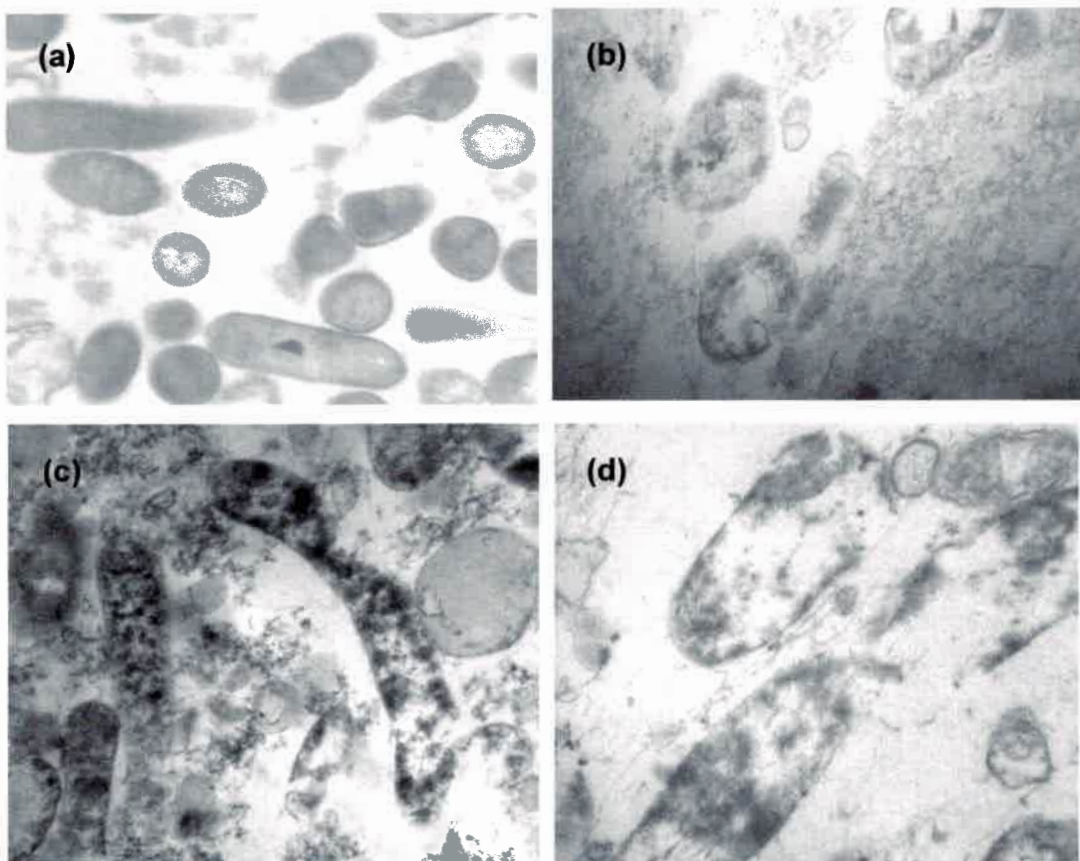


Figura 28: Efecto del EH de *A. satureioides* sobre *P. larvae* observado en microscopio electrónico de transmisión. **(a)** Células bacterianas sin tratamiento a 21560x. **(b)** Células bacterianas tratadas con EH de 2 mg/ml a 50000x. **(c)** Células bacterianas tratadas con EH de 4 mg/ml a 30000x. **(d)** Células bacterianas tratadas con EH de 8 mg/ml a 50000x.

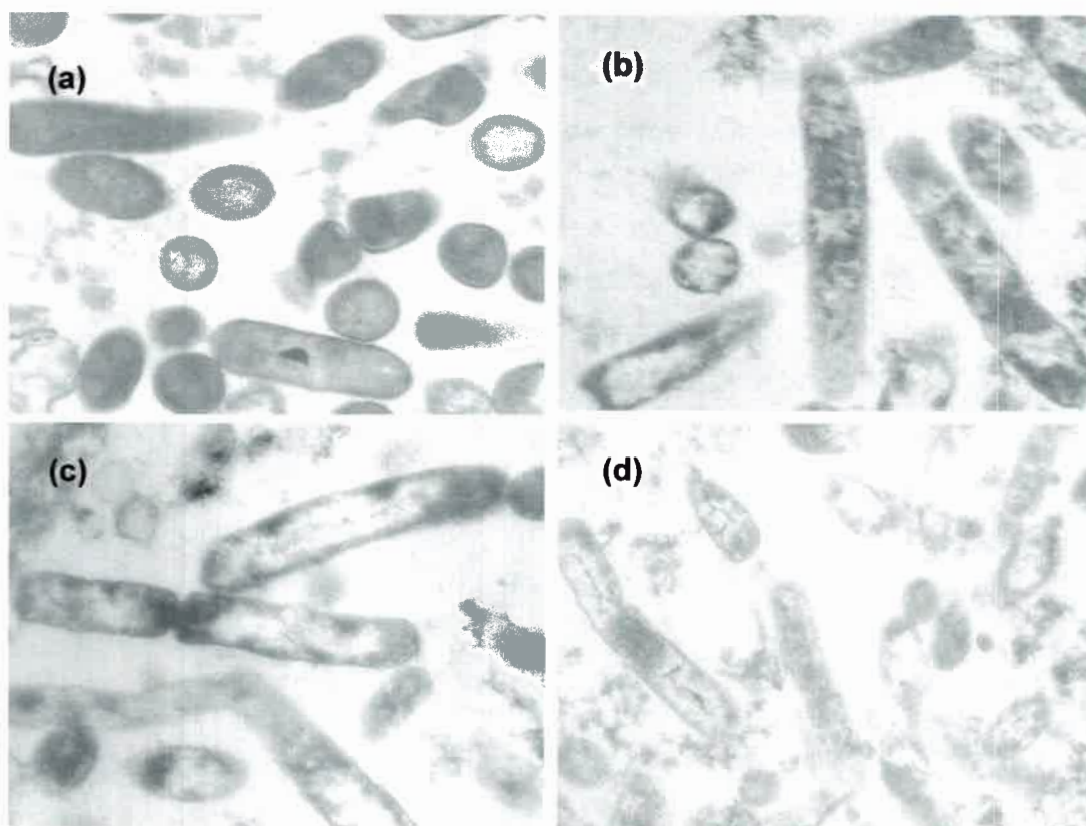
Minthostachys verticillata

Figura 29: Efecto del EH de *M. verticillata* sobre *P. larvae* observado en microscopio electrónico de transmisión. **(a)** Células bacterianas sin tratamiento a 21560x. **(b)** Células bacterianas tratadas con EH de 2 mg/ml a 21560x. **(c)** Células bacterianas tratadas con EH de 4 mg/ml a 21560x. **(d)** Células bacterianas tratadas con EH de 8 mg/ml a 16700x.

Podría suponerse que el daño del EH es causado a nivel de membrana citoplasmática y como consecuencia de esto, hay ruptura de la pared celular y pérdida de contenido celular. Existen investigaciones donde se discute el modo y el sitio de acción de diferentes extractos vegetales y sus principales componentes. Estos últimos actuarían modificando la permeabilidad y la fluidez de la membrana citoplasmática. Por otro lado, se ha comprobado que los compuestos fenólicos también ejercen su actividad antimicrobiana alterando la estructura y función de la dicha membrana (Sikkema *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 2003; Burt, 2004; Reichling *et al.*, 2009; Turgis *et al.*, 2009; Devi *et al.*, 2010).

Ya se han probado extractos vegetales como aceites esenciales, extractos etanólicos y decocciones frente a *P. larvae* (Floris y Carta, 1990; Calderone *et al.*, 1994; Alippi *et al.*, 1996; Fuselli *et al.*, 2005; González, 2005; Gende *et al.*, 2008; González y Marioli, 2010; Flesar *et al.*, 2010; Cesari, 2011) y frente a otros microorganismos que causan enfermedades en la colmena (Colin *et al.*, 1989; Floris y Carta, 1990; Di Mayuga y Keer-García 1991; Imdorf *et al.*, 1994; Kraus, *et al.*, 1994; Albo *et al.*, 2003; Ruffinengo *et al.*, 2005; Albo *et al.*, 2008). Estos resultados indican la elevada sensibilidad que presentan los microorganismos frente a productos naturales y nos conducen a pensar en la aplicación de un tratamiento alternativo y natural para controlar el estado sanitario de las colmenas, incrementando la producción y la calidad de sus productos.

4- Cromatografía en capa delgada (CCD)

Achyrocline satureioides

Tras realizar una selección con distintos solventes utilizados como fase móvil y diferentes combinaciones de las mismas para separar los componentes del AE y del EH (que mostró la mejor actividad antibacteriana entre los extractos obtenidos mediante extracción líquido-líquido), las fases móviles que lograron una mejor resolución de bandas fueron: tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5) para el AE y hexano/acetona (7:3) para el EH.

- Aceite esencial (AE)

Cuando las cromatografías corridas con tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5) como fase móvil fueron reveladas bajo luz UV a 254 nm, se observaron bandas bien definidas (Rf: 0,16; 0,20; 0,23; 0,34; 0,40; 0,45; 0,52; 0,57; 0,62; 0,70 y 0,97) (Figura 30). Cuando esas mismas placas fueron reveladas con yodo y con ClFe_3 no se observaron nuevas bandas.

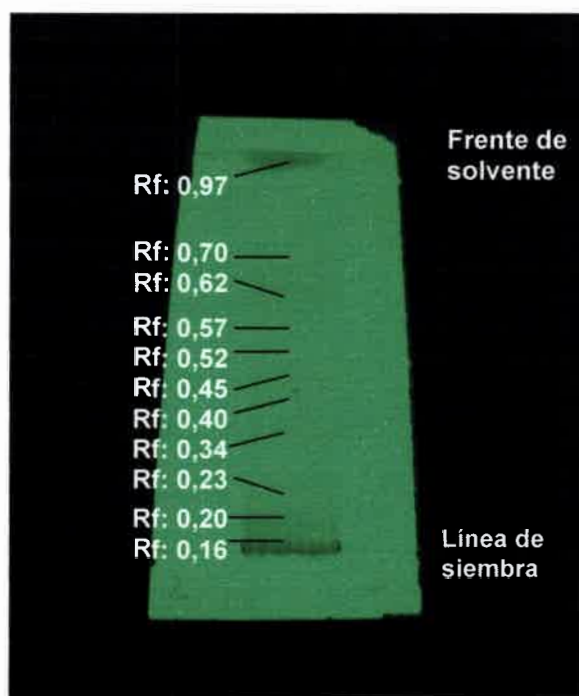


Figura 30: CCD del AE de *A. saturoioides* – Fase Móvil: tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5) revelada con luz UV a 254 nm

- Extracto de hexano (EH)

Cuando las cromatografías corridas con hexano/acetona (7:3) como fase móvil fueron reveladas bajo luz UV a 254 nm, se observaron bandas bien definidas (Rf: 0,33; 0,46; 0,51; 0,57; 0,63; 0,71 y 0,79) (Figura 31). Cuando esas mismas placas fueron reveladas con yodo no se observaron nuevas bandas, mientras que cuando dichas placas fueron reveladas con ClFe_3 se observaron 2 bandas nuevas bien definidas (Rf: 0,15 y 0,23) las cuales no habían sido visualizadas con luz UV (Figura 32).

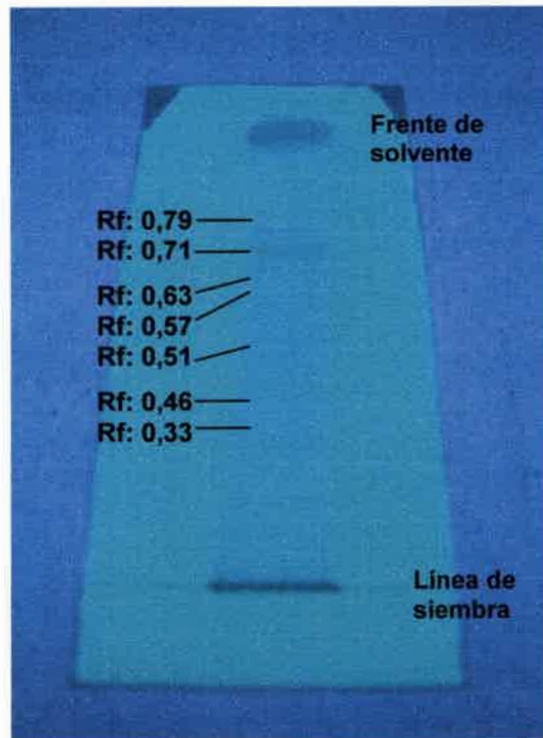


Figura 31: CCD del EH de *A. saturoioides* – Fase Móvil: hexano/acetona (7:3) revelada con luz UV a 254 nm

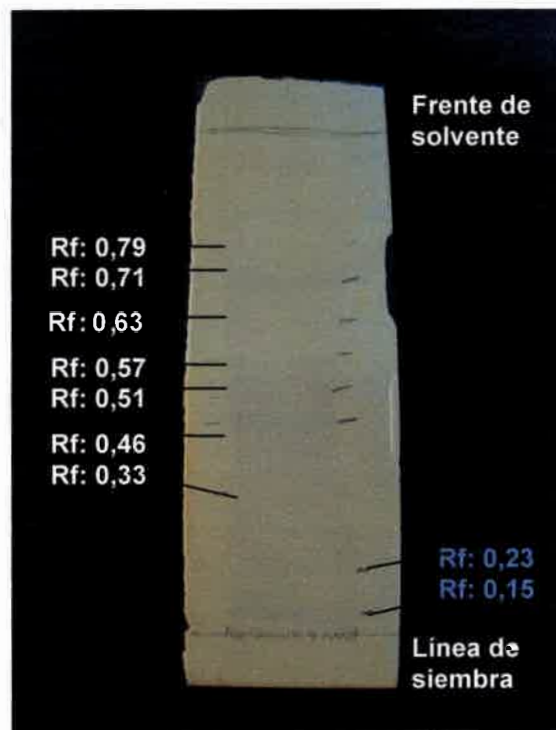


Figura 32: CCD del EH de *A. saturoioides* – Fase Móvil: hexano/acetona (7:3) revelada con ClFe_3

Minthostachys verticillata

Tras realizar una selección con distintos solventes utilizados como fase móvil y diferentes combinaciones de las mismas para separar los componentes del AE y del EH (que mostró la mejor actividad antibacteriana entre los extractos obtenidos mediante extracción líquido-líquido), las fases móviles que lograron una mejor resolución de bandas fueron: tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5) para el AE y éter etílico/hexano (7:3) para el EH.

• Aceite esencial (AE)

Cuando las cromatografías corridas con tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5) como fase móvil fueron reveladas bajo luz UV a 254 nm, se observaron bandas bien definidas (Rf: 0,33; 0,43; 0,47; 0,60 y 0,72) (Figura 33). Cuando esas mismas placas fueron reveladas con yodo y con ClFe_3 no se observaron nuevas bandas.

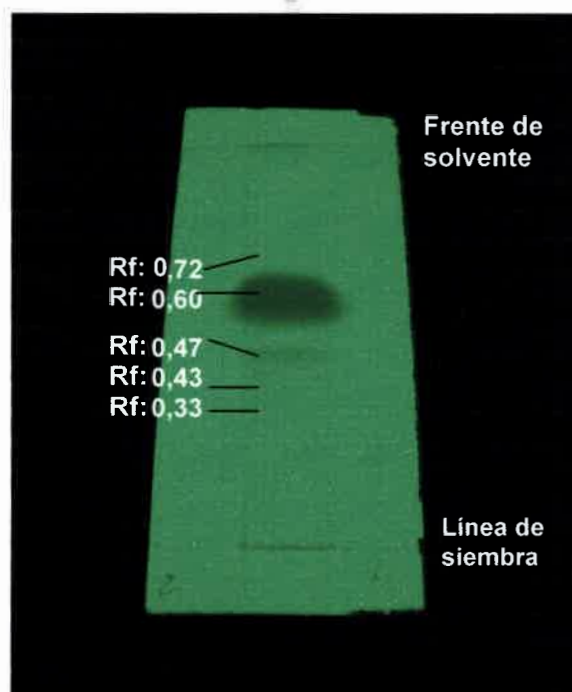


Figura 33: CCD del AE de *M. verticillata* – Fase Móvil: tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5) revelada con luz UV a 254 nm

- Extracto de hexano (EH)

Cuando las cromatografías corridas con éter etílico/hexano (7:3) como fase móvil fueron reveladas bajo luz UV a 254 nm, se observaron bandas bien definidas (Rf: 0,15; 0,23; 0,30; 0,36; 0,44; 0,51; 0,57; 0,64; 0,73; 0,83 y 0,94) (Figura 34). Esas mismas placas reveladas con ClFe_3 no mostraron nuevas bandas, mientras que al revelarlas con yodo, se observaron 3 bandas bien definidas (Rf: 0,69; 0,76 y 0,96) con Rf diferentes a los observados con luz UV (Figura 35).

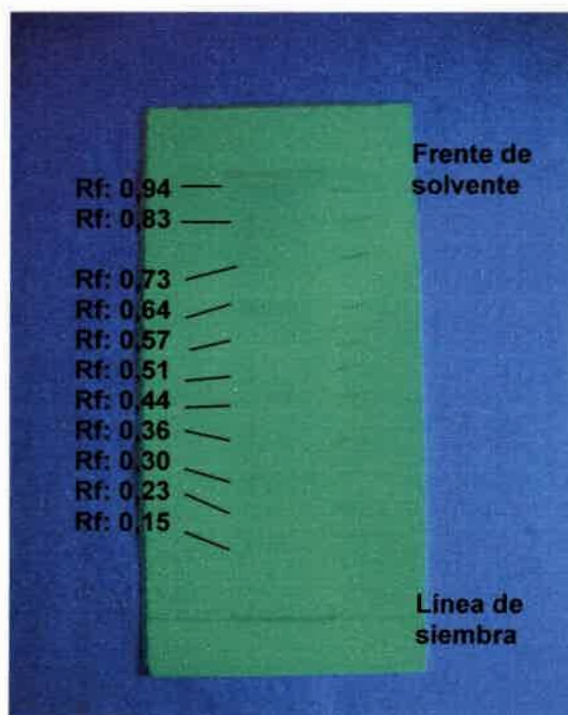


Figura 34: CCD del EH de *M. verticillata* – Fase Móvil: éter etílico/hexano (7:3) revelada con luz UV a 254 nm

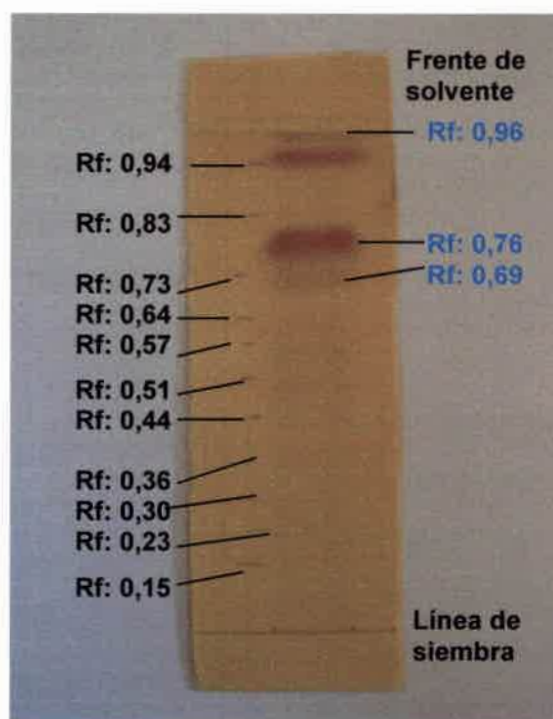


Figura 35: CCD del EH *M. verticillata* – Fase Móvil: éter etílico/hexano (7:3) revelada con yodo

Estas cromatografías, que mostraron bandas con buena resolución pertenecientes a los componentes de los AE y de los EH de *A. saturoioides* y de *M. verticillata*, fueron empleadas para determinar su actividad antibacteriana frente a *P. larvae* mediante la técnica de bioautografía.

5- Bioautografía

Ensayo de la actividad antibacteriana del AE y del EH de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* por la técnica de bioautografía (Gende *et al.*, 2008)

Con la finalidad de determinar e identificar cuáles son los componentes del AE y del EH de *A. saturoioides* y de *M. verticillata*, responsables de su actividad antibacteriana, la misma se evaluó empleando la técnica de bioautografía. En la placas control se observó coloración rosa indicando desarrollo bacteriano, lo cual significa que *P. larvae* es capaz de reducir el TTC y desarrollarse en su presencia. Cabe destacar que fue necesario utilizar TTC al 5% (Gende *et al.*, 2008), mientras que para otros microorganismos se requiere baja concentración de este colorante vital u otras

sales de tetrazolio para poner de manifiesto el desarrollo microbiano (Sawaya *et al.*, 2004; Sartoratto *et al.*, 2004; Zampini *et al.*, 2005; Furtado *et al.*, 2005). En las cajas de Petri que contenían las placas de CCD se observaron bandas sin coloración indicando inhibición de crecimiento, confirmando que los AE y los EH de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* poseen uno o más compuestos activos que inhiben el desarrollo de *P. larvae* y por otro lado, que con esta metodología se puede evaluar y poner en evidencia la actividad antibacteriana de dichos extractos.

Achyrocline saturoioides

- Aceite esencial (AE)

Cuando se empleó tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5) como fase móvil para correr las CCD, se observaron zonas de inhibición del crecimiento de *P. larvae* con Rf de 0,16; 0,20; 0,23; 0,34; 0,40; 0,45; 0,52; 0,57; 0,62 y 0,97 (Figura 36).

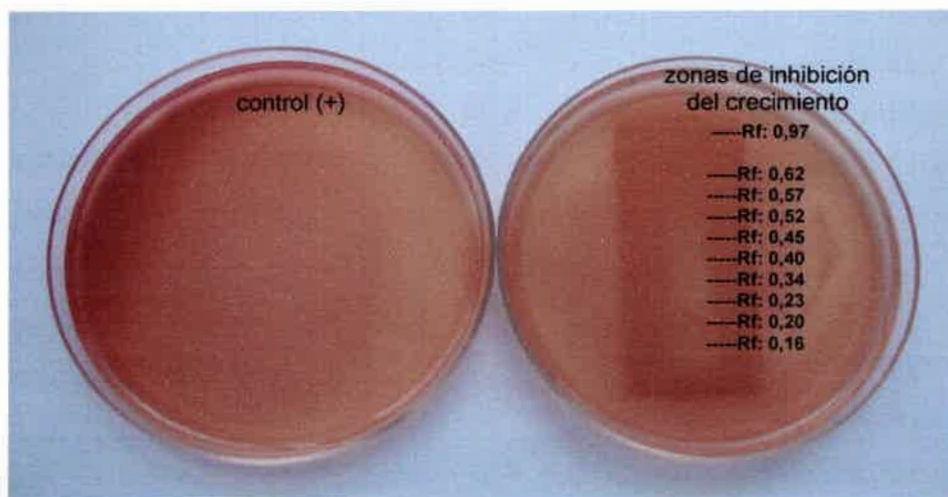


Figura 36: Bioautografía del AE de *A. saturoioides* frente a *P. larvae* 7
Fase Móvil: tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5)

Los valores de Rf de las zonas de inhibición del crecimiento de *P. larvae* observadas en el ensayo de bioautografía fueron comparados con los valores de Rf de los cromatofolios y se observó que dichos valores coinciden con todas las bandas del cromatofolio reveladas bajo luz UV a 254 nm, excepto la banda con Rf de 0,7 que no posee actividad antibacteriana sobre el microorganismo en estudio (Figura 37).

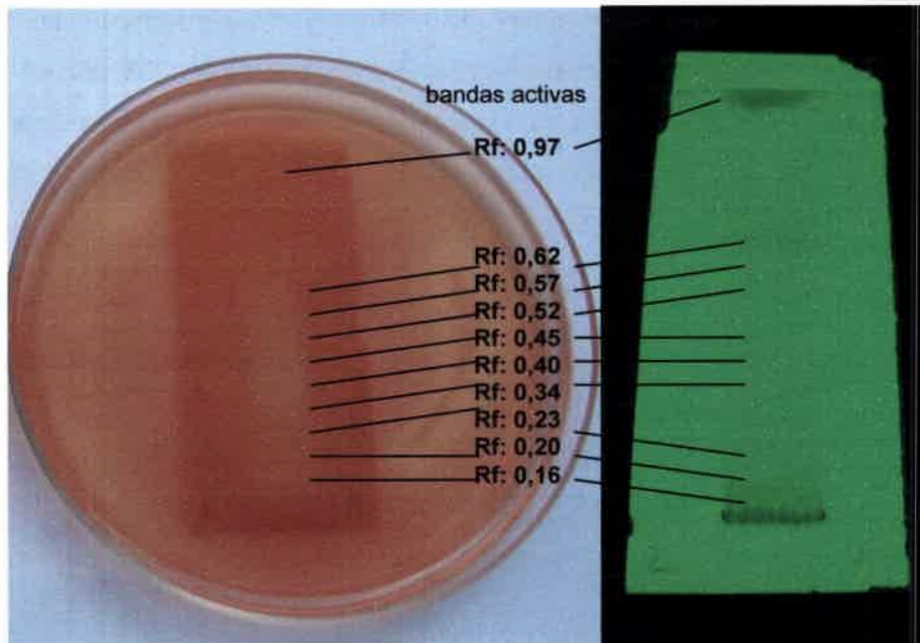


Figura 37: Comparación de los Rf de las zonas de inhibición del crecimiento del ensayo de bioautografía con el cromatofolio revelado con luz UV a 254 nm

- Extracto de hexano (EH)

Cuando se empleó hexano/acetona (7:3) como fase móvil para correr las CCD, se observaron zonas de inhibición del crecimiento de *P. larvae* con Rf de 0,15; 0,23; 0,49 y 0,57 (Figura 38).



Figura 38: Bioautografía del EH de *A. saturoioides* frente a *P. larvae* 7
Fase Móvil: hexano/acetona (7:3)

Los valores de Rf de las zonas de inhibición del crecimiento de *P. larvae* observadas en el ensayo de bioautografía fueron comparados con los valores de Rf de los cromatofolios y se observó que dichos valores coinciden con 2 de las bandas del cromatofolio reveladas con luz UV a 254 nm y con 2 bandas reveladas con ClFe_3 (Figura 39).

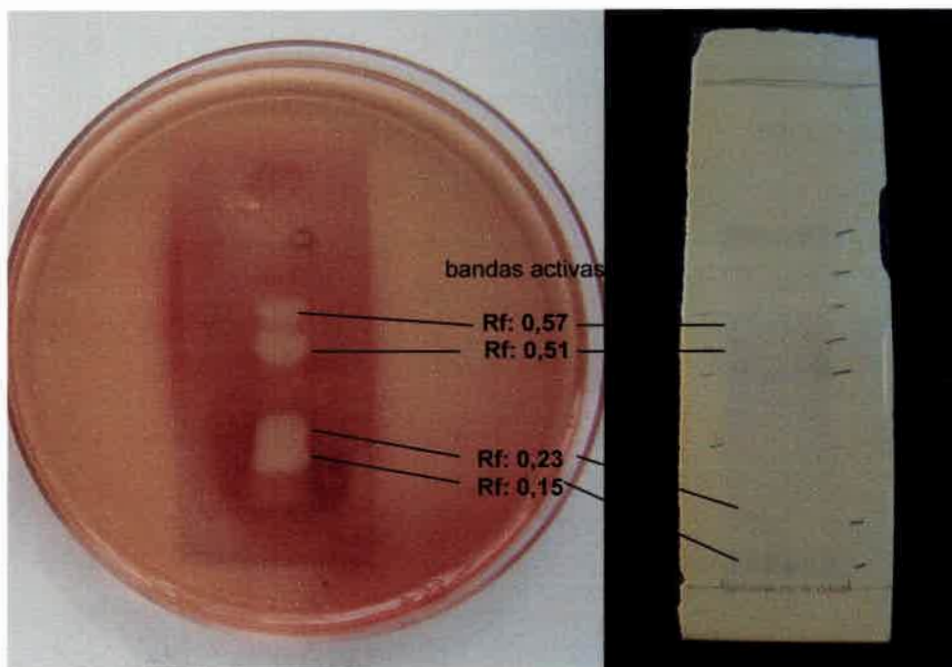


Figura 39: Comparación de los Rf de las zonas de inhibición del crecimiento del ensayo de bioautografía con el cromatofolio revelado con ClFe_3

Diferentes extractos o fracciones no volátiles de esta especie vegetal ya han sido evaluados como antimicrobianos frente a *Escherichia coli* y *Aspergillus niger* presentando buena actividad (Anesini y Pérez, 1993). Su decocción demostró ser muy efectiva frente a *Staphylococcus aureus* (Calvo et al., 2006).

Minthostachys verticillata

- Aceite esencial (AE)

Cuando se empleó tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5) como fase móvil para correr las CCD, se observaron zonas de inhibición del crecimiento de *P. larvae* con Rf de 0,33; 0,43; 0,60 y 0,72 (Figura 40).

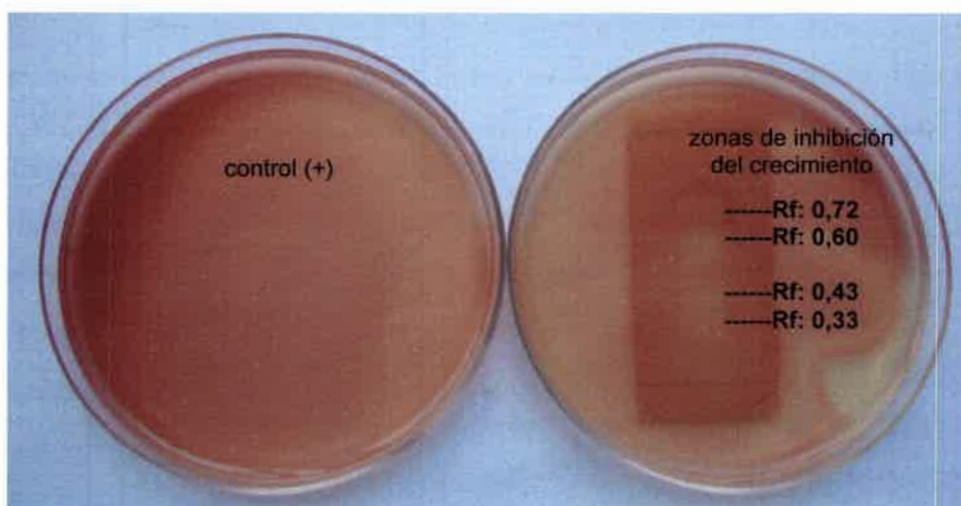


Figura 40: Bioautografía del AE de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 7
Fase Móvil: tolueno/acetato de etilo (9,5:0,5)

Los valores de Rf de las zonas de inhibición del crecimiento de *P. larvae* observadas en el ensayo de bioautografía fueron comparados con los valores de Rf de los cromatofolios y se observó que dichos valores coinciden con todas las bandas del cromatofolio reveladas bajo luz UV a 254 nm, excepto la banda con Rf de 0,47 que no posee actividad antibacteriana sobre el microorganismo en estudio (Figura 41).

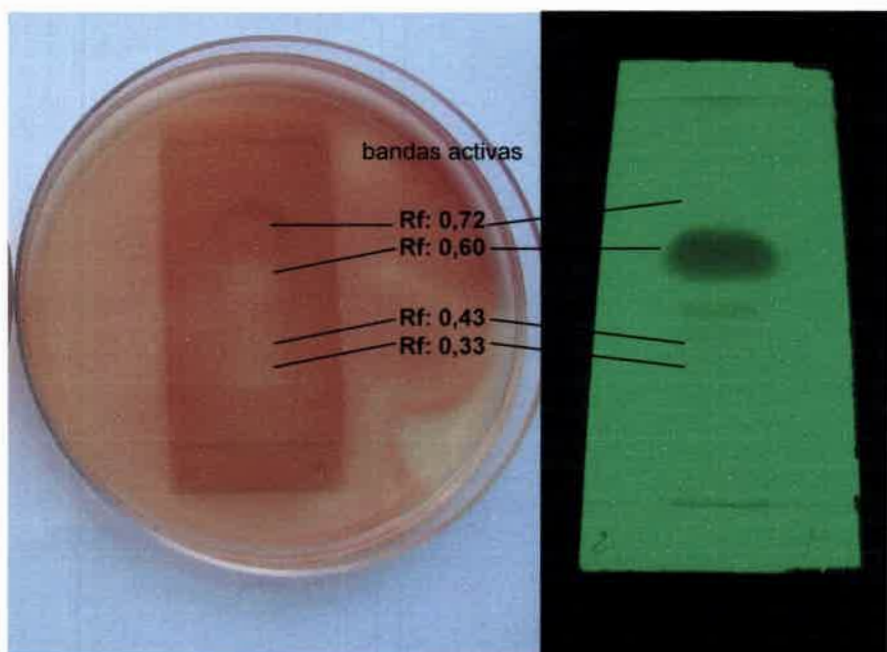


Figura 41: Comparación de los Rf de las zonas de inhibición del crecimiento del ensayo de bioautografía con el cromatofolio revelado con luz UV a 254 nm

La actividad antimicrobiana del AE de esta especie vegetal a sido evaluada frente a hongos filamentosos, levaduras, virus y frente a bacterias, entre éstas *Bacillus cereus*, *Salmonella tiphy*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*, donde las bacterias Gram positivo resultaron ser más sensibles que las Gram negativo (De Feo *et al.*, 1998; Zanon *et al.*, 1999; Primo *et al.*, 2001; Ybarra, 2004; Oliva, 2007).

- Extracto de hexano (EH)

Cuando se empleó éter etílico/hexano (7:3) como fase móvil para correr las CCD, se observó una zona de inhibición con Rf de 0,76 (Figura 42).

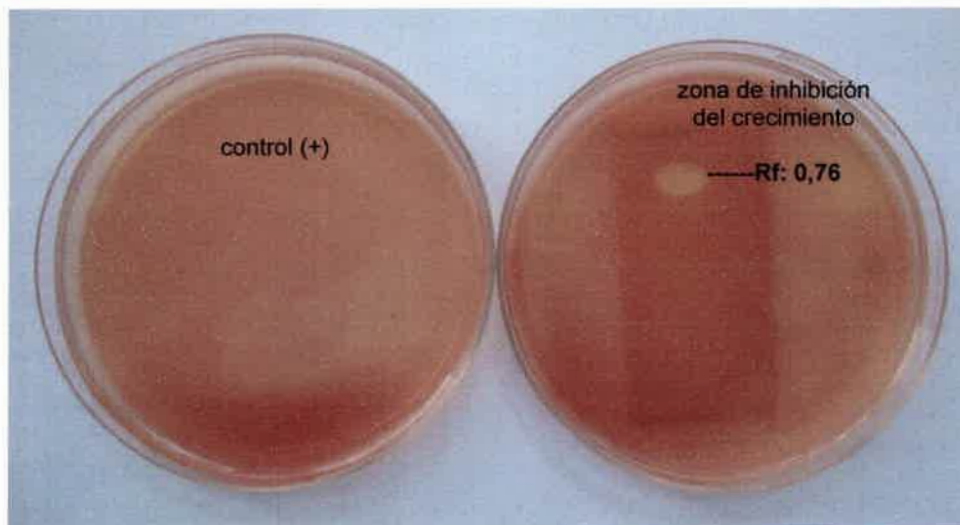


Figura 42: Bioautografía del EH de *M. verticillata* frente a *P. larvae* 7
Fase Móvil: éter etílico/hexano (7:3)

El valor de Rf de la zona de inhibición del crecimiento de *P. larvae* observada en el ensayo de bioautografía fue comparado con los valores de Rf de los cromatofolios y se observó que dicho valor coincide con una de las bandas del cromatofolio reveladas con yodo, ya que esta banda no fue visualizada cuando la placa se reveló bajo luz UV a 254 nm (Figura 43).

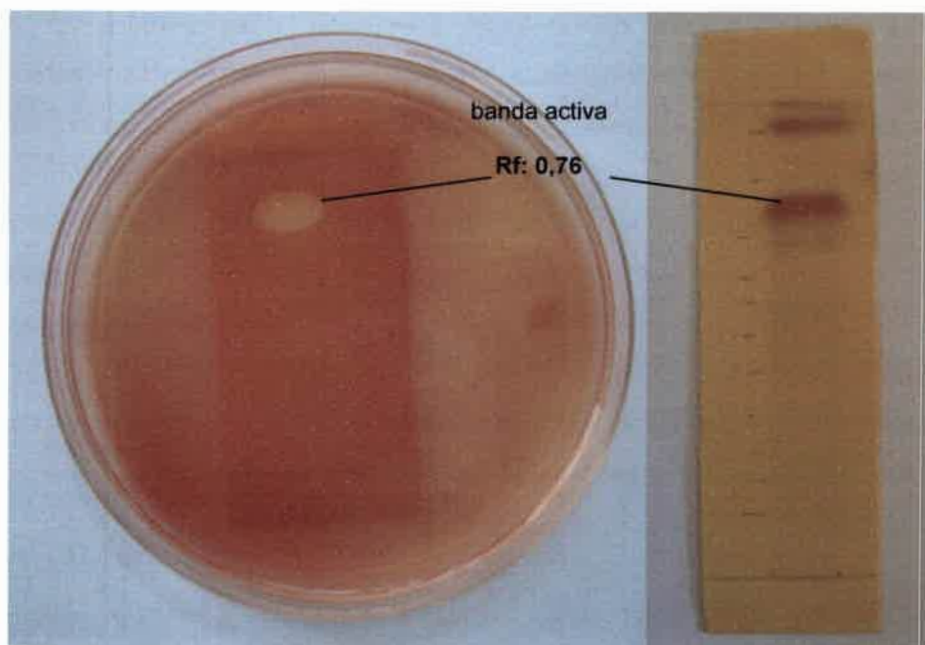


Figura 43: Comparación del Rf de la zona de inhibición del crecimiento del ensayo de bioautografía con el cromatofolio revelado con yodo

En la bibliografía consultada no se encontraron referencias donde se hayan evaluado extractos o fracciones no volátiles de esta especie vegetal como agentes antimicrobianos.

Si nos referimos a la actividad antibacteriana de los aceites esenciales en general, existen estudios realizados que avalan el hecho de que dicha actividad esta dada por los terpenos que forman parte de la composición de los aceites esenciales, ya sea en calidad o en cantidad. Además, estos terpenos han demostrado poseer actividad antimicrobiana por si solos (De Pooter *et al.*, 1995; Hammer *et al.*, 1999; Zygadlo y Juliani, 2000). Varios trabajos realizados con aceites esenciales avalan la actividad antimicrobiana de los mismos adjudicándose esta actividad a los terpenos mayoritarios (Deans *et al.*, 1995; Demetzos *et al.*, 1997; El-Sahkawy *et al.*, 1998). Sin embargo, muchos autores afirman que la proporción de componentes minoritarios de una esencia podría llegar a tener tanto o igual influencia en la actividad biológica como los componentes mayoritarios (Zygadlo y Juliani, 2000).

Con respecto a la metodología empleada para evaluar la actividad antibacteriana, la bibliografía consultada cita gran número de trabajos donde se utiliza la técnica de bioautografía para evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana de extractos vegetales (Arias *et al.*, 2004; Sartoratto *et al.*, 2004; Furtado *et al.*, 2005; Zampini *et al.*, 2005; Zampini *et al.*, 2007; Jasmine *et al.*, 2007; Shai *et al.*, 2008; Shai *et al.*, 2009; Chomnawang *et al.*, 2009). Gende y colaboradores han evaluado la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* frente a *P. larvae*, identificando los componentes activos responsables de dicha actividad (Gende *et al.*, 2008). Esta técnica no es solo una herramienta útil para identificar sustancias con actividad antimicrobiana, en la actualidad también se la emplea para separar e identificar compuestos con propiedades antioxidantes (Gu *et al.*, 2009).

Las bandas de los AE y de los EH de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* que mostraron ser activas frente a *P. larvae*, fueron analizadas con técnicas cromatográficas más específicas para identificar los componentes responsables de dicha actividad.

6- Cromatografía gaseosa (CG-EM)

Achyrocline saturoioides

El AE de *A. saturoioides* obtenido mediante destilación por arrastre con vapor de agua utilizando una trampa tipo Clevenger se sometió a un análisis más exhaustivo mediante CG-EM con el objetivo de determinar su composición química e identificar sus componentes mayoritarios.

En la Figura 44 se muestra el perfil cromatográfico del AE, donde se detallan los tiempos de retención y las áreas de los componentes mayoritarios.

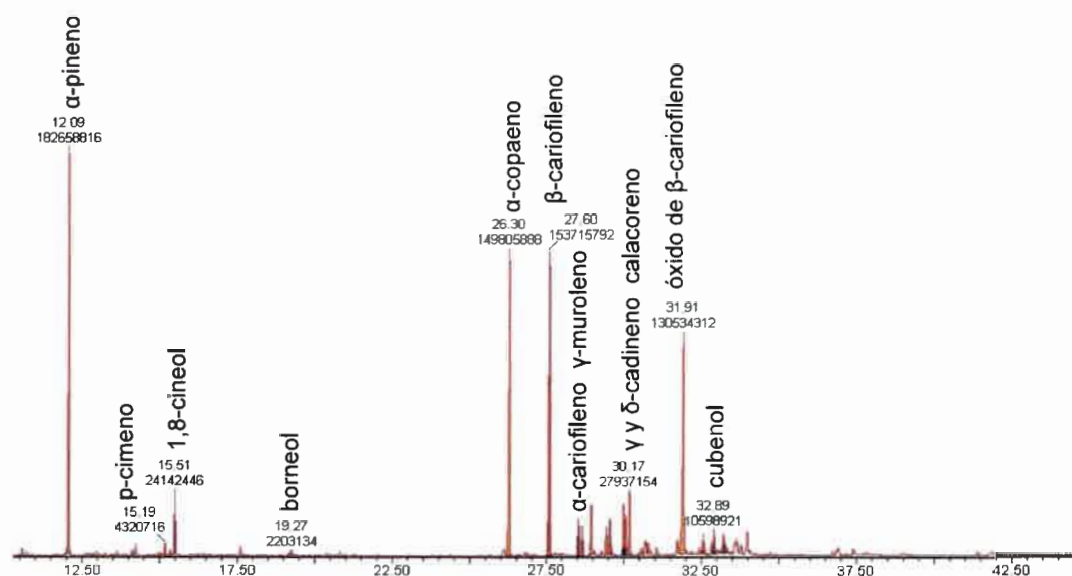


Figura 44: Perfil cromatográfico del AE de *A. saturoioides*

En la Tabla 14 se resumen los tiempos de retención y los porcentajes de cada componente individual presente en el AE los que fueron determinados a partir del área que representó a cada pico.

Tabla 14: Componentes del AE de *A. saturoioides*

Componentes	Tiempo de retención	%
α-pineno	12.09	22,7
p-cimeno	15.19	0,5
limoneno	15.36	0,2
1,8-cineol	15.51	3,0
isopinocarveol	19.18	0,1
borneol	19.27	0,3
α-copaeno	26.30	18,6
β-cariofileno	27.60	19,1
α-cariofileno	28.50	2,0
γ-muroлено	28.94	2,7
β-selineno	29.40	1,4
α-muroлено	29.54	2,3
γ-cadineno	29.97	2,7
δ-cadineno	30.05	2,1
calacoreno	30.17	3,5
óxido de β-cariofileno	31.91	16,2
cubenol	32.89	1,3
cadinol	33.20	1,2

Como puede observarse, α -pineno (22,7%), β -cariofileno (19,1%), α -copaeno (18,6%) y óxido de β -cariofileno (16,2%) son los componentes presentes en mayor proporción en la muestra analizada. Sin embargo, no hay que despreciar aquellos que aunque se encuentren en menor cantidad, también están presentes en el aceite esencial.

Estos resultados coinciden con los encontrados en la bibliografía consultada, ya que en diferentes investigaciones se ha determinado que β -cariofileno, 1,8-cineol, cis- β -ocimeno, trans- β -ocimeno y α -pineno son los componentes mayoritarios de la esencia. Estudios posteriores revelaron que limoneno, α -humuleno, borneol, α -terpineol, δ -cadineno, α -cadinol, sabineno y α -copaeno también son componentes presentes en el aceite esencial de *A. saturoioides* (Lamaty *et al.*, 1991; Petenatti *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2006; Gillij *et al.*, 2008; Retta *et al.*, 2010).

Estudios químicos de aceites esenciales de otras especies pertenecientes al género *Achyrocline*, han demostrado la presencia de componentes similares a los encontrados en *A. saturoioides* (Petenatti *et al.*, 2004; Retta *et al.*, 2009).

En la Figura 45 se muestra el perfil cromatográfico de la banda con Rf de 0,40 perteneciente al AE de *A. saturoioides* aislada mediante CCD, donde se detallan los tiempos de retención y las áreas de los componentes identificados.

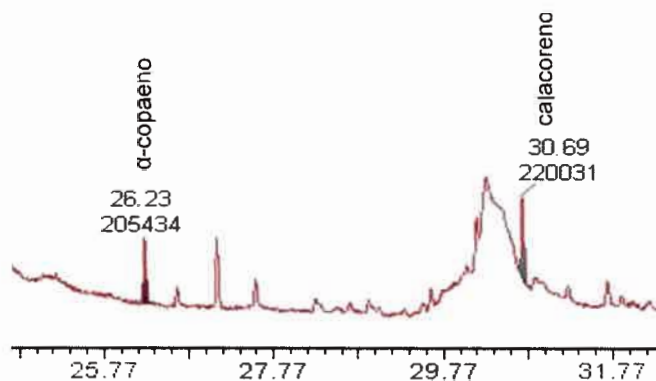


Figura 45: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,40 del AE de *A. saturoioides*

En la Tabla 15 se resumen los tiempos de retención y los porcentajes de los componentes presentes en dicha banda del AE determinados a partir del área que representó a cada pico.

Tabla 15: Componentes de la banda con Rf 0,40 del AE de *A. saturoioides*

Componentes	Tiempo de retención	%
α -copaeno	26,23	45,6
calacoreno	30,69	54,4

Como se muestra en la tabla 15, los componentes que fueron identificados son calacoreno y α -copaeno. Estos componentes varían en la proporción en la que aparecen en la esencia, destacando a calacoreno (54,4%) que en esta banda constituye el principal componente.

En la Figura 46 se muestra el perfil cromatográfico de la banda con Rf de 0,45 perteneciente al AE de *A. saturoioides* aislada mediante CCD, donde se detallan los tiempos de retención y las áreas de los componentes identificados.

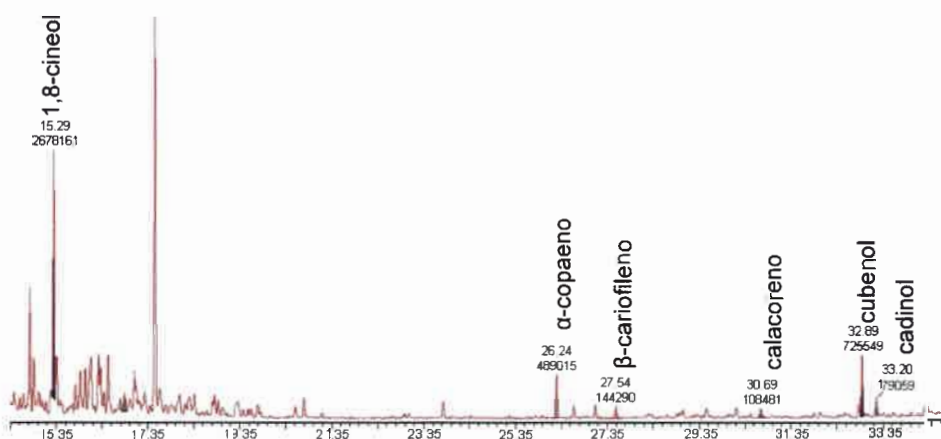


Figura 46: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,45 del AE de *A. saturoioides*

En la Tabla 16 se resumen los tiempos de retención y los porcentajes de los componentes presentes en dicha banda del AE determinados a partir del área que representó a cada pico.

Tabla 16: Componentes de la banda con Rf 0,45 del AE de *A. saturoioides*

Componentes	Tiempo de retención	%
1,8-cineol	15,29	60,7
α-copaeno	26,24	11,6
β -cariofileno	27,54	3,4
calacoreno	30,69	2,3
cubenol	32,89	16,9
cadinol	33,20	5,1

Los componentes que fueron identificados en esta banda son 1,8-cineol (60,7%) en mayor proporción, seguido por cubenol y α -copaeno. Cadinol, β -cariofileno y calacoreno, aunque en menor proporción, también fueron identificados como los principales constituyentes de esta banda.

En la Figura 47 se muestra el perfil cromatográfico de la banda con Rf de 0,52 perteneciente al AE de *A. saturoioides* aislada mediante CCD, donde se detallan los tiempos de retención y las áreas de los componentes identificados.

**Figura 47:** Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,52 del AE de *A. saturoioides*

En la Tabla 17 se resumen los tiempos de retención y los porcentajes de los componentes presentes en dicha banda del AE determinados a partir del área que representó a cada pico.

Tabla 17: Componentes de la banda con Rf 0,52 del AE de *A. saturoioides*

Componentes	Tiempo de retención	%
1,8-cineol	15,32	82,8
α -copaeno	26,26	13,4
β -cariofileno	27,56	3,8

En esta banda, 1,8-cineol vuelve a ser el componente mayoritario (82,2%), acompañado por α -copaeno y β -cariofileno, quienes también fueron identificados en la banda con Rf de 0,45, y en la banda con Rf de 0,40 para el caso de α -copaeno.

En la Figura 48 se muestra el perfil cromatográfico de la banda con Rf de 0,60 perteneciente al AE de *A. saturoioides* aislada mediante CCD, donde se detallan los tiempos de retención y las áreas de los componentes identificados.

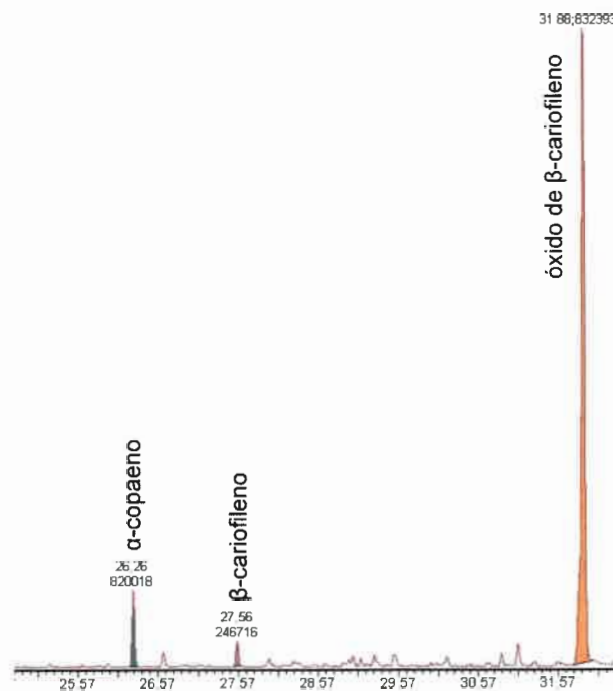


Figura 48: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,60 del AE de *A. saturoioides*

En la Tabla 18 se resumen los tiempos de retención y los porcentajes de los componentes presentes en dicha banda del AE determinados a partir del área que representó a cada pico.

Tabla 18: Componentes de la banda con Rf 0,60 del AE de *A. saturoioides*

Componentes	Tiempo de retención	%
α -copaeno	26,26	8,7
β -cariofileno	27,56	2,7
óxido de β-cariofileno	31,88	88,6

Óxido de β -cariofileno (88,6%) aparece como el componente mayoritario en esta banda, seguido por α -copaeno y en tercer lugar por β -cariofileno, ambos identificados en otras bandas del AE.

Cabe destacar la presencia de α -copaeno en las 4 bandas analizadas, mientras que β -cariofileno fue identificado en 3 de las 4 bandas. Por otro lado, 1,8-cineol y calacoreno fueron aislados en 2 bandas y el óxido de β -cariofileno sólo en 1 de ellas. En el caso de los primeros, α -copaeno y β -cariofileno, coinciden con los porcentajes en que estos componentes están presentes en el AE de *A. saturoioides*, no así es el caso para el óxido de β -cariofileno, que a pesar de la gran proporción en la que se encuentra en la esencia, sólo fue identificado en 1 de las bandas. Situación muy similar ocurre con α -pineno (22,7%), quién siendo el componente que aparece en mayor proporción en el AE, no fue identificado en ninguna de las bandas analizadas.

Si ahora analizamos a 1,8-cineol y calacoreno, estos 2 componentes no se destacan por la proporción en la que aparecen en el AE de *A. saturoioides*, ya que lo hacen con 3,0% y 3,5% respectivamente, sin embargo fueron identificados en 2 de las 4 bandas analizadas.

Confirmando lo citado en la bibliografía, en nuestro trabajo se determinó que α -pineno, β -cariofileno, α -copaeno y óxido de β -cariofileno son los componentes mayoritarios del aceite esencial evaluado, y que p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, γ -muroloeno, β -selineno, α -muroloeno, γ -cadineno, δ -cadineno, cubenol y δ -cadinol, en menor proporción, también son constituyentes de la esencia. La mayoría de estos componentes han sido aislados en las bandas activas indicando que son los responsables de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie vegetal

estudiada. Sería aconsejable evaluar estos componentes de forma individual para corroborar si son ellos los responsables de dicha actividad, o si la misma no estaría determinada por la interacción de estos componentes con los minoritarios.

Minthostachys verticillata

El AE de *M. verticillata* obtenido mediante destilación por arrastre con vapor de agua utilizando una trampa tipo Clevenger se sometió a un análisis más exhaustivo mediante CG-EM con el objetivo de determinar su composición química e identificar sus componentes mayoritarios.

En la Figura 49 se muestra el perfil cromatográfico del AE, donde se detallan los tiempos de retención y las áreas de los componentes mayoritarios.

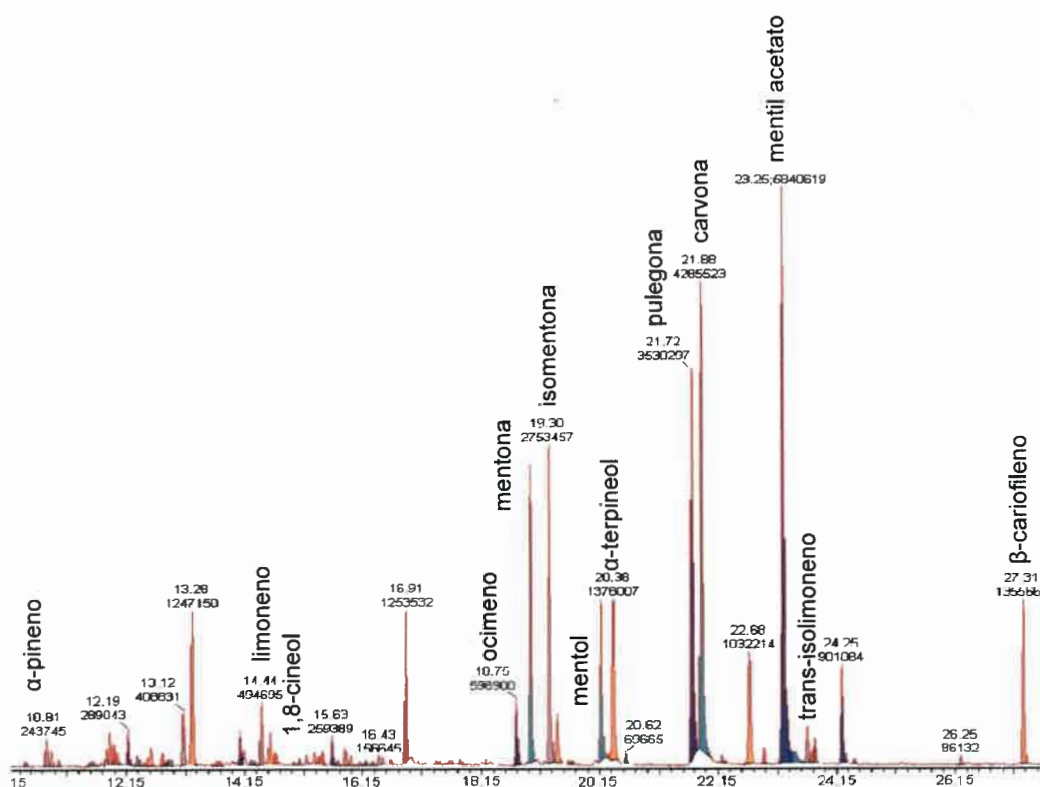


Figura 49: Perfil cromatográfico del AE de *M. verticillata*

En la Tabla 19 se resumen los tiempos de retención y los porcentajes de cada componente individual presente en el AE los que fueron determinados a partir del área que representó cada pico.

Tabla 19: Componentes del AE de *M. verticillata*

Componentes	Tiempo de retención	%
α -pineno	10.91	0,7
limoneno	14.44	2,2
1,8-cineol	14.58	1,3
ocimeno	18.75	2,6
mentona	18.98	10,8
isomentona	19.30	11,6
mentol	20.18	6,0
α -terpineol	20.30	0,2
pulegona	21.72	14,9
carvona	21.88	18,0
mentil acetato	23.25	24,5
trans-isolimoneno	23.66	1,5
β -cariofilleno	27.31	5,7

Como puede observarse, mentil acetato (24,5%), carvona (18,0%), pulegona (14,9%), isomentona (11,6%) y mentona (10,8%) son los componentes presentes en mayor proporción en la muestra analizada. Sin embargo, no hay que despreciar aquellos que aunque se encuentren en menor cantidad, también están presentes en el AE.

Estos resultados coinciden con la bibliografía consultada ya que diferentes investigaciones demostraron que los componentes mayoritarios del AE de *M. verticillata* son pulegona y mentona. Posteriormente, mejores métodos de análisis hicieron posible la identificación de componentes minoritarios, en particular isomentona, limoneno, mentol, 1,8-cineol, y β -pineno, como así también otros componentes que están presentes en cantidades muy pequeñas, entre ellos carvona, α -pineno, piperitenona, sabineno, mirceno, y β -ocimeno (Fester *et al.*, 1950; Fester y Martinuzzi, 1950; Fester y Martinuzzi, 1952, Fester *et al.*, 1956; Fester, 1958; Fester *et al.*, 1960; Zygadlo *et al.*, 1996; De Feo *et al.*, 1998; Toloza *et al.*, 2006; Caridi *et al.*, 2007; Oliva, 2007; Schmidt-Lebuhn, 2008b; Caridi, 2009; Palacios *et al.*, 2009).

Con los avances de la ciencia se ha logrado demostrar una gran diversidad genética del aceite esencial de *M. verticillata* con respecto a sus principales componentes, permitiendo clasificar a dicha especie en 3 quimiotipos: carvona, timol-carvacrol y pulegona-mentona. Estudios bibliográficos reportan que el quimiotipo

pulegona-mentona es el más predominante (Zygadlo *et al.*, 1996), sin embargo, en este trabajo se ha identificado el quimiotipo carvona, ya que este componente es el mayoritario en el aceite esencial analizado.

En diferentes estudios se ha demostrado que puede haber variación en la composición química de un aceite esencial según la edad de la planta, la parte del vegetal utilizada, la época de cosecha y el lugar en el que se recolectó, indicando variaciones morfogénicas de los aceites esenciales (Karaman, 2006). Algunos investigadores sostienen que las diferencias en la composición química cuantitativa de los aceites esenciales, pueden deberse a alteraciones en el metabolismo de las plantas como resultado de factores internos y/o externos, como su edad fisiológica, los componentes nutritivos del suelo y la época del año en que se realiza la colecta. Estos aspectos podrían afectar la proporción de compuestos químicos en la planta o la presencia de algunos de ellos. Variaciones en las condiciones climáticas podrían influir sobre el aceite, alterando algún metabolito o su acumulación (Barrio Alonso *et al.*, 2001).

En la Figura 50 se muestra el perfil cromatográfico de la banda con Rf de 0,33 perteneciente al AE de *M. verticillata* aislada mediante CCD, donde se detallan los tiempos de retención y las áreas de los componentes identificados.

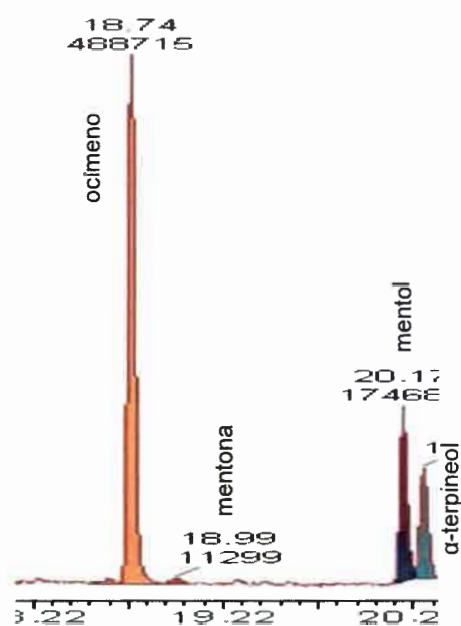


Figura 50: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,33 del AE de *M. verticillata*

En la Tabla 20 se resumen los tiempos de retención y los porcentajes de los componentes presentes en dicha banda del AE determinados a partir del área que representó a cada pico.

Tabla 20: Componentes de la banda con Rf 0,33 del AE de *M. verticillata*

Componentes	Tiempo de retención	%
ocimeno	18.74	62,3
mentona	18.99	1,5
mentol	20.17	22,3
α -terpineol	20.28	13,9

Como se muestra en la tabla 20, los componentes que fueron identificados son ocimeno (62,3%) en mayor proporción, seguido por mentol (22,3%), y finalmente α -terpineol y mentona. Estos componentes varían en la proporción en la que aparecen en la esencia, ya que todos los componentes aparecen en baja proporción, excepto la mentona, quien siendo uno de los componentes mayoritarios, aquí logró identificarse en muy baja cantidad (1,5%).

En la Figura 51 se muestra el perfil cromatográfico de la banda con Rf de 0,43 perteneciente al AE de *M. verticillata* aislada mediante CCD, donde se detallan los tiempos de retención y las áreas de los componentes identificados.

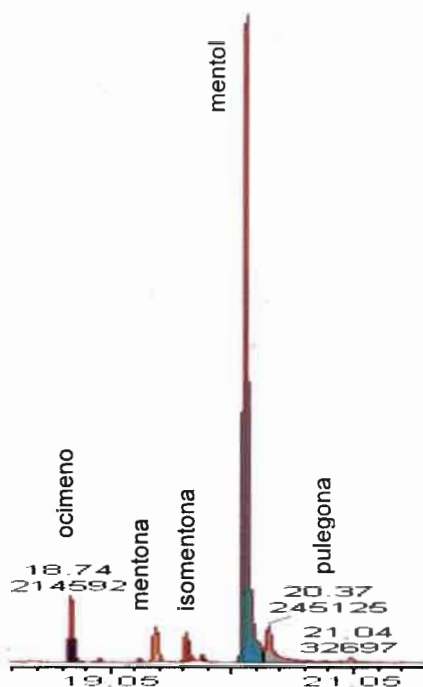


Figura 51: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,43 del AE de *M. verticillata*

En la Tabla 21 se resumen los tiempos de retención y los porcentajes de los componentes presentes en dicha banda del AE determinados a partir del área que representó a cada pico.

Tabla 21: Componentes de la banda con Rf 0,43 del AE de *M. verticillata*

Componentes	Tiempo de retención	%
ocimeno	18.74	8,1
mentona	18.98	0,6
isomentona	19.30	0,5
mentol	20.17	90,2
pulegona	21.72	0,6

Mentol (90,2%) aparece como el componente mayoritario en esta banda, seguido por ocimeno, pulegona, mentona e isomentona que se presentan en muy bajas proporciones en relación el primero. Si bien el mentol fue identificado también en la banda con Rf de 0, 33, no se presenta en altas proporciones en el AE de *M. verticillata*.

En la Figura 52 se muestra el perfil cromatográfico de la banda con Rf de 0,60 perteneciente al AE de *M. verticillata* aislada mediante CCD, donde se detallan los tiempos de retención y las áreas de los componentes identificados.

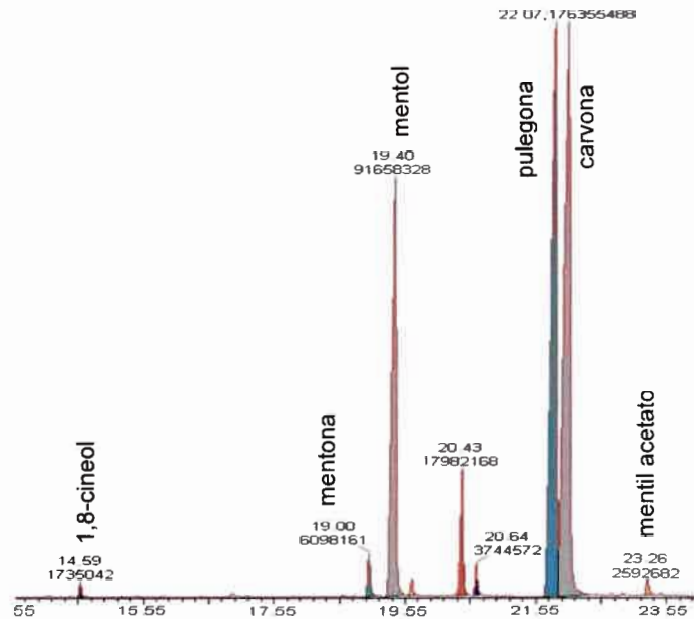


Figura 52: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,60 del AE de *M. verticillata*

En la Tabla 22 se resumen los tiempos de retención y los porcentajes de los componentes presentes en dicha banda del AE determinados a partir del área que representó a cada pico.

Tabla 22: Componentes de la banda con Rf 0,60 del AE de *M. verticillata*

Componentes	Tiempo de retención	%
1,8-cineol	14.59	0,4
mentona	19.00	1,5
mentol	19.41	21,0
pulegona	21.87	36,5
carvona	22.07	39,9
mentil acetato	23.26	0,7

Los componentes que fueron identificados en esta banda son carvona (39,9%) en mayor proporción, inmediatamente seguido por pulegona (36,5%) y luego mentol (21,0%), este último compuesto también fue identificado en las bandas anteriores.

Mentona, mentil acetato y 1,8-cineol, aunque se presentan en bajas proporciones, también fueron identificados como los principales constituyentes de esta banda.

En la Figura 53 se muestra el perfil cromatográfico de la banda con Rf de 0,72 perteneciente al AE de *M. verticillata* aislada mediante CCD, donde se detallan los tiempos de retención y las áreas de los componentes identificados.

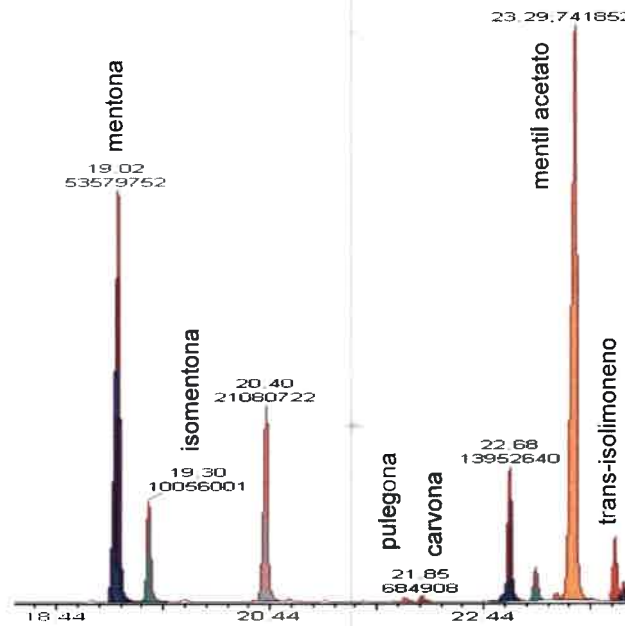


Figura 53: Perfil cromatográfico de la banda con Rf 0,72 del AE de *M. verticillata*

En la Tabla 23 se resumen los tiempos de retención y los porcentajes de los componentes presentes en dicha banda del AE determinados a partir del área que representó a cada pico.

Tabla 23: Componentes de la banda con Rf 0,72 del AE de *M. verticillata*

Componentes	Tiempo de retención	%
mentona	19.02	36,9
isomentona	19.30	6,9
pulegona	21.70	0,3
carvona	21.86	0,5
mentil acetato	23.29	51,1
trans-isolimonoeno	23.66	4,3

En esta banda, mentil acetato es el componente mayoritario (51,1%), como así también lo es en el AE de *M. verticillata*. Mentona fue identificado con el segundo porcentaje mayoritario, seguido por isomentona y trans-isolimoneno, por último, carvona y pulegona.

Si analizamos los componentes identificados en las bandas, mentona fue identificada en las 4 bandas analizadas, pulegona y mentol fueron identificados en 3 de las 4 bandas, mientras que isomentona, ocimeno, carvona y mentil acetato fueron identificados en 2 de ellas. Finalmente, 1,8-cienol fue identificado en una banda en baja proporción, esto coincide con lo que ocurre en el aceite esencial ya que este componente está en menor proporción (1,3%) con respecto al resto.

Tal como se muestra en las Figuras 52 y 53, y en las tablas 22 y 23, en las bandas con Rf de 0,60 y 0,72, se han identificado los componentes mayoritarios del aceite esencial, entre ellos mentil acetato, carvona, pulegona y mentona.

Confirmando lo citado en la bibliografía, en nuestro trabajo se determinó que mentil acetato, carvona, pulegona, isomentona, mentona y mentol son los componentes mayoritarios del aceite esencial evaluado, y que α -pineno, limoneno, 1,8-cineol, ocimeno, isopulegona, α -terpineol, dihidrocarvona, trans-isolimoneno, cis-ocimeno y β -cariofileno, en menor proporción, también son constituyentes de la esencia. La mayoría de estos componentes han sido aislados en las bandas activas indicando que son los responsables de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *M. verticillata*. Sería aconsejable evaluar estos componentes de forma individual para corroborar si son ellos los responsables de dicha actividad, o si la misma no estaría determinada por la interacción de estos componentes con los minoritarios.

Cabe destacar que si bien la CCD no es la técnica de preferencia ni la sugerida para aislar e identificar compuestos de productos vegetales tan complejos en su composición química, como lo son los aceites esenciales, esta metodología fue la elegida debido al bajo rendimiento de la esencia. A pesar de lo planteado, esta técnica resultó ser efectiva, ya que con la misma fue posible identificar al menos los componentes mayoritarios y algunos minoritarios, tanto del aceite esencial de *A. saturoioides* como del de *M. verticillata*.

7- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Achyrocline satureioides

El EH de *A. satureioides* obtenido mediante extracción continua en un extractor líquido-líquido se sometió a un análisis más exhaustivo mediante HPLC con el objetivo de intentar determinar su composición química e identificar sus componentes mayoritarios (Figura 54).

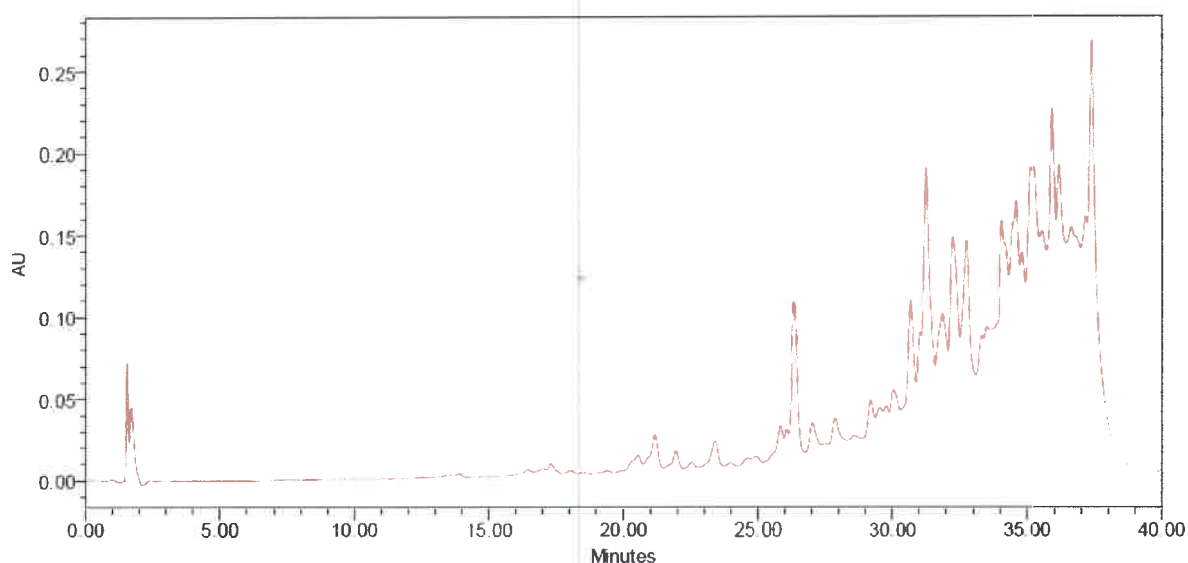


Figura 54: Perfil cromatográfico del EH de *A. satureioides*

El análisis de las muestras se realizó comparando los tiempos de retención y las absorbancias de los picos obtenidos con estándares de flavonoides disponibles en la base de datos del equipo, como quercetina, isoquercetina y canferol. El monitoreo de los cromatogramas fue realizado con variación de longitud de onda de 230 a 500 nm ya que los flavonoides nombrados anteriormente tienen absorbancia máxima en esas longitudes de onda.

Teniendo en cuenta lo descripto, no se pudieron identificar los componentes del EH de *A. satureioides*, debido a que los tiempos de retención y los espectros de absorbancia de los mismos no coinciden con los de los estándares con los que fueron comparados.

La bibliografía consultada cita la presencia de flavonoides, como quercetina, isoquercetina, luteolina, entre otros y de diferentes ácidos fenólicos, tales como el cafeico, el clorogénico y el isoclorogénico, ésteres y algunos polisacáridos como compuestos mayoritarios, en diferentes extractos de las partes aéreas de *Achyrocline alata* y *Achyrocline satureioides* (Bohlmann *et al.*, 1980; Ferraro *et al.*, 1981; Simões *et al.*, 1988; Broussalis *et al.*, 1989; Puhlmann *et al.*, 1992; Broussalis *et al.*, 1993; De Souza *et al.*, 2002; Arredondo *et al.*, 2004; Polydoro *et al.*, 2004; Taylor, 2005). Si bien en nuestro trabajo no se pudieron identificar los componentes del EH de *A. satureioides*, la actividad antimicrobiana de este extracto se podría atribuir a los flavonoides y a los diferentes compuestos fenólicos, ya que los mismos ejercen su actividad antimicrobiana alterando la estructura y función de la membrana citoplasmática (Sikkema *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 2003; Burt, 2004). Además, a los flavonoides se les atribuyen diferentes propiedades biológicas, entre ellas antimicrobianas (Havsteen, 1983; Middleton y Chithan, 1993; Harborne y Baxter, 1995; Afolayan y Meyer, 1997; Harborne y Williams, 2000; De Souza *et al.*, 2007). Por ejemplo, las propiedades antimicrobianas y antifúngicas del propóleo, son atribuidas a su alto contenido de flavonoides (Grange y Davey, 1990; Cafarchia *et al.*, 1999; Bosio *et al.*, 2000; Hegazi *et al.*, 2000).

Minthostachys verticillata

El EH de *M. verticillata* obtenido mediante extracción continua en un extractor líquido-líquido se sometió a un análisis más exhaustivo mediante HPLC con el objetivo de intentar determinar su composición química e identificar sus componentes mayoritarios (Figura 55).

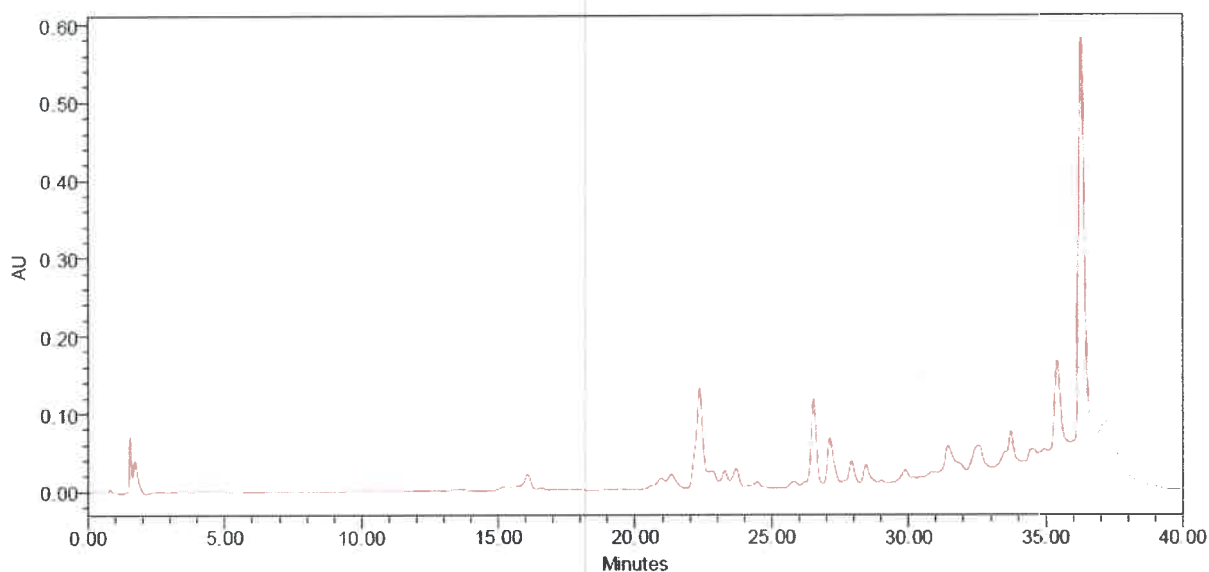


Figura 55: Perfil cromatográfico del EH de *M. verticillata*

Al consultar la bibliografía, no se encontraron datos sobre la composición química de la fracción no volátil de *M. verticillata*. Sin embargo, el análisis de las muestras se realizó comparando los tiempos de retención y las absorbancias de los picos obtenidos con estándares de flavonoides disponibles en la base de datos del equipo, como quercetina, isoquercetina, y canferol. El monitoreo de los cromatogramas fue realizado con variación de longitud de onda de 230 a 500 nm ya que los flavonoides nombrados anteriormente tienen absorbancia máxima en esas longitudes de onda.

Teniendo en cuenta lo descrito, no se pudieron identificar los componentes del EH de *M. verticillata*, debido a que los tiempos de retención y los espectros de absorbancia de los mismos no coinciden con los de los estándares con los que fueron comparados.

8- Oxitetraciclina

Ensayo de la actividad antibacteriana de OTC por la técnica de difusión en pozo (De Feo *et al.*, 1998)

Con la finalidad de comparar la actividad antibacteriana de los diferentes extractos vegetales con un antibiótico de uso común en el tratamiento de Loque Americana, se determinaron los valores de CIM de la OTC frente a las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas.

La tabla 24 resume los resultados promedio y la desviación estándar obtenidos midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas frente a OTC.

Tabla 24: Actividad antibacteriana de OTC

Cepas de <i>P. larvae</i>	Concentración de OTC (mg/ml)						
	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0063	0,0032	0,0016
1	36±0,6	30,3±0,6	26,0±0,7	20,7±1,2	NI	NI	NI
2	33,3±0,6	25,7±1,7	14,0±1,2	NI	NI	NI	NI
3	40,3±1,0	35,7±0,6	32,3±1,0	28,3±1,2	20,7±0,6	NI	NI
4	30,7±2,4	25,0±1,1	15,7±0,6	NI	NI	NI	NI
5	32,0±0,6	28,3±1,0	20,7±1,1	13,7±1,2	10,7±0,6	NI	NI
6	37,3±0,6	30,7±0,6	20,3±0,6	13,3±2,4	9,7±1,0	NI	NI
7	41,5±2,0	36,0±0,6	27,0±0,6	20,7±1,2	16,3±0,6	NI	NI
8	36,3±1,7	28,7±0,0	25,7±0,0	22,7±2,0	16,0±1,0	NI	NI
9	35,0±0,0	28,7±0,6	22,3±0,6	16,7±2,0	NI	NI	NI
10	22,0±0,6	16,0±0,0	8,0±0,0	8,3±0,6	NI	NI	NI
11	25,7±0,6	12,3±0,6	10,3±1,0	8,0±1,0	NI	NI	NI

Referencias: NI: No inhibición del crecimiento

Puede observarse la presencia de halos de inhibición del crecimiento en las 11 cepas de *P. larvae* estudiadas, lo que permite afirmar que la OTC posee actividad antibacteriana con valores de CIM entre 0,0063 y 0,25 mg/ml. Estos valores de CIM coinciden o están próximos a los encontrados para otros microorganismos como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. uberis*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis*, los cuales estuvieron en un intervalo de 0,0008 a 0,0125 mg/ml (Poloni, 2009) y con los valores encontrados para cepas de *Bacillus cereus* aisladas de muestras de miel, cuyos valores de CIM estuvieron en un intervalo de 0,008 a 0,128 mg/ml (López *et al.*, 2008).

Cabe destacar que la mayoría de las cepas de *P. larvae* no presentaron una zona clara de inhibición de crecimiento, ya que dentro de los halos se observaban colonias del microorganismo, sospechosas de ser resistentes al antibiótico evaluado. A pesar que la OTC es uno de los antibióticos utilizados con más frecuencia en la prevención y el control de Loque Americana, se han encontrado cepas de *P. larvae* resistentes a la misma (Alippi *et al.*, 1999; Miyagi *et al.*, 2000; Evans, 2003; Alippi *et al.*, 2007; Reynaldi *et al.*, 2008). La resistencia a las tetraciclinas es debido a la adquisición de genes asociados a plásmidos o transposones (Roberts, 1996; Roberts, 2005). Recientemente se han aislado cepas de *P. larvae* resistentes a la OTC, a las cuales se les ha detectado la presencia de dos plásmidos diferentes en su genoma (Alippi *et al.*, 2007).

Debido a que esta enfermedad causa severos daños económicos al sector apícola en muchos países del mundo, ya que la presencia de antibióticos en la miel y en otros productos de la colmena influye negativamente al momento de su comercialización y exportación, y, que por otro lado, existe la posibilidad de la aparición de resistencia por parte de los microorganismos patógenos, es por ello que esta problemática señala la necesidad de disponer de una metodología adecuada para controlar el estado sanitario de las colmenas mediante procedimientos ecológicamente limpios. Es así como se propone el uso de extractos vegetales con potencial aplicación en el control de Loque Americana como nueva medida profiláctica, mejorando el estado sanitario de las colmenas, incrementando la producción y la calidad de sus productos, a través de un tratamiento alternativo y natural.

Conclusiones

- De todas las colmenas provenientes del sur de la provincia de Córdoba con síntomas de Loque Americana, se logró aislar e identificar su agente causal *Paenibacillus larvae* mediante pruebas fisiológicas y taxonómicas moleculares.
- Todas las cepas de *P. larvae* estudiadas resultaron inhibidas en su crecimiento cuando se enfrentaron al aceite esencial y a los diferentes extractos de *Achyrocline satureioides*. El extracto de hexano presentó mayor actividad antibacteriana en relación a los otros extractos obtenidos mediante extracción líquido-líquido.
- Los componentes del aceite esencial y del extracto de hexano de *A. satureioides* se lograron separar mediante cromatografía en capa delgada.
- La técnica de bioautografía permitió evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana del aceite esencial y del extracto de hexano de *A. satureioides* frente a *P. larvae*, determinándose 10 zonas de inhibición del crecimiento para el aceite esencial, y 4 zonas de inhibición del crecimiento para el extracto de hexano.
- La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas permitió determinar la composición química del aceite esencial de *A. satureioides*, identificándose a α -pineno, β -cariofileno, α -copaeno y óxido de β -cariofileno como los componentes mayoritarios de dicho aceite esencial.
- El crecimiento de todas las cepas de *P. larvae* fue inhibido por el aceite esencial y por los diferentes extractos de *Minthostachys verticillata*. El extracto de hexano ejerció mayor actividad antibacteriana en relación con los otros extractos que fueron obtenidos mediante extracción líquido-líquido.
- Se lograron separar los componentes del aceite esencial y del extracto de hexano de *M. verticillata* empleando cromatografía en capa delgada.
- La técnica de bioautografía permitió evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana del aceite esencial y del extracto de hexano de *M. verticillata* frente a *P. larvae*, determinándose 4 zonas de inhibición del crecimiento para el aceite esencial, y 1 zona de inhibición del crecimiento para el extracto de hexano.

- La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas permitió determinar la composición química del aceite esencial de *M. verticillata*, identificándose a mentil acetato, carvona, pulegona, isomentona y mentona como los componentes mayoritarios de dicho aceite esencial.
- La especie de *M. verticillata*, de acuerdo al principal componente de su aceite esencial, fue clasificada dentro del quimiotipo carvona.
- El efecto de los extractos de hexano de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* frente a las células vegetativas de *P. larvae* se visualizó empleando técnicas de microscopía electrónica de transmisión.
- Todas las cepas de *P. larvae* resultaron inhibidas en su crecimiento cuando se enfrentaron a Oxitetraciclina, antibiótico utilizado en el tratamiento de Loque Americana. Sin embargo, este antibiótico han generado la aparición de cepas resistentes y su aplicación está restringida debido a los residuos que deja en la miel y productos apícolas.
- Los resultados obtenidos constituyen la primera evidencia del uso de *A. saturoioides* y *M. verticillata* como agentes antibacterianos frente a *P. larvae*. Dado también que demuestran la elevada sensibilidad que presentan las cepas de dicha bacteria frente a sus extractos, y que los componentes responsables de la actividad antibacteriana han sido aislados e identificados, sería aconsejable evaluar estos componentes de forma individual para corroborar si son ellos los responsables de dicha actividad, o si la misma estaría determinada por la interacción de estos componentes entre sí, ya que éstos podrían aplicarse como tratamiento alternativo y natural para controlar el estado sanitario de las colmenas, incrementando la producción y la calidad de sus productos.

Anexo 1

Medio de cultivo para el mantenimiento, la conservación y la determinación de la actividad antibacteriana**Medio MYPGP**

Caldo:

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

Medio sólido:

Agar 2 g

Medio semisólido:

Agar 0,6 g

Medios de cultivo para la identificación de *Paenibacillus larvae***Voges-Proskauer**

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura	15 g
Glucosa.....	5 g
Agua destilada	1000 ml
pH final.....	6,9

Hidrólisis del almidón

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura	15 g
K ₂ HPO ₄	3 g
Almidón.....	15 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Hidrólisis de la gelatina

Extracto de carne	3 g
Peptona.....	2 g
Gelatina.....	120 g
Agua destilada	1000 ml
pH final.....	7

Hidrólisis de la caseína

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura	15 g
K ₂ HPO ₄	3 g
Leche en polvo descremada	50 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Utilización del citrato (medio comercial citrato de Simmons 24,2 g)

Citrato de sodio	
Cloruro de sodio	
Fosfato dipotásico	
Fosfato monoamónico	
Sulfato de magnesio	
Agar	
Agua destilada	1000 ml
pH final.....	6,9

Reactivos para la identificación de *Paenibacillus larvae*

Colorante para la técnica de la gota pendiente

Fuscina fenicada de Ziehl

Colorantes para la coloración de Gram

Violeta de genciana o Cristal Violeta

Lugol (I₃K)

Alcohol

Fuscina básica o safranina

Reactivos y materiales para tinción negativa

Parafilm

Grilla recubierta con película de Formvar o de Carbono

Acido Fosfotúngstico al 2%

Reactivo para la prueba de la catalasa

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10%

Reactivos para la reacción de Voges-Proskauer

Solución de α -naftol (5% p/v en alcohol absoluto)

Hidróxido de potasio (KOH) al 40%.

Reactivo de lugol para la prueba de hidrólisis de almidón

I₂ 1 g

IK 2 g

Agua destilada 300 ml

Reactivos y solventes para la obtención de los productos vegetales

Na₂SO₄ anhidro (Cicarelli)

Alcohol etílico grado medicinal (Anedra)

Hexano pro-análisis (Cicarelli)

Benceno pro análisis (Cicarelli)

Éter etílico pro análisis (Sintorgan)

Acetato de etilo pro análisis (Cicarelli)

Diluyente de los productos vegetales para la determinación de actividad antibacteriana por la técnica de microdilución en caldo

Agar-agar al 0,15% p/v (Britania)

Colorante vital para la determinación de actividad antibacteriana por la técnica de microdilución en caldo

Resarzurina al 0,01% p/v (Merck)

Diluyente de los productos vegetales para la determinación de actividad antibacteriana

Dimetilsulfóxido (Sintorgan)

Soluciones para la visualización del efecto del EH de *A. saturoioides* y de *M. verticillata* sobre *P. larvae* mediante microscopía electrónica de transmisión

Solución tampón de S-collidine 0,2M, pH 7,2-7,4

S-collidine..... 5,34 ml
CIH 2N (para pH 7,4)..... 9 ml
Agua destilada 100 ml

Solución fijadora de Glutaraldehído al 2,5%

Glutaraldehído al 25% 10 ml
Solución tampón de S-collidine 0,2M
pH 7,2-7,4 20 ml
Agua bidestilada..... 70 ml

Solución fijadora de Tetróxido de osmio (O_3O_4) al 1%

Tetróxido de osmio..... 1 g
Agua bidestilada..... 100 ml

Resina EMBED 812

Mezcla para la Preinclusión

Solución A:

EMBED 812..... 5 ml
DDSA 8 ml

Solución B:

EMBED 812..... 8 ml
NMA..... 7 ml
Acetona..... 28 ml

Mezcla para la Inclusión

Solución A..... 13 ml
Solución B..... 15 ml
DMP-30..... 16 gotas

Solución contrastante de Acetato de uranilo

Acetato de uranilo (2H₂O) 2,5 g
Agua destilada 50 ml

Solución contrastante de Citrato de plomo

(NO₃)₂ Pb 1,33 g
(CO₃) Na₂. 2H₂O 1,76 g
OHNa 1N 8 ml
Agua destilada 50 ml

Reactivos reveladores usados en cromatografía en capa delgada

Grageas de yodo (Cicarelli)
Cloruro férrico al 40% (Cicarelli)

Colorante vital para la determinación de actividad antibacteriana por la técnica de bioautografía

Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio al 5% p/v (Merck)

Diluyente de los productos vegetales en cromatografía gaseosa

Hexano grado HPLC (Sintorgan)

Solventes de las Fases móviles para cromatografía líquida de alta eficacia

Metanol grado HPLC (J. T. Baker)
Acetonitrilo grado HPLC (Sintorgan)
Acido acético glacial grado HPLC (Sintorgan)

Diluyente de los productos vegetales en cromatografía líquida de alta eficacia

Metanol grado HPLC (J. T. Baker)

Antibiótico para la determinación de actividad antibacteriana

Oxitetraciclina (Sigma)

Fases móviles para cromatografía en capa delgada

Todos los solventes mostrados en la siguiente tabla, son de calidad HPLC.

Tabla 1: Fases móviles

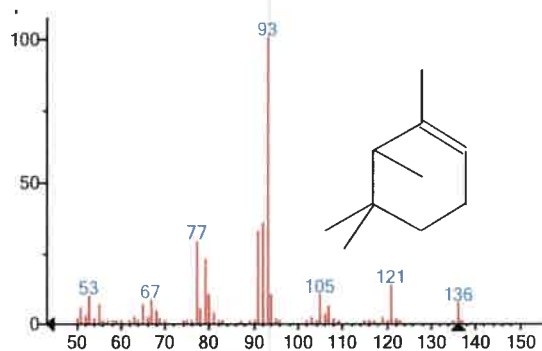
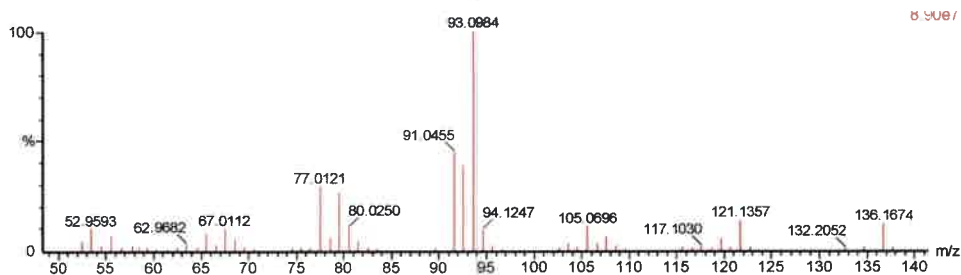
Solventes	Relación
acetato de etilo/cloroformo	1:1
acetato de etilo/diclorometano	1:1
acetona/cloroformo	1:1
acetona/benceno	1:1
acetona/diclorometano	1:1
benceno/acetato de etilo	1:1
benceno/acetato de etilo	7:3
hexano/acetona	1:1
hexano/acetona	6:4
hexano/acetona	7:3
hexano/acetato de etilo	1:1
hexano/acetato de etilo	7:3
cloroformo/éter etílico	1:1
éter etílico/benceno	1:1
éter etílico/hexano	1:1
éter etílico/hexano	6:4
éter etílico/hexano	7:3
diclorometano/hexano	7:3
diclorometano/éter etílico	1:1
diclorometano/éter etílico	6:4
diclorometano/éter etílico	7:3
tolueno/acetato de etilo	8:2
tolueno/acetato de etilo	9,5:0,5

Anexo II

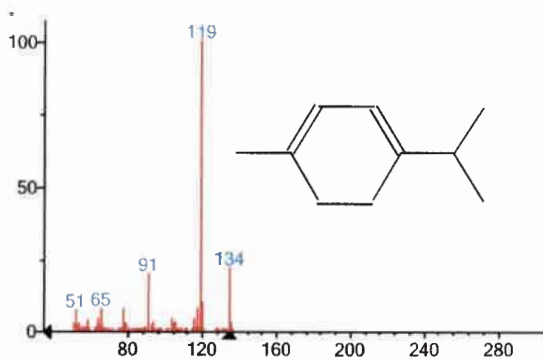
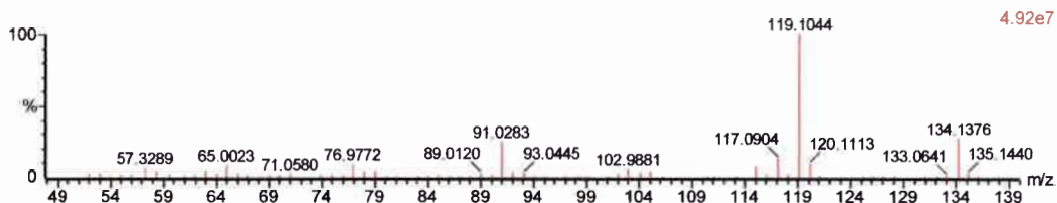
Para cada uno de los componentes mayoritarios, del AE de *A. saturoioides* y de *M. verticillata*, en primer lugar se muestra el espectro de masas obtenido para la muestra analizada y en segundo lugar, el espectro de masas y la estructura de cada componente pertenecientes a la biblioteca del programa Nist MS Search 2.0.

Achyrocline saturoioides

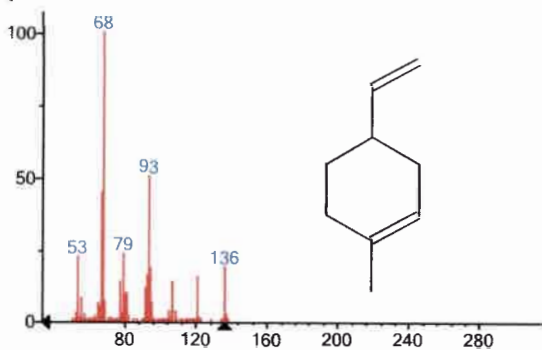
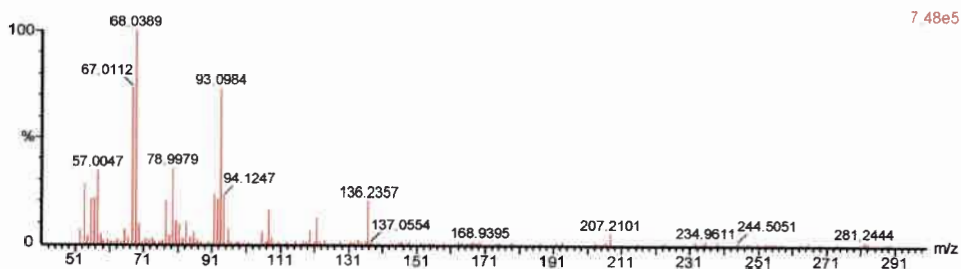
α -pineno



p-cimeno

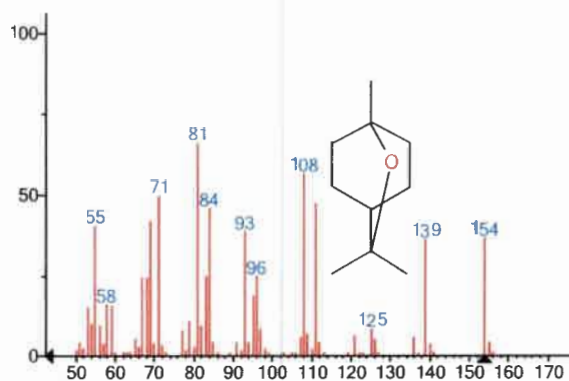
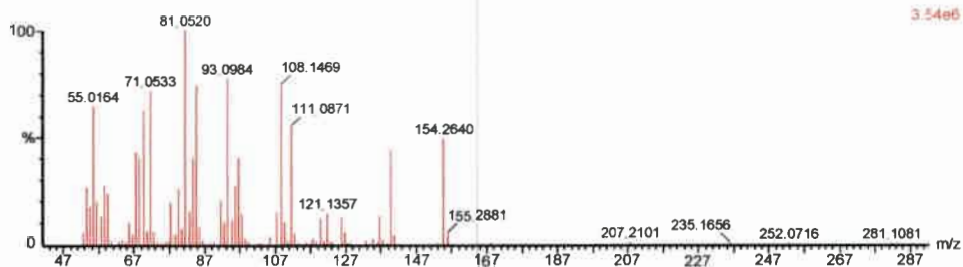


limoneno

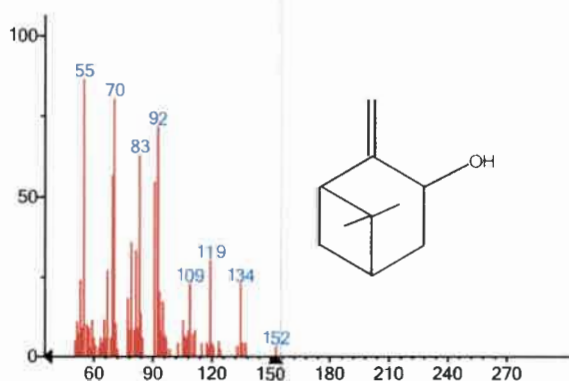
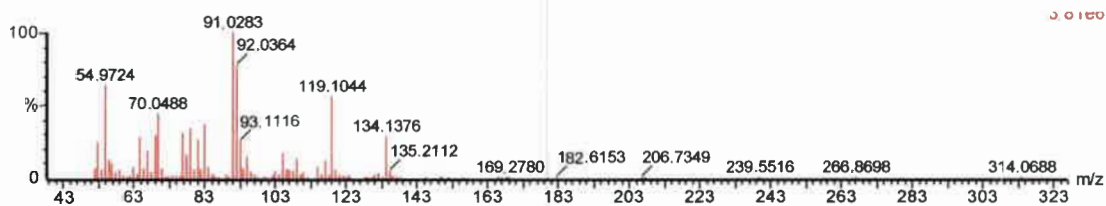




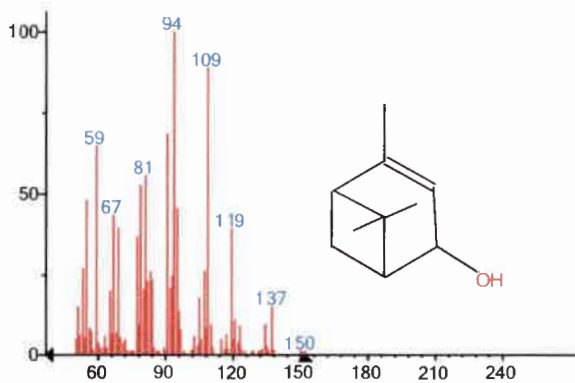
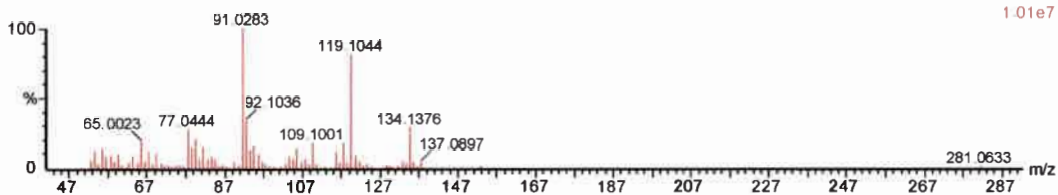
1,8-cineol



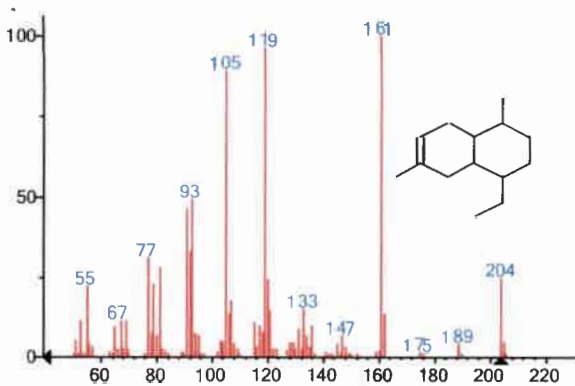
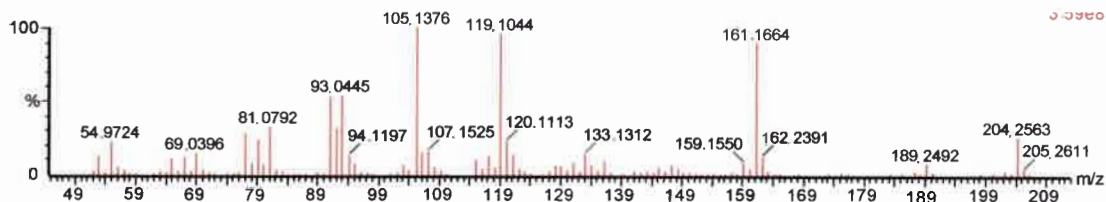
isopinocarveol



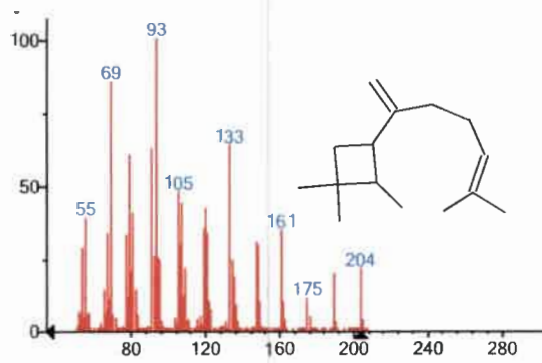
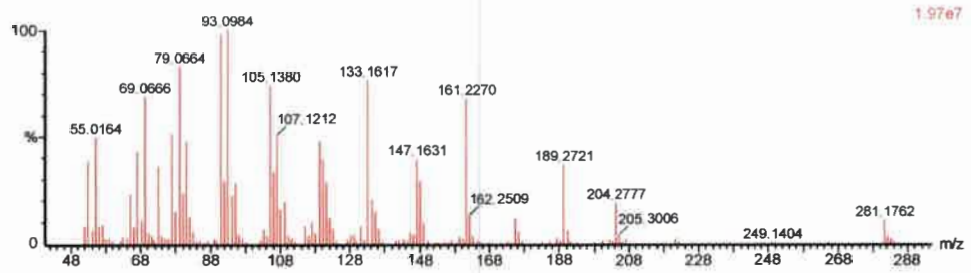
borneol



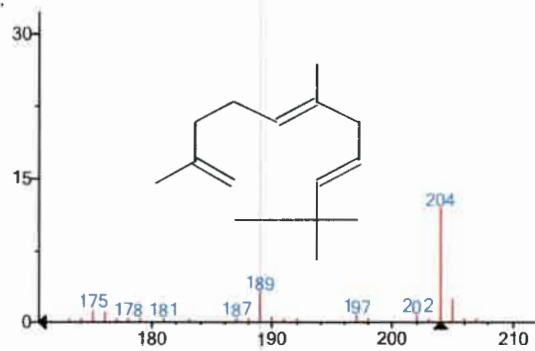
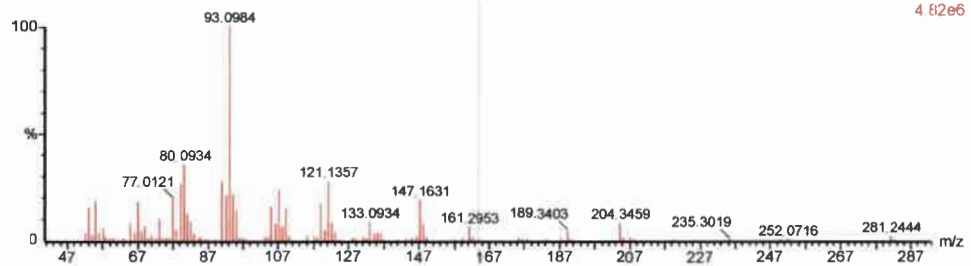
α -copaeno



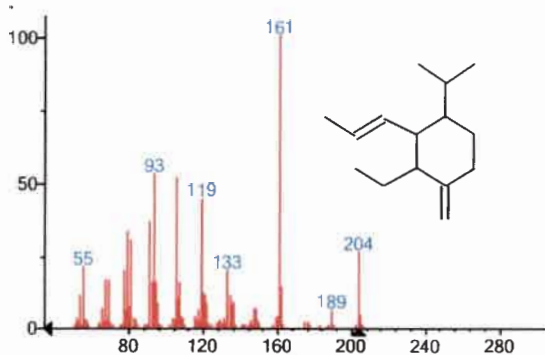
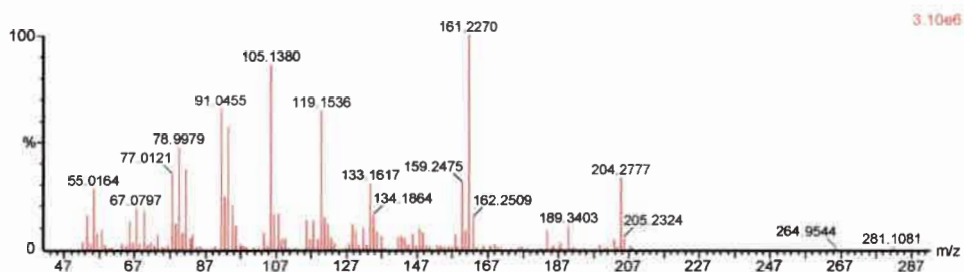
β -cariofileno



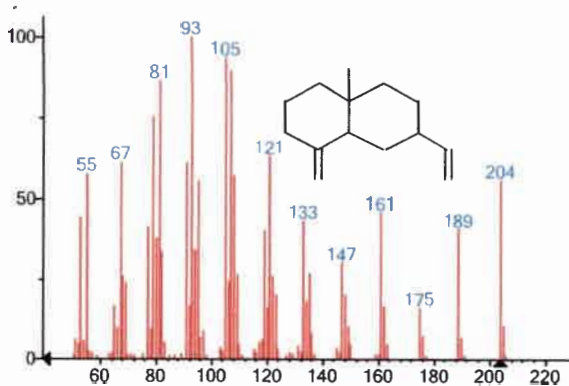
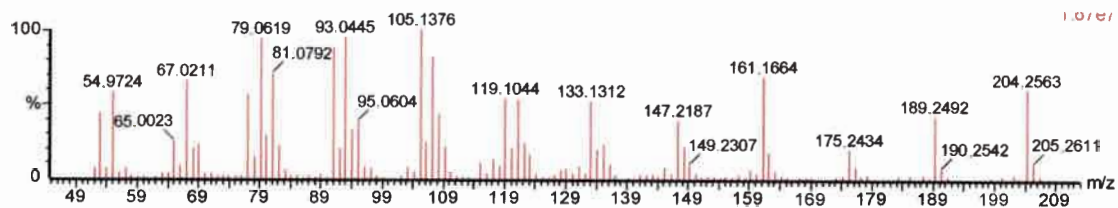
α -cariofileno



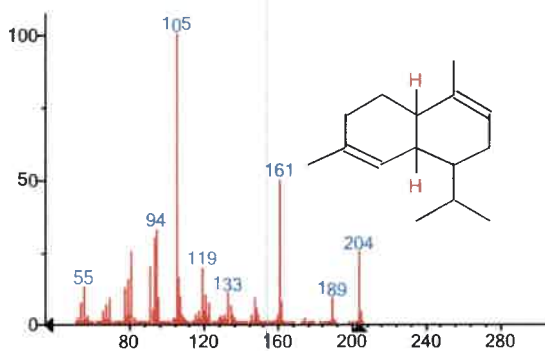
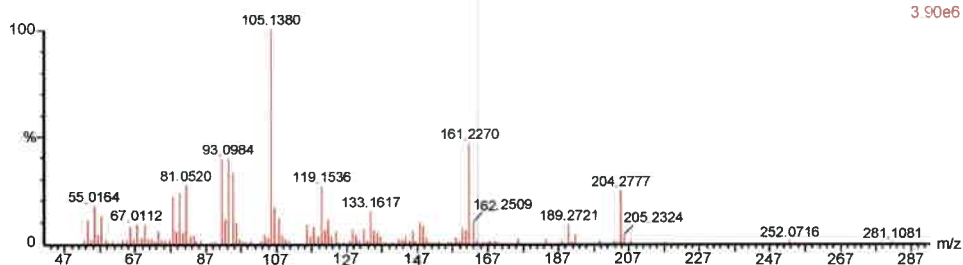
γ-muroloeno



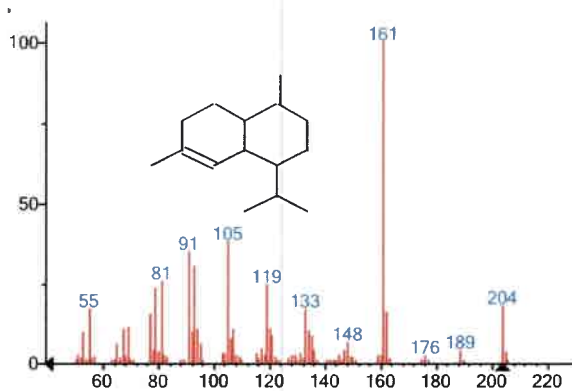
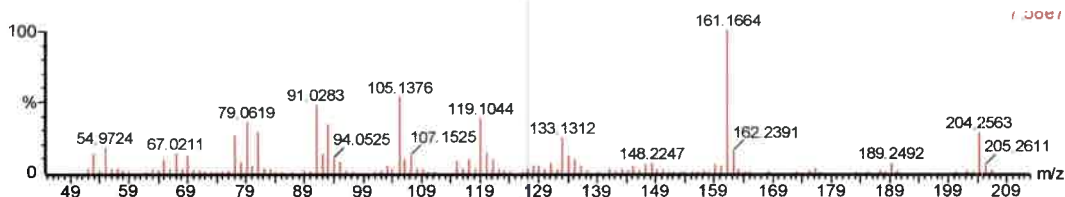
β-selineno



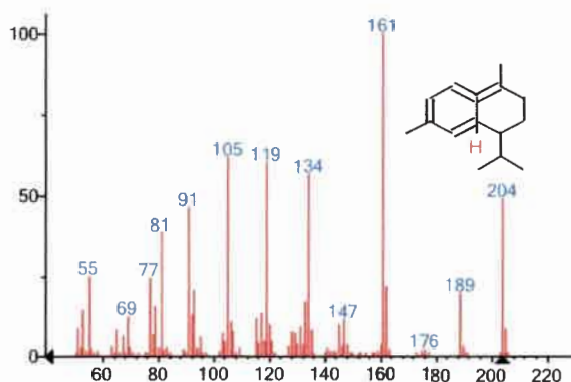
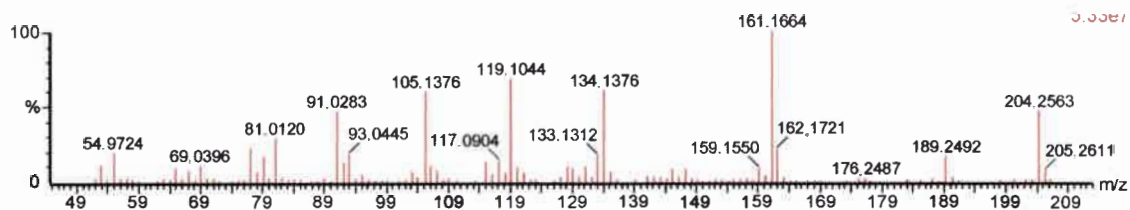
α -muroleno



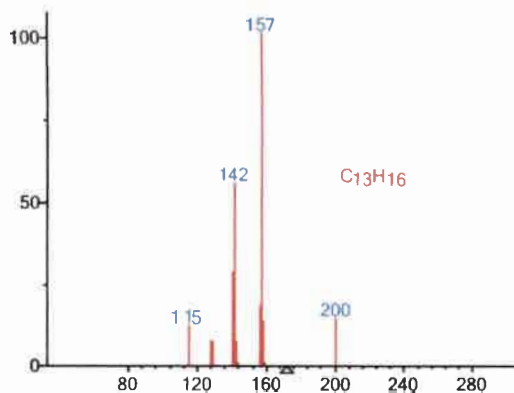
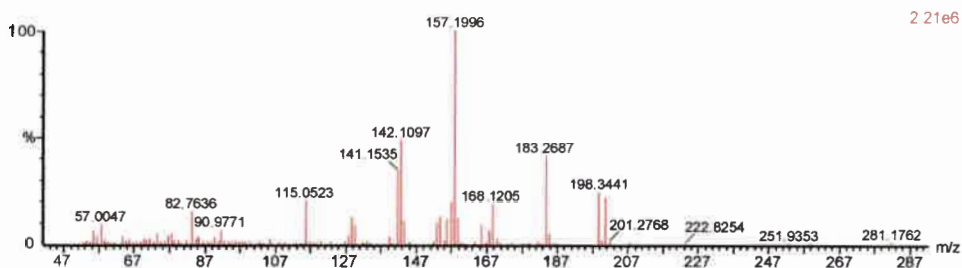
γ -cadineno



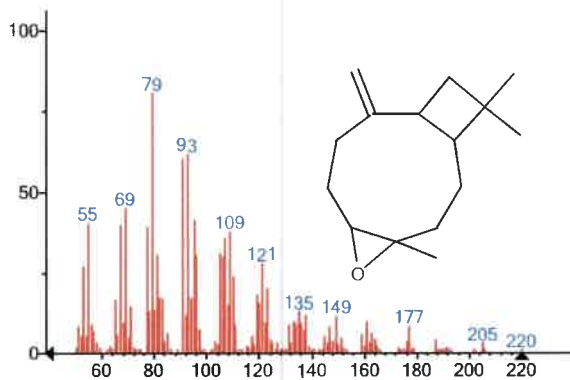
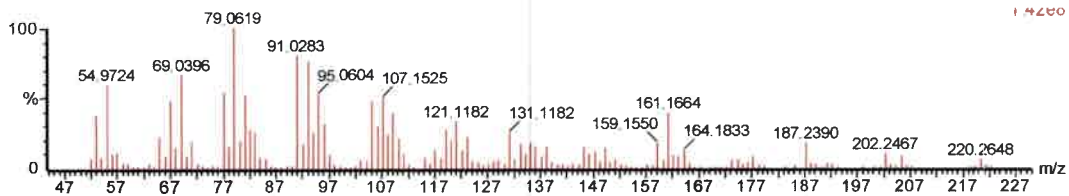
δ-cadineno



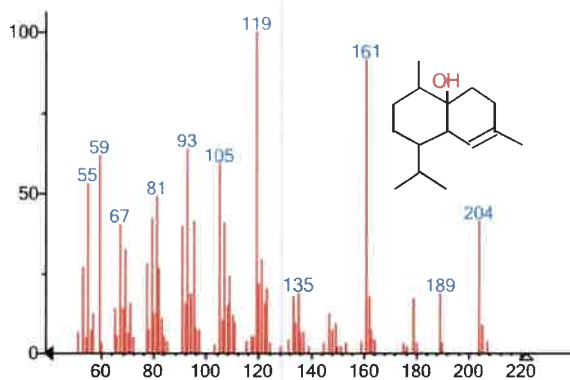
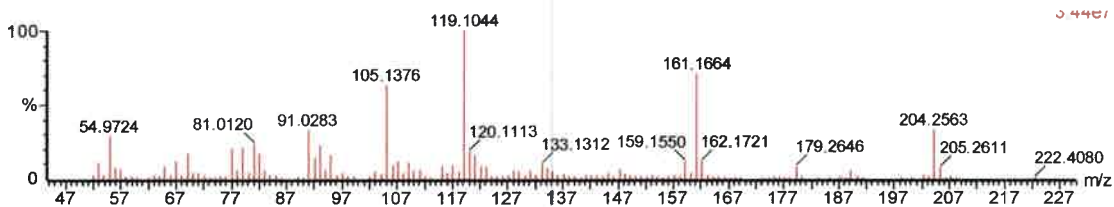
calacoreno



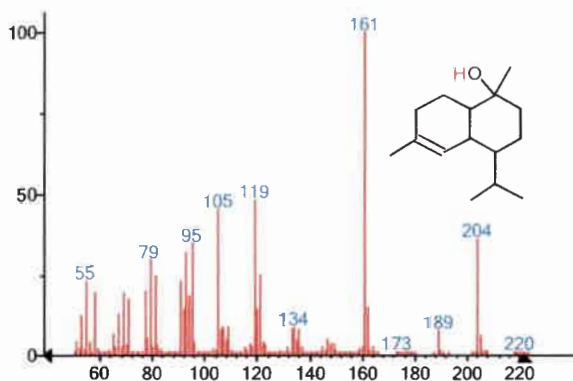
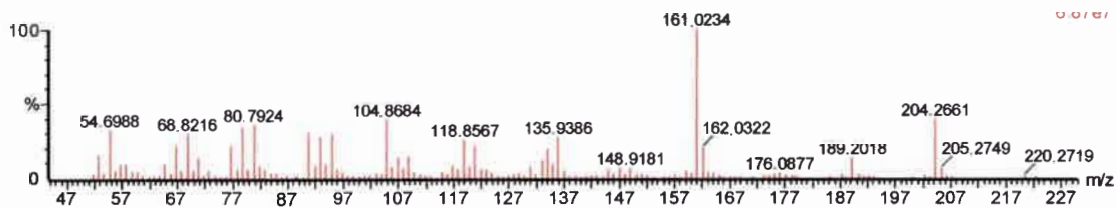
óxido de β-cariofileno



cubenol

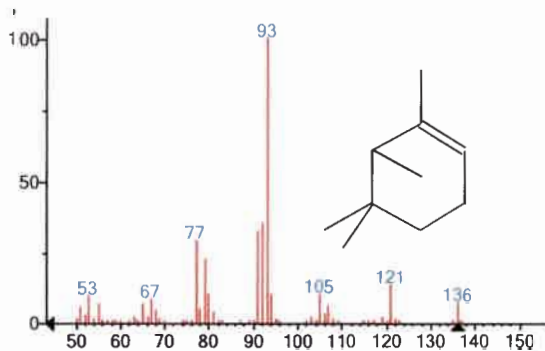
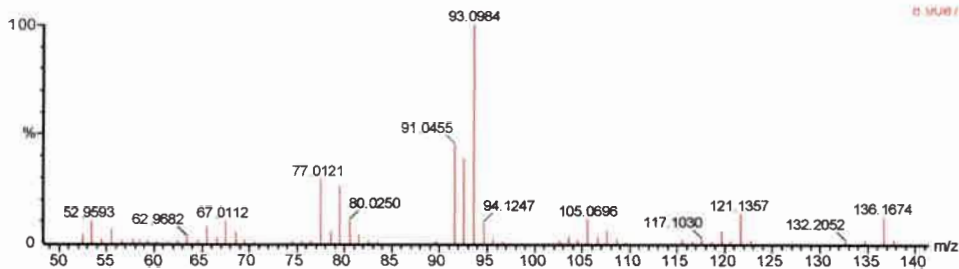


cadinol

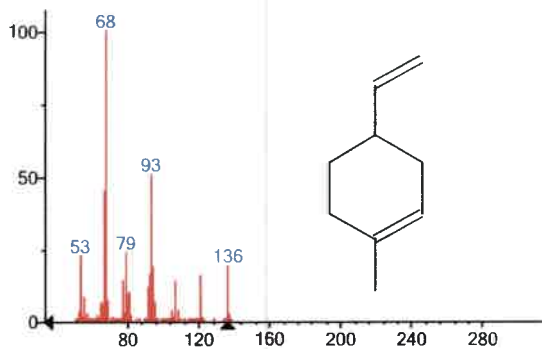
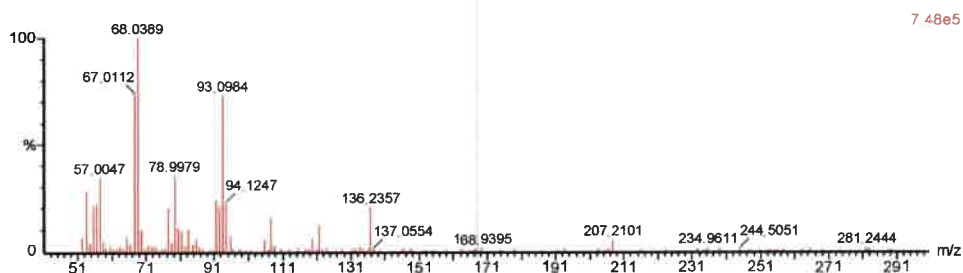


Minthostachys verticillata

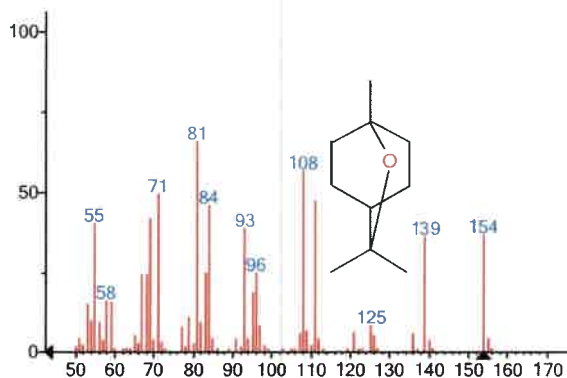
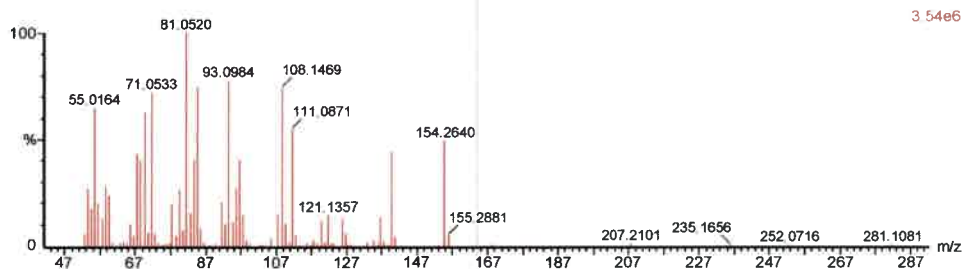
α -pineno



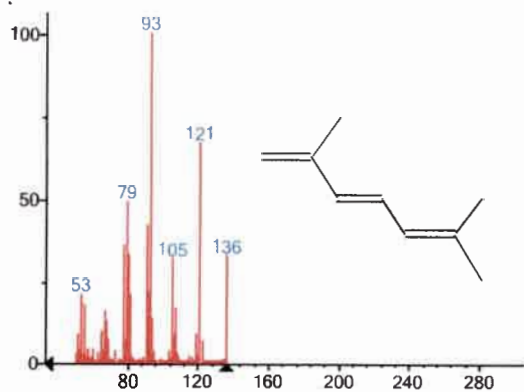
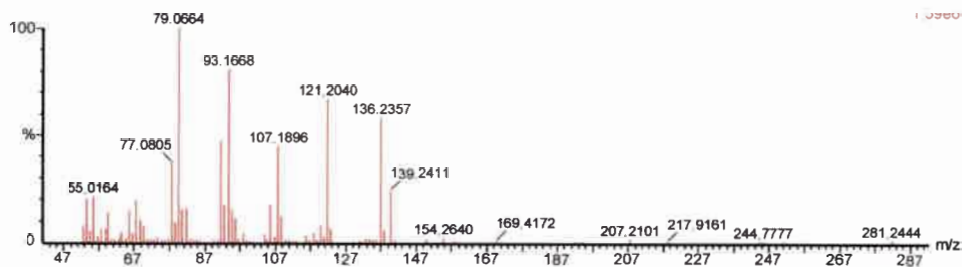
limoneno



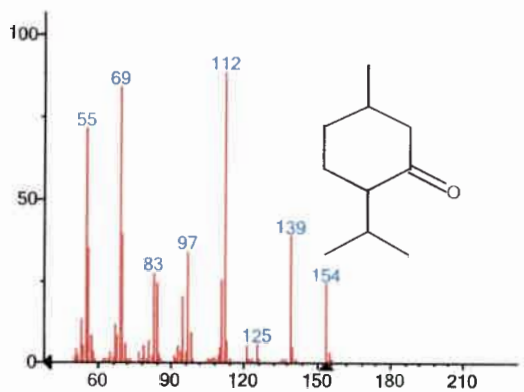
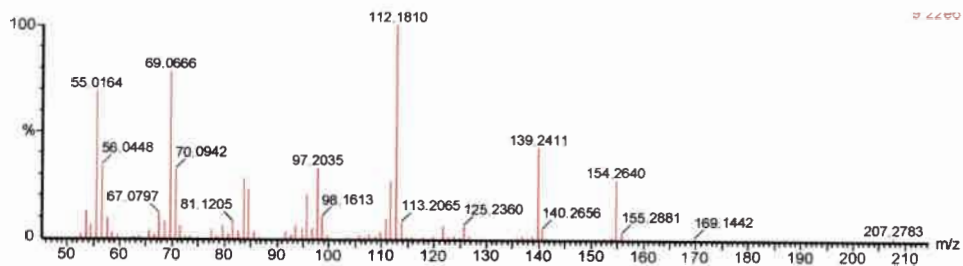
1,8-cineol



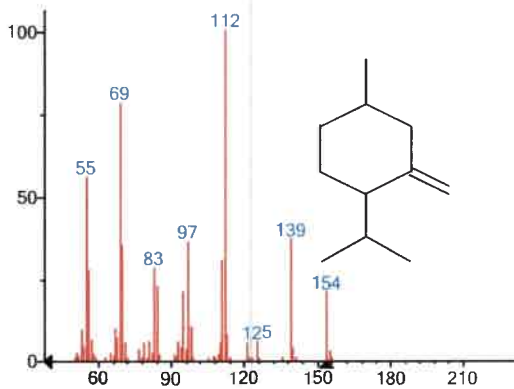
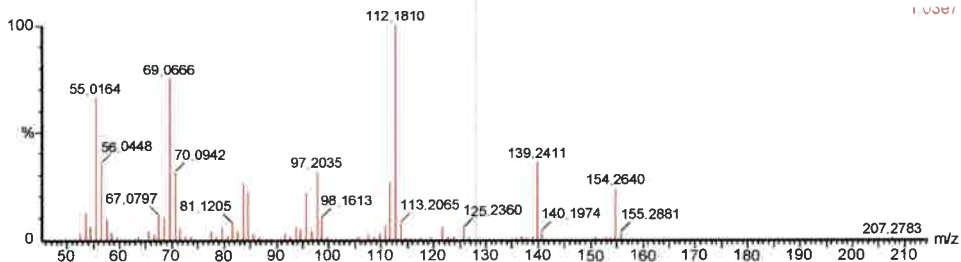
ocimeno



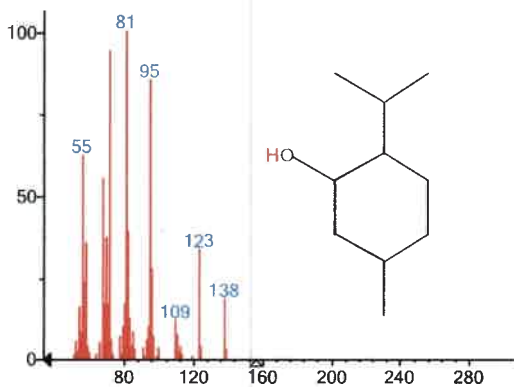
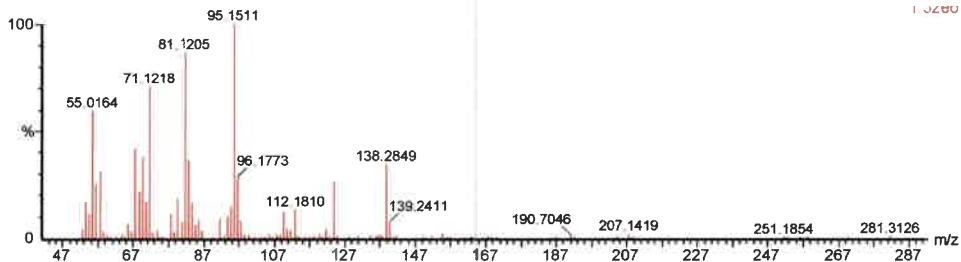
mentona



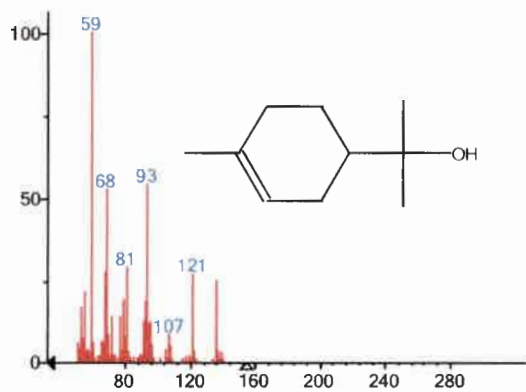
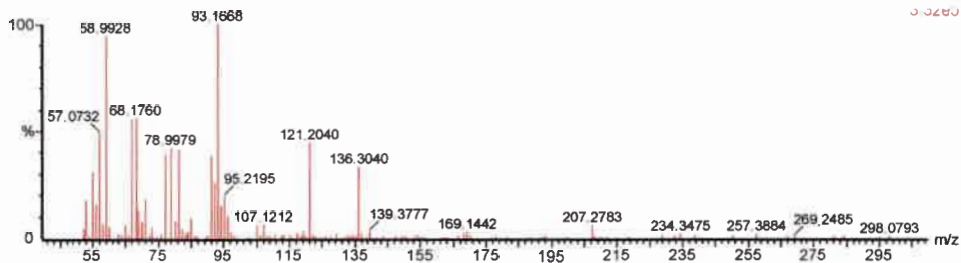
isomentona



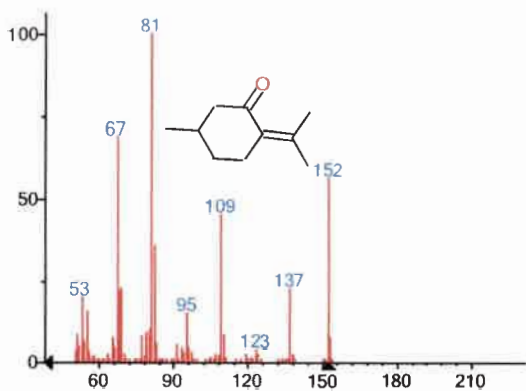
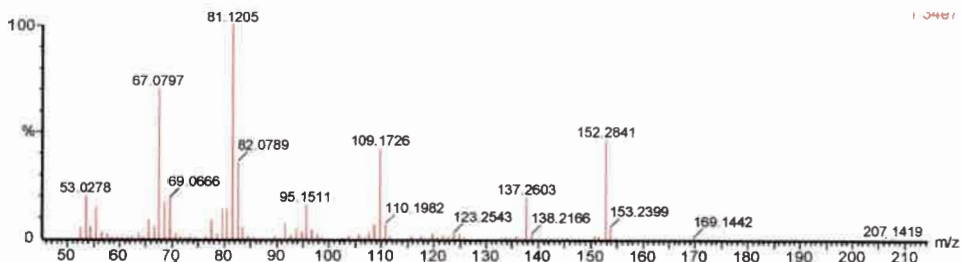
mentol



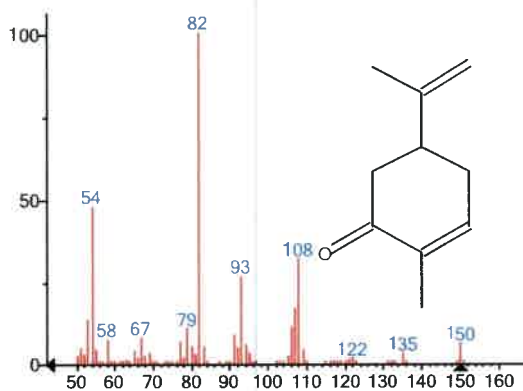
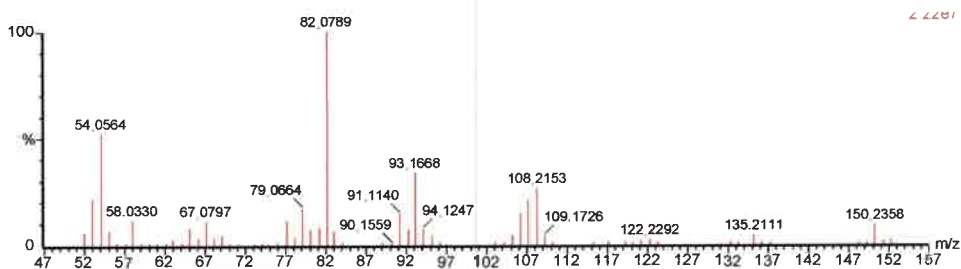
α-terpineol



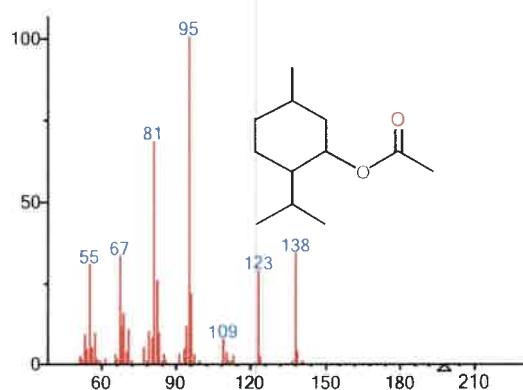
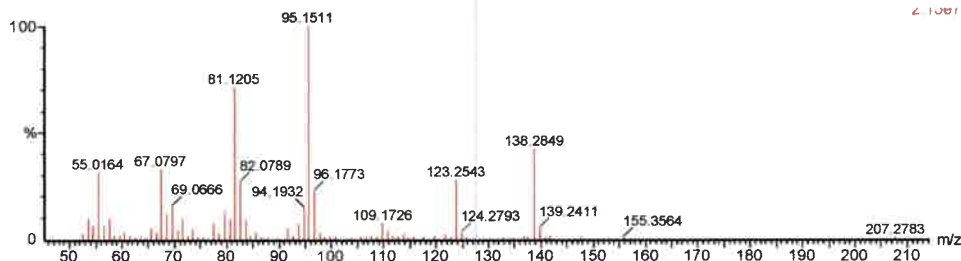
pulegona



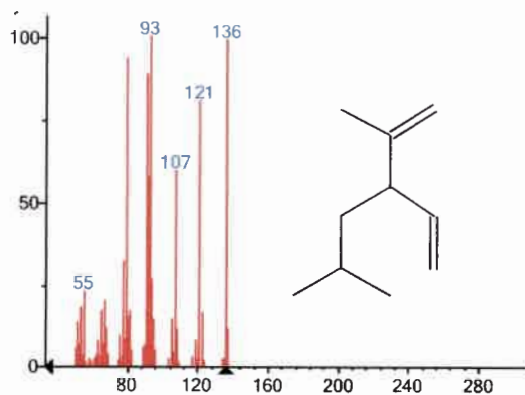
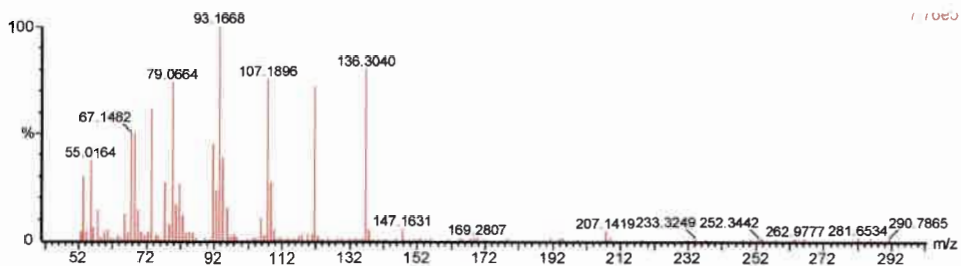
carvona



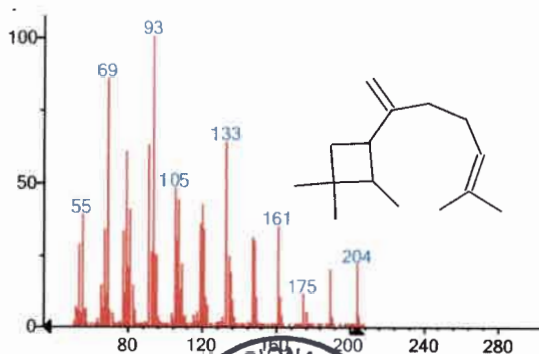
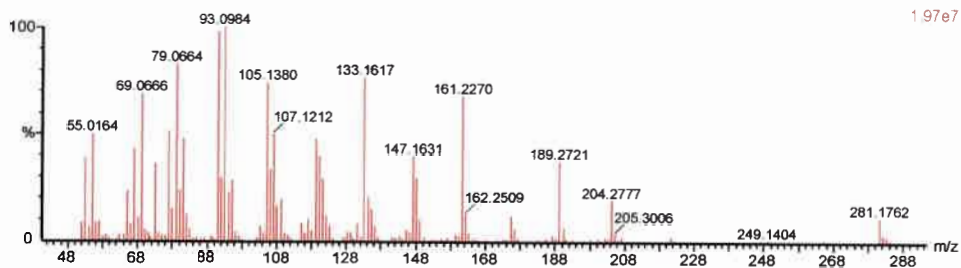
mentil acetato



trans-isolimonoeno



β -cariofileno



Bibliografia

- **Afolayan, A. J.; Meyer, J. J. (1997)** The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology* 57: 177-181.
- **Agnese, A. M.; Pérez, C.; Cabrera, J. L. (2001)** *Adesmia aegiceras*: antimicrobial activity and chemical study. *Phytomedicine* 8: 389-394.
- **Ahmad, I.; Agil, F.; Owais, M. (2006)** *Modern Phytomedicine. Turning medicinal plants into drugs.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- **Albo, G.; Carranza, M.; Carimele, E.; Henning, C.; Ré, M. S.; Ringuelet, J.; De Giusti, M. (2003)** Control in vitro de *Ascosphaera apis* con aceites esenciales y biocidas y toxicidad de estas sustancias para *Apis mellifera* L. 26º Congreso Argentino de Producción Animal, Mendoza Argentina.
- **Albo, G. N.; Reyandi, F. G.; Yordáz, M.; Henning, C. (2008)** Toxicidad de aceites esenciales con efectos fungistático sobre *Ascosphaera apis* en larvas y adultos de *Apis mellifera* L. *Veterinaria Cuyana* Año 3 N° 1 y 2.
- **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. (1992)** Characterization of *Bacillus larvae* White, the causal agent of American foulbrood of honeybees. First record of its occurrence in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 24: 67-72.
- **Alippi, A. M. (1995)** Loque Americana, problemática actual en Argentina. *Vida Apícola* 73: 49-53.
- **Alippi, A. M. (1996)** Caracterización de aislamientos de *Paenibacillus larvae* mediante tipo bioquímico y resistencia a oxitetraciclina. *Revista Argentina de Microbiología* 28: 197-203.
- **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. (1997)** Background of American foulbrood in Argentina. *Bee World* 78 (2): 92-95.
- **Alippi, A. M.; Albo, G.; Leniz, D.; Rivera, I.; Zanelli, M.; Roca, A. (1999)** Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American foulbrood of honeybees. *Journal of Apicultural Research* 38: 149-158.

- **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. *Journal of Invertebrate Pathology* 91: 141-146.
- **Alippi, A. M.; De Graaf, D. C.; Brown, M.; Evans, J. D.; Feldlaufer, M.; Gregorc, A.; Hornitzky, M.; Pernal, S. F.; Schuch, D. M.T.; Titera, D.; Tomkies, V.; Ritter, W. (2006)**. Diagnostic of American Foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology* 43: 583-590.
- **Alippi, A. M.; López, A. C.; Reynaldi, F.J.; Grasso, D. H.; Aguilar, O. M. (2007)** Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of a honey bee larval disease. *Veterinary Microbiology* 125: 290-303.
- **Alkire, B. H.; Tucker, A. O.; Maciarello, M. J. (1994)** Tipo *Minthostachys mollis* (Laminaceae): an Ecuadorian mint. *Economic botany* 48: 60-64
- **Amat, A. G.; Yajía, M. E. (1998)** Plantas vasculares utilizadas en la fitoterapia popular de la provincia de Misiones (Argentina). *Farmacobotánica y Farmacognosia en Argentina (1980-1998)*. La Plata. pág: 136.
- **Amorín, J. L. (1988)** Guía taxonómica de plantas de interés farmacéutico. Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal.
- **Anesini, C.; Perez, C. (1993)** Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 39: 119-128.
- **Antúnez, K.; Harriet, J.; Gende, L.; Maggi, M.; Eguaras, M.; Zunino, P. (2008)** Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Veterinary Microbiology* 131: 324-331.
- **Antúnez, K.; Anido, M.; Arredondo, D.; Evans, J. D.; Zunino P. (2010)** Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Veterinary Microbiology* 141: 385-389.
- **Antúnez, K.; Anido, M.; Arredondo, D.; Evans, J. D.; Zunino P. (2011)** *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. *Veterinary Microbiology* 147: 83-89.
- **Arias, M. E.; Gomez, J. D.; Cudmani, N. M.; Vattuone, M. A.; Isla, M. I. (2004)** Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. *Life Sciences* 75: 191-202.
- **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* 8(5): 389-401.

- **Arredondo M. F.; Blasina, F.; Echeverri, C.; Morquio, A.; Ferreira, M. M Abin-Carraquiry, J. A.; Lafon, L.; Dajas, F. (2004)** Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology* 91: 13-20.
- **Ash, C.; Priest, F. G.; Collins, M. D. (1993)** Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64: 253–260.
- **Bachanova, K.; Klaudiny J.; Kopernicky, J.; Simuth, J. (2002)** Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 33: 259-269.
- **Bailey, L. (1984)** Bacterias. *Patología de las abejas*. Cap. 4: 28-43. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- **Bailey, L.; Ball, B. V. (1991)** *Honey Bee Pathology*. 2º edición, pág:193. Academic Press; London, UK.
- **Bamba, D. E.; Bessiere, J. M.; Pélisser, Y.; Fourasté, I. (1993)** Essential oils of *Eupatorium adoratam*. *Planta Médica* 59: 184-185.
- **Bandoni, A. (2000)** Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica: Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores 1: 13-29. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- **Barboza, G. E.; Cantero, J. J.; Núñez, C., Ariza Espinar L. (2006)**. Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina). Pteridófitas y antofitas silvestres o naturalizadas. Editorial del Museo Botánico, Córdoba.
- **Barrio Alonso, G.; Roque Quinteros, A.; Arias, M. (2001)** Estudio comparativo de la capacidad inactivante de distintas colectas de la planta *Phyllanthus orbicularis*. *Revista Cubana. Plantas Medicinales* 3: 83-86.
- **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*. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 273–281.
- **Bilikova, K.; Wu, G.; Simuth, J. (2001)** Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie* 32: 275-283.
- **Bisset, N. G. (1994)** *Herbal drud and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientist basis*. Medpharm Sientific Publishers, Stuttgart, U. K.
- **Bocco, M. E.; Vischi, N.; Montani, N. (1997)** Relevamiento de las plantas medicinales y espontáneas del Departamento Río Cuarto (Cba.) *Parodiana IX*. Buenos Aires.

-
- **Bohlmann, F.; Abraham, W. R.; Robinson, H.; King, R.M. (1980)** A new labdane derivative and geranylphloroglucinols from *Achyrocline alata*. *Phytochemistry* 19: 2475-2477.
 - **Bosio, K.; Avanzini, C.; D'Avolio, A.; Ozino, O.; Savoia, D. (2000)** In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 31: 174-177.
 - **Bounous, C.; Boga, V. (2005)**. Fundamentos para el control de Varroa y Loque Americana. Editado por la Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA. Boletín de Divulgación 87: 1-41.
 - **Brandelli, C. L. C.; Giordani, R. B.; De Carli, G. A.; Tasca, T. (2009)** Indigenous traditional medicine: in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitology Research* 104:1345-1349.
 - **Broussalis, A.; Ferraro, G.; Gurni, A.; Coussio, J. (1989)** Aspectos fitoquímicos de especies argentinas del género *Achyrocline*. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 8: 11-16.
 - **Broussalis, A.; Ferraro, G.; Coussio, J. (1993)** Phenolic constituents of *Achyrocline alata*. *Biochemical Systematics and Ecology* 21: 306.
 - **Bruneton, J. (1991)** Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. *Technique et Documentation - Lavoisier*: 157-172. Acribia, Zaragoza. España.
 - **Bruneton, J. (2001)** Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2ª Edición. Acribia, Zaragoza. España.
 - **Bruno, S. B. (1999)** Enfermedades en la Etapa Larval: Loque Americana. *Ciencia y Abejas* 29: 2-7.
 - **Burt, S. (2004)** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
 - **Cafarchia, C.; De Laurentis, N.; Milillo, M. A.; Losacco, V.; Puccini, V. (1999)** Antifungal activity of Apulia region propolis. *Parassitologia* 41: 587-590.
 - **Calderone, N. W.; Shimanuki, H.; Allen-Warden, G. (1994)** *Journal of Essential Oil Research* 6: 279-287.
 - **Calvo, D.; Cariddi, L. N.; Grosso, M.; Demo, M. S.; Maldonado, A. M. (2006)** *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): Antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. and immunomodulating effects on human lymphocytes. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48: 247-255.

- **Cariddi, L. N.; Sabini, L. I.; Maldonado, A. M. (2005)** Propiedades inmunológicas y mitogénicas de productos derivados de *Minthostachys verticillata* sobre linfocitos de niños alérgicos con infección viral. Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 36: 35-40.
- **Cariddi, L. N.; Panero, A.; Demo, M.; Grosso, M.; Zygadlo, J.; Sabini, L.; Maldonado, A. M. (2007)** Inhibition of immediate-type allergic reaction by *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling essential oil. Journal Essential Oil Research 19: 190-196.
- **Cariddi, L.; Moser, M.; Andrada, M.; Demo, M.; Zygadlo, J.; Sabini, L.; Maldonado, A. M. (2009)** The effect of *Minthostachys verticillata* essential oil on the immune response of patients allergic to dust mites. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 8(3): 224-233.
- **Cesari, A. (2011)** Uso de extractos vegetales frente a *Paenibacillus larvae*, como alternativa en el tratamiento de Loque Americana. Tesis de grado para optar al título de Microbióloga. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- **Chomnawang, M. T.; Surassmo, S.; Wongsariya, K.; Bunyapraphatsara, N. (2009)** Antibacterial Activity of Thai Medicinal Plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fitoterapia 80: 102-104.
- **Ciccia, G.; Coussio, J.; Mongelli, E. (2000)** Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. Journal of Ethnopharmacology 72: 185-189.
- **Colin, M.E.; Ducos de Lahitte, J.; Larribau, E.; Boue, T. (1989)** Activite des huiles essentielles de Labies sur *Ascosphaera apis* et traitement den rucher. Apidologie 20: 221-228.
- **Collins, C. H.; Lyne, P. M.; Grange, J. M. (1999)** Microbiological Methods. Cap.: 12 Antimicrobial susceptibility tests. 7º edición. Editorial Butterworth Heinemann.
- **Consolini, A. E.; Ragone, M. I.; Tambussi, A.; Paura, A. (2007)** Estudio Observacional del Consumo de Plantas Medicinales en La Provincia de Buenos Aires, Argentina, en el Periodo Diciembre de 2004-Noviembre de 2005. Latin American Journal of Pharmacy 26(6): 924-936.
- **Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S. L.; Duke, J. A.; Brielmann, H. L. (2006)** Natural products from Plants. 2º edición. CRC Press. Taylor & Francis Group.

- Deans, S. G.; Noble, R.; Hiltunen, R.; Wuryani, W. Péntzes, L. (1995) Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L): Impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in Agein Mice. *Flavor and Fragrance* 10: 323-328.
- De Feo, V.; Ricciardi, A.L.; Biscardi, D.; Senatore, F. (1998) Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epl. (Laminaceae). *Journal Essential Oil Research* 10: 61-65.
- De Graaf, D. C.; Alippi, A. M.; Brown, M.; Evans, J. D.; Feldlaufer, M.; Gregorc, A.; Hornitzky, M.; Pernal, S. F.; Schuch, D. M. T.; Titera, D.; Tomkies V.; Ritter, W. (2006a) Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology* 43: 583-590.
- De Graaf, D. C.; De Vos, P.; Heyndrickx, M.; Van Trappen, S.; Peiren, N.; Jacobs, F.J. (2006b) Identification of *Paenibacillus larvae* to the subspecies level: an obstacle for AFB diagnosis. *Journal of Invertebrate Pathology* 91: 115-123.
- De la Sota, M.; Bacci, M. (2004). *Manual de procedimientos: Enfermedades de las Abejas*. Dirección Nacional de Sanidad Animal, Buenos Aires.
- Demetzos, C.; Katerinopoulos, H.; Kouvarakis, A.; Stratigakis, N.; Loukis, A.; Ekonomakis, C.; Spiliotis, V.; Tsaknis, J (1997) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Citrus creticus* subsp. *eriocephalus*. *Planta Medica* 63: 477-479.
- De Pooter, H. L.; Aboutabl, E. A.; El ShaBrawy, O. A. (1995) Chemical composition and antimicrobial activity of essentials oils of leaf, steam and rhizome of *Alpinia speciosa* (J.C. Wendl) K. Schum grown in Egypt. *Flavor and Fragrance Journal* 10: 63-67.
- De Souza, K. C. B.; Schapoval, E. E. S.; Bassani, V. L. (2002) LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *Journal Pharmacology Biomedical Analysis* 28: 771-777.
- De Souza, K. C. B.; Bassani, V. L.; Schapoval, E. E. S. (2007) Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine* 14: 102-108.
- Devi, K. P.; Nisha, S. A.; Sakthivel, R.; Pandian, S. K. (2010) Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology* 130 (1): 107-115.
- Di Mayuga, R.E.; Keer-García, S. (1991) Antimicrobial screening of Medicinal plants from Baja California Sur, México. *Journal of Ethnopharmacology* 31: 181-192.

- **Dimitri, M. J. (1980)** Descripción de las especies cultivadas en la Argentina. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. pág: 925. Editorial ACME, Buenos Aires.
- **Dingman, D. W.; Stahly, D. P. (1983)** Medium Promoting Sporulation of *Bacillus larvae* and Metabolism of Medium Components. Applied and Environmental Microbiology 46: 860-869.
- **Donaldson, J. R.; Warner, S. L.; Cates, R. G.; Young, D. G. (2005)** Assessment of antimicrobial activity of fourteen essential oils when using dilution and diffusion methods. Pharmaceutical Biology 43: 687-695.
- **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*. Journal Essential Oil Research 17: 336-340.
- **El-Sakhawy, F.; Tantawy, M.; Ross, A.; El Sohly, A. (1998)** Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Murraya exotica* L. Flavor and Fragrance Journal 13: 59-62.
- **Evans, J. D. (2003)** Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology 83: 46-50.
- **Evans, J. D. (2004)** Transcriptional immune response by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology 85:105-111.
- **Evans, J. D.; Lopez, D. L. (2004)** Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). Journal of Economic Entomology 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. Journal of Apicultural Research 44: 168-171.
- **Evans, J. D.; Armstrong, T. N. (2006)** Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. BMC Ecology 6: 4.
- **Ferraro, G. E.; Norbed, C.; Cussio, J. D. (1981)** Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. Phytochemistry 20: 2053-2054.
- **Fester, G. A.; Gargallo, M. A.; Martinuzzi, E. A. (1950)** Algunas esencias volátiles de San Luis y Córdoba. Revista de la Facultad de Química Industrial y Agrícola. Santa Fe, Argentina 18: 3-22.

- **Fester, G. A.; Martinuzzi, E. A. (1950)** La esencia de peperina. 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)** Sustancias 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. Revista de la Facultad Ingeniería Química Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina 29: 21-44.
- **Finelgold, S. M.; Baron, E. J. (1992)** Diagnóstico Microbiológico. Cap.: 36 Determinación de la susceptibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos; ensayos de agentes antimicrobianos. 7  edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- **Flesar, J.; Havlik, J.; Kloucek, P.; Rada, V.; Titera, D.; Bednar, M.; Stropnický, M.; Kokoska, L. (2010)** *In vitro* growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. Veterinary Microbiology 145: 129-133.
- **Floris, L.; Carta, C. (1990)** In vivo activity of *Cinnamomum zeylanicum* nees essential oil against *Bacillus larvae* White. Apicultura 6: 57-61.
- **Fournet, A.; Rojas de Arias, A.; Charles, B.; Bruneton, J. (1996)** Chemical constituents of essential oils of Mu a, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas disease vectors. Journal of Ethnopharmacology 52: 145-149.
- **Friedman M.; Henika, P.; Levin, E.; Mandrell, R. (2004)** Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 6042-6048.
- **Fuentes Fiallio, V.; Mendes, G.; Rodríguez Ferrara, C.; Soler, B.; González, R.; López, E. (2001)** Din mica de acumulaci n mensual y diaria de alcaloides y flavonoides en *Passiflora incarnata* L. Revista Cubana. Plantas Medicinales 3: 105-11.

- **Furtado, .N. A. J. C.; Vieira Fonseca, M. J.; Bastos, J. K. (2005)** The potential of an *aspergillus fumigatus* brazilian strain to produce antimicrobial secondary metabolites. Brazilian Journal of Microbiology 36: 357-362.
- **Fuselli, S. R.; Gende, L. B.; García d la Rosa, S. B.; Eguaras, M. J.; Fritz, R. (2005)** Inhibition of *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* by essentials oils of two wild plants and their emulsifying agents. 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. (2006a)** Antimicrobial activity of some Argentinean wild plant essential oils against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American foulbrood (AFB). Journal of Apicultural Research 45: 2-7.
- **Fuselli, S. R.; García de la Rosa, S. B.; Gende, L. B.; Eguaras, M. J.; Fritz, R. (2006b)** Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. Revista Argentina de Microbiología 38: 89-92.
- **Fuselli, S. R.; García 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 seriphoides* A. Gray) to control American foulbrood (AFB) in honey bee (*Apis mellifera* L.) hives. Journal Essential Oil Research 19: 514-519.
- **Fuselli, S. R.; García de la Rosa, S. B.; Eguaras, M. J.; Fritz, R. (2008a)** Susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* to essential oils distilled from exotic and indigenous Argentinean plants. Journal Essential Oil Research 20: 464-470.
- **Fuselli, S. R.; García de la Rosa, S. B.; Eguaras, M. J.; Fritz, R. (2008b)** Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. World Journal Microbiology and Biotechnology 24: 2067-2072.
- **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 Varroa destructor. Journal of Apicultural Research 48: 77-78.
- **Gattuso, M.; Cortadi, A.; Rodriguez, M. V.; Mc Cargo, J.; Retta, D.; Bandoni, A.; Ferraro, G.; Gattuso, S. (2008)** Caracteres florales en la identificación de *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline flaccida* y *Gnaphalium gaudichaudianum* (Asteraceae-Inuleae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 7: 190-198.

- **Gende, L. B.; Floris, I.; Fritz, R.; Eguaras, M. J. (2008)** Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oils and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentine. Bulletin of Insectology 61: 1-4.
- **Gende, L. B.; Maggi, M. D.; Damiani, N.; Fritz, R.; Eguaras, M. J.; Floris, I. (2009)** Advances in the apiary control of the honeybee American Foulbrood with Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil. Bulletin of Insectology 62(1): 93-97.
- **Genersch, E.; Forsgren, E.; Pentikäinen, 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. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 56: 501-511.
- **Genersch, E. (2010)** American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology 103: 10-19.
- **Gillij, Y. G.; Gleiser, R. M.; Zygodlo, J. A. (2008)** Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. Bioresource Technology 99: 2507-2515.
- **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.
- **González, M. J.; Marioli, J. M. (2010)** Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. Journal of Invertebrate Pathology 104: 209-213.
- **González Pereyra, M. L.; Cariddi, L. N.; Ybarra, F.; Isola, M. C.; Demo, M. S.; Sabini, L.; Maldonado, A. M. (2005)** Immunomodulating properties of *Minthostachys verticillata* on human lymphocytes and basophils. Revista Alergia México 52: 105-112.
- **Goodwin, R. M. (1994)** Detection of American Foulbrood using the plate culture technique. Laboratory manual.
- **Govan, V. A.; Allsopp, M. H.; Davison, S. (1999)** A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. Applied and Environmental Microbiology 65: 2243-2245.
- **Grange, J. M.; Davey, R. W. (1990)** Antibacterial properties of propolis (bee glue). Journal of the Royal Society of Medicine 83: 159-60.
- **Gu, L.; Wu, T.; Wang, Z. (2009)** TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. LWT - Food Science and Technology 42: 131-136.

- **Hammer, K.; Carson, C.; Riley, T. (1999)** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86: 985-990.
- **Hansen, H.; Brodsgaard, C. (1999)** American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and bee control. *Bee World* 80: 5-23.
- **Harborne, J. B; Baxter, H. (1995)** The handbook of natural flavonoids, Volumen 1 y 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- **Harborne, J. B, Williams, C. A. (2000)** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- **Haseman, L. (1961)** How long can spores of American Foulbrood live? *American Bee Journal* 101: 298-299.
- **Havsteen, B. (1983)** Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemistry Pharmacology* 32: 1141–1148.
- **Hegazi, A. G; Abd El Hady, F. K, Abd Allah, F. A. (2000)** Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch* 55: 70-75.
- **Heyndrickx, M.; Vandemeulebroecke, K.; Hoste, B.; Janssen, P.; Kersters, K.; de Vos, P.; Logan, N. A.; Ali, N.; Berkeley, R. C. W. (1996)** Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later 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*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 270-279.
- **Hornitzky, M. A. Z.; Karlovskis, S. (1989)** A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. *Journal of Apicultural Research* 28 (2): 118-120.
- **Imdorf, A.; Kilchenmann, V.; Maquelin, C.; Bogdanov, S. (1994)** Optimierung der Anwendung von "Apilife Var" zur Bekämpfung von *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 25: 49-60.
- **Jasmine, N.; Daisy, P.; Selvakumar, B. N. (2007)** Evaluating The Antibacterial Activity of *Elephantopus scaber* Extracts on Clinical Isolates of B-lactamase Producing Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from UTI Patients. *International Journal of Pharmacology* 3: 165-169.
- **Jean-Prost, P.; Medori, P.; Le Conte, Y. (2007)** Apicultura. Conocimiento de la abeja. Manejo de las colmenas. 4° edición. Madrid. pág: 47.
- **Karaman, S. (2006)** Morphogenetic variation for essentials oils in *Salvia palaestina* Benthian leaves and bracts from Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9(14): 2720-2723.

- **Katznelson, H. (1950)** *Bacillus pulvifaciens* (n. Sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *Journal of Bacteriology* 59: 153-155.
- **Koneman, E. W. (1999)** Diagnóstico Microbiológico. Cap.: 15 Pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos. 5° edición. Editorial Médica Panamericana.
- **Kraus, B.; Koeniger, N.; Fuchs, S. (1994)** Screening of substances for their effect on *Varroa jacobsoni*: attractiveness, repellency, toxicity and masking effects of ethereal oils. *Journal of Apicultural Research* 33: 34-43.
- **Lamaty, G.; Menut, Ch.; Bessiere, J. M.; Schenkel, E. P.; Dos Santos, M. A.; Bassani, V. (1991)** The chemical composition of some *Achyrocline satureioides* and *Achyrocline alata* oils from Brazil. *Journal of Essential Oil Research* 5: 317-321.
- **Lauro, F. M.; Favaretto, M.; Covolo, L.; Rasso, M.; Bertoloni, G. (2003)** Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology* 81: 195-201.
- **Leal, P. F.; Queiroga, C. L.; Rodrigues, M. V. N.; Montanari, I.; Meireles; M. A. A. (2006)** Global Yields, Chemical Compositions, and Antioxidant activities of extracts from *Achyrocline alata* and *Achyrocline satureioides*. *Pharmacognosy Magazine* 2: 153-159.
- **Litter, M. (1980)** Farmacología experimental y clínica, 6° edición. Editorial El Ateneo. pág: 1953.
- **López, A. C.; De Ortúzar, R. V. M.; Alippi, A. M. (2008)** Tetracycline and oxytetracycline resistance determinants detected in *Bacillus cereus* strains isolated from honey samples. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 231-236.
- **Maldonado, A. M.; Calvo, D.; Cariddi, L. N.; Demo, M. (2001)** Efectos linfoproliferativos y antimicrobianos de productos vegetales derivados de *Mintostachys verticillata* y *Achyrocline satureioides*. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* 32: 82.
- **Mann, C. M.; Markham, J. L. (1998)** A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84: 538-544.
- **Martínez, G. J. (2005)** Recolección y Comercialización de Plantas Medicinales en el Departamento Santa María, Provincia de Córdoba, Argentina. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 24(4): 575-84.
- **Mathenson, A. (1993)** World bee health report. *Bee World* 74 (4): 176-212.
- **Middleton, E.; Chithan, K. (1993)** The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB, editor. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall.

- **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.
- **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. Journal of Invertebrate Pathology 75: 95-96.
- **Mongelli, E.; Desmarchelier, C.; Coussia, G. (1995)** Actividad antimicrobiana e interacción con el ADN de plantas medicinales de la Amazonia Peruana. Revista Argentina de Microbiología 27: 199-203.
- **Morse, R. A.; Shimanuki, H. (1990)** Summary of control measures. Honeybee pest, predators and diseases. Comstock Publishing, Cornell New York, USA, 341-361.
- **Morse, R. A.; Flottum, K. (1997)** Honey bee pests, predators and diseases. Root Co, Medina, Ohio, pág: 718.
- **Nordstrom, S.; Fries, I. (1995)** A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. Journal of Apicultura Research 34 (2): 97-103.
- **Núñez, C.; Cantero J. (2000)** Las plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. Ed. de la Universidad Nacional de Río Cuarto.
- **Ojeda; M., Coirini, R.; Cosiansi, J.; Zapata, R.; Zygadlo, J. (2001)** Evaluation of variability in natural populations of peperina (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.), an aromatic species from Argentina. Plant Genetic Resources Newsletter 126: 27-30.
- **Oliva, M. M. (2007)** Estudios comparativos en la composición química y actividad biológica de aceites esenciales de plantas medicinales de Argentina. Tesis de doctorado para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- **Olofsson, T. C.; Vasquez, A. (2008)** Detection and identification of a nivel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. Current Microbiology 57: 356-363.
- **Olsen, P. E.; Grant, G. A.; Nelson, D. L.; Rice, W. A. (1990)** Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. Canadian Journal of Microbiology 36: 732-735.
- **Otte, E. (1973)** Contribution to the laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with particular reference to the fluorescent antibody technique. Apidologie 4 (4): 331-339.

- Palacios, S. M.; 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.). *Parasitology Research* 106(1): 207-212.
- Palomino, O. (2001) Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria.
- Parrillo, S.; Manini-Ríos, J. J.; Echeverry, S. (1999) *Acta Horticulturae* 501: 125.
- Peng, Y. S.; Peng, K. Y. (1979) A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as diagnostic methods for American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 33:284-289.
- Pereira, J. V.; Baldoqui Bergamo, D. C.; Pereira, J. O.; França, S. C.; Rodrigues Prieto, R. C. L.; Silva-Sousa, Y. T. (2005) Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. *Brazilian Dental Journal* 16(3): 192-196.
- 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.
- Petenatti, E. M.; Nievas, C. M.; Petenatti, M. E.; Del Vitto, L. A. (2004) Medicamentos herbarios en el centro-oeste Argentino, IV. "Marcelas" y "vira-viras" en muestras comerciales. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 23(4): 484-491.
- Poloni, V. (2009) Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima de antibióticos de uso frecuente en apicultura. Tesis de grado para optar al título de Microbióloga. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Polydoro, M.; de Souza, K. C. B.; Andrades, M. E.; Da Silva, E. G.; Boniato, F.; Heydrich, J.; Dal-Pizzol, F.; Schapoval, S.; Basan, V. L.; Moreira, J. C. F. (2004) Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences* 74: 2815-2826.
- Pomar, S. (1993) Contenido y variación del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling en distintos órganos y épocas del año. Tesis de grado para optar al título de Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Primo, V.; Rovera, M.; Zanon, S.; Oliva, M.; Demo, M.; Daghero, J.; Sabini, L. (2001) Determinación de la actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb). *Revista Argentina de Microbiología* 33: 113-117.

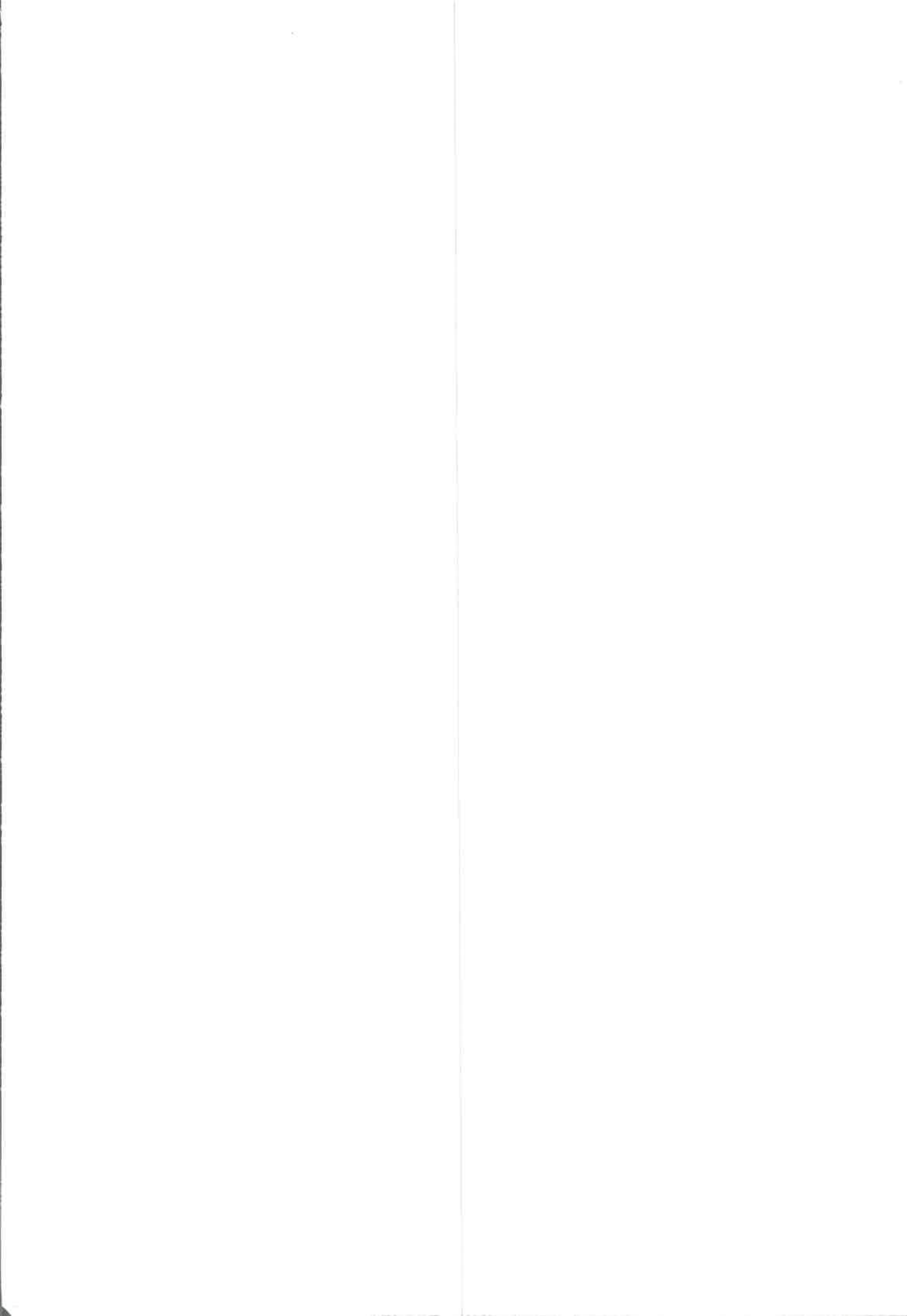
- Puhlmann, J.; Knaus, U.; Tubaro, L.; Schaefer, W.; Wagner, H. (1992) Immunologically active metallic ioncontaining polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry* 31: 2617-2621.
- Ratera, E. L.; Ratera, M. O. (1980) Plantas que curan. Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. *Hemisferio Sur*. pág: 43-85. Buenos Aires.
- Reichling, J.; Schnitzler, P.; Suschke, U.; Saller, R. (2009) Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties. An overview. *Forsch Komplementmed* 16: 79-90.
- Retamar, J. (1988) Phytochemical modifications in aromatic species. International conference on Essential oils, flavours, fragrances and cosmetics. Peking, China. 202-216.
- Retta, D.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Di Leo Lira, P.; Van Baren, C.; Ferraro, G.; Bandoni, A. (2009) Essential oil composition of *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. (Asteraceae) from different locations of Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 877-881.
- Retta, D.; Fernandez Penuto, R.; Correa, M.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Arnaldo Bandoni, A. (2010) Diferenciación de las especies *Achyrocline satureioides*, *A. flaccida* y *Gnaphalium gaudichaudianum* por sus perfiles cromatográficos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(2):93-99.
- Reynaldi, F. J.; Alippi, A. M. (2006) Optimización del desarrollo de *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae* en medios semi-selectivos. *Revista Argentina de Microbiología* 38: 69-72.
- Reynaldi, F. J.; Albo, G. N.; Alippi, A. M. (2008) Effectiveness of tilmicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease of honeybees. *Veterinary Microbiology* 132: 119-128.
- Roberts, M. C. (1996) Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *Microbiological Reviews* 19: 1-24.
- Roberts, M. C. (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *Microbiology Letters* 245: 195-203.
- Rojas, L. B.; Usubillaga, A. N (1995) Essential oil of *Minthostachys mollis* Grisebach from Venezuela. *Journal of Essential Oil Research* 7: 211-213.
- Ruffinengo, S.; Eguaras, M.; Floris, I.; Faverin, C.; Bailac, P.; Ponzi, M. (2005) LD₅₀ and Repellent Effects of Essential Oils from Argentinian Wild Plant Species on *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology* 98(3): 651-655.

- Ruffinengo, S. R.; Maggi, M.; Fuselli, S.; Floris, I.; Clemente, G.; Firpo, N. H.; Bailac, P. N.; Ponzi, M. I. (2006) Laboratory Evaluation of *Heterothalamus alienus* Essential Oil Against Different Pests of *Apis mellifera*. *Journal of Essential Oil Research* 18: 704-707.
- Sabini, M. C.; Cariddi, L. N.; Escobar, F. M.; Aguilar, J. J.; Tonn, C. E.; Contigiani, M. S.; Sabini, L. I. (2010) Action of extracts obtained with organic solvents from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling on viability of *Herpes simplex* Type 1 virus (HSV-1). *Molecular Medicinal Chemistry* 21: 84-87.
- Samuelsson, G. (1999) Drug of natural origin. A textbook of Pharmacognosy. 4^o edición. Editorial Apotekarsiceteten. Estocolmo, Suecia.
- Sartoratto, A.; Machado, A. L.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C.; Rehder, V. L. (2004) Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 35: 275-280.
- Sawaya, A. C. H. F.; Souza, K. S.; Marcucci, M. C.; Cunha, I. B. S.; Shimizu, M. T. (2004) Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 35: 104-109.
- Schmidt-Lebuhn, A. N. (2008a) Revision of the genus *Minthostachys* (Labiatae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 98: 1-77.
- Schmidt-Lebuhn, A. N. (2008b) Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 118: 343-353.
- Scorzoni, L.; Benaducci, T.; Fusco Almeida, A. M.; Siqueira Silva, D. H.; Vanderlan da Silva, B.; Soares Mendes Gianinni, M. J. (2007) The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 391-397.
- Senatore, F.; De Feo, V. (1995) Flavonoid glycosides from *Minthostachys spicata* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 23: 573-574.
- Shai, L. J.; McGaw, L. J.; Masoko, P.; Eloff, J. N. (2008) Antifungal and antibacterial activity of seven traditionally used South African plant species active against *Candida albicans*. *South African Journal of Botany* 74: 677-684.
- Shai, L. J.; McGaw, L. J.; Eloff, J. N. (2009) Extracts of the leaves and twigs of the threatened tree *Curtisia dentate* (Cornaceae) are more active against *Candida albicans* and other microorganisms than the stem bark extract. *South African Journal of Botany* 75: 363-366.

- **Shimanuki, H. (1990)** Bacteria. En: Honeybee pest, predators and diseases. Cornell University Press, Ithaca, USA 27-47.
- **Sikkema, J.; De Bont, J. A.; Poolman, B. (1995)** Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59: 201-222.
- **Simões, C. M. O; Schenkel, E. P.; Bauer, L.; Langeloh, A. (1988)** Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC., Compositae, *Journal of Ethnopharmacology* 22: 281-293.
- **Sneath, P. H. A. (1989)** Endospore-forming Gram positive rods and cocci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Cap. 13: 1104-1125.
- **Soraru, S. B; Bandoni, A. L. (1994)** Labiadas. *Plantas de la Medicina Popular Argentina*. pág: 62-64. Buenos Aires.
- **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.
- **Stalhy, D.; Andrews, R.; Yousten, A. (1992)** The genus *Bacillus*. *Insect Pathogens. The prokaryotes (Vol. II)*, Cap. 77: 1706-1711. Ed. Springer-Verlag.
- **Tassou, C.; Drosinos, E.; Nychas., G. (1995)** Effect of Essential Oil from mint on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 593-600.
- **Taylor, L. (2005)** *The Healing Power of Rainforest Herbs. A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals*. Square One Publishers.
- **Tepe, B.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Sokmen, M.; Polissiou, M. (2005)** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 90: 333-340.
- **Thompson, T. S.; Pernal, S. F.; Noot, D. K.; Melathopoulos, A. P.; Van den Heever, J. P. (2007)** Degradation of incurred tylosin to desmycosin – Implications for residue analysis of honey. *Analytica Chimica Acta* 586: 304-311.
- **Tolozá, A. C.; Zygadlo, J.; Mougabure Cueto, G.; Biurrún, F.; Zerba, F.; Picollo, M. I. (2006)** Fumigant and Repellent Properties of Essential Oils and Component Compounds Against Permethrin-Resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *Journal of Medical Entomology* 43(5): 889-895.

- **Toshkov, A.; Valarianov, T.; Tomov, A. (1970)** The immunofluorescence method and the quick and specific diagnosis of American foulbrood of bee brood (in German). Bulletin of Apiculture 13: 13-18.
- **Toursarkissian. (1980)** Plantas medicinales de la Argentina, sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica. Ed. Emisferio Sur SA. Argentina. pág 177.
- **Turgis, M.; Han, J.; Caillet, S.; Lacroix, M. (2009)** Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. Food Control 20: 1073–1079.
- **Villar del Fresno, A. M. (1999)** Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España.
- **Vogt; M. V.; Sutil, S. B.; Escobar, F. M.; Sabini, M. C.; Cariddi, L. N.; Torres, C. V.; Zanon, S. M.; Sabini, L. I. (2010)** *Minthostachys verticillata* essential oil and its major components: antiherpetic selective action in HEp-2 cells. Molecular Medicinal Chemistry 21: 177-120.
- **Walsh, S. E.; Maillard, J. Y.; Russel, A. D.; Catrenich, C. E.; Charbonneau, D. L.; Bartolo, R. G. (2003)** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. Journal of Applied Microbiology 94: 240-247.
- **Wedenig, 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, G. F. (1906)** The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. USDA, Bureau of Entomology, Technical Series, 14: 1-50.
- **Wong, P. Y.; Kitts, D. D. (2006)**. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. Food Chemistry 97: 505-515.
- **Ybarra, F. (2004)** Influencia de la época de recolección de *Minthostachys verticillata* sobre la actividad antibacteriana de su aceite esencial. Tesis de grado para optar al título de Microbiólogo. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- **Zampini, I. C.; Vattuone, M. A.; Isla, M. I. (2005)** Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. Journal of Ethnopharmacology 102: 450-456.
- **Zampini, I. C.; Cudmani, N.; Isla, M. I. (2007)** Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 41: 385-393.
- **Zanon, S. M.; Ceriatti, F. S.; Rovera, M.; Sabini, L. J.; Ramos, B. A. (1999)** Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. Revista Latinoamericana de Microbiología 41: 59-62.

- **Zhavnenko, V. M. (1971)** Indirect method of immunofluorescence in the diagnosis of fowlbrood (American and European). *Veterinaria* 8:109-111.
- **Zygadlo, J. A.; Maestri, D. M.; Lamarque, A. L.; Guzmán, C. A.; Velasco-Negueruela, A.; Pérez-Alonso, M. J.; García-Vallejos, M. C.; Grosso, N. R. (1996)** Essential oil variability of *Minthostachys verticillata*. *Biochemical Systematic and Ecology* 4: 319-323.
- **Zygadlo, J.A.; Juliani, H.R. (2000)** Bioactivity of essential oil components. *Current topic in phytochemistry* 3: 204-214.



U.N.R.C.
Biblioteca Central



69521

69521