

**RUFFINATTO, LAURA A.**

Actividad antioxidante de fracciones activas de extracto de *Mitochondria verticillata*

**2015 74394**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA**

**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES  
ACTIVAS DE EXTRACTOS DE *Minthostachys  
verticillata* (PEPERINA) FRENTE A *Paenibacillus  
larvae*”**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN INOCUIDAD  
Y CALIDAD DE ALIMENTOS**

**MICROBIOLOGA LAURA ANDREA RUFFINATTO**

**2015**

74394

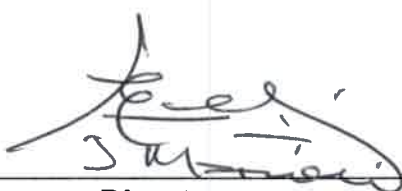
MF
C. 11.
T. 975

Actividad antimicrobiana de fracciones activas de *Mintostachys verticillata* (peperina) frente a *Paenibacillus larvae*.



---

**Maestranda**  
Mic. Laura A. Ruffinatto



---

**Director**  
Dr. Juan M. Marioli

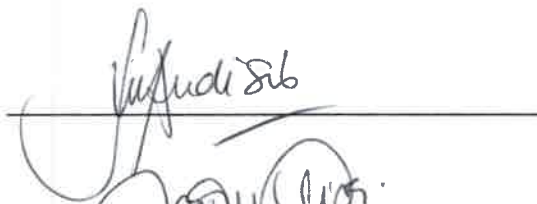


---

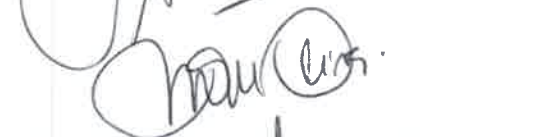
**Co-Directora**  
MsC. Viviana G. Beoletto

TRIBUNAL JURADO DE TESIS

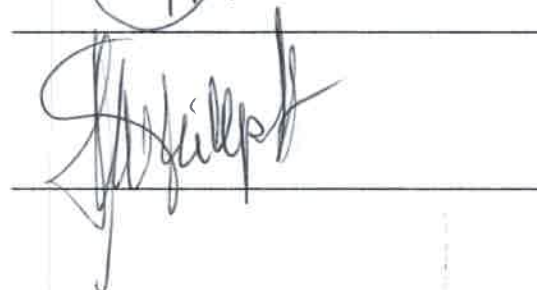
Dra. Marcela Carina Audisio



Dra. María de las Mercedes Oliva



Dra. Stella Maris Chiacchiera



## AGRADECIMIENTOS

*A mi papa y mi hermano, sin su apoyo y cariño me hubiera sido imposible concretar este proyecto.*

*A mi querida amiga Marianela Ponce, con quien compartí, este viaje con todas sus frustraciones y alegrías. Muchas gracias amiga por el apoyo, el cariño... y el alojamiento.*

*Al Dr. Juan Marioli y MsC. Viviana Beoletto por sus conocimientos brindados y su guía para la realización de esta investigación.*

*A M.V Paula Melegatti y M.V Natalia Pereyra, por aportar los conocimientos y las abejas necesarios para realizar el test de toxicidad oral.*

*A la Dra. Marcela Audisio, la Dra. Ma. Mercedes Oliva y la Dra, Stella Chiacchiera por los aportes realizados durante la corrección de este trabajo.*

*Y por último, pero no menos importante, a mis compañeros de cohorte, por las experiencias, conocimientos, debates, tragos y asados compartidos.*

<b>Resumen</b>	VI
<b>Abstract</b>	VII
<b>Introducción</b>	
1. Loque Americana	1
1.1 Características generales	1
1.2 Sintomatología y diagnóstico	2
1.3 Agente causal: <i>Paenibacillus larvae</i>	7
1.4 Transmisión y patogénia	9
2. Control y tratamiento de Loque Americana	11
2.1 Riesgo del uso de antibióticos en el tratamiento de Loque Americana	14
3. Tratamientos alternativos con sustancias antibacterianas naturales	17
3.1 Plantas medicinales	17
3.2 Plantas medicinales en la Provincia de Córdoba	20
3.3 <i>Minthostachys verticillata</i>	21
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	24
<b>Materiales y Métodos</b>	
1. Procedencia y conservación de cepas de <i>Paenibacillus larvae</i>	25
2. Recolección y procesamiento del material vegetal	26
3. Obtención de extracto hexano (EH), benceno (EB) y éter etílico (EE) de <i>M. verticillata</i>	26
4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	27
5. Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)	28
6. Cromatografía en capa delgada (TLC)	29
7. Bioautografía	29
8. Cromatografía tipo flash	30
9. Test de toxicidad aguda en abejas adultas	31
<b>Resultados y Discusión</b>	
1. Material vegetal	33
1.1 Recolección y procesamiento	33
1.2 Obtención de extractos	33
2. Actividad antibacteriana	33
2.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	34
2.1.1 CIM del extracto hexano	34
2.1.2 CIM del extracto éter etílico	35
2.1.3 CIM de oxitetraciclina	37
2.2 Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)	40
2.2.1 CBM del extracto hexano	40
2.2.2 CBM del extracto éter etílico	41

3. Cromatografía en placa delgada (TLC)	43
4. Bioautografía	45
5. Separación de bandas con actividad antimicrobiana	47
6. Actividad antibacteriana de las bandas 0,83 y 0,58	48
7. Determinación de la toxicidad oral aguda del EH en abejas adultas	53
<b>Conclusiones</b>	55
<b>Bibliografía</b>	57
<b>Anexo I: Medios de cultivo, reactivos y solventes</b>	66
<b>Anexo II: Determinación de la LD<sub>50</sub> del dimetoato</b>	68
<b>Anexo III: Tabla de Finney</b>	70

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Procedencia de las cepas de <i>P. larvae</i>	25
<b>Tabla 2:</b> Valores de CIM del EH de <i>M. verticillata</i> frente a cepas de <i>P. larvae</i>	34
<b>Tabla 3:</b> Valores de CIM del EE de <i>M. verticillata</i> frente a cepas de <i>P. larvae</i>	36
<b>Tabla 4:</b> Valores de CIM de OXT frente a cepas de <i>P. larvae</i>	37
<b>Tabla 5:</b> Valores de CBM del EH de <i>M. verticillata</i> frente a cepas de <i>P. larvae</i>	40
<b>Tabla 6:</b> Valores de CBM del EE de <i>M. verticillata</i> frente a cepas de <i>P. larvae</i>	42
<b>Tabla 7:</b> Valores de CIM y CBM del EH y las bandas 0,83 y 0,58	43
<b>Tabla 8:</b> Mortalidad de abejas a distintas concentraciones de dimetoato a las 24 h	68
<b>Tabla 9:</b> Tabla de Finney para la transformación de porcentajes a Probit	70

## INDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Valores de CIM de EH y EE de <i>M. verticillata</i> y OXT frente a <i>P. larvae</i>	39
<b>Gráfico 2:</b> Valores de CBM de EH y EE de <i>M. verticillata</i> frente a <i>P. larvae</i>	41
<b>Gráfico 3:</b> Valores de CIM de EH y las bandas 0,83 y 0,58 frente a cepas de <i>P. larvae</i>	51
<b>Gráfico 4:</b> Valores Probit de Mortalidad vs Log. concentración de Diemtoato	68

## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1-</b> Progresión de larvas infectadas con <i>P. larvae</i>	3
<b>Fig. 2-</b> Sintomatología de Loque Americana	4
<b>Fig. 3-</b> <i>Paenibacillus larvae</i>	8
<b>Fig. 4-</b> Ciclo infeccioso de Loque Americana	11
<b>Fig. 5-</b> Planta de <i>Minthostachys verticillata</i> “peperina”	22
<b>Fig. 6-</b> Obtención de extractos de peperina	27
<b>Fig. 7-</b> Recipiente de poliestireno para recolectar las abejas	32
<b>Fig. 8-</b> Determinación de la CIM del EH	35
<b>Fig. 9-</b> Determinación de la CIM del EE	36
<b>Fig. 10-</b> Determinación de la CBM del EH	41
<b>Fig. 11-</b> Determinación de la CBM del EE	42
<b>Fig. 12-</b> Cromatofólios obtenidos con EH	44
<b>Fig. 13-</b> Bioautografía	47





<b>Fig. 14-</b> Placas de TLC reveladas con yodo	48
<b>Fig. 15-</b> Determinación de la CIM de la banda 0,83	50
<b>Fig. 16-</b> Determinación de la CIM de la banda 0,58	50
<b>Fig. 17-</b> recolección de abejas para el test de toxicidad oral	54

**CBM:** Concentración bactericida mínima.

**CIM:** Concentración inhibitoria mínima.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**EB:** Extracto benceno.

**EE:** Extracto éter etílico.

**EH:** Extracto hexano.

**ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.

**LD<sub>50</sub>:** Dosis letal cincuenta.

**MYPGP:** Medio rico para el cultivo de *P. larvae* (Müller-Hinton, levadura, fosfato, glucosa, piruvato).

**OCDE:** Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos.

**OXT:** Oxitetraciclina.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**SAGPYA:** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos.

**SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

**TLC:** Cromatografía en capa delgada.

**TTC:** Cloruro de 2, 3, 5- trifenil tetrazolio.

**UNRC:** Universidad Nacional de Río Cuarto.

*Paenibacillus larvae* es una bacteria Gram (+), esporulada, agente causal de Loque Americana. Esta es una enfermedad de la larva de la abeja *Apis mellifera*, es muy nociva y altamente contagiosa, causante de grandes pérdidas económicas a los apicultores alrededor del mundo. Diferentes antibióticos han sido utilizados para controlar la Loque Americana, pero su uso tiene importantes desventajas, como la aparición de cepas resistentes, y la presencia de residuos en los productos de la colmena. Por ello es necesario desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de colonias infectadas.

Se sabe que algunos aceites esenciales y extractos derivados de plantas pueden inhibir el crecimiento de *P. larvae*. Estudios previos en nuestro laboratorio muestran que extractos de distintas especies vegetales tienen actividad antibacteriana frente a *P. larvae*. Una de las plantas que mostró mayor actividad es *Minthostachys verticillata* ("peperina"), una especie nativa ampliamente usada en la medicina popular.

El objetivo de esta investigación es desarrollar tratamientos alternativos y no contaminantes para el control de Loque Americana, a partir de extractos de *M. verticillata*.

Para ello utilizamos cepas de *P. larvae* aisladas de apiarios del Departamento Río Cuarto, en la provincia de Córdoba y otras aportadas por INTA Balcarce. *M. verticillata* fue recolectada en el Cerro Pan de Azúcar (31°14'17,72" S 64°25'12,29" O), ubicado en la ciudad de Cosquín, en la provincia de Córdoba. A partir de las plantas secas se obtuvieron extracto hexano (EH), extracto benceno (EB) y extracto éter etílico (EE), por medio de una extracción líquido-líquido. La actividad antibacteriana de estos se analizó con la técnica de microdilución en caldo. El EH fue el más bioactivo con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) entre 0,032 y 0,125 mg/ml, y de concentración bactericida mínima (CBM) entre 0,125 y 0,5 mg/ml.

Por medio de TLC se separaron los componentes del EH, se pudieron observar seis bandas reveladas bajo luz UV y cinco bandas reveladas con yodo. De estas últimas las bandas con Rf 0,83 y Rf 0,58 mostraron actividad antibacteriana frente a *P. larvae* en la prueba de bioautografía. Con el fin de analizarlas individualmente, las bandas 0,83 y 0,58, se separaron con cromatografía en columna tipo flash. Ambas bandas mostraron actividad antibacteriana contra *P. larvae*, pero esta fue mucho menor que la del EH. La banda 0,83 tuvo valores de CIM entre 4 y 8 veces mayores que el EH, y la banda 0,58 tuvo valores de CIM 32 veces mayores que el extracto completo. Esto sugiere la existencia de un efecto sinérgico entre los componentes del extracto.

Dado el potencial del EH como posible antibacteriano para el tratamiento de Loque Americana se decidió evaluar la toxicidad oral aguda de éste en las abejas adultas, y presentó una LD<sub>50</sub> > 200 µd/abeja a las 24 Hs, lo que indica que el extracto no es tóxico para las abejas.

Estos resultados muestran que el EH podría utilizarse como antibacteriano contra *P. larvae*, con la ventaja de que la bacteria no presenta resistencia a éste y que no dejaría residuos peligroso en los productos de la colmena, preservando su inocuidad y calidad. Por ello se debe seguir estudiando este extracto, para determinar en mayor detalle su composición y analizar distintas dosis y formas de administración que hagan eficiente su uso a campo.

*Paenibacillus larvae* is a Gram positive, spore-forming bacterium, and causative agent of American Foulbrood (AFB). This is a disease of honey bees (*Apis mellifera*) brood, which still is among the most deleterious bee diseases, highly contagious, causing considerable economic losses to beekeepers all over the world. 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 hive products. Thus, the development of new strategies to treat AFB infected honeybee colonies is necessary.

Essential oils and extracts of 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 had antibacterial activity against *P. larvae*. Among these plants, *Minthostachys verticillata*, a native specie widely used in natural and popular medicine, was one of the most effective.

The aim of this research is to identify compounds, in different extracts of *M. Verticillata*, with antimicrobial activity against *P. larvae*.

We used strains of *P. larvae* isolated from apiaries in Río Cuarto department (Córdoba), that showed clinical symptoms of the disease, and strains of *P. larvae* provided by INTA Balcarce. *M. verticillata* was collected in Cerro Pan de Azucar (31° 14' 17,72" S, 64° 25' 12,29" O) located in Cosquín, Córdoba province. From a water - alcohol (1:1 v/v) macerate of the dried plants we obtained the hexane extract (HE), benzene extract (BE), and ethyl ether extract (EE) by liquid-liquid extraction. Bioactivity was evaluated by the broth microdilution method. EH had the best antibacterial activity, with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values between 0,032 and 0,125 mg/ml, and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values between 0,125 and 0,5 mg/ml. The MBC/MIC ratio showed that the HE has bacteriostatic activity against *P. larvae*.

Separation by TLC of the components of the HE showed the presence of 6 bands under UV light at 254 nm, and 5 bands revealed with iodine. Two of the last bands (Rf=0,83 and Rf=0,58) showed antibacterial activity with bioautography. In order to analyze them individually, the bands with Rf=0,83 and Rf=0,58 were separated by flash-chromatography. Both bands showed antibacterial activity against *P. larvae*, but this was much lower than that of the whole EH. The band with Rf=0,83 had MIC values between 4 and 8 times higher than EH, and the band with Rf=0,58 had a MIC value 32 times higher than the whole EH. This suggests the existence of synergy between the components of the extract.

Given the potential shown by the EH as possible antibacterial treatment of the AFB, it was decided to evaluate the acute oral toxicity of this extract on adult bees, which showed an LD<sub>50</sub>>200 µg/bee at 24 h indicating that the extract is not toxic to bees.

These results indicate that the EH could be used as an antibacterial agent against *P. larvae*, with the advantage that the bacterium has no resistance to it, and would not leave dangerous residues in bee products, preserving the safety and quality of these. Therefore, it is important to continue studying this extract to determine in greater detail its composition and to analyze different doses and administration ways to make efficient its use in the field.

A decorative horizontal band at the bottom of the page features a repeating pattern of purple hexagons. The hexagons are arranged in a honeycomb-like grid, with some hexagons appearing slightly darker than others, creating a subtle 3D effect. The word "INTRODUCCION" is centered within this band in a white, serif font.

# *INTRODUCCION*

## 1- Loque Americana

### 1.1- Características Generales

Loque Americana, también conocida por su denominación inglesa como "American Foulbrood", es una enfermedad bacteriana que afecta a la abeja doméstica (*Apis mellifera* L.), durante el estado larval, siendo las abejas adultas portadoras asintomáticas pasivas o activas. Su agente causal es *Paenibacillus larvae* [Genersch, 2010].

Ésta es una de las enfermedades más serias e infecciosas de las colmenas, por su alto grado de patogenicidad. No solo mata a las larvas infectadas, sino que también es potencialmente letal para la colonia. La Loque Americana es altamente contagiosa, la diseminación de la enfermedad es facilitada al mantener varias colmenas en un espacio reducido y por el intercambio de abejas reinas, colonias y miel. Además, la enfermedad puede permanecer latente y aparecer de forma repentina debido a factores de estrés, condiciones externas, resistencia genética o causas desconocidas, incluso después de años de creerla erradicada, causando severos daños económicos al sector apícola en muchos países productores de miel [Genersch, 2010].

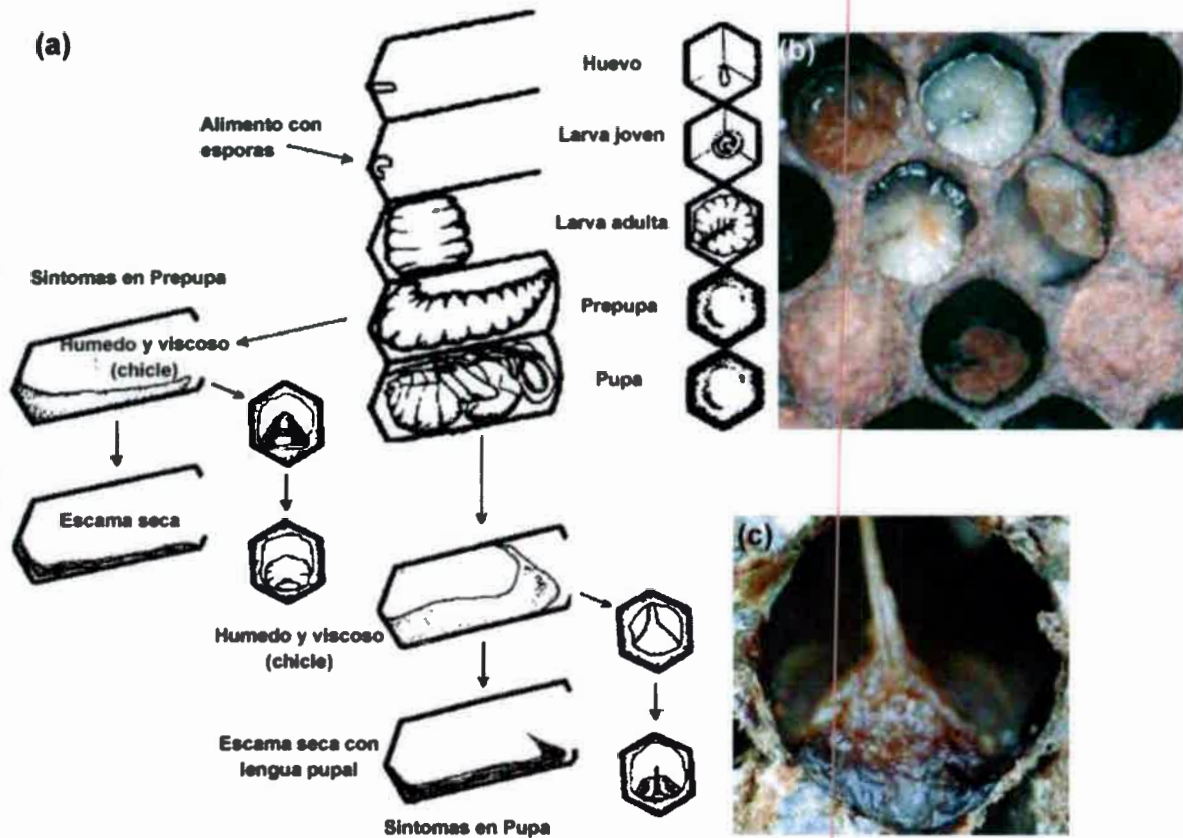
Actualmente Loque Americana tiene prácticamente una distribución mundial, y se ha identificado en todos los países productores de miel [Genersch, 2010]. En Argentina se detectó por primera vez en el año 1989, en la zona de Tandil, provincia de Buenos Aires en un brote ocurrido en un grupo de abejas italianas que sufrieron una mortandad del 53%. Se sugiere que probablemente el origen fue el ingreso de material vivo importado desde Estados Unidos [Alippi, 1992; Alippi, 1997]. Debido a la falta de controles adecuados se ha diseminado a todas las provincias productoras de miel (Santiago del Estero, Misiones, Tucumán, Neuquén, Chubut, Córdoba, Entre Ríos, Santa Fe y La Pampa), probablemente por el traslado de colmenas y la compraventa de reinas y núcleos sin control sanitario. Esta enfermedad constituye una seria amenaza para la industria apícola en general y limita la comercialización de sus productos [Alippi, 1995].

## 1.2- Sintomatología y diagnóstico

Una larva sana tiene un color blanco brillante, primero se desarrolla en forma de “C” en el fondo de la celda y posteriormente crece erguida hasta llenar la celda. En cambio, las larvas infectadas mueren en esta posición erecta y se tornan de un color amarillo pálido para convertirse más adelante en un material viscoso, pegajoso y amorfo, de color marrón. Si la muerte tiene lugar durante el estado pupal, se forma 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 (Fig. 1) [Shimanuki, 1990; Bruno, 1999].

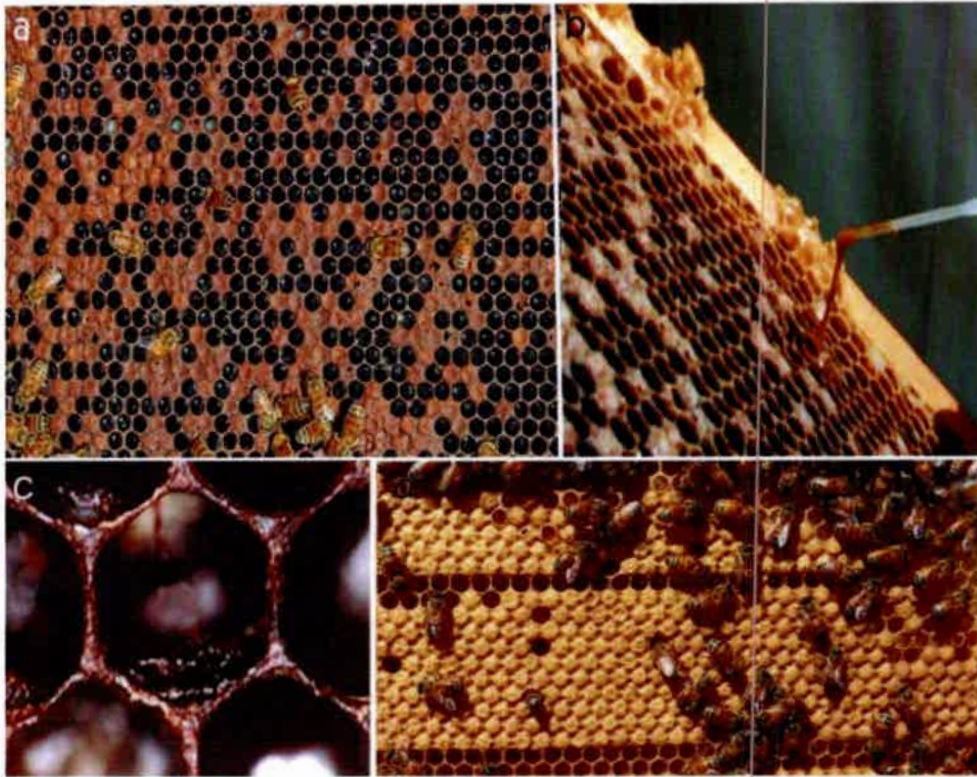
Los cuadros de las colmenas afectadas presentan la cría “salteada”, es decir que se pueden detectar celdas infectadas no operculadas, celdas sanas operculadas y celdas vacías en el mismo panel, presentando un aspecto de mosaico (Fig. 2a). Los opérculos se ven hundidos y roídos, por acción de las abejas limpiadoras que intentan sacar las crías ya muertas, y pierden su color café característico para tornarse castaños oscuro, casi negros [<http://www.apinetla.com.ar>].

Transcurridos unos 10 o 15 días desde la muerte de la larva, las colmenas infectadas despiden un olor nauseabundo, y se puede observar la característica patognomónica de la enfermedad, un material viscoso que al introducir un palito dentro de la celda que lo contiene y luego al retirarlo, se estira hasta una longitud que supera los 2,5 cm por lo cual este material se denomina “chicle” (Fig. 2b). Después de transcurrido un mes o más desde la muerte de la larva este “chicle” se seca y se fija fuertemente al fondo de la celda. En este momento se lo denomina “escama” (Fig. 2c). Si sometemos este material a luz ultravioleta, podemos visualizar cierta fluorescencia. [<http://www.apinetla.com.ar/ar/sanidad/loque.htm>].



**Fig. 1- Progresión de larvas infectadas con Loque Americana.** (a) Esquema que ilustra las diferentes transformaciones que sufren las larvas infectadas. (b) Celdas abiertas que contienen larvas sanas (blancas) e infectadas (marrones). (c) Celda con una escama en la que se puede observar la lengua pupal.





**Fig. 2- Sintomatología de Loque Americana.** (a) Marco infectado, se puede observar el aspecto de mosaico característico. (b) Celda con material con consistencia de chicle. (c) Escama seca pegada en el fondo de la celda. (d) Marco de una colmena sana (foto tomada en Apiario Experimental del Programa de Apicultura de la Secretaria de Extensión y Desarrollo de la UNRC), se puede ver claramente la diferencia con el marco infectado.

Todos los síntomas descritos anteriormente son tan típicos de Loque Americana que su detección puede efectuarse directamente en el campo, sin embargo el análisis en el laboratorio permite obtener una confirmación inequívoca del diagnóstico. [Bailey y Ball, 1991].

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]. Dado que *P. larvae* es un patógeno altamente especializado de la larva de la abeja para que las esporas

pueden germinar y desarrollar su forma vegetativa *in-vitro* deben utilizarse medios de cultivo con una base rica como infusión cerebro-corazón, Columbia agar con el agregado de sangre de ovino [Heyndrickx y col., 1996] y agar MYPGP que tiene como base al medio Müller-Hinton [Dingman y Stahly, 1983]. 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 describe el agregado de glucosa y piruvato de sodio [Dingman y Stahly, 1983]. También se han diseñado medios de cultivo específicos y selectivos, que contienen ácido nalidíxico, para la búsqueda de *P. larvae* en muestras con bajo número de esporas y que están contaminadas con otras bacterias [Alippi, 1996].

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 que sugiere el Manual de Bacteriología Sistemática Bergey. Las pruebas bioquímicas más comúnmente utilizadas son:

- Test de catalasa: negativo (permite diferenciar rápidamente a *P. larvae* de otros bacilos presentes en la colmena, los cuales son catalasa positivos) [Alippi, 1990].
- Test de Voges-Proskauer: negativo.
- Hidrólisis del almidón: negativa.
- Hidrólisis de la gelatina: positiva.
- Hidrólisis de la caseína: positiva.
- Utilización de citrato: negativa.

Si bien los métodos tradicionales proveen un medio efectivo y económico para el diagnóstico de Loque Americana, también se están desarrollando nuevos protocolos de identificación de *P. larvae* a partir de larvas o productos derivados de las abejas, basados en técnicas inmunológicas y moleculares [De Graaf y col., 2006a]. Se han desarrollado varias técnicas basadas en anticuerpos para el diagnóstico de Loque Americana como técnicas de inmunodifusión, donde los

anticuerpos interactúan con el antígeno bacteriano durante un proceso de difusión doble, dejando líneas de precipitación, o técnicas de inmunofluorescencia, donde los anticuerpos se conjugan con un fluorocromo haciendo que *P. larvae* se vea como una bacteria fluorescente sobre un fondo oscuro al examinar el frotis con un microscopio de fluorescencia [Otte, 1973, Peng y Peng, 1979]. También se ha conseguido identificar a *P. larvae* por medio de un ensayo de ELISA indirecto usando anticuerpos monoclonales [Olsen y col., 1990].

Actualmente existe en el mercado un kit de prueba de diagnóstico para Loque Americana (Vita-AFB-Kit), manufacturado por Vita Europa Limited, el cual consiste en un dispositivo de flujo lateral con anticuerpos monoclonales que permite detectar la presencia del agente causal de la enfermedad en larvas de abejas, directamente en el apiario [www.vita-europe.com].

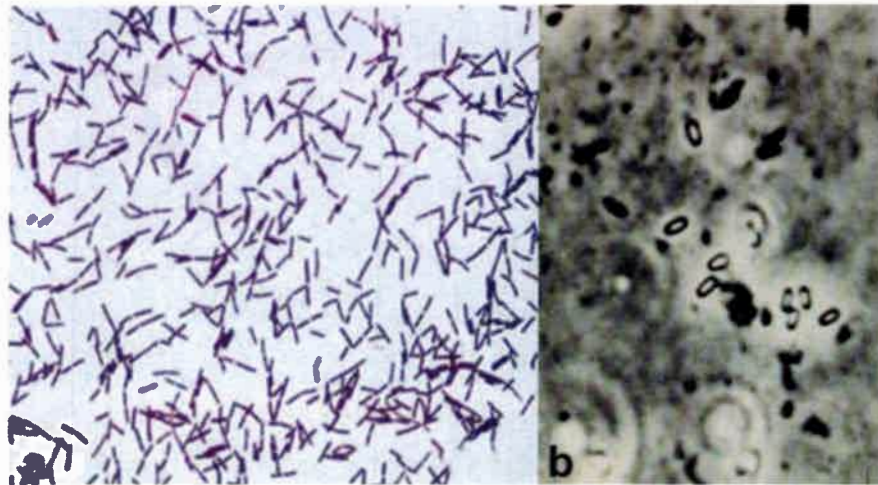
También se han desarrollado técnicas moleculares para la identificación de *P. larvae*. El primer ensayo de PCR realizado con este fin se llevó a cabo por Govan y col., en 1999 y se basó en el ARNr 16S. Desde entonces se han desarrollado protocolos de PCR más sensibles que permiten el análisis directo de larvas, miel u otros suministros y productos del apiario, utilizando técnicas de PCR anidado [Lauro y col., 2003], o PCR en tiempo real [Martinez y col., 2010]. Los métodos basados en PCR se caracterizan por tener una alta sensibilidad, sin embargo algunos estudios han demostrado casos en que *P. larvae* fue detectado por métodos tradicionales pero no por PCR, posiblemente debido a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR en la muestra o a errores en los protocolos de extracción. No obstante PCR ha probado ser una técnica valiosa cuando se deben testear gran cantidad de muestras para detectar la presencia de Loque Americana, ya que permite hacerlo de forma rápida y a un costo relativamente moderado [Bakonyi y col., 2010; Forsgren y Laugen, 2014].

### 1.3- Agente causal: *Paenibacillus larvae*

El agente causal de Loque Americana es *Paenibacillus larvae*, un bacilo Gram positivo, esporulado y microaerófilo, de aproximadamente 2,3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  de ancho, generalmente se encuentra agrupado de a pares, solo o en cadenas cortas y es móvil con flagelos peritricos (Fig. 3a).

En 1906, White fue quien describió la especie *Bacillus larvae*, como el agente patógeno de Loque Americana [White, 1906]. Años más tarde, en 1950, Katznelson describe una especie estrechamente relacionada, *Bacillus pulvificiens*, también aislada de larvas de abejas, pero en asociación con una enfermedad rara llamada "escama pulverulenta" [Katznelson, 1950]. En 1993 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 *pulvificiens* (anteriormente *Bacillus pulvificiens*). Mediante la publicación de la reclasificación propuesta en el Diario Oficial del Comité Internacional de Sistemática de Procariontes, 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 y col., 1993; Heyndrickx y col., 1996; De Graaf y col., 2006b; Genersch y col., 2006; Genersch, 2010].

La característica principal de *P. larvae* es la de formar endosporas de forma ovoide, centrales o terminales, brillantes y refringentes que se colorean sólo en su parte periférica. Al observarlas en el microscopio puede visualizarse su movimiento browniano, característica que diferencia las esporas de *P. larvae* de otros bacilos esporulados que afectan a las abejas (Fig. 3b). Las esporas son extremadamente resistentes al calor, desinfectantes químicos, cloro, radiación UV, desinfectantes iodados y agua caliente con cualquier aditivo. Son capaces de sobrevivir en paneles con crías putrefactas y restos de larvas (escamas), durante décadas. También en la miel perduran durante años. [De la Sota y Bacci, 2005]



**Fig. 3- *Paenibacillus larvae*.** (a) Tinción de Gram de un cultivo de 72hs (x1000). (b) Esporas visualizadas con microscopia de fases (Fuente: U.S Dept. of Agriculture).

*P. larvae* sólo es infeccioso en su estadio de endosporas y estas son las responsables del inicio del ciclo de la enfermedad. Sólo son susceptibles de infección las larvas de 12 a 36 hs de vida, las larvas con más de 48 hs de vida o las abejas adultas no se infectan al ingerir las esporas [Hitchcock, y col., 1979]. Solamente se necesita que la larva ingiera unas 10 a 15 esporas (a veces menos), para iniciar una infección fatal efectiva [Brodsgaard y col., 1998; Genersch y col., 2005].

Pese a la alta virulencia que *P. larvae* generalmente presenta para las larvas de abeja y la gran infecciosidad, no siempre produce la enfermedad en la totalidad de la colonia. Esto se debe a que *P. larvae* es un patógeno que debe matar a su huésped para ser transmitido, por lo tanto su virulencia está dada por dos factores:

- i. La probabilidad de infectar a un huésped.
- ii. El tiempo de vida del huésped.

El punto (i) es resuelto por la gran resistencia de las esporas, las cuales pueden permanecer infecciosas durante décadas. Para evaluar el punto (ii) hay que

considerar la virulencia a nivel individual, que lleva a la muerte de la larva, y la virulencia a nivel grupal, que lleva a que toda la colonia sucumba a la enfermedad.

En la colonia las abejas nodrizas eliminan las larvas enfermas como parte de una respuesta inmune social. Como sólo las larvas que no son removidas permiten que *P. larvae* esporule diseminando la enfermedad por la colonia, la eficiencia de la transmisión depende de la proporción de larvas que no son eliminadas por las abejas nodrizas. Dado que las celdas de cría permanecen abiertas hasta el inicio de la metamorfosis, aquellas larvas que mueren antes de que las celdas se cierren tienen mayor probabilidad de ser removidas. En cambio, las larvas que mueren en celdas operculadas no podrán ser eliminadas y se convertirán en escamas llenas de esporas que diseminaran la enfermedad por la colonia. Por esta razón, mientras más virulenta sea la cepa de *P. larvae* a nivel individual, matando las larvas infectadas rápidamente, será menos virulenta a nivel de la colonia. [Rauch y col., 2009].

#### 1.4- Transmisión y Patogenia

*P. larvae* se transmite por medio de las abejas pecoreadoras que ingresan las esporas a la colmena llevándolas en sus buches melarios, de abejas pilladoras de colmenas infectadas, herramientas del apicultor, introducción de paneles con crías infectadas, alimentos con miel contaminada y cualquier intercambio de material proveniente de colmenas infectadas [De la Sota y col., 2005].

Una vez que las esporas ingresan a la colonia las abejas nodrizas las transmiten a las larvas con el alimento. Las esporas pasan a través del intestino anterior para llegar al intestino medio donde, debido a las condiciones de pH y tenor de oxígeno, germinan alrededor de 12 hs después de haber sido ingeridas. Las células vegetativas colonizan el intestino medio y proliferan en él sin alterar visiblemente el epitelio intestinal [Yue y col., 2008].

Durante este estadio de la infección *P. larvae* convive con su huésped en una relación de comensalismo, viviendo del alimento ingerido por la larva. Se ha

demostrado que *P. larvae* posee enzimas activas de las vías metabólicas de Emden-Meyerhoff, pentosas fosfato y Entner-Doudoroff, las cuales están involucradas en el metabolismo de carbohidratos, lo que le permitirían sobrevivir de manera vegetativa [Genersch, 2010].

En la larva infectada la membrana periotrófica ayuda a mantener la masa de bacterias contenidas en el lumen del intestino. Pero a medida que la infección avanza y el intestino se encuentra completamente lleno de bacterias, *P. larvae* es capaz de atravesar esta barrera protectora y atacar el epitelio. Las bacterias atraviesan el epitelio a través de los espacios intracelulares alcanzando la hemolinfa, donde vive y prolifera [Yue y col., 2008]. Para poder atravesar el epitelio *P. larvae* secreta proteasas extracelulares durante el crecimiento vegetativo y la infección. Estas enzimas son las responsables de alterar la integridad del epitelio degradando las uniones célula-célula y célula- matriz, permitiendo que el microorganismo alcance la hemolinfa [Hrabak y Martinek, 2007].

Otras enzimas que posiblemente actúan como factores de virulencia son las enolasas. Se ha demostrado que *P. larvae* secreta enolasas al medio y también se ha encontrado actividad enolasa en la superficie de las esporas. Estas enolasas secretadas podrían activar enzimas proteolíticas del huésped (análogas al sistema plasminogeno de los mamíferos), contribuyendo a la degradación de la larva [Antúnez y col., 2011].

Una vez que *P. larvae* penetró el epitelio y colonizó la hemolinfa las proteasas y otras enzimas proteolíticas son necesarias para continuar degradando los restos de la larva, transformándolos en una sustancia amarronada y viscosa (“chicle”). Esto es de vital importancia para el microorganismo ya que debe ser capaz de liberarse de los tejidos de la larva estando todavía en estado vegetativo, asegurando que después de la esporulación las esporas puedan diseminarse por la colonia para llegar a su siguiente huésped [Genersch, 2010].

Por último, esta sustancia viscosa se seca formando una escama dura fuertemente adherida a la pared inferior de la celda. Estas escamas son altamente

infectivas ya que contienen millones de esporas y cuando las abejas nodrizas tratan de quitarlas esparcen las esporas diseminando la enfermedad por toda la colonia y a colonias vecinas (Fig. 4). La alta producción de esporas y la gran resistencia de estas es lo que hace al control de Loque Americana tan dificultoso [Genersch, 2010].

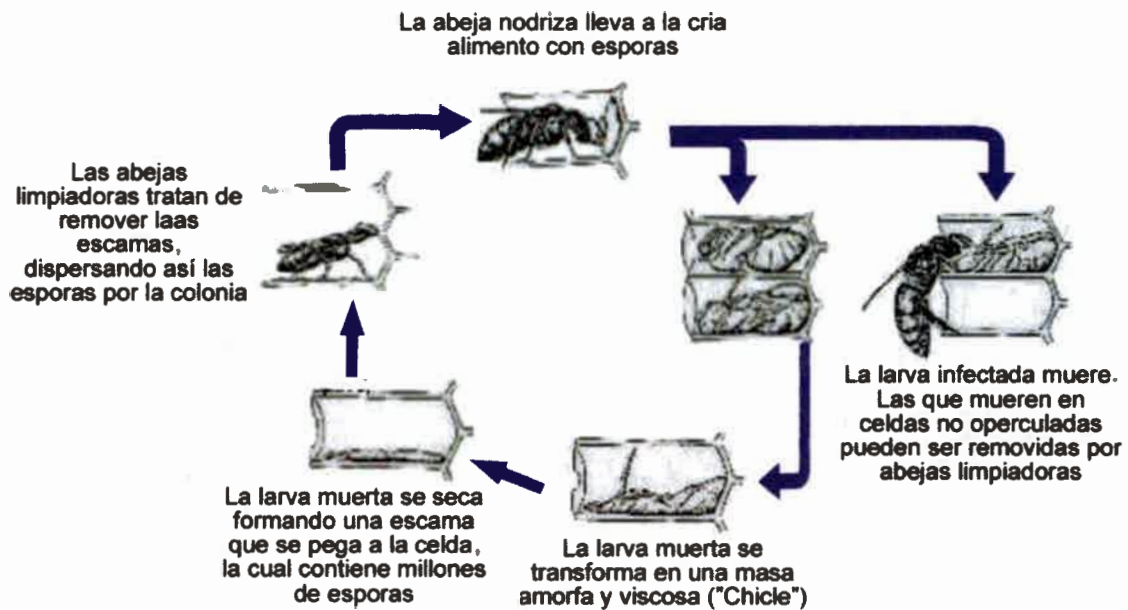


Fig. 4- Ciclo infeccioso de Loque Americana

## 2- Control y tratamiento de Loque Americana

Por las características propias de la enfermedad, una vez que Loque Americana es detectada en una región, es muy difícil de erradicarla por completo de dicha zona. Por eso es muy importante proteger las zonas libres de Loque e identificar cuanto antes la enfermedad cuando se presenta para poder realizar el correcto saneamiento del material infectado evitando la diseminación de la enfermedad [De la Sota y col., 2005]



Para evitar el ingreso de esporas a la colmena es necesario el control escrupuloso y continuo del estado de salud de las abejas y sus crías (en períodos de 90 días como mínimo), incluso en época invernal. Además, se deben tener en cuenta las siguientes acciones preventivas:

- Mantener las colonias fuertes.
- Colocar las colmenas separadas unas de otras y en pequeños grupos dentro del campo para evitar la deriva de las pecoradoras y el pillaje.
- Evitar el pillaje y el saqueo, por lo que hay que mantener a las colonias bien alimentadas y con reinas eficientes.
- Jamás dar acogida a enjambres pequeños y mantener cualquier tipo de material vivo nuevo en un sector bien separado hasta estar seguros de su sanidad.
- No aportar miel, polen o paneles de colonias desconocidas.
- Seleccionar genéticamente abejas con mejor resistencia a la enfermedad (mayor comportamiento higiénico) [De la Sota y col., 2005, <http://www.sada.org.ar>, <http://inta.gob.ar/apicultura>]

Cuando la enfermedad ha sido detectada lo primero que se debe hacer es evaluar el grado de infección para determinar si se puede salvar algo del material vivo y del material inerte. Si se decide que se puede recuperar el material vivo esto puede hacerse por dos métodos: trasiego directo o cepillado y trasiego doble o paquetado.

El trasiego directo consiste en transferir las abejas una única vez a una colmena nueva o esterilizada. Este método no es tan eficiente ya que la enfermedad no se elimina por completo, sólo se consigue bajar el nivel de infección y hay un riesgo de recurrencia de un 20%. Por ello, el cepillado, sólo se utiliza cuando hay muchas colmenas infectadas y el nivel de infección es bajo.

Para realizar el trasiego doble se debe separar a la reina y enjaularla y luego se traspasan todas las abejas de la colmena a un porta paquete (caja pequeña con

una abertura superior por donde se introducen las abejas). Si la cantidad de abejas trasegadas no alcanza a pesar 1,2 – 1,5 Kg, se debe reforzar con abejas de otras colonias. Este paquete se deja por 48 hs en un lugar oscuro y ventilado, luego de este periodo se abre el paquete y se introduce en una colmena nueva, y se libera a la reina. Si bien este método es más caro y engorroso es mucho más efectivo, con un riesgo de recurrencia de solamente el 3%.

Para recuperar el material inerte hay varios métodos:

- Aplicar fuego directo flameando las alzas, pisos y techos con un soplete.
- Sumergir el material de madera en parafina de grado alimentario a 130 - 160°C durante 10 min. Es un método muy eficaz para eliminar esporas.
- Esterilización en autoclave a 121°C, 2 atm durante 30 min.
- Desinfección con productos químicos, como por ejemplo sumergir el material en soda caustica al 10%. También se puede usar oxido de etileno, pero es muy peligroso.
- Irradiación con cobalto 60, es muy efectivo ya que permite esterilizar paneles con restos de larvas muertas en su estado de chicle o escama.

Hay casos en que el material no se puede recuperar y las colmenas infectadas deben ser destruidas a fuego. Para ello se matan las abejas con algún insecticida y luego se procede a incinerar los paneles, abejas y marcos en un pozo de unos 60 a 70 cm de diámetro. Una vez finalizada la quema se tapa el pozo para evitar el pillaje de restos de cera y miel que puedan haber quedado.

Acompañando los métodos de control mencionados anteriormente se puede aplicar un tratamiento medicamentoso. El resultado inmediato del tratamiento con antibióticos es una disminución rápida de los síntomas, sin embargo se debe tener en cuenta que estos sólo actúan sobre la forma vegetativa de *P. larvae*, no son capaces de destruir las esporas dejando latente el potencial infeccioso de las colonias. Por ello es muy importante el tratamiento integral del material vivo e inerte.

El antibiótico más utilizado en el tratamiento de Loque Americana es el clorohidrato de oxitetraciclina, pero también se está comenzando a utilizar la tilosina. Actualmente hay varios productos aprobados por SENASA a base de clorohidrato de oxitetraciclina y uno a base de tilosina disponibles en el mercado. Al aplicar estos antibióticos se deben seguir rigurosamente las indicaciones de los marbetes comerciales (dosis, forma de aplicación, periodo de carencia, etc.) para evitar la aparición de efectos no deseados.

Si se decide realizar un tratamiento con antibióticos se deben tener en cuenta los riesgos que implica la aplicación de los mismos a la colmena. El incorrecto uso de los antibióticos (sobre o sub dosificación, uso indiscriminado, uso preventivo) predispone al desarrollo de cepas de *P. larvae* resistentes a éstos. Además, residuos de la droga pueden permanecer en la cera, la miel, el polen y los propóleos, perjudicando la salud de los consumidores y afectando la comercialización de dichos productos. [De la Sota y col., 2005; <http://www.sada.org.ar>, <http://inta.gob.ar/apicultura>, <http://www.beekeeping.com>].

## 2.1- Riesgos del uso de antibiótico en el tratamiento de Loque Americana

Durante años, en Argentina, Estados Unidos y Canadá, el único antibiótico aprobado para el tratamiento de Loque Americana fue la oxitetraciclina [Reynaldi y col., 2010]. Éste es un antibiótico de amplio espectro perteneciente al grupo de las tetraciclinas, tiene acción bacteriostática ya que actúa sobre los ribosomas e interrumpe la síntesis de proteínas, inhibiendo así el crecimiento microbiano [Madigan y col., 1999]. En apicultura se utiliza bajo la forma de clorohidrato y se puede aplicar en forma de jarabe, en polvo o como pasta medicamentosa [<http://www.sada.org.ar>].

Dado que la oxitetraciclina no afecta a las esporas sólo mitiga la enfermedad, no la elimina, por lo tanto las colmenas afectadas deben ser tratadas constantemente para prevenir los brotes de Loque Americana. Este uso intensivo del antibiótico ha favorecido la aparición de cepas de *P. larvae* resistentes, las

cuales se han dispersado por Argentina y Norte América en los últimos años [Evans, 2003; Miyagi y col., 2000]. La resistencia a tetraciclinas se debe frecuentemente a la adquisición de nuevos genes asociados a plásmidos o transposones. En diferentes estudios se han aislado, a partir de cepas resistentes, plásmidos que llevan los genes de resistencia, los cuales se transferirían por mecanismos de conjugación [Alippi y col., 2007; Murray y col., 2007; Alippi y col., 2014].

Debido a esto, se han comenzado a estudiar otros antibióticos efectivos frente a *P. larvae*. Recientemente se aprobó el uso de tartrato de tilosina para el tratamiento de colmenas infectadas con Loque Americana en Argentina y Estados Unidos. Otros antibióticos como la tilmicosina y la lincomicina están siendo estudiados [Reynaldi y col., 2010].

Además del desarrollo de cepas resistentes, el uso de los antibióticos puede llevar a que queden restos de éstos o sus metabolitos en la miel y productos derivados, lo que representa un potencial riesgo para la salud de los consumidores. Dado que las colmenas no poseen metabolismo, los medicamentos que se usan para tratarlas no son eliminados por la farmacocinética como ocurre con otros alimentos de origen animal. La eliminación de los residuos depende de que sean consumidos por las abejas o de que el apicultor remueva la miel contaminada [Reybroek y col., 2012].

En distintos estudios realizados se han observado variaciones en las concentraciones de residuos de tetraciclinas entre las muestras tomadas en distintos apiarios, e incluso entre muestras de distintas colmenas de un mismo apiario. Pero en general se ha probado que la oxitetraciclina se incorpora rápidamente en la miel (se puede detectar en la cámara de cría a las 24 hs de aplicado el tratamiento) y que su degradación es lenta, encontrándose concentraciones de residuos de este antibiótico en el orden de mg/kg de miel, incluso hasta 390 días después de aplicado el tratamiento. También se observó que las colmenas no tratadas pueden contaminarse por deriva del antibiótico de colmenas vecinas, se han detectado residuos de tetraciclina en colmenas que se

encontraban a 35 m de las tratadas [Thompson y col., 2006; Martel y col., 2006; Tayar Peres y col. 2010].

En cuanto a la tilosina se ha comprobado que, en medios ácidos como la miel, se degrada produciendo desmicosina, la cual parece ser bastante estable. Por ello a la hora de realizar análisis de residuos se deben buscar ambas, la tilosina y la desmicosina [Thompson y col., 2007].

Todo esto hace que sea muy difícil determinar el periodo de carencia que debe tenerse luego del uso de antibióticos en las colmenas para evitar la aparición de residuos. Por esta razón, en los países de la Unión Europea no está permitido el uso de antimicrobianos, y las colmenas afectadas con Loque Americana son destruidas a fuego directo, lo que lleva a que tengan una política de cero tolerancia para la presencia de residuos de antibióticos en la miel. En países como Argentina y Estados Unidos, si bien está aprobado el uso de antibióticos, no está permitida la presencia de residuos orgánicos o inorgánicos en la miel [Reybroeck y col., 2012].

El problema que presentan estas políticas de “cero tolerancia” es que cada país tiene diferentes métodos para la detección de antibióticos, los cuales tiene diferentes especificidades. Esto conlleva a que los límites de decisión, para aprobar o no un lote determinado, dependan del método que utiliza cada laboratorio en particular, lo cual es problemático para los exportadores de miel, como Argentina [Reybroeck y col., 2012].

Argentina es el principal exportador de miel a nivel mundial, con una participación en el total de las exportaciones a nivel mundial de un 13%. Las mieles Argentinas se caracterizan por su variedad de colores y sabores, fruto de los varios orígenes florales que generan características organolépticas particulares. En 2012 se exportó un 95% de la producción, en su mayoría como miel a granel, siendo los principales destinos de la exportación Estados Unidos (56%), Alemania (21%), Italia (3,5%), Japón (3%) y Francia (2%).  
[[http://64.76.123.202/SAGPYA/economias\\_regionales](http://64.76.123.202/SAGPYA/economias_regionales)].

Debido a estos riesgos potenciales que presenta el uso de antibióticos, se ha hecho necesaria la búsqueda de métodos alternativos para el tratamiento de Loque Americana. Hasta el momento se están estudiando tres posibles alternativas:

- Mejoramiento genético de las abejas que muestra un incremento en la respuesta inmune frente a Loque Americana, principalmente debido a su comportamiento higiénico [Spivak y Reuter, 2001; Wedenig y col., 2003; Evans, 2004; Seeley y Yarpi, 2007].
- Control biológico a través de bacterias antagónicas [Evans y Armstrong, 2004; Evans y col., 2005 y 2006; Alippi y col., 2006; Lee y col., 2009; Sabaté y col., 2009; Yoshiyama y col., 2013].
- Tratamiento con sustancias antibacterianas naturales como propóleos [Antúnez y col., 2008; Mihai y col., 2012; Bilikova y col., 2013], aceites esenciales y extractos de diferentes plantas aromáticas [Fuselli y col., 2006, 2008a, 2008b y 2009; Flesar y col., 2010; Gende y Marioli, 2008 y 2009; González y col., 2010; Boligon y col., 2013; Reyes y col., 2013].

### **3- Tratamiento alternativo con sustancias antibacterianas naturales.**

#### **3.1- Plantas medicinales**

Desde la prehistoria el hombre emplea plantas medicinales para tratar sus dolencias. Para la medicina antigua, el reino vegetal era una fuente muy importante de remedios, y su uso estaba íntimamente ligado a las creencias religiosas de las distintas civilizaciones antiguas. Con el transcurrir del tiempo y el avance de la ciencia se han aislado de estas plantas sus principios activos y se han realizado estudios químicos, fisiológicos y médicos. Muchos de estos productos naturales fueron incorporados a las farmacopeas, continuando todavía hoy el uso de ellos en medicina [Schmidt-Lebuhn, 2008].

En general, podemos definir a las plantas medicinales como vegetales que ejercen una acción farmacológica beneficiosa para el organismo vivo. La acción benéfica de estas plantas sobre un organismo enfermo se debe a que contienen determinados principios activos. Los principios activos son metabolitos que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico de la enfermedad, son los que confieren las propiedades terapéuticas a las plantas, y en base a ellos se clasifican y seleccionan [Schmidt-Lebuhn, 2008].

Todas las partes del vegetal pueden contener principios activos, pero las hojas constituyen uno de los órganos más interesantes de las plantas medicinales, pues en ellas es donde se realiza la mayor parte de los procesos metabólicos. La cantidad de principios activos y su composición depende especialmente de los factores ecológicos del lugar donde el vegetal se ha desarrollado [Ratera y Ratera, 1980; Nuñez y Cantero, 2000], 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 y col., 2001]. Hay muchos factores que influyen en el quimiotipo de una misma planta, como el clima, la composición del suelo, la elevación, la estación en la que se recolecta la planta y el estrés que ésta ha sufrido. Esto lleva a que exista una variabilidad relativamente alta entre los quimiotipos de plantas de la misma especie [Schmidt-Lebuhn, 2008].

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. Por ello se han incrementado los estudios sobre las relaciones entre la estructura molecular de los metabolitos y su función. Sin embargo, el mundo vegetal está lejos de haber sido completamente explorado. Hasta ahora, de las aproximadamente 350.000 especies vegetales que se cree que existen, solo se ha descubierto un tercio de ellas. De las especies reportadas, sólo una muy pequeña fracción ha sido investigada para determinar sus propiedades químicas y potencial medicinal. Es por ello que hay un gran número de medicinas

derivadas de plantas que todavía no se han descubierto alrededor del mundo [Cseke y col., 2006].

En la medicina tradicional las plantas medicinales se administraban principalmente en forma de infusiones, cocimientos o macerados. Sin embargo, actualmente el uso de aceites esenciales y extractos vegetales es de mayor interés científico debido a su utilidad comercial, ya que estos son frecuentemente utilizados en 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 un amplio rango de actividades biológicas (antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antioxidantes y anti-inflamatorios) [Barrio Alonso y col., 2001; Tepe y col., 2005; Cseke y col., 2006].

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

El uso de aceites esenciales y otros extractos provenientes de plantas aromáticas constituyen una importante alternativa para el tratamiento de enfermedades microbianas. Las investigaciones con estos vegetales 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. 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 positivas y Gram negativas, virus, hongos y levaduras [Sridhar y col., 2003; Friedman y col., 2004; Wong y Kitts, 2006; Reichling y col., 2009).

### 3.2 Plantas Medicinales en la Provincia de Córdoba

La Argentina es un país muy extenso, abarca una extensión de 4.025.695 km<sup>2</sup>, incluyendo la región antártica, por lo que presenta un paisaje muy heterogéneo. Cuenta con grandes llanuras, mesetas, sierras y montañas, donde se presentan distintos climas, desde subtropical húmedo a polar, y distintos tipos de suelos. Esto permite el desarrollo de una de las más variables y ricas floras medicinales, caracterizando el paisaje de cada región con plantas típicas. [Ratera y Ratera, 1980; Demo y Oliva, 2008].

En el centro de Argentina, más precisamente al sur de la provincia de Córdoba nos encontramos con situaciones muy contrastantes de clima, relieve, hidrografía y suelo; lo que conlleva a una gran variedad florística y fisonómica de su vegetación [Bianco y col., 1992]. En esta región crecen unas 373 plantas vasculares con actividad farmacológica potencial, lo que representa un 19% de la flora total de la provincia. La mayor parte de la flora medicinal está representada por hierbas perennes (50%), hierbas anuales (29%) y en menor medida por arbustos (8%) y árboles (3%). La mayoría de las especies se recolectan en primavera-verano, y un 25% de las plantas medicinales se concentran en la zona serrana [Núñez y Cantero, 2000].

Una de las plantas nativas de la Provincia de Córdoba que presenta propiedades medicinales es *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, popularmente conocida como “peperina”.

### 3.3 *Minthostachys verticillata*

El género *Minthostachys* comprende 17 especies de arbustos aromáticos escandentes, restringidos al área andina de Sur América. Es de gran importancia etnobotánica, farmacéutica y comercial debido a los aceites esenciales y extractos que se obtienen de estas plantas. No sólo se utilizan, como condimentos o té en la cocina popular andina, sino que son unas de las plantas más utilizadas en la medicina tradicional del área. Es un género taxonómicamente complicado, con gran variabilidad morfológica. Las especies más conocidas son *Minthostachys mollis*, la cual comprende tres variedades que se encuentran desde Venezuela hasta Bolivia; *Minthostachys acris* Schmidt-Leb que se encuentra en el sur de Perú; y *Minthostachys verticillata* (Griseb) Epling, que se encuentra en el noroeste y centro Argentino [Schmidt-Lebuhn, 2008].

*Minthostachys verticillata* es un subarbusto perenne de hasta 2 m de altura, con tallos ascendentes y ramosos; hojas decusadas, pecioladas, ovaladas, cuneadas en la base con margen entero o irregularmente aserrado en la mitad superior. Presenta flores pequeñas, tubulares, agrupadas en racimos. Los cálices son bilabiados y las corolas blancas (Fig. 5). En general posee un aroma mentado y fresco, aunque una planta puede presentar 2 o 3 aromas distintos, según la región donde se la recoja. Debido a que presentan una gran diversidad química de componentes. Los análisis realizados de diferentes muestras ponen en evidencia la presencia de al menos 13 quimiotipos. En la provincia de Córdoba sólo se presenta el quimiotipo típico: mentona-pulegona [Elechosa, 2009].

En diferentes investigaciones se ha demostrado que los componentes mayoritarios del aceite esencial de *M. verticillata* son los terpenos pulegona y mentona, y los componentes minoritarios son limoneno, mentol, 1,8-cineol y  $\beta$ -pineno, como así también otros componentes que están presentes en cantidades muy pequeñas [De Feo y col., 1998; Schmidt-Lebuhn, 2008; Cariddi, 2009; Palacios y col., 2009].



Fig. 5- Planta de *Minthostachys verticillata*, “peperina”

La especie *M. verticillata* ha sido incluida en la Farmacopea Nacional Argentina desde su sexta edición [Schmidt-Lebuhn, 2008]. Popularmente, se utiliza principalmente en forma de infusión como digestivo, sedativo, antiespasmódico, antidiarreico, carminativo, broncodilatador, antirreumático, insecticida, antimicótico y antiparasitario [Ratera y Ratera, 1980; De Feo y col., 1998; Ojeda y col., 2001; Schmidt-Lebuhn, 2008]. Además, se ha estudiado que presenta propiedades inmunomoduladores, mitogénicas y antialérgicas [Maldonado y col., 2001; González Pereyra y col., 2005; Caridi y col., 2005; Caridi y col., 2007; Caridi y col., 2009]. Se ha probado la actividad de sus extractos como insecticida contra larvas de mosquitos y de la mosca doméstica [Ciccía y col., 2000; Palacios y col., 2009; Rossi y col., 2012]. 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* Tiphya, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*,

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli* [De Feo y col., 1998; Zanon y col., 1999; Primo y col., 2001; Sabini y col., 2010; Vogt y col., 2010].

Debido al potencial que presenta *M. verticillata* para ser usada como agente terapéutico, se han realizado distintos estudios para evaluar la toxicidad de su aceite esencial y se pudo comprobar que éste no es citotóxico *in-vitro*, ni citogenotóxico *in-vivo*, tanto en altas como en bajas concentraciones, por lo que aparentemente sería seguro utilizarlo como agente terapéutico [Sutil y col., 2006; Escobar y col., 2012].

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el aceite esencial y los extractos acuosos de *M. verticillata* poseen actividad antibacteriana frente a *P. larvae*. Se observó que los extractos acuosos presentaron mayor actividad antibacteriana que el aceite esencial. Esto puede deberse a que los extractos acuosos presentan una mayor variedad de compuestos que el aceite esencial [González y col., 2010].

Esta actividad biológica encontrada en los extractos acuosos abre la posibilidad de utilizar los extractos de *M. verticillata* para prevenir brotes de Loque Americana, en lugar de los antibióticos utilizados actualmente. Si bien se está muy lejos de poder utilizar estos extractos *in vivo*, los resultados obtenidos hasta el momento son prometedores y ameritan que se sigan investigando sus propiedades.

Con este trabajo de investigación se espera poder obtener mayor información sobre el/los compuesto/s responsables de la actividad biológica y su nivel de toxicidad para las abejas; de modo que en el futuro se pueda llegar a obtener un producto con potencial aplicación en el tratamiento de Loque Americana, que permita mejorar el estado sanitario de las colmenas, incrementando así la producción y la calidad de sus productos, a través de un tratamiento natural que no deje residuos peligrosos.



***HIPOTESIS Y  
OBJETIVOS***

**Hipótesis:**

Diferentes extractos de *Minthostachys verticillata* poseen actividad antibacteriana frente a *Paenibacillus larvae*, agente causal de Loque Americana, por lo tanto presentan una alternativa natural para el tratamiento de dicha enfermedad.

**Objetivo General:**

Determinar si diferentes extractos de *Minthostachys verticillata* presentan actividad anitimicrobiana frente a *Paenibacillus larvae*, agente causal de Loque Americana.

**Objetivos específicos:**

- 1- Obtención de diferentes extractos a partir de macerados hidro-alcoholicos (1:1) de *M. verticillata*.
- 2- Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima y de la Concentración bactericida mínima de los extractos obtenidos, frente a *P. larvae*.
- 3- Identificación y separación de las fracciones activas del extracto con mayor actividad antimicrobiana.
- 4- Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima y de la Concentración bactericida mínima de las fracciones del extracto que presente actividad antimicrobiana.
- 5- Determinación de la toxicidad oral del extracto en abejas adultas (*Apis mellifera* L.)

A decorative horizontal band at the bottom of the page features a repeating pattern of purple hexagons. The hexagons are arranged in a staggered grid, with some hexagons appearing slightly darker than others, creating a subtle 3D effect. The text is centered within this patterned band.

***MATERIALES Y  
METODOS***

## 1- Procedencia y conservación de cepas de *Paenibacillus larvae*.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron aisladas e identificadas previamente en el laboratorio de Microbiología General, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto, a partir de cuadros de colmenas de la zona sur de la provincia de Córdoba con síntomas de Loque Americana [González, 2011]. Además, se utilizaron cepas del mismo microorganismo provistas por el INTA Balcarce, provincia de Buenos Aires. En la Tabla 1 se enlistan las cepas utilizadas y el lugar de procedencia de cada una.

Las cepas fueron mantenidas en cajas de Petri con medio de cultivo MYPGP agarizado [Dingman y Stahly, 1983], a 4 °C realizando pasajes en medio de cultivo fresco semanalmente. Para una conservación más duradera, las cepas se preservaron a -20 °C en caldo MYPGP con la adición de glicerol al 20% como criopreservador.

**Tabla 1:** Procedencia de las cepas de *P. larvae*

CEPA N°	PROCEDENCIA
1	Balcarce, Provincia de Buenos Aires
2	Balcarce, Provincia de Buenos Aires
4	Balcarce, Provincia de Buenos Aires
6	Balcarce, Provincia de Buenos Aires
7	Paso del Durazno, Provincia de Córdoba
8	Coronel Moldes, Provincia de Córdoba
9	Coronel Moldes, Provincia de Córdoba
10	Coronel Moldes, Provincia de Córdoba
11	Coronel Moldes, Provincia de Córdoba
12	Coronel Moldes, Provincia de Córdoba
13	Coronel Moldes, Provincia de Córdoba
14	Cepa de referencia, Provincia de Entre Ríos
17	Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires



## **2-Recolección y procesamiento del material vegetal.**

*M. verticillata* se recolectó en el Cerro Pan de Azúcar (31°14'17,72" S 64°25'12,29" O), ubicado en la ciudad de Cosquín, en la provincia de Córdoba. Las ramas se recolectaron manualmente y de modo sustentable, es decir sin arrancar las plantas de raíz, en época de floración (a finales de noviembre y luego en marzo-abril), como se indica en el Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noreste de la Argentina [Elechosa y col, 2009].

En el laboratorio se seleccionaron hojas, tallos finos y flores y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel grafito, 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.

## **3- Obtención de extracto de hexano (EH), de benceno (EB) y éter etílico (EE) de *M. verticillata*.**

Se pesaron 300 g de material vegetal seco y se maceraron con etanol:agua (1:1). Periódicamente el macerado se filtró por papel Whatman N° 2 obteniéndose un extracto hidroalcohólico (Fig. 6a). Luego de cada filtración se repuso el extractante para continuar macerando el material vegetal el tiempo que fuera necesario, repitiendo este procedimiento hasta agotar el material.

El extracto hidroalcohólico obtenido fue concentrado a presión reducida para evaporar el etanol, así se obtuvo un extracto acuoso (EA) (Fig. 6b). Finalmente, a dicho extracto se le realizó una extracción líquido-líquido en forma sucesiva con solventes de polaridad creciente (hexano, benceno y éter etílico). De esta manera se obtuvieron los extractos de hexano (EH), de benceno (EB) y de éter etílico (EE) (Fig. 6c).



**Fig. 6- Obtención de extractos de “peperina”.** (a) Macerado etanol/ agua (1:1). (b) Concentración del extracto hidroalcoholico, para obtener el EA. (c) Extracción líquido-líquido con solventes de polaridad creciente, para obtener los diferentes extractos.

#### 4-Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

La CIM se determinó por medio de la técnica de microdilución en caldo [Mann y Makham, 1998]. Dicha técnica fue parcialmente modificada con el objeto de adecuarla a las condiciones de cultivo del microorganismo en estudio.

Se preparó el inóculo en medio MYPGP con agar al 0,1%, a partir de una placa desarrollada con 72 hs de incubación a 37 °C en atmósfera de microaerofilia, obteniéndose una suspensión equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland.

Se realizaron diluciones seriadas factor 2 de los extractos a ensayar en dimetilsulfóxido (DMSO). En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 170 µl del inóculo y se agregaron 20 µl de las diluciones a probar. El control positivo consistió en 170 µl del inóculo con 20 µl del DMSO sin el extracto a probar y el negativo en 170 µl de medio de cultivo sin inóculo con 20 µl del extracto a probar.

La microplaca se incubó a 37 °C en microaerofilia durante 14-15 hs. Finalmente, se agregaron 10 µl de una solución de resazurina al 0,01% y la microplaca fue nuevamente incubada 24 hs a 37 °C. El ensayo fue realizado por duplicado.

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 consideró la CIM como la última dilución del extracto o del antibiótico que presente color azul [Mann y Makham, 1998].

## 5- Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM).

A partir de las microplacas en las que se determinó la CIM por la técnica de dilución en caldo, se tomaron 100 µl de los pocillos que presentaron crecimiento negativo (azules) y se sembraron en superficie en medio MYPGP agarizado. Luego se incubaron por 36 a 72 hs a 37 °C en condiciones de microaerofilia.

Se consideró la CBM como la última dilución del extracto en la que no se observe crecimiento de *P. larvae* en la placa [Moredo y col., 201; Reynaldi y col., 2010].

## 6-Cromatografía en capa delgada (TLC).

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 0,5 cm de la base. Con un tubo capilar se realizó la siembra del extracto a probar. La siembra se realizó en banda, en este caso de un 1 cm de ancho. Los cromatofolios se desarrollaron en una cubeta de vidrio, previamente saturada con los vapores de la fase móvil (éter etílico / hexano 7:3).

Una vez que los cromatofolios fueron corridos, se retiraron de la cubeta, se dejaron secar y se observaron bajo luz ultravioleta (UV) a 254 nm. Los cromatofolios también se revelaron con yodo, para ello, se los colocó junto a grageas de yodo en frascos y se mantuvieron a 30°C durante 40 minutos.

Posteriormente se seleccionaron aquellas cromatografías donde se visualizaban bandas separadas y definidas, correspondientes a diferentes compuestos presentes en el extracto y se midieron los Rf de las mismas.

Las placas donde se observaron bandas bien definidas y que no habían sido reveladas con yodo, se esterilizaron bajo luz UV durante 1 h, de cada lado, y se conservaron bajo condiciones estériles para ser luego utilizadas en la técnica de bioautografía [Furniss y col., 1989].

## 7-Bioautografía.

Se preparó el inóculo a partir de un cultivo desarrollado en medio MYPGP agarizado con 72 h de incubación a 37 °C en microaerofilia, obteniéndose una dilución en solución fisiológica equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland. Se colocó 1 mL de la dilución anterior en 20 mL de medio de cultivo MYPGP agarizado al 0,6% fundido a 40 °C y se vertió en una caja de Petri la cual contenía una TLC desarrollada como se describió en el punto 6.

Una vez solidificado el medio de cultivo, las cajas se incubaron a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 24 h. Luego se vertió 1 mL de una solución de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) en agua destilada al 5% sobre la superficie

del medio de cultivo y, realizando movimientos circulares, se esparció la solución de TTC hasta cubrir toda la placa. Las cajas se incubaron nuevamente a 37 °C en microaerofilia durante 24-48 h. El ensayo fue realizado por triplicado.

La visualización de la actividad antimicrobiana se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos vivos de transformar el TTC en formazán. El color rosa indicó desarrollo bacteriano, mientras que las zonas sin coloración indicaron inhibición del crecimiento, éstas fueron comparadas con los Rf de las TLC correspondientes, permitiendo identificar las bandas con actividad antimicrobiana [Gende y col., 2008].

## 8-Cromatografía tipo flash.

La columna se empaquetó de forma manual con 30 g de Sílica Gel 60, suspendida en 150 mL de eluyente. Como fase móvil se utilizó una mezcla de éter etílico/ hexano 7:3.

Una vez armada la columna se colocó en la parte superior de la misma la muestra a separar, como una solución al 25% en la fase móvil. La fase móvil se hizo correr con un flujo de aproximadamente 20 µL/seg, y se recogieron fracciones de 3 mL.

Debido a que el éter etílico es muy volátil tanto la fase móvil como la columna se mantuvieron refrigeradas durante todo el ensayo.

Las bandas purificadas en cada fracción recolectada se identificaron con TLC, las cuales se desarrollaron como se indicó en el punto 7. Aquellas fracciones que contenían la banda de interés se juntaron en un mismo recipiente y se procedió a secar los restos de solvente bajo presión de nitrógeno [Furniss y col., 1989].

## 9- Test de toxicidad oral aguda en abejas adultas.

La toxicidad aguda del EH en abejas adultas se determinó según lo indicado en las Directrices para los ensayos de productos químicos, sección 2, efectos en sistemas bióticos, Guía N° 213 de la OCDE (Organización para la Cooperación y

Desarrollo Económicos) [<http://www.oecd-ilibrary.org>], y se expresó como Dosis Letal 50 (LD<sub>50</sub>) a las 24 h de exposición al agente antimicrobiano. La LD<sub>50</sub> se define como la concentración de una sustancia que resulta letal para el 50% de la población testeada.

Para realizar el ensayo se recolectaron las abejas (*Apis mellifera* L.) por la mañana, a partir de marcos de colmenas sanas, y se colocaron grupos de 20 abejas en vasos de poliestireno cubiertos con gasa (Fig. 7). Luego de la recolección las abejas se mantuvieron en un cuarto fresco y con buena ventilación, y se dejaron sin alimento por 24 h. Transcurrido este tiempo, fueron alimentadas con 200 µL de solución alimentadora de sacarosa al 50% p/v, en la cual se disolvieron las distintas concentraciones de EH a ensayar. Una vez que las dosis fueron consumidas completamente, las abejas se alimentaron *ad libitum* con solución de sacarosa 50% p/v.

Como control tóxico se utilizó Dimetoato (O,O-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato) [Gough y col. 1994]. Como control negativo se utilizó la solución alimentadora sacarosa 50% p/v. Tanto los grupos tratamiento como los controles se ensayaron por triplicado.

La LD<sub>50</sub> a las 24 h se calculó mediante un análisis de Regresión Lineal Probit. Este procedimiento mide la relación entre una dosis determinada y la proporción de casos que presentan una cierta respuesta a ésta. Permite estimar la dosis necesaria para inducir una determinada proporción de respuestas, en este caso la LD<sub>50</sub> [<http://www.ibm.com/ar/es>].



**Fig. 7. Recipiente de poliestireno donde se recolectaron las abejas.** Tiene una tapa de gasa para que pase el aire y en esta se colóca un tip por el cual se suministra el alimento. En el frente del recipiente se caló una ventana que se cubrió con nylon, para facilitar el conteo de las abejas.



*RESULTADOS Y  
DISCUSION*



## 1- Material vegetal

### 1.1- Recolección y procesamiento

Se realizó una primera recolección en los meses de noviembre y diciembre, y una segunda recolección en marzo y abril, períodos en que la planta se encuentra en floración, ya que se ha observado que en esta época las plantas medicinales poseen mayor concentración de sus aceites esenciales y extractos [Barrio Alonso y col., 2001; Elechosa, 2009].

*Minthostachys verticillata* fue fácilmente reconocida a campo por sus características morfológicas y aroma distintivo. Luego de la recolección la especie vegetal fue identificada en la Catedra de Botánica de la facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC), y una muestra de la misma fue depositada en el herbario de la Facultad con el número de identificación 507.

### 1.2- Obtención de los extractos

Luego de realizar una extracción continua en extractor líquido-líquido con solventes de polaridad creciente, se obtuvieron 1.213 mg del extracto hexano (EH), 312,4mg del extracto benceno (EB) y 528,7 mg del extracto éter etílico (EE). Los rendimientos de la extracción, calculados en base al peso seco del material vegetal, fueron del 0,41% para el EH, 0,1% para el EB y 0,18% para el EE.

## 2- Actividad antibacteriana

En estudios previos realizados en este laboratorio se observó que el EB posee muy poca actividad antibacteriana [González, 2011], por lo que en este estudio sólo se trabajará con EH y EE.

## 2.1- Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos

### 2.1.1- CIM del extracto hexano

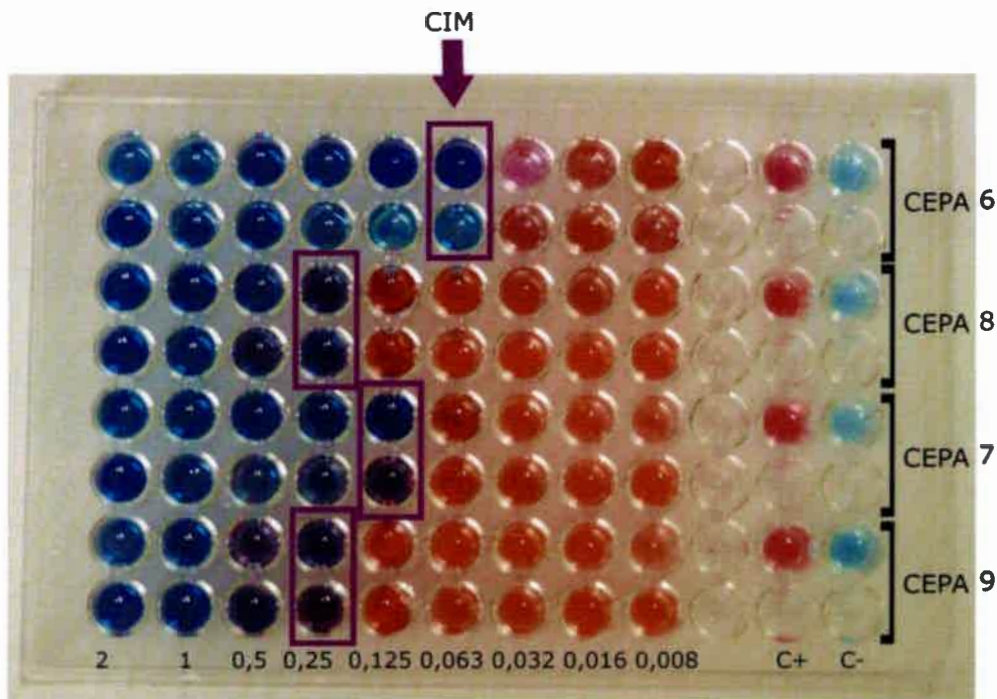
La CIM se determinó por medio de la técnica de microdilución en caldo [Mann y Makham, 1998]. Los pocillos color azul (Fig. 8) indican inhibición del crecimiento, por lo que se pudo determinar que el EH presentó actividad antibacteriana frente a *Paenibacillus larvae*, con una CIM que oscilaba entre 0,032 y 0,25 mg/ml.

En la figura 8 se muestra la actividad antibacteriana del EH frente a las cepas 6, 7, 8 y 9; y en la tabla 2 se detallan los valores promedios de CIM obtenidos con las 13 cepas ensayadas. En la misma se observa que la cepa 11 fue la más sensible con una CIM de 0,032 mg/ml y la más resistente fue la cepa 14 con una CIM de 0,25 mg/ml. Las cepas 1, 8, 9, 10, 12 y 17 presentaron valores de CIM de 0,125 mg/ml, mientras que las cepas 2, 4, 6, 7 y 13 tuvieron valores de CIM de 0,063 mg/ml.

**Tabla 2:** Valores de CIM del EH de *M. verticillata* frente a cepas de *P. larvae*

CEPAS <i>P. larvae</i>	CONCENTRACIÓN EXTRACTO HEXANO (mg/ml)								
	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,032	0,016	0,008	0,004
1					NI	NI	NI	NI	NI
2						NI	NI	NI	NI
4						NI	NI	NI	NI
6						NI	NI	NI	NI
7						NI	NI	NI	NI
8					NI	NI	NI	NI	NI
9					NI	NI	NI	NI	NI
10					NI	NI	NI	NI	NI
11							NI	NI	NI
12					NI	NI	NI	NI	NI
13						NI	NI	NI	NI
14				NI	NI	NI	NI	NI	NI
17					NI	NI	NI	NI	NI

I: crecimiento inhibido NI: crecimiento no inhibido. Los cuadros lilas indican la CIM.



**Fig. 8- Determinación de la CIM del EH.** Sobre las cepas 6, 7, 8 y 9 de *P. larvae*. En la parte inferior de la imagen se encuentran las concentraciones de EH colocadas en cada pocillo, en mg/ml. C+: control de crecimiento positivo, C-: control de crecimiento negativo.

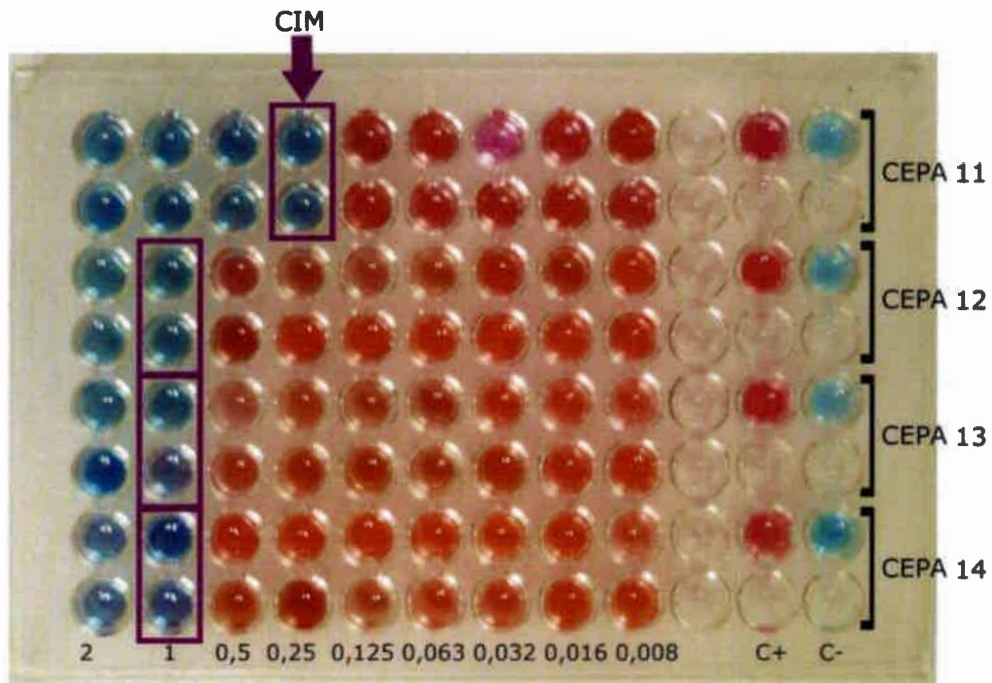
### 2.1.2- CIM del extracto éter etílico

El extracto éter etílico (EE) presentó actividad antibacteriana sobre *Paenibacillus larvae* con una CIM que osciló entre 0,125 y 1 mg/ml. La cepa 11 resultó ser la más sensible con una CIM de 0,125 mg/ml y la más resistente fue la cepas 8 con una CIM de 1 mg/ml. En la tabla 3 se resumen los valores de CIM de todas las cepas ensayadas y en la figura 9 se muestra la actividad antibacteriana del EE frente a las cepas 11, 12, 13 y 14.

**Tabla 3:** Valores de CIM del EE de *M. verticillata* frente a cepas de *P. larvae*

CEPAS <i>P. larvae</i>	CONCENTRACIÓN EXTRACTO ETÉR ETILICO (mg/ml)									
	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,032	0,016	0,008	
1	I	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2	I	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
4	I	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
6	I	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
7	I	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
8	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
9	I	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
10	I	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI
11	I	I	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI
12	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
13	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
14	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
17	I	I	I	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI

I: crecimiento inhibido NI: crecimiento no inhibido. Los cuadros lilas indican la CIM.



**Fig. 9- Determinación de la CIM del EE.** Sobre las cepas 11, 12, 13 y 14 de *P. larvae*. En la parte inferior de la imagen se encuentran las concentraciones de EE colocadas en cada pocillo, en mg/ml. C+: control de crecimiento positivo, C-: control de crecimiento negativo.

### 2.1.3- CIM de Oxitetraciclina

Para tener un marco de referencia con que comparar la actividad antibacteriana de los extractos vegetales se determinó la CIM de oxitetraciclina (OXT), un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de las tetraciclinas comúnmente utilizado en el tratamiento de Loque Americana [Madigan y col., 1999; De la Sota y Bacci, 2005].

En la tabla 4 se resumen los resultados de CIM obtenidos frente a todas las cepas de *P. larvae* ensayadas. Podemos observar que OXT presentó valores de CIM entre 0,0063 y 0,0025 mg/ml. Estos valores coinciden con los obtenidos en otros laboratorios [Reynaldi y col., 2010], y están próximos a 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 y col., 2008].

Las cepas 1, 8, 14 y 17 fueron las más susceptibles, y las cepas 2, 4 y 12 fueron las más resistentes.

**Tabla 4:** Valores de CIM de OXT frente a cepas de *P. larvae*

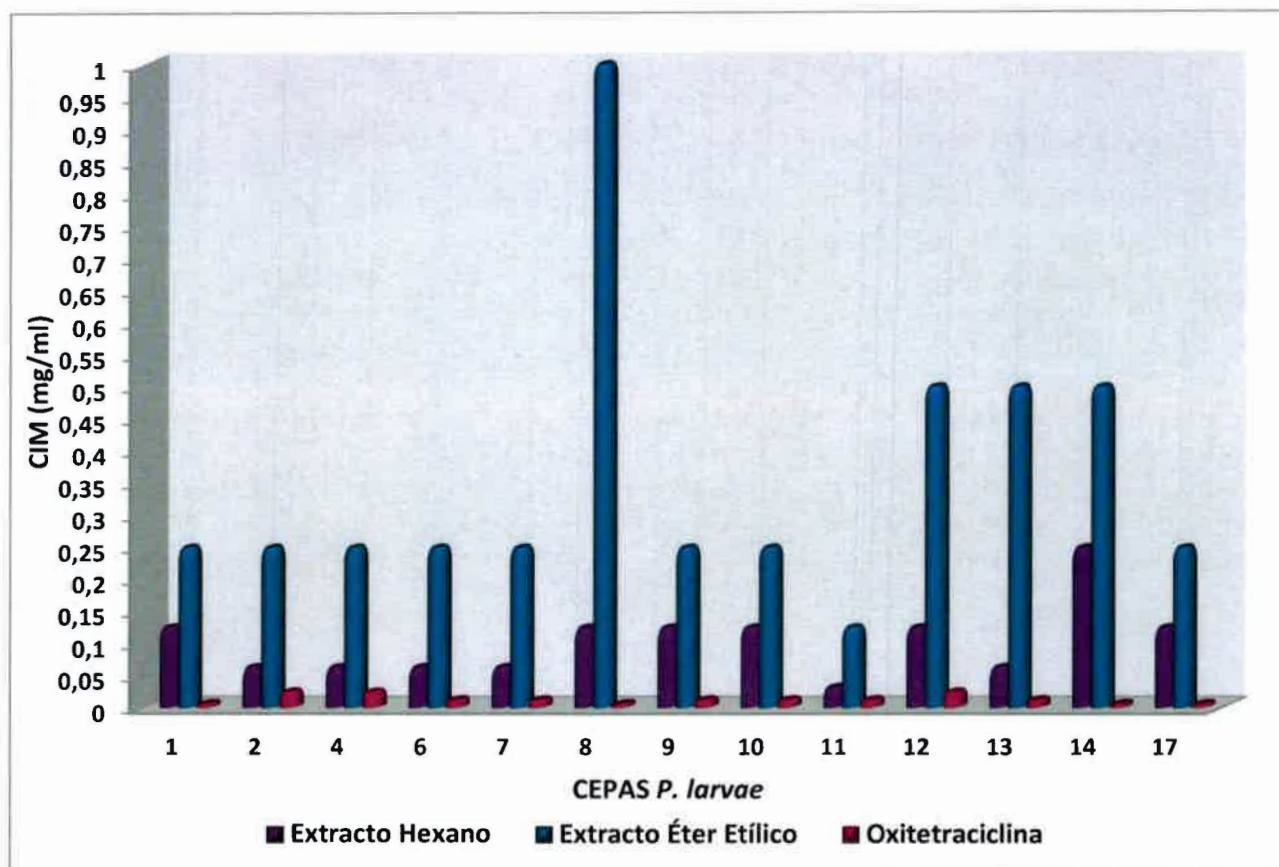
CEPAS <i>P. larvae</i>	CONCENTRACIÓN OXITETRACICLINA (mg/ml)								
	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0063	0,0032	0,0016	0,0008	0,0004
1						NI	NI	NI	NI
2				NI	NI	NI	NI	NI	NI
4				NI	NI	NI	NI	NI	NI
6					NI	NI	NI	NI	NI
7					NI	NI	NI	NI	NI
8						NI	NI	NI	NI
9					NI	NI	NI	NI	NI
10					NI	NI	NI	NI	NI
11					NI	NI	NI	NI	NI
12				NI	NI	NI	NI	NI	NI
13					NI	NI	NI	NI	NI
14						NI	NI	NI	NI
17						NI	NI	NI	NI

I: crecimiento inhibido NI: crecimiento no inhibido. Los cuadros lilas indican la CIM.

En el gráfico 1 se comparan los valores de CIM obtenidos con los distintos extractos de *M. verticillata* (EH y EE), y con OXT. Al comparar la CIM obtenida con el EH y con el EE, claramente se ve que el EH presentó mayor actividad antibacteriana frente a *P. larvae*, por lo que se necesitaría una menor concentración de este para inhibir al microorganismo. Las cepas 1, 2, 4, 6, 7, 9 y 10 se comportaron prácticamente del mismo modo frente a los extractos, pero las cepas 1, 9 y 10 requirieron una mayor concentración de EH para inhibir el crecimiento. Por otro lado las cepas 12, 13 y 14 tuvieron iguales valores de CIM para el EH, pero difirieron en cuanto a los valores de CIM que presentaron frente al EE, siendo la cepa 14 la más resistente y la 13 la más susceptible.

La cepa 11 resultó ser la más sensible frente a ambos extractos, con un valor de CIM de 0,032 mg/ml para EH y de 0,125 mg/ml para EE; la cepa 14 fue la más resistente frente al EH con valores de CIM de 0,25 mg/ml y la cepa 8 fue la más resistente frente al EE con valores de CIM 1 mg/ml (Gráfico 1).

**Gráfico 1:** Valores de CIM de EH y EE obtenidos de *M. verticillata*, y OXT frente a cepas de *P. larvae*



En cuanto a la OXT, podemos apreciar en el gráfico que presentó valores de CIM mucho más bajos que los extractos, sin embargo, en estudios anteriores realizados en este laboratorio, se observó que varias de las cepas de *P. larvae* mostraban signos de resistencia frente a OXT [González, 2010], lo cual también ha sido demostrado en numeroso trabajos de investigación [Evans, 2003; Alipi y col., 2006; Murray y col., 2007]. La resistencia a las tetraciclinas es debido a la adquisición de genes asociados a plásmidos o transposones. En diferentes estudios se han aislado, a partir de cepas resistentes, plásmidos que llevan los genes de resistencia, los cuales se transferirían por mecanismos de conjugación [Alippi et. al., 2007; Murray y col., 2007].

Debido a que cada vez son más las cepas de *P. larvae* que desarrollan resistencia a OXT y a que el uso de los antibióticos puede llevar a que queden restos

de éstos o sus metabolitos en la miel y productos derivados, lo que representa un potencial riesgo para la salud de los consumidores es necesario encontrar un tratamiento alternativo para la Loque Americana.

## 2.2- Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)

### 2.2.1- CBM del extracto hexano

A partir de los pocillos que mostraron inhibición del crecimiento en las determinaciones de CIM (color azul), se sembraron placas de medio MYPGP agarizado para poder obtener los valores de CBM. En la figura 10 se muestran las placas correspondientes a la determinación de la CBM de la cepa 9 frente al EH.

Todas las cepas presentaron CBM frente al EH, la mayoría de las cepas presentaron valores entre 0,25 mg/ml y 0,5 mg/ml, sólo la cepa 14 presentó una CBM de 1 mg/ml y la cepa 11 una CBM 0,125 mg/ml . En la tabla 5 se detallan todos los resultados obtenidos con las 13 cepas ensayadas.

**Tabla 5:** Valores de CBM del EH de *M. verticillata* frente a cepas de *P. larvae*

CEPAS <i>P. larvae</i>	CONCENTRACION EXTRACTO HEXANO (mg/ml)								
	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,032	0,016	0,008	0,004
1	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
2	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
4	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
6	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
7	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
8	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
9	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
10	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
11	SC	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC
12	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
13	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
14	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
17	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC

SC: sin crecimiento CC: con crecimiento. Los cuadros lilas indican la CBM.



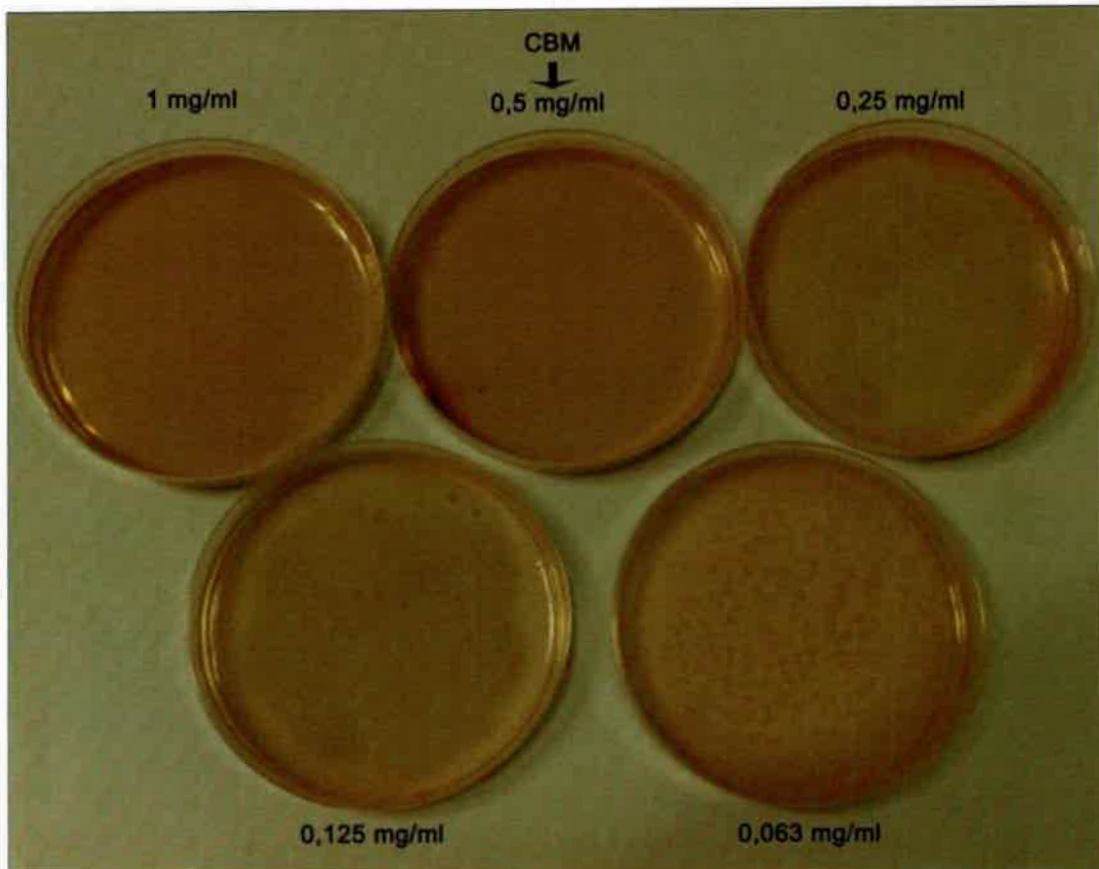


Fig. 10- Determinación de la CBM del EH sobre *P. larvae* cepa 9 (Se indican las concentraciones de EH en cada placa).

### 2.2.2- Determinación de la CBM del extracto éter etílico

En la figura 11 se observan las placas correspondientes a la determinación de la CBM del EE frente a la cepa 11 de *P. larvae*, y en la tabla 6 se resumen los resultados obtenidos frente a las trece cepas ensayadas, donde se puede ver que el EE presentó valores de CBM entre 0,5 mg/ml y 2 mg/ml.

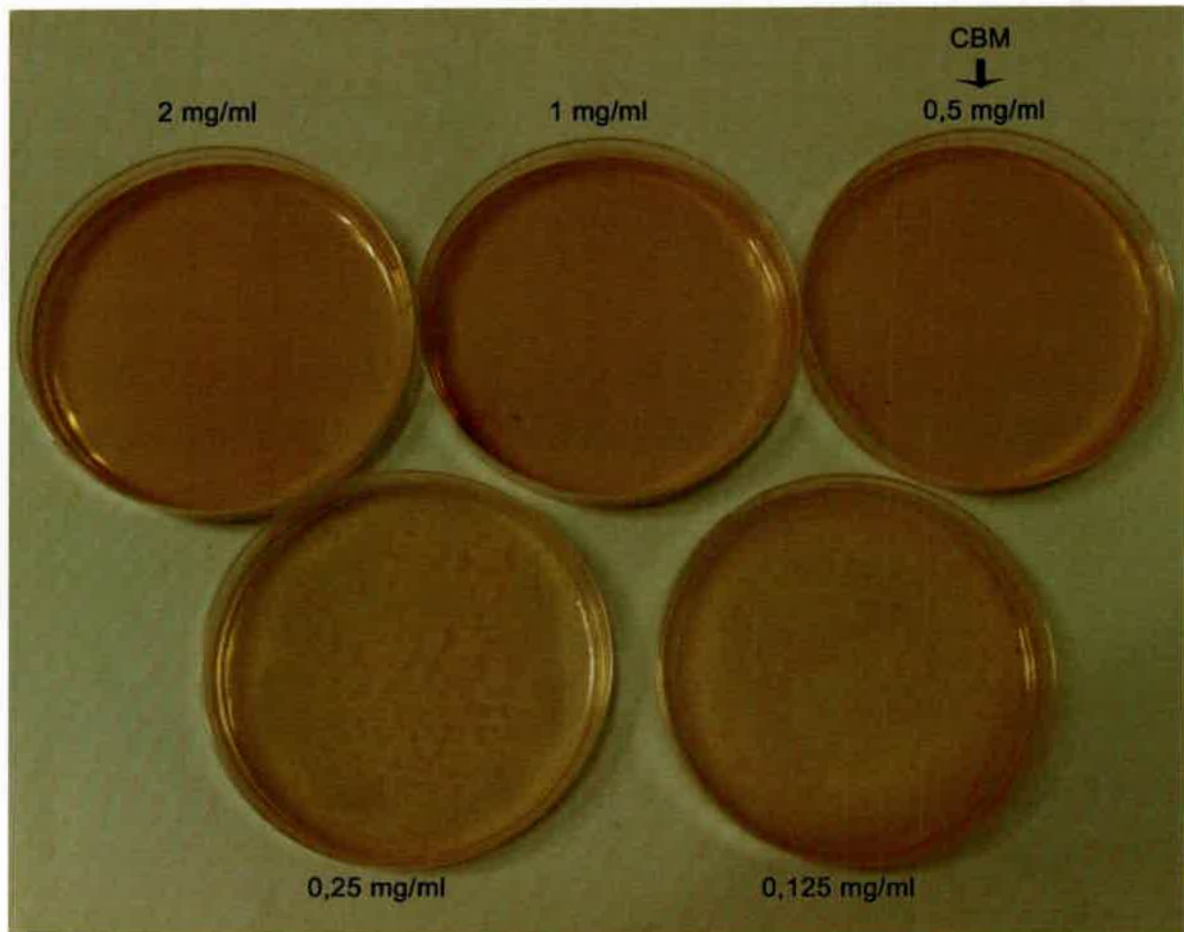


Fig. 11- Determinación de la CBM del EE sobre *P. larvae* cepa 11 (Se indican las concentraciones de EE en cada placa)

Tabla 6: Valores de CBM del EE de *M. verticillata* frente a cepas de *P. larvae*

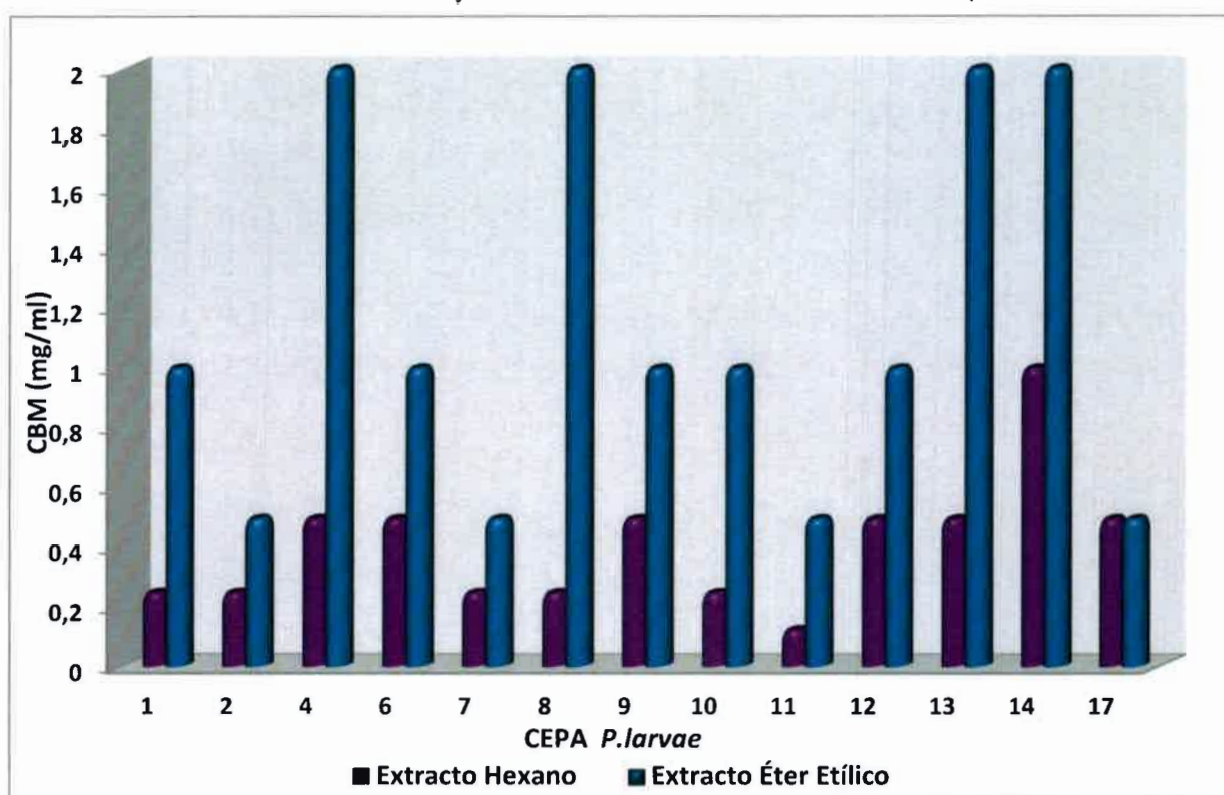
CEPAS	CONCENTRACIÓN EXTRACTO ETÉR ETILICO (mg/ml)								
<i>P. larvae</i>	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,032	0,016	0,008
1	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
2	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
4	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
6	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
7	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
8	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
9	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
10	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
11	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
12	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
13	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
14	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
17	SC	SC	SC	CC	CC	CC	CC	CC	CC

SC: sin crecimiento CC: con crecimiento. Los cuadros lilas indican la CBM.

En el gráfico 2 se comparan los valores de CBM obtenidos con los extractos hexano y éter etílico frente a todas las cepas ensayadas. Se puede ver que el EH presentó los valores más bajos de CBM para todas las cepas ensayadas. Las cepas 2, 7 y 11 tuvieron comportamientos similares frente a los extractos, sólo la cepa 11 tuvo una CBM menor frente al EH.

Las cepas 1, 6, 9, 10 y 12 también se comportaron de forma similar. Todas tuvieron una CBM de 1 mg/ml frente al EE, y frente al EH las cepas 1 y 10 tuvieron una CBM 0,25 mg/ml, mientras que las cepas 9, 6 y 12 presentaron una CBM de 0,5 mg/ml.

Gráfico 2: Valores de CBM de EH y EE obtenidos de *M. verticillata* frente a cepas de *P. larvae*

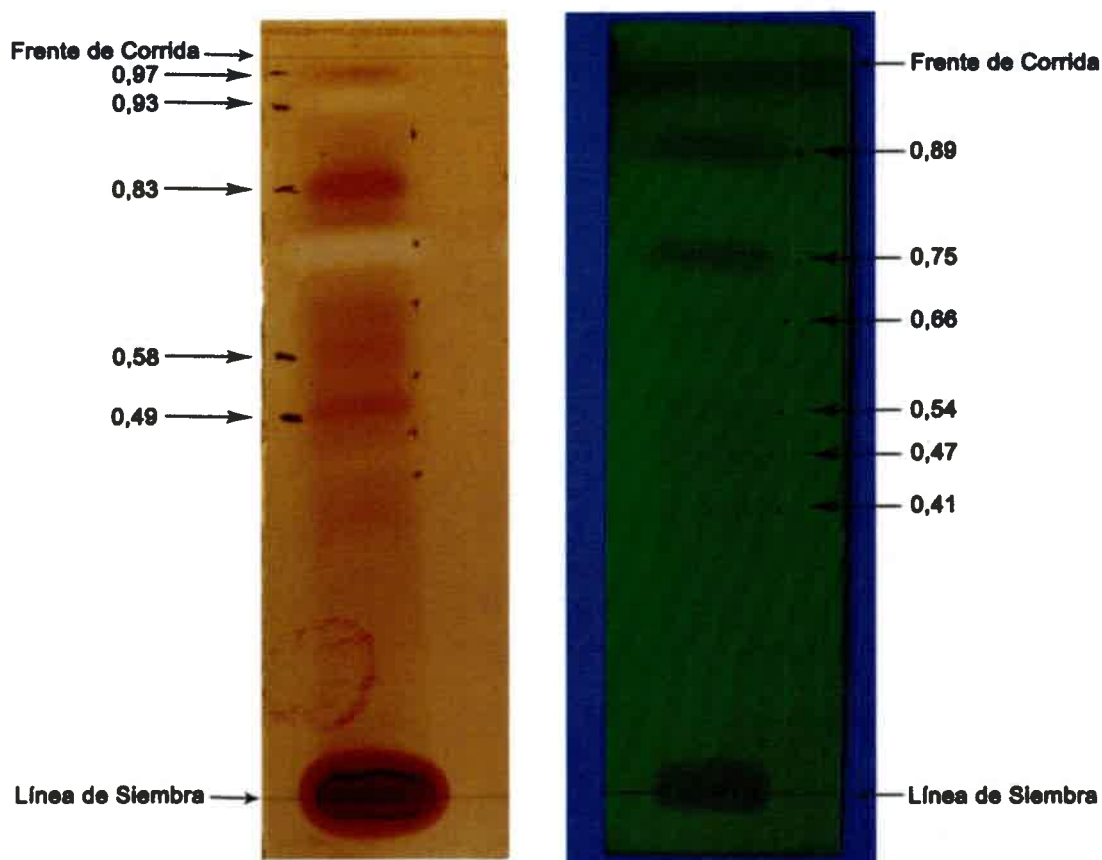


### 3- Cromatografía en capa delgada (TLC)

Dado que el EH fue el que mostró mayor actividad antibacteriana frente a *P. larvae*, se decidió estudiarlo en mayor detalle, para lo cual se procedió a separar sus componentes por medio de una cromatografía en capa delgada.

Después de probar distintas combinaciones de solventes como fase móvil se logró una mejor resolución de bandas con éter etílico/hexano (7:3)

En total se obtuvieron 11 bandas bien definidas. De estas, 6 bandas se observaron bajo luz UV 254 nm, las cuales correspondieron a los Rf: 0,41; 0,47; 0,54; 0,66; 0,75 y 0,89. Las otras 5 bandas se observaron al revelar las placas con yodo, y correspondieron a los Rf: 0,49; 0,58; 0,83; 0,93 y 0,97. La Banda Rf 0,93 no se colorea con yodo, sino que queda blanca. Lo mismo sucede con la banda que aparece a Rf: 0,75 bajo luz UV (Fig. 12).



**Fig. 12- Cromatofolios obtenidos con EH.** El de la izquierda está revelado con yodo y el de la derecha con luz UV 254 nm. A los costados de cada uno se indican los valores de Rf de cada banda.

Los cromatofolios que presentaron buena definición de bandas, y no habían sido tratados con yodo, se esterilizaron bajo luz UV durante 24 Hs y se utilizaron para realizar las bioautografías.

#### 4- Bioautografía

Con la finalidad de identificar cuáles son los componentes del EH de de *M. verticillata* responsables de su actividad antibacteriana, los cromatofolios con buena definición de bandas se analizaron empleando la técnica de bioautografía. Esta técnica es una herramienta muy útil para la identificación de sustancias antibacterianas ya que permite realizar, por medio de los cromatogramas, un escaneo preliminar para localizar compuestos activos, incluso en matrices tan complejas como los extractos vegetales [Ramirez y Marin Castaño, 2009].

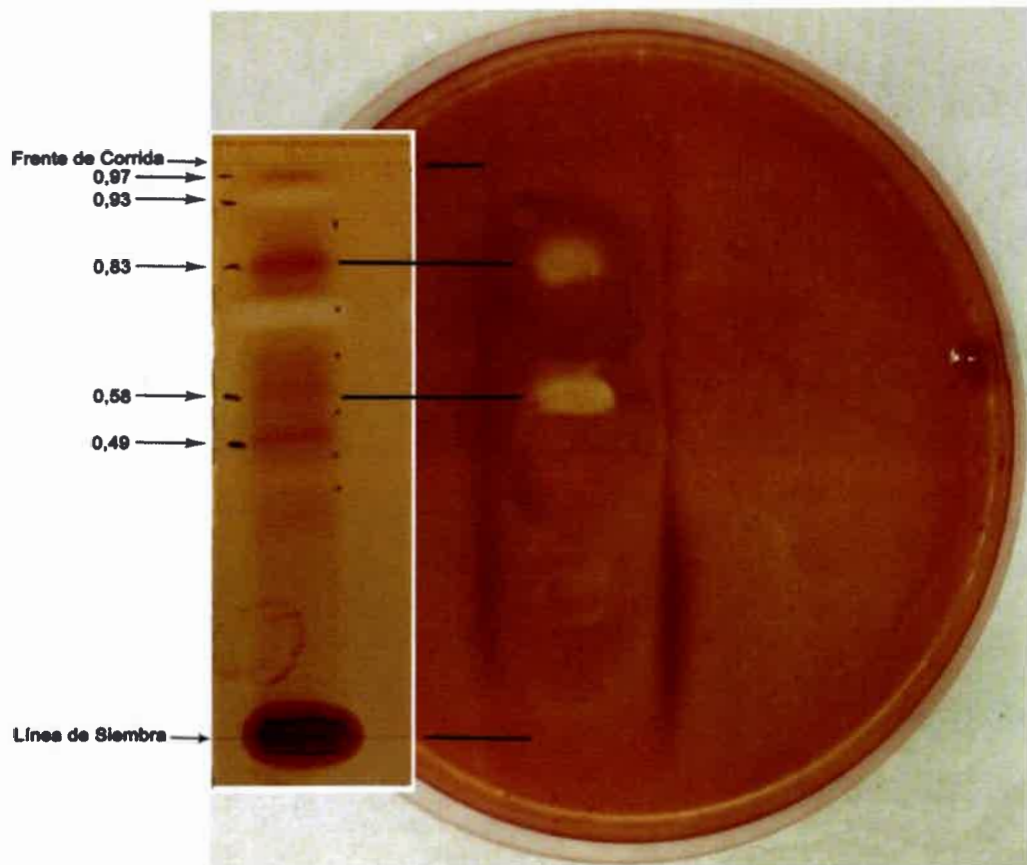
La bioautografía ha sido utilizada en un gran número de trabajos para evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana de extractos vegetales y aceites esenciales frente a distintos patógenos [Arias y col., 2004; Zampini y col., 2007; Shai y col., 2009; Padon Baquero y col., 2013; Kagan y Flythe, 2014]. Gende y col., 2008, han evaluado la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* frente a *P. larvae*, identificando los componentes activos responsables de dicha actividad utilizando la técnica de bioautografía..

En las autobiografías de los cromatofolios del EH se observaron dos zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo que correspondieron a los valores de Rf 0,58 y 0,83. Éstos fueron comparados con los valores de Rf de los cromatofolios y se observó que dichos valores coinciden con los de dos bandas del cromatofolio revelado con yodo. Estas bandas no fueron visualizadas cuando la placa se reveló bajo luz UV a 254 nm (Fig. 13).

Esto demostraría que en el EH de *M. verticillata* hay al menos dos compuestos distintos con actividad antimicrobiana frente a *P. larvae*.

En la bibliografía consultada no se encontraron referencias donde se hayan evaluado extractos de *M. verticillata*, obtenidos con solventes orgánicos, como agentes antibacterianos. Si se han estudiado las propiedades antibacterianas del aceite esencial de esta especie frente a diversos microorganismos, como *Bacillus cereus*, *Salmonella* Tiphys, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli* [De Feo y col., 1998; Primo y col., 2001; Vogt y col., 2010]; y también se ha comprobado, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio que el aceite esencial y los extractos acuosos de *M. verticillata* poseen actividad antibacteriana frente a *P. larvae* [González y Marioli, 2010]. En cuanto a extractos obtenidos a partir de esta aromática, hay estudios que han demostrado que extractos alcohólicos, clorofórmicos y hexánicos presentan actividad antiviral [Zanon y col., 1999; Sabini y col., 2010].

Estas referencias bibliográficas muestran el gran potencial que posee *M. verticillata* para ser utilizada como agente antimicrobiano, lo cual apoya los resultados obtenidos en este estudio que mostraron que el EH de *M. verticillata*, presenta actividad antibacteriana frente a *P. larvae*, y que al menos dos componentes de éste son responsables de dicha actividad.



**Fig. 13- Bioautografía.** Se compara la bioautografía realizada con el EH frente a la cepa 17 de *P. larvae* con una TLC de dicho extracto revelada con yodo. Se pueden observar las áreas de inhibición del crecimiento alrededor de las bandas de Rf 0,58 y 0,83.

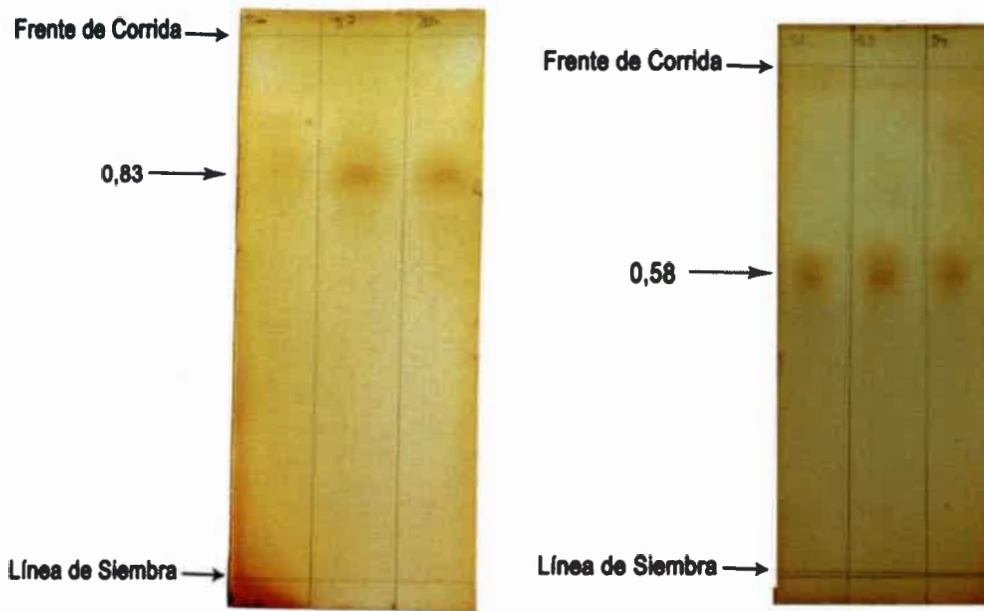
## 5- Separación de las bandas con actividad antimicrobiana

Con el fin de estudiar las propiedades individuales de las bandas de Rf 0,83 y 0,58; que presentaron actividad antimicrobiana frente a *P. larvae* en el ensayo de bioautografía, se procedió a separarlas por medio de una cromatografía en columna tipo flash.

Para el armado de la columna se utilizó Silica Gel 60 como fase estacionaria y una mezcla de éter etílico/hexano 7:3 como fase móvil. La fase móvil se hizo correr con un flujo aproximado de 1,2 mL/min, y se fueron recogiendo fracciones de 3 ml. Las bandas purificadas en cada fracción recolectada se

identificaron por TLC, en la figura 14 se observan placas de TLC reveladas con yodo, donde se pueden ver las bandas 0,83 y 0,58 separadas.

Partiendo de 1235 mg de EH se obtuvieron 89,7 mg de la banda con Rf de 0,83 y 68,1 mg de la banda con Rf de 0,58. Es decir que se tuvo un rendimiento del 7,26% para la banda 0,83 y del 5,51% para la banda 0,58.



**Fig. 14- Placas de TLC reveladas con yodo.** En el cromatofólio de la derecha se observa la banda 0,83 aislada y en el de la izquierda la banda 0,58.

## 6- Actividad antibacteriana de las bandas 0,83 y 0,58

Para evaluar la actividad antibacteriana de las bandas por separado se determinaron los valores de CIM y CBM de las mismas, frente a 3 cepas de *P. larvae*. Las cepas utilizadas en estos ensayos presentaron cada una distintos valores de CIM frente al EH completo.

En la tabla 7 se resumen los valores de CIM y CBM que presentó cada una de las cepas ensayadas frente al EH completo y a las bandas con Rf de 0,83 y 0,58 por separado.



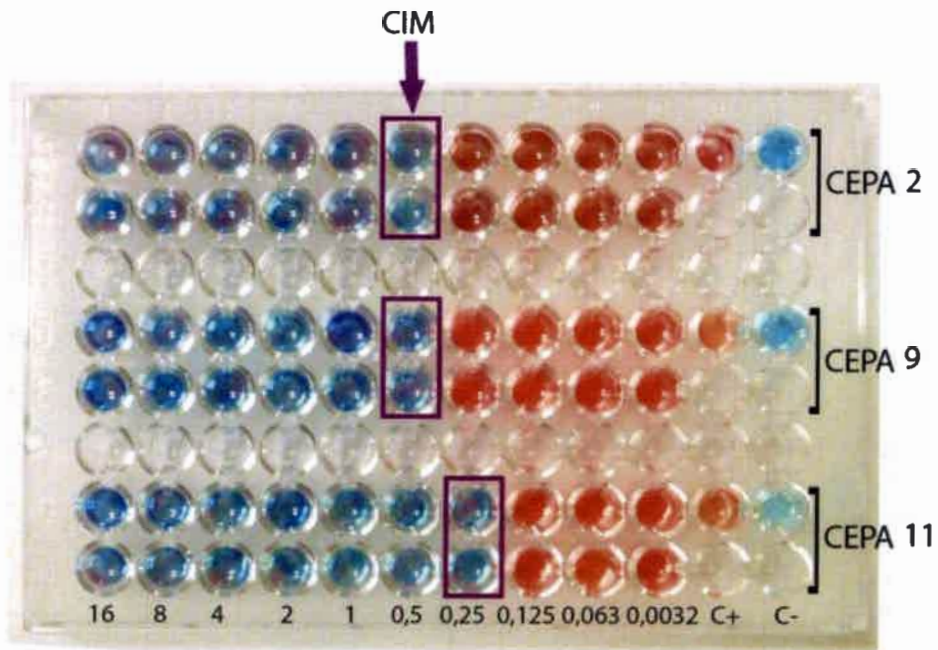
**Tabla 7:** Valores de CIM y CBM del EH y las bandas 0,83 y 0,58 frente a cepas de *P. larvae*

CEPAS <i>P. larvae</i>	EXTRACTO HEXANO		BANDA 0,83		BANDA 0,58	
	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)
2	0,063	0,5	0,5	NP	2	NP
9	0,125	0,5	0,5	NP	4	NP
11	0,032	0,125	0,25	NP	1	NP

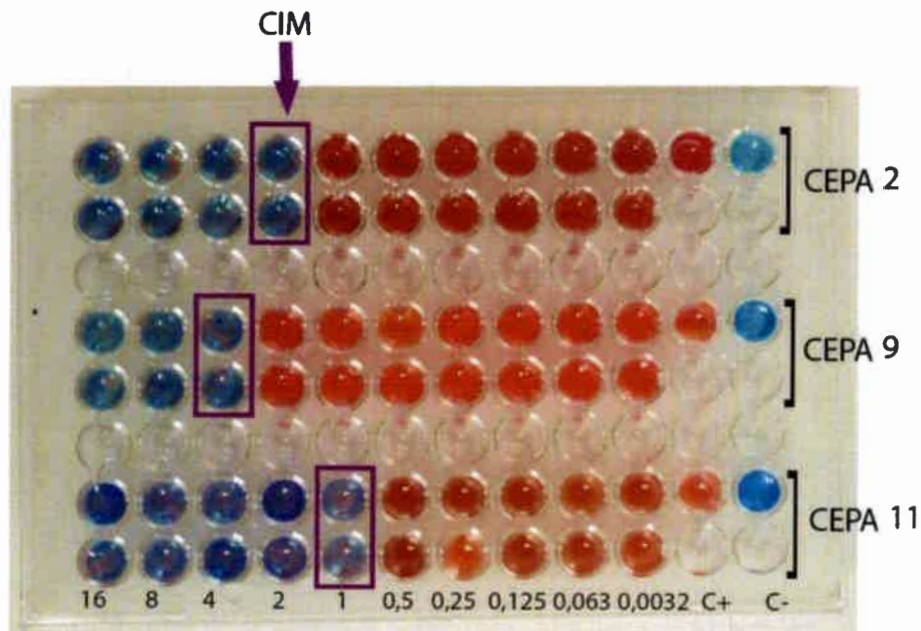
NP: no presenta

En la tabla se puede observar que ninguna de las bandas aisladas presentó valores de CBM a las concentraciones ensayadas (la concentración más alta ensayada fue de 16 mg/ml).

La CIM se determinó por medio de la técnica de microdilución en caldo [Mann y col., 1998] (Figs. 15 y 16). La banda 0,83 presentó valores de CIM de 0,5 mg/ml frente a las cepas 2 y 9, y de 0,25 mg/ml frente a la cepa 11. La banda 0,58 tuvo una CIM de 2 mg/ml frente a la cepa 2, 4 mg/ml frente a la cepa nueve, y de 1 mg/ml frente a la cepa 11.

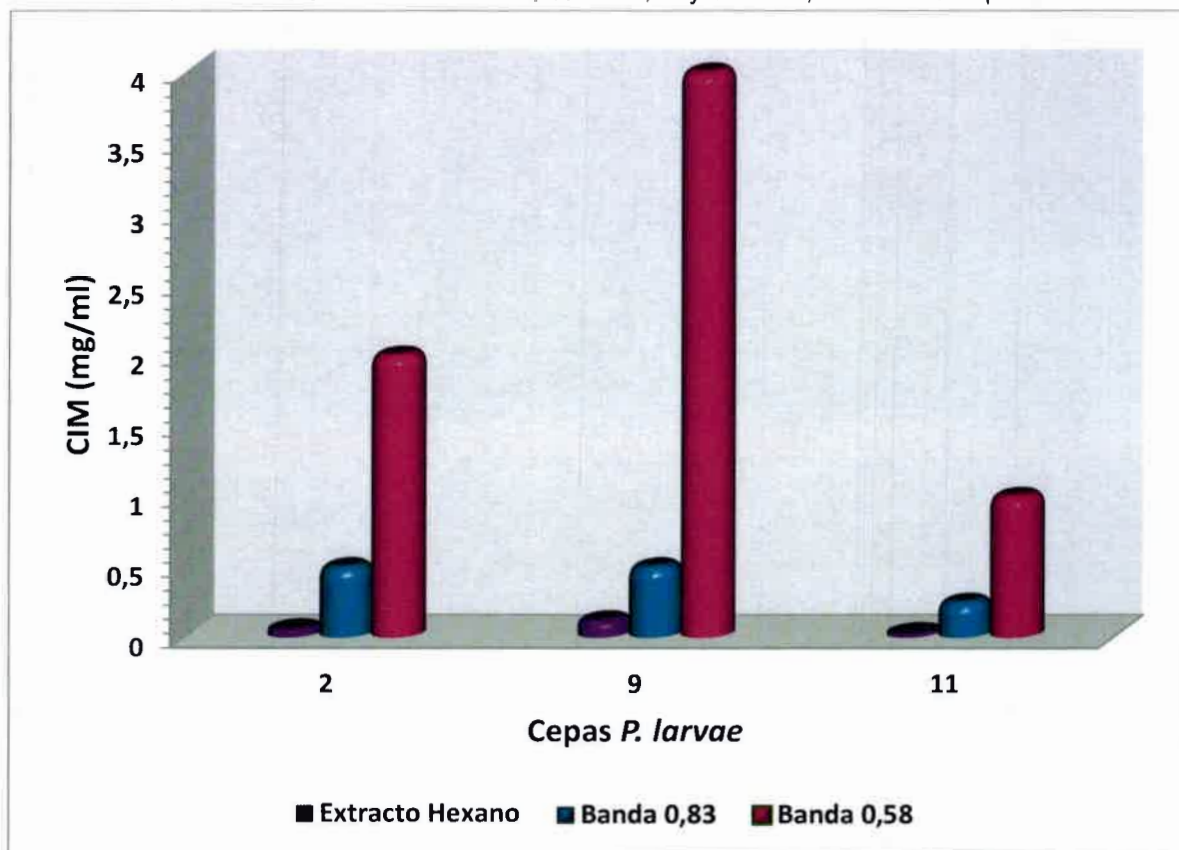


**Fig. 15- Determinación de la CIM de la banda 0,83.** Sobre las cepas 2, 9 y 11 de *P. larvae*. En la parte inferior de la imagen se encuentran las concentraciones de la banda 0,83 colocadas en cada pocillo, en mg/ml. C+: control de crecimiento positivo, C-: control de crecimiento negativo.



**Fig. 16- Determinación de la CIM de la banda 0,58.** Sobre las cepas 2, 9, y 11 de *P. larvae*. En la parte inferior de la imagen se encuentran las concentraciones de la banda 0,58 colocadas en cada pocillo, en mg/ml. C+: control de crecimiento positivo, C-: control de crecimiento negativo.

**Gráfico 3:** Valores de CIM de EH, banda 0,83 y banda 0,58 frente a cepas de *P. larvae*



Si comparamos estos valores con los obtenidos utilizando en EH completo vemos que la Banda 0,83 tuvo valores de CIM 4 y 8 veces mayores que éste, mientras que la banda 0,58 presentó valores de CIM 32 veces mayores que el EH (Gráfico 3). Estos resultados muestran claramente que, si bien las bandas por separado tienen actividad antibacteriana frente a *P. larvae*, el EH completo es un antimicrobiano mucho más efectivo, lo que sugiere la existencia de un efecto sinérgico entre sus componentes.

Se dice que existe sinergia entre dos o más compuestos químicos cuando la acción de dichos compuestos combinados es mayor que la suma aritmética de las acciones de los compuestos individuales [Cseke y col., 2006]. Varios estudios realizados con plantas medicinales sugieren que sus propiedades se deben a la

interacción de múltiples constituyentes, y que gran parte de estas se pierden cuando sus componentes se analizan por separado [Ríos y col., 2005; Cseke y col., 2006; Juno y col., 2011].

Actualmente se utilizan algunos cócteles de drogas para tratar enfermedades como infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), algunos tipos de cáncer, y para combatir infecciones con microorganismos resistentes a múltiples drogas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Enterococcus*. Estos tratamientos con mezclas sinérgicas de químicos específicos han demostrado ser más efectivos en bajas dosis, que en altas dosis de un compuesto particular [Cseke y col., 2006].

Las plantas, al no contar con mecanismos de evasión para defenderse, ya que se encuentran ancladas al suelo u otro sustrato, han necesitado desarrollar mecanismos químicos de defensa. Esto ha contribuido a que las plantas medicinales, por su propia naturaleza, posean un amplio espectro de compuestos orgánicos que se han desarrollado evolutivamente a través de los milenios para ser biológicamente activos y constituir un eficiente sistema de defensa de la planta frente a depredadores y patógenos. Esto refuerza la idea de que son más efectivos los extractos completos de plantas medicinales, que sus componentes aislados, ya que los químicos que componen estos extractos han evolucionado conjuntamente como la combinación sinérgica más eficiente [Firn y col., 2000; Wink, 2003; Cseke y col., 2006; Ringulet y Viña, 2013].

Nuestros resultados concuerdan con esta idea, ya que las bandas 0,83 y 0,58 mostraron una actividad antimicrobiana frente a *P. larvae* mucho menor que el EH entero. Es posible que las demás bandas que se observaron al separar el extracto, si bien no presentaron actividad por si solas, pueden tener un rol importante al interactuar con las bandas activas de forma sinérgica e incrementar la actividad antibacteriana de éstas.

Estos resultados son muy interesantes, ya que una de las razones por la que se comenzó a investigar nuevos antibióticos o compuestos naturales como tratamientos alternativos para Loque Americana, es que *P. larvae* a desarrollado

resistencia a OXT, el principal antibiótico utilizado para combatir esta enfermedad. Sin embargo, los microorganismos son muy resilientes, y con el tiempo podrían desarrollar resistencia a los nuevos compuestos diseñados para combatirlos. Utilizar extractos de plantas medicinales completos, en lugar de un solo compuesto aislado a partir de estos, podría presentar una solución más definitiva a este problema. Atacar a la bacteria con un coctel de compuestos naturales impediría que esta desarrollara resistencia al tratamiento, ya que debería generar mecanismos de resistencia a varios compuestos y no sólo a uno.

## 7- Determinación de la toxicidad oral aguda del EH en abejas adultas

Dado que los resultados obtenidos muestran que el EH de *M. verticillata* presenta actividad antibacteriana contra *P. larvae*, lo que le confiere el potencial de ser utilizado en el tratamiento de la Loque Americana, se procedió a testear la toxicidad de dicho extracto en abejas adultas.

Para determinar la toxicidad de un compuesto este puede ser administrado de forma oral o tópica. Se decidió testear la toxicidad oral del extracto, ya que los compuestos que se encuentran en el alimento son pasados a los productos de la colmena, incluida la jalea real que se utiliza para alimentar a las larvas. Por ello, determinar la toxicidad oral para las abejas adultas es muy importante, ya que ellas serán afectadas por la mayor concentración del EH.

Para realizar el test se utilizaron abejas adultas *Apis mellifera* L, que se recolectaron por la mañana en el Apiario Experimental del Programa de Apicultura de la Secretaria de Extensión y Desarrollo de la UNRC, y se colocaron en recipientes de poliestireno tapados con gasa, en grupos de 20 abejas (Fig. 17).

Se trabajó con cinco grupos tratamiento de EH: 12,5; 25, 50, 100 µg/abeja y 200 µg/abeja respectivamente; tres controles con el estándar

tóxico dimetoato: 0,1; 0,2; 0,4  $\mu\text{g}/\text{abeja}$  respectivamente; y con sacarosa 50% p/v como control negativo. Todos los grupos se ensayaron por triplicado.

La  $\text{LD}_{50}$  a las 24 Hs del compuesto de referencia (dimetoato) fue de 0,29  $\mu\text{g}/\text{abeja}$  lo cual coincide con el rango de 0,1-0,35  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ , propuesto por Directrices para los ensayos de productos químicos, sección 2, efectos en sistemas bióticos, Guía N° 213 de la OCDE [<http://www.oecd-ilibrary.org>]. En el anexo II se detalla el procedimiento realizado para el cálculo de la  $\text{LD}_{50}$  del dimetoato.

No se pudo determinar la  $\text{LD}_{50}$  del EH, ya que este no presentó efecto letal, incluso a la dosis más alta ensayada (200  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ), por lo que se puede considerar que no es tóxico para las abejas.

Es muy común cuando se trabaja con extractos naturales o aceites esenciales que no se puede determinar la  $\text{LD}_{50}$  [Flesar y col., 2010]. Esta es una las ventajas de usar derivados de plantas medicinales, ya que son prácticamente no tóxicos, y no dejarán residuos peligrosos en los productos de la colmena.



**Fig. 17- Recolección de abejas para el test de toxicidad oral. (a)** M.V Paula Melegatti recolectando las abejas a partir de un marco en el Apiario Experimental del Programa de Apicultura de la Secretaría de Extensión y Desarrollo de la UNRC. **(b)** Recipiente de poliestireno en el que se recolectaron las abejas.



*CONCLUSIONES*

- ☑ El EH y el EE, obtenidos a partir de *Minthostachys verticillata* (“peperina”), presentaron actividad antibacteriana frente a *Paenibacillus larvae*, agente causal de la Loque Americana.
- ☑ El EH presento mayor actividad antimicrobiana contra *P. larvae* que el EE.
- ☑ La fase móvil éter etílico/hexano 7:3, resultó ser la más adecuada para separar los componentes del EH por TLC, obteniendo una buena resolución de bandas, lo que permitio visualizar 6 bandas bajo luz UV a 254 nm y otras 5 bandas al revelar con Yodo, las cuales no se observaron bajo luz UV.
- ☑ Por medio de bioautografía se observó que las bandas de Rf 0,83 y 0,58 del EH, reveladas con yodo, presentaron actividad antibacteriana frente a *P. larvae*.
- ☑ Las bandas activas se separaron con cromatografía en columna tipo flash, y si bien ambas bandas presentaron actividad antibacteriana, esta fue mucho menor que la actividad del EH entero, lo que sugiere que existe un efecto sinérgico entre los componentes del extracto.
- ☑ El EH resultó ser no tóxico para las abejas adultas, incluso a concentraciones de 200 µg/abeja.
- ☑ Los resultados obtenidos muestran que el EH de *M. verticillata* tiene el potencial de ser utilizado como tratamiento alternativo de la Loque Americana, ya que presenta actividad antibacteriana contra *P. larvae* y no es tóxico para las abejas adultas.
- ☑ Uno de los problemas que presenta el uso de antibióticos es que *P. larvae* ha desarrollado mecanismos de resistencia a estos. El EH no sólo no presenta este problema, sino que el hecho que sea más efectivo utilizar el extracto completo, tiene la ventaja de disminuir considerablemente la



probabilidad de que la bacteria desarrolle resistencia al extracto con el tiempo, como ha sucedido con la OXT.

- ☑ Otra ventaja de los extractos naturales es que, a diferencia de los antibióticos, no dejan residuos peligrosos en los productos de la colmena, mejorando la inocuidad y calidad de estos. Para un país como Argentina, donde un 95% de su producción de miel se exporta, el poder tratar las colmenas sin el riesgo de que queden residuos es muy importante, ya que la mayoría de los países tienen una ley de “tolerancia cero” para la presencia de residuos orgánico o inorgánicos en la miel. Además se podría tratar la enfermedad sin tener que suspender la comercialización del producto.

#### PROYECCIONES:

- ☑ Todos estos resultados ameritan que se siga estudiando al EH de *M. verticillata* para el tratamiento de Loque Americana, concentrándose en determinar en mayor detalle su composición y analizar distintas dosis y formas de administración que hagan eficiente su uso a campo.



***BIBLIOGRAFIA***

- **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.** (1997) Background of American foulbrood in Argentina. *Bee World* 78 (2): 92-95.
- **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; 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.
- **Alippi, A. M; Leon I. E, Lpoez, A. C.** (2014) "Tetracycline-resistance encoding plasmids from *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease, isolated from commercial honeys". *International Microbiology* 17: 49-61.
- **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.** (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.
- **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.
- **Bailey, L; Ball, B. V.** (1991) *Honey Bee Pathology*. 2º edición, pág:193. Academic Press; London, UK.
- **Bakonyi, T; Derakhshifar, I; Granbesteiner, E; Nowotny, N.** (2010) "Development and evaluation of PCR assay for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization". *Applied and Environmental Microbiology*. 69(3): 1504-1510.

- 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.
- Bianco, C. A; Cantero, J. J. (1992) "Las plantas vasculares del suroeste de la provincia de Córdoba". Ed. De la Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Bilikova, K; Papova, M; Trusheva, B; Bankova, V. (2013) "New anti- *Paenibacillus larvae* substances purified from propolis" Apidologie 44(3): 278-285.
- Boligon, A. A; Brum, T. F; Zadra, M; Piana, M; Alves, C. F. S; Fausto, V. P; Barboza, V. S; Vaucher, R. A; Santos, R. V. C; Athayde, M. L. (2013) "Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*". Journal of Invertebrate Pathology, 112: 105-107.
- Brodsgaard, C.J; Ritter, W; Hansen, H; (1998) "Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores". Apidologie 29.
- 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.
- 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.
- Ciccía, G; Coussio, J; Mongelli, E. (2000) "Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants". Journal of Ethnopharmacology 72: 185-189.
- Cseke, L. J; Kirakosyan, A; Kaufman, P. B; Warber, S. L; Duke, J. A; Brielmann, H. L. (2006) "Natural products from plants". 2ª edición. Taylor & Francis Group. Estados Unidos.
- 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.** (2005) "Manual de procedimientos: enfermedades de las abejas". SENASA
- **Demo, M. S; Oliva, M. M.** (2008) "Antimicrobial activity of medicinal plants from South America". *Botanical Medicine in Clinical Practice*. Capítulo 17.
- **Dingman D. W; Stahly D. P.** (1983) "Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components". *Applied and Environmental Microbiology* 46: 860-9.
- **Elechosa, M. A.** (2009) "Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina". Proyecto Específico PNHFA4164: Desarrollo de tecnologías innovativas para la exploración, conservación, evaluación y utilización de plantas aromáticas nativas. IRB-CIRN-INTA Castelar.
- **Escobar, F. M; Cariddi, L. N; Sabini, M. C; Reinosa, E; Sutil, S. B; Torres, C. V; Zanon, S. M; Sabini, L. I.** (2012) "Lack of citotoxic and genotoxic effects of *Minthostachys verticillata* essential oil: studies *in vitro* and *in vivo*". *Food and Chemical Toxicology* 50: 3062-3067.
- **Evans, J. D.** (2003) "Diverse origins of tetracycline resistance en 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; 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.
- **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.
- **Firn, R.D; C.G. Jones.** (2000) "The evolution of secondary metabolism: a unifying model". *Molecular Microbiology* 37: 989–994.
- **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.
- **Forsgren, E; Laugen, A. T.** (2014) "Prognostic value of using bee and hive debris samples for detection of American Foulbrood disease in honey bee colonies". *Apidologie* 45: 10-20.

- **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.
- **Furniss, B. S; Hannaford, A. J; Smith, P. W; Tatchell, A. R.** (1989) "Vogel's textbook of practical organic chemistry". 5<sup>th</sup> Edition. Longman Scientific & Technical. United States.
- **Fuselli, S.R; de la Rosa, S.B.G; Eguaras, M.J; Fritz, R.** (2008a) "Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 2067–2072.
- **Fuselli, S.R; de la Rosa, S.B.G; Eguaras, M.J; Fritz, R.** (2008b) "Susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* to essential oils distilled from exotic and indigenous Argentinean plants". *J. Ess. Oil Res.* 20: 464–470.
- **Fuselli, S.R; de la Rosa, S.B.G; Gende, L.B; Eguaras, M.J; Fritz, R.** (2006) "Antimicrobial activity of some Argentinian wild plant essential oils against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American foulbrood (AFB)". *Journal of Apicultural Research*. 45: 2–7.
- **Fuselli, S.R; Maggi, M.D; de la Rosa, S.B.G; Principal, J; Eguaras, M.J; Fritz, R.** (2009) "In vitro antibacterial and antiparasitic effect of citrus fruit essential oils on the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* and the parasitic mite *Varroa destructor*". *Journal of Apicultural Research*. 48: 77–78.
- **Gende, L.B; Floris, I; Fritz, R; Eguaras, M.J.** (2008) "Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentina". *Bulletin of Insectology* 61: 1–4.
- **Gende, L.B; Maggi, M.D; Fritz, R; Eguaras, M.J; Bailac, P.N; Ponzi, M.I.** (2009) "Antimicrobial activity of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* essential oils against *Paenibacillus larvae*". *Journal of Essential Oil Research*. 21: 91–93.
- **Genersch, E; Ashiralieva, A; Fries, I;** (2005). "Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae*, the causative agent of American foulbrood disease in honey bees". *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 7551–7555.
- **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.
- **González, M. J; Marioli, J. M.** (2010) "Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatics plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood". *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 209-213.
- **González, M.** (2011) "Caracterización de algunos productos naturales con actividad antimicrobiana contra *Paenibacillus larvae*, agente causal de Loque Americana" Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

- **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.
- **Gough, H. J; Mcldoe, E. C; Lewis, G. B.** (1994) "The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity test on honey bees (*Apis mellifera* L.)". *Journal of Apicultural Research*. 33: 119-125.
- **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.
- **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.
- **Hitchcock, J.D; Stoner, A; Wilson, W.T; Menapace, D.M.** (1979) "Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honeybee larvae of various ages (Hymenoptera: Apidae)". *Journal of the Kansas Entomological Society*. 52, 238–246.
- **Hrabak, J; Martinek, K;** (2007) "Screening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* by using substrate-SDS–polyacrylamide gel electrophoresis". *Journal of Apicultural Research*. 46,160–164.
- **Juno, H. A; Sy-Cordero A. A; Etefagh K. A; Burns J. T; Micko, K. T; Graf, T. N; Richter, S. J; Cannon, R. E; Gaudet, R; Oberlies, N. H; Cech, N. E.** (2011) "Synergy-directed fractionation of botanical medicines: a case study with goldenseal (*Hydrastis canadensis*)" *Journal of Natural Products*. 74(7): 1621-1629.
- **Kagan, I. A; Flythe, M. D.** (2014) "Thin-Layer chromatographic (TLC) separation and bioassays of plant extracts to identify antimicrobial compounds". *Journal of visualized experiments*. 65: e5411- e5411.
- **Katznelson, H.** (1950). "*Bacillus pulvifaciens* (n. Sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae". *Journal of Bacteriology*. 59, 153–155.
- **Lauro, F.M; Favaretto, M; Covolo, L; Rasso, M. and Bertoloni, G.** (2003) "Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol". *Journal of Food Microbiology*. 81: 195–201.
- **Lee, H; Churey, J. J; Worobo, R. W.** (2009) "Isolation and characterization of a protective bacterial culture isolated from honey active against American Foulbrood disease". *FEMS Microbiology Letters* 296: 39-44.
- **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.
- **Madigan, M. T; Martinko, J. M. y Parker, J.** (1999) "Brock: Biología de los microorganismos". 8<sup>va</sup> Edición. Ed. Prentice Hall. Madrid.

- **Maldonado, A. M; Calvo, D; Cariddi, L. N; Demo, M.** (2001) "Efectos linfoproliferativos y antimicrobianos de productos vegetales derivados de *Minthostachys 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.
- **Martel, A.C; Zeggane, S; Drajnudel, P; Faucon, J.P; Aubert, M.** (2006) "Tetracycline residues in honey after hive treatment". Food Additives & Contaminants. A 23 (3): 265–273.
- **Martinez, J; Simon, V; Gonzales, B; Conget, P.** (2010) "A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnosis and screening of American Foulbrood". Letters in Applied Microbiology 50: 603-610.
- **Mihai, C. M; Marghitas, L. A; Dezmirean, P. S; Chirila, F; Mortiz, R. F; Schluns, H.** (2012) "Interacción among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*". Journal of Invertebrate Pathology. 110: 68- 72.
- **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.
- **Moredo, M. A; Landoni, M. F; Perfumo, C. J.** (2001) "Concentración inhibitoria mínima en cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniade* en la Republica Argentina". Analecta Veterinaria. 21 (2): 6-11.
- **Murray, D. K; Aronstein, K. A; De Leon, J. H.** (2007) "Analysis of pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*". Plasmid 58: 89-100.
- **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.
- **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.
- **Padon Baquero, L. C; Venegas Gordillo, J; Rendón Fernandez, M. R; Santos Arias, R; Hernandez Rodriguez, P.** (2013) "Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de hojas de cuatro especies agroforestales de orquídea colombiana". Revista Cubana de Plantas Medicinales. 8(1): 57-70.
- **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.



- 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.
- 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.
- Ramirez, L. S; Marín Castaño, D. (2009) "Metodologías para evaluar *in-vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal". Scientia Et Technica. 42: 263-268.
- Ratera, E. L; Ratera, M. O. (1980) "Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular". Ed. Hemisferio Sur. Argentina.
- Rauch, S; Ashiralieva, A; Hedtke, K; Genersch, E; (2009) "Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees". Appl. Environmental Microbiology. 75: 3344–3347.
- 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.
- Reybroeck, W; Daeseleire, E; De Brabander, H. F; Herman, L. (2012) "Antimicrobials in beekeeping" Veterinary Microbiology 158: 1-11.
- Reyes, M. G; Torres, M. J; Maggi, M. D; Marioli, J. M; Gil, R. R; Sosa, V. E; Uriburu, M. L; Audisio, M. C. (2013) "*In vitro* inhibition of *Paenibacillus larvae* by different extracts and pure compounds from *Flouresia* spp.". Industrial Crops and Products 50: 758-763.
- Reynaldi, F. J; Lacunza, J.; Alippi, A. M; Rule, R. (2010) "Unión de los antibióticos tilosina, tilmicosina y oxitetraciclina a proteínas presentes en abejas, larvas y productos de la colmena de *Apis mellifera* L." Revista Argentina de Microbiología 42: 279-283.
- Ringulet, J; Viña, S. (2013) "Productos naturales vegetales". 1ª Edición. Edulp: Editorial de la Universidad de La Plata. Argentina.
- Ríos, J. L; Recio, M. C. (2005) "Medical Plants and antimicrobial activity". Journal of Ethnopharmacology. 100: 80-84.
- Rossi, Y. E; Canavoso, L; Palacios, S. M. (2012) "Molecular response of *Musca domestica* L. to *Minthostachys verticillata* essential oil, (4R)(+) – pulegone and menthone". Fitoterapia 83: 336-342.
- Sabaté, D. C; Carrillo, L; Audisio, C. (2009) "Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascophera apis* by *bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples". Resarch in Microbiology 160(3): 193-199.
- 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.

- **Schmidt-Lebuhn, A. N.** (2008) "Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae)". *Journal of Ethnopharmacology* 118: 343–353.
- **Seely, T. D; Tarpy, D. R.** (2007) "Queen promiscuity lowers disease within honeybee colonies". *Proceedings of the Royal Society B* . 274: 67-72.
- **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) "Honeybee pest, predators and diseases". Cornell University Press, Ithaca, USA 27-47.
- **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.
- **Sutil, S. B; Artesano, A; Vogt, V; Torres, C. V; Zanono, S. M; Sabini, L. I.** (2006) "*Minthostachys verticillata*: toxicity of its essential oil and mayor constituents to *Artemia salina* and cell lines". *Molecular Medicinal Chemistry* 10: 41- 42.
- **Tayar Peres, G; Rath, S; Reyes Reyes, F. G.** (2010) "A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey". *Food Control* 21(5): 620-625.
- **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, H.M; Waite, R.J; Wilkins, S; Brown, M.A; Bigwood, T; Shaw, M; Ridgway, C; Sharman, M.** (2006) "Effects of shook swarm and supplementary feeding on oxytetracycline levels in honey extracted from treated colonies". *Apidologie* 37: 51–57.
- **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.
- **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* essentials oil and its major components: antiherpetic selective action in HEp-2 cells". *Molecular Medicinal Chemistry* 21: 177-120.
- **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.
- **Wink, M.** (2003) "Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective". *Phytochemistry* 64: 3–19.

- **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.
- **Yoshiyama, M; Wu, M; Sugimura, Y; Takaya, N; Kimoto-Nira, H; Suzuki, C.** (2013) "Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials". *Journal of Invertebrate Pathology*. 112(1): 62-67.
- **Yue, D; Nordhoff, M; Wieler, L.H; Genersch, E;** (2008) "Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*)". *Environmental Microbiology* 10: 1612–1620.
- **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 Cordoba, Argentina". *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41: 59-62.

#### Páginas Web consultadas.

- <http://www.apinetla.com.ar/ar/sanidad/loque.htm>
- Subsecretaría de desarrollo de economías regionales:  
[http://64.76.123.202/SAGPYA/economias\\_regionales](http://64.76.123.202/SAGPYA/economias_regionales)
- SENASA: <http://www.senasa.gov.ar>
- INTA: <http://inta.gob.ar/apicultura>
- Sociedad Argentina de Apicultores: <http://www.sada.org.ar>
- [http://www.beekeeping.com/articulos/loque\\_american.htm](http://www.beekeeping.com/articulos/loque_american.htm)
- [www.vita-europe.com](http://www.vita-europe.com)
- <http://www.oecd-ilibrary.org>
- <http://www.ibm.com/ar/es>

A decorative horizontal band at the bottom of the page. It features a repeating pattern of purple hexagons. A vertical black stripe runs through the center of the band, creating a dark background for the text.

*ANEXOS*

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

**Medio MYPGP**

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

Para medio sólido:

Agar.....2 g

Para medio semisólido:

Agar.....0,6 g

**Reactivos y solventes para la obtención de los productos vegetales**

Hexano

Benceno

Éter etílico

**Fase móvil para cromatografía en capa delgada (TLC) y la cromatografía en columna**

Éter etílico/Hexano 7:3

**Reactivo para revelar cromatofolios**

Grageas de yodo

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

Resazurina al 0,01%

**Diluyente de los productos vegetales para la determinación de actividad antibacteriana**

Dimetilsulfóxido (DMSO)

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

Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) al 5%

**Antibiótico para la determinación de actividad antibacteriana**

Oxitetraciclina (OXT)

**Tabla 10:** Mortalidad de abejas a diferentes concentraciones de dimetoato a las 24 h

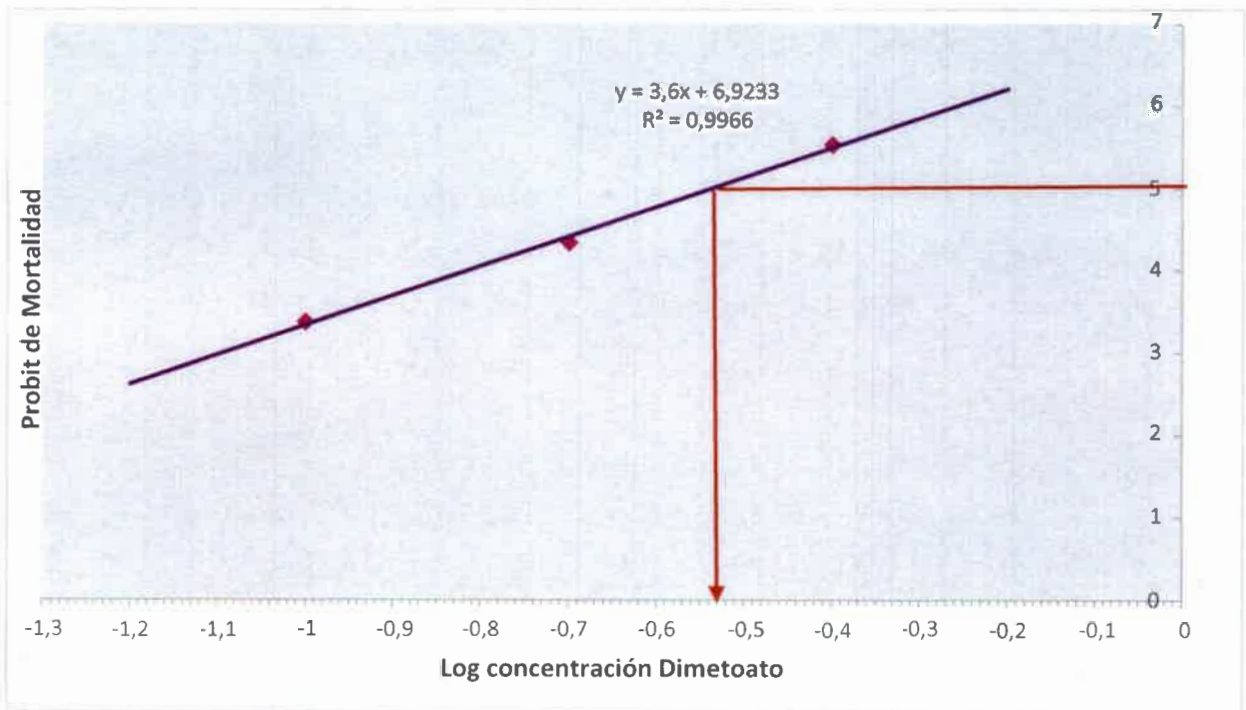
DIMETOATO (mg/abeja)	ABEJAS TOTALES	ABEJAS MUERTAS A LAS 24 h <sup>(a)</sup>	% MORTALIDAD A LAS 24 h	PROBIT DE MORTALIDAD <sup>(b)</sup>	LOG DE LA CONCENTRACIÓN <sup>(c)</sup>
0,1	20	1	5	3,36	-1
0,2	20	5	25	4,33	-0,7
0,4	20	14	70	5,52	-0,4

<sup>(a)</sup>Valores promediados de tres grupos.

<sup>(b)</sup>Valores obtenidos de la tabla de Finney para transformar porcentajes en Probit (Anexo III).

<sup>(c)</sup>Las concentraciones se convierten a logaritmo para que al graficar se obtenga una recta.

**Gráfico 4:** Probit de mortalidad vs. Log de la concentración de dimetoato



La LD<sub>50</sub> es la concentración de dimetoato a la que la mortalidad es del 50%, por lo que le corresponde un valor Probit de 5. Utilizando la ecuación de la recta obtenida en la regresión lineal de Probit podemos calcular dicha concentración.

**Cálculos:**

$$y = 3,6x + 6,9233$$

$$5 = 3,6x + 6,9233$$

$$x = (5 - 6,9233)/3,6$$

$$x = -0,53425$$

$$\text{antilog}(-0,53425) = 0,29$$

**La LD50 a las 24Hs del Dimetoato es de 0,29 µg/abeja**



Tabla 11: Tabla de Finney, para la transformación de porcentajes en Probit

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

En la columna de % se selecciona la decena del porcentaje que se quiere transformar, y en la fila la unidad. El número que se encuentra en la celda en que ambas convergen, es el valor de Probit que le corresponde a dicho porcentaje.

Por ejemplo si se quiere transformar un porcentaje del 28%, el valor Probit que le corresponde es de 4,42.