

# Evaluación de la actividad inhibitoria, *in vivo* e *in vitro*, del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y cinco diluyentes sobre cultivos de *Ascosphaera apis*

## *In vitro* and *in vivo* evaluation of the inhibitory activity of *Cymbopogon citratus* essential oil and of five diluents on *Ascosphaera apis* cultures

Albo GN<sup>1,\*</sup>, Reynaldi FJ<sup>2,3</sup>, Altamirano R<sup>4</sup>, Vivot W<sup>5</sup>, Córdoba SB<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Curso de Producción Animal I. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata; <sup>2</sup> CCT-CONICET La Plata; <sup>3</sup> Cátedra de Micología Médica e Industrial, FCV, UNLP; <sup>4</sup> Cálculo Estadístico y Biometría, FCAYF, UNLP; <sup>5</sup> Departamento Micología INEI ANLIS "Dr. C. G. Malbrán".

\*Correo electrónico del autor: [albo.graciela@yahoo.com.ar](mailto:albo.graciela@yahoo.com.ar)

**Resumen:** Se evaluó la concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y cinco diluyentes sobre cultivos de *Ascosphaera apis*. Se determinó la toxicidad en abejas adultas y se calculó el radio de selectividad de la formulación aceite esencial-diluyente. Se determinó la CIM mediante difusión en agar MY20 de 28 aislados de *A. apis* de Argentina y Chile con los diluyentes Tween 80, dimetilsulfóxido (DMSO), propilenglicol, alcohol 70° y agua en concentraciones 150, 250, 500 y 750 mg/l, formuladas en 2,5 % del diluyente v/v. La toxicidad oral aguda sobre la abeja melífera adulta se evaluó para la combinación de *C. citratus* con propilenglicol y con alcohol 70°, usando dimetoato como control tóxico. El alcohol 70° resultó ser el mejor diluyente para el *C. citratus*, ya que presentó una CIM<sub>90</sub> de 250 mg/l, fue "virtualmente no tóxico" para abejas adultas y presentó un radio de selectividad de 6 µL/abeja a las 72 horas, transformándolo en la formulación aceite esencial-diluyente menos tóxica para el control de *A. apis* en colonias de abejas.

**Palabras clave:** *Ascosphaera apis*, *Apis mellifera*, *Cymbopogon citratus*, diluyentes, sensibilidad *in vitro*

**Abstract:** The minimal inhibitory concentration (MIC) of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and five diluents against *Ascosphaera apis* crops was evaluated. Toxicity in adult bees was determined. Also, the selectivity ratio of the essential oil-diluents' formulation was calculated. The MIC was determined by agar diffusion in MY20 medium against 28 isolates of *A. apis* from Argentina and Chile. Diluents Tween 80, dimethyl sulfoxide (DMSO), propylene glycol (PG), alcohol 70° and water at the concentrations 150, 250, 500 and 750 mg/l, formulated in the diluent 2.5 % v/v were used. The acute oral toxicity on adult honey bee was tested for *C. citratus* in combination with PG and alcohol 70°, using dimethoate as toxic control. Alcohol 70° was the best diluent for *C. citratus* since it exhibited a MIC<sub>90</sub> of 250 mg/l, was "virtually non-toxic" for adult bees and showed a selectivity ratio of 6 µL /bee at 72 hours, being the essential oil-diluent formulation least toxic to control *A. apis* in honey bee colonies.

**Key words:** *Ascosphaera apis*, *Apis mellifera*, *Cymbopogon citratus*, diluents, *in vitro* susceptibility

## Introducción

La República Argentina es el segundo productor mundial de miel, con una producción media de 65.000 toneladas, de la cual se exporta cerca del 90 %, por un valor aproximado de 195 millones de dólares (FAO 2014). En este sentido, las abejas melíferas (*Apis mellifera*, L.) no solo producen miel sino que aseguran la polinización de más del 80 % de los cultivos que proveen alimentos para el hombre en el mundo. Sin embargo, este eslabón tan importante en los procesos ecológicos y la economía mundial, se ve afectada por una gran cantidad de enfermedades infecciosas. Entre ellas, las infecciones fúngicas causadas por *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive & Spiltoir (Spiltoir 1955, Spiltoir y Olive 1955) y *Aspergillus* spp. (Jensen *et al.* 2013) son las micosis más frecuentes que afectan a las larvas de las abejas causando la cría yesificada y cría pétreas, respectivamente. Particularmente, *A. apis* puede causar una mortandad de hasta un 80% de la cría, generando pérdidas en la producción de miel que oscilan entre un 5 y un 37 % (Zaghloul *et al.* 2005). Desde su detección en la Argentina, en el año 1978 (Rossi y Carranza 1980), a la fecha existe escasa información sobre la prevalencia de la enfermedad en el país (Reynaldi *et al.* 2003). Sin embargo, en relevamientos recientes realizados en la provincia de Buenos Aires se determinó que la prevalencia de la infección llega al 7 % (com. pers. Guardia López A, 2014). En la actualidad, el proceso infeccioso no solo no se logró erradicar, sino que por el contrario, se extendió a otras zonas geográficas en el mundo (Aronstein y Murray 2010). En Argentina se la encuentra en todas las zonas productoras del país, posiblemente debido a la trashumancia de colmenas (Reynaldi *et al.* 2003). Algunos investigadores consideran que el avance del patógeno en nuestro país se debe, entre otras razones, a la poca resistencia natural que encontró el hongo para diseminarse.

La enfermedad afecta solo a los estadios larvales de las tres castas de abejas (obreras, zánganos y reina) y no a los individuos adultos. La vía de infección de las larvas (particularmente las de 3° y 4° estadio) es a través del aparato digestivo y se inicia con el consumo de alimento contaminado con esporas de *A. apis*. Una vez en el intestino medio las esporas del hongo germinan, probablemente activadas por el tenor de CO<sub>2</sub> (Aronstein y Murray 2010). Las larvas infectadas reducen, y finalmente detienen, el consumo de alimento. Recientemente, se identificaron ciertas enzimas producidas por *A. apis* que están implicadas en la penetración de la membrana peritrófica de las larvas (Teanthana y Chantawannakul 2008). La muerte ocurre como resultado de daños mecánicos y enzimáticos, desorganización en la circulación de la hemolinfa e intoxicación general. Finalmente, el

cuerpo de la larva se cubre de un micelio algodonoso blanco que ocupa el extremo posterior de la larva o prepupa pero no la cabeza, que puede desprenderse del cuerpo al extraer una larva. Las larvas muertas se desecan y transforman en cuerpos yesosos.

Para el control de la cría yesificada, tanto *in vitro* como a campo, se han evaluado numerosos y variados productos quimioterapéuticos; sin embargo, ninguno resultó 100 % eficaz (Davis y Ward 2003). Más aún, algunos investigadores sugieren que la aplicación de fungicidas sintéticos produce incremento de la mortalidad con la consiguiente pérdida de abejas (Mullin *et al.* 2010). Además, los fungicidas pueden contaminar la colonia y reducir la presencia de hongos benéficos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Rhizopus*, que juegan un papel crítico en la manufactura del alimento de las abejas, produciendo la fermentación fúngica del polen. Por esta razón, se han comenzado a estudiar otras alternativas para controlar la enfermedad como son las técnicas de manejo y profilaxis de las colonias y el uso de abejas resistentes a la infección por *A. apis*. La mejora del estado nutricional de las colonias, en conjunto con el reemplazo del 30 % de los cuadros de cría y alzas melarias de la colmena infectada, resultan medidas efectivas para reducir la carga esporular en la colmena (Aronstein y Murray 2010).

Estudios recientes proponen el uso de productos naturales y ecológicamente seguros para el control de la cría yesificada. Entre ellos, los compuestos antimicrobianos derivados de plantas y los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas resultan alternativas interesantes para el control de la infección. Asimismo, la presencia de otros hongos asociados con abejas (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Bacillus* spp.) favorece el equilibrio y sanidad en la colmena. En este sentido, los productos naturales son una excelente alternativa a los pesticidas sintéticos ya que permiten controlar la infección, disminuyendo el impacto negativo en el medio ambiente y la miel de consumo humano.

Los aceites esenciales han demostrado ser eficaces para el control de las enfermedades de *A. mellifera* L., tales como loque americana (Roussanova 2011), varroasis (Umpiérrez *et al.* 2013); nosemosis (Porrini *et al.* 2011) y cría yesificada (Klousek *et al.* 2012). Asimismo, el uso de sustancias naturales es de fundamental importancia, ya que impide la contaminación de los productos de la colmena (Mullin *et al.* 2010). Actualmente, se desconoce la existencia de resistencia a los aceites esenciales; aunque de presentarse, su aparición sería más lenta que lo observado con los otros fármacos usados en apicultura (Maggi *et al.* 2009).

Los objetivos del trabajo fueron: 1) determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un aceite

esencial de *C. citratus* con el uso de cinco diluyentes sobre 28 aislados de *A. apis*; 2) calcular la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), sobre la abeja melífera adulta, de *C. citratus* con el diluyente que menos afecta la actividad inhibitoria del aceite esencial y 3) establecer el radio de selectividad del aceite esencial y sus diluyentes sobre la abeja adulta.

## Materiales y métodos

### Pruebas de sensibilidad *in vitro* del aceite esencial de *C. citratus* con distintos diluyentes sobre *A. apis*.

El aceite esencial evaluado fue extraído del "lemongrass" (*C. citratus* (DC) Stapf), Fam. Poaceae. La extracción se realizó por hidrodestilación Clevenger (Norma IRAM 18729) del material de oreado (humedad 10-15%) a partir de hojas de lemongrass cultivadas en la zona de La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Se estudió la efectividad del aceite esencial con cinco diluyentes sobre 28 aislados de *A. apis*, procedentes de las provincias argentinas de Buenos Aires (n=14), Córdoba (n=5), Neuquén (n=1), La Pampa (n=3) y las regiones IX y X de Chile (n=5). Los aislados pertenecen a la colección de cultivos del Curso de Producción Animal I, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (FCAyF, UNLP), y fueron identificados en estudios previos a partir de larvas enfermas, yesificadas y otras aisladas de miel. Conservación: los aislados fueron conservados a -20 °C en viales con glicerol al 20 % en agua destilada estéril. Para la realización de los ensayos se tomó una alícuota del cultivo original y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

Se determinó la CIM *in vitro* del aceite esencial de *C. citratus* sobre 28 aislados de *A. apis* con el empleo de cinco diluyentes. Se utilizó el método de difusión en agar (CLSI 2010). Como diluyentes se seleccionaron: Tween 80 (Sigma-Aldrich, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), propilenglicol (PG) (Sigma-Aldrich, EUA), alcohol 70° y agua. El control de crecimiento fue en medio MY20 más los aislados estudiados.

### Aceite esencial

Se evaluó *C. citratus* en las concentraciones 150, 250, 500 y 750 mg/l, formulado en 2,5 % del diluyente v/v. Luego, cada concentración se adicionó al medio de cultivo MY20 [(glucosa al 20% (Britania, Argentina), agar 2 % (Britania, Argentina), extracto de malta 0,3 % (Sigma-Aldrich, EUA), extracto de levadura 0,3 % (Sigma-Aldrich, EUA) y peptona de carne 0,5 % (Sigma-Aldrich, EUA)] previamente atemperado

a 40 °C. Se prepararon las placas para todas las formulaciones aceite esencial/diluyente. Se efectuaron 2 repeticiones por tratamiento.

### Inóculo

Las cepas en cultivo puro se incubaron durante 7-10 días a 35 °C en placas de Petri con el medio de cultivo MY20. Se realizó una observación microscópica para confirmar la presencia de esporocistos con objetivo 40 X. A partir del cultivo de *A. apis* se tomó una alícuota con ansa y se realizó una suspensión en un tubo con 5 ml de agua destilada estéril. Con el fin de liberar las ascas y ascosporas contenidas en los esporocistos, se agregaron 5 perlas de vidrio estériles en la suspensión y se procedió a la agitación mediante un vórtex durante 30 seg y posterior centrifugación a 3500 rpm durante 5 min. A partir de esta suspensión de ascosporas, se preparó un inóculo final que contenía aproximadamente  $0,4-5 \times 10^4$  UCF/ml, que es el tamaño de inóculo establecido para los hongos miceliales en los documentos de referencia M38-A2 (CLSI 2010) y M51-A del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2010). La siembra del inóculo se realizó con ayuda de hisopo de algodón estéril embebido en la suspensión y posterior dispersión sobre las placas con medio MY20. Las placas sembradas fueron incubadas a 35 °C durante 7 días promedio. Luego, con ayuda de sacabocado estéril se retiraron trozos del cultivo de 7 mm de diámetro y se depositaron sobre la superficie de las placas de 15 cm de diámetro conteniendo medio MY20, y las distintas formulaciones aceite esencial/diluyente. Control de crecimiento: en cada placa se evaluaron cinco aislados de *A. apis* de diferentes orígenes geográficos.

Las placas fueron incubadas a 35 °C en oscuridad y leídas a 24, 48, 72 y 144 horas. El ensayo se realizó por duplicado.

### Lectura

La lectura fue visual y el tamaño del halo (en mm) se midió con calibre. Se consideró la  $CIM_{50}$  como la concentración más baja de aceite esencial capaz de provocar el 50 % o más de inhibición al compararlo con el control de crecimiento y la  $CIM_{90}$ , es decir, la concentración más baja que produce el 90 % o más de inhibición.

### Interpretación de los resultados

Al no existir puntos de corte para ningún aceite esencial no fue posible categorizar a los aislados como sensibles o resistentes. Se calculó la  $CIM_{50}$  y la  $CIM_{90}$ .

Se utilizó el análisis de Varianza y, posteriormente, el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## La toxicidad oral aguda en abeja melífera adulta

Los ensayos de toxicidad oral aguda del aceite esencial *C. citratus* sobre abeja melífera adulta, se realizaron en abril de 2014 en el laboratorio del Curso de Producción Animal I de la FCAyF, UNLP, Buenos Aires, Argentina. Se empleó la técnica propuesta por OEPP/EPPO (2010), con modificaciones y su resultado fue expresado como DL<sub>50</sub> (µg p.a./abeja). La clasificación de rangos de toxicidad utilizada en la determinación de DL<sub>50</sub> fue la propuesta por la International Commission for Bee Botany (ICBB 1985).

Brevemente, se recolectaron abejas pecoreadoras de colmenas a campo que se anestesiaron con CO<sub>2</sub> para introducir las en los frascos de prueba (la unidad experimental). En cada frasco se incluyeron 10 abejas. Se dejaron recuperar y se reemplazaron los individuos con poca vitalidad. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento. Las abejas fueron alimentadas con 200 µL de una solución de sacarosa (50% p/v en agua destilada estéril) más la correspondiente dosis del aceite esencial con su diluyente. Cada abeja consumió en promedio 20 µL de la formulación. Los preparados se dejaron 5 horas para garantizar su consumo. Posteriormente, se reemplazaron los alimentadores por otros, con una preparación de 3 gramos de una mezcla de glucosa y azúcar impalpable, cantidad suficiente de alimento hasta la finalización del ensayo luego de 72 horas. Para los ensayos *in vivo* de DL<sub>50</sub> se tomaron como base los resultados de sensibilidad *in vitro* obtenidos en este trabajo a los que se les realizó una posterior transformación a µg p.a./abeja de acuerdo a Albo *et al.* (2003). Asimismo, se realizaron ensayos previos de palatabilidad en abeja adulta con los diluyentes y *C. citratus*. El Tween 80 fue descartado porque no resultó palatable para las abejas (Albo, datos no publicados) y el DMSO se eliminó por ser el diluyente con mayor efecto inhibitorio “*per se*” que el aceite esencial. Con el propósito de disponer de dos diluyentes alternativos para calcular la DL<sub>50</sub> de *C. citratus* sobre la abeja adulta, se seleccionó alcohol 70°, además del PG. Se realizó un ensayo con 6 tratamientos (T<sub>1</sub> a T<sub>6</sub>): T<sub>1</sub> sacarosa 50 % p/v como control blanco; T<sub>2</sub> sacarosa 50% p/v con PG al 2,5 % v/v; T<sub>3</sub> sacarosa 50 % p/v con 2,5% v/v de alcohol 70 %; T<sub>4</sub> *C. citratus* diluido en 2,5 % de PG v/v a las concentraciones 2; 4; 8 y 16 µg p.a./abeja; T<sub>5</sub> *C. citratus* con 2,5% de alcohol 70° v/v a 2; 4; 8 y 16 µg p.a./abeja y T<sub>6</sub> dimetoato, como tóxico estándar, a 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 y 0,64 µg p.a./abeja (Gough *et al.* 1994).

El aceite esencial se formuló en sacarosa al 50 % p/v y 2,5 % del diluyente v/v.

Se midió la mortalidad de abejas adultas a 24, 48 y 72 horas. La DL<sub>50</sub> fue calculada por el análisis de

regresión PROBIT Versión 1,5 y los valores de mortalidad fueron corregidos por la fórmula de Abbott (1987).

Para determinar el radio de selectividad del aceite esencial de *C. citratus* con los diluyentes, se calculó el cociente entre la DL<sub>50</sub> para la abeja adulta (µg p.a./abeja) y la CIM<sub>50</sub> (µg/ml) del aceite esencial con cada diluyente efectiva sobre *A. apis*, en base al trabajo de Gende *et al.* (2009) a efectos de evaluar si el producto resultaba seguro para su aplicación en colmenas a campo. El valor del radio de selectividad se expresó en ml/abeja.

## Resultados y discusión

### Pruebas de sensibilidad *in vitro* del aceite esencial de *C. citratus* con distintos diluyentes sobre *A. apis*

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diluyentes ( $F = 349,35$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0,0001$ ). Un posterior Test de Tukey mostró dos grupos; por un lado el DMSO y el alcohol 70° ( $p = 0,0003$ ), mientras que el Tween 80, el PG y el agua formaron otro grupo ( $p = 0,00002$ ).

Asimismo se encontraron diferencias significativas en el crecimiento medio de los aislados de *A. apis* de distintos orígenes geográficos a las 72 horas de crecimiento ( $F = 8,40$ ;  $df = 27$ ;  $p < 0,00001$ ). Un posterior test de Tukey generó 8 grupos, en el que el de menor crecimiento (entre 2,5 y 3,9 cm) incluyó 13 aislados, 3 de Chile (IX y X Región) y 10 de Argentina (de las provincias de Córdoba, Neuquén y Buenos Aires). El grupo de mayor desarrollo (entre 5,4 y 5,9 cm) incluyó 3 aislados de La Plata y Tandil (Buenos Aires).

En la figura 1 se muestran los valores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> para las formulaciones de los cinco diluyentes con el aceite esencial. En este sentido, la dilución con DMSO exhibió la mayor inhibición con 150 µg/ml para la CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>.

Para la dilución con alcohol 70° los valores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> fueron de 150 y 250 µg/ml, mientras que para el PG se obtuvo un valor de 250 µg/ml para la CIM<sub>50</sub> y la CIM<sub>90</sub>. Finalmente, los valores obtenidos con Tween 80 fueron de 500 µg/ml para la CIM<sub>50</sub> y de 750 µg/ml para la CIM<sub>90</sub>, en tanto que para el agua el valor fue de 750 µg/ml para la CIM<sub>50</sub> y la CIM<sub>90</sub>.

El agua, el Tween 80 y el PG fueron los diluyentes que menos afectaron al poder inhibitorio del aceite esencial “*per se*” comparados con el alcohol 70° y el DMSO. Sin embargo, como los aceites esenciales son poco solubles en agua (D’Acampora Zellner *et al.* 2010), los diluyentes propuestos para los ensayos de DL<sub>50</sub> serían el Tween 80 y el PG.

Davis y Ward (2003) observaron que la inhibición *in vitro* de *A. apis* frente al aceite esencial de *C.*



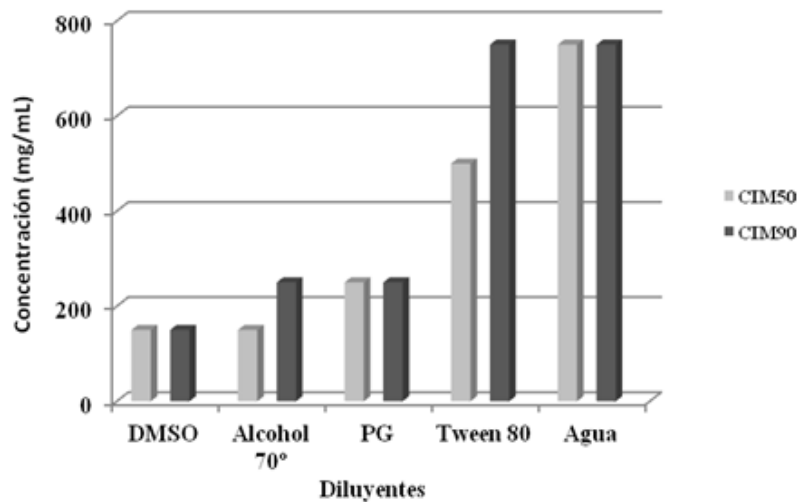


Figura 1: Valores de la CIM<sub>50</sub> y la CIM<sub>90</sub> de diluyentes con el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*.

*citratus* con Tween 80, como diluyente, se produjo dentro del rango de 250 y 1000  $\mu\text{L/L}$  de acuerdo al origen geográfico de la especie usada. Kloucek *et al.* (2012) observaron una moderada actividad inhibitoria de los vapores de *C. citratus* y una elevada actividad inhibitoria de *Cymbopogon flexosus* sobre aislados de *A. apis*. Fuselli *et al.* (2005) demostraron efecto inhibitorio adicional con el uso de PG como emulsionante de los aceites esenciales de *Acantholippia seriphoides* y *Tagetes minuta*, empleados para el control de la bacteria *Paenibacillus larvae*.

### La toxicidad oral aguda en abeja melífera adulta

El control blanco ( $T_1$ ) exhibió 2, 3 y 6 % de mortandad a las 24, 48 y 72 horas, el control sacarosa-PG ( $T_2$ ) presentó 20, 26 y 28 % de mortandad y el control sacarosa-alcohol ( $T_3$ ) manifestó menor incidencia de la mortandad con valores de 5, 7 y 13 %, respectivamente.

La DL<sub>50</sub> de dimetoato fue de 0,28; 0,20 y 0,13  $\mu\text{g p.a./abeja}$  a 24, 48 y 72 horas, considerada normal para productos "altamente tóxicos" (Gough *et al.* 1994). En *C. citratus* con el alcohol 70° se determinaron valores de DL<sub>50</sub> de 15.350; 6.000 y 893  $\mu\text{g p.a./abeja}$  de 24-72 horas, correspondiendo al rango de productos "virtualmente no tóxicos" (ICCB 1985). *C. citratus* con el PG se mostró como un producto "virtualmente no tóxico" a las 24 horas con una DL<sub>50</sub> de 880  $\mu\text{g p.a./abeja}$ . En tanto que la DL<sub>50</sub> con PG a las 48 y 72 horas, fue de 52  $\mu\text{g p.a./abeja}$  y 9  $\mu\text{g p.a./abeja}$ , respectivamente, lo que ubica a la formulación aceite esencial-PG como "leve y moderadamente tóxica", en

los dos horarios de evaluación, respectivamente (Tabla 1). En estudios previos, Albo *et al.* (2010) determinaron que *C. citratus* diluido en PG se presentó como una esencia "levemente tóxica" con abeja de invierno, en tanto que en primavera se mostró como "virtualmente no tóxica" a las 24 y 48 horas y "levemente tóxica" a las 72 horas. Los resultados obtenidos en este trabajo afianzan la idea de que la abeja adulta es más sensible a la potencial toxicidad de los aceites esenciales en el período otoño-invernal.

El radio de selectividad de *C. citratus* y los diluyentes estudiados se detallan en la Tabla 2. Los valores obtenidos del radio de selectividad para el *C. citratus* y el diluyente alcohol 70° se situaron en 102,33; 40 y 5,95 ml/abeja a las 24, 48 y 72 horas. Por otro lado, *C. citratus* con PG presentó menores radios de selectividad, con niveles de 3,52; 0,21 y 0,04 ml/abeja, respectivamente. Otros investiga-

Tabla 1. Dosis letal media (DL<sub>50</sub>) ( $\mu\text{g/abeja}$ ) del aceite esencial de *C. citratus* con diluyentes a distintos intervalos de exposición.

Tratamientos	Tiempo de evaluación en horas		
	24	48	72
<i>C. citratus</i> en alcohol 70°	15.350	6.000	893
<i>C. citratus</i> en PG	880	52	9
Dimetoato	0,28	0,20	0,13

Los valores presentados en esta tabla fueron generados por el paquete estadístico EPA PROBIT, versión 1.5. La clasificación de rangos de toxicidad utilizada en la determinación de DL<sub>50</sub> es la propuesta por la International Commission for Bee Botany (ICBB 1985).

Tabla 2. Valores del radio de selectividad (RS) que corresponde a la relación entre la concentración letal media ( $\mu\text{g p.a./abeja}$ ) del aceite esencial de *C. citratus* y diluyentes sobre abeja adulta y la concentración inhibitoria mínima ( $\text{CIM}_{50}$ ,  $\mu\text{g/ml}$ ) del aceite esencial y diluyentes sobre *A. apis*.

Horas	$\text{DL}_{50}$ ( $\mu\text{g p.a./abeja}$ )		$\text{CIM}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		RS (ml/abeja)	
	C.c. - PG	C.c. - AL	C.c. - PG	C.c. - AL	C.c. - PG	C.c. - AL
24	880	15.350	250	150	3,52	102,33
48	52	6.000	250	150	0,21	40
72	9	893	250	150	0,04	5,95

C.c. *Cymbopogon citratus*; PG propilenglicol; AL alcohol 70°

dores calcularon el radio de selectividad de aceites esenciales con funciones acaricidas sobre *Varroa destructor* ( $\text{DL}_{50} A. mellifera / \text{DL}_{50} V. destructor$ ), como *Eupatorium buniifolium* (Umpiérrez et al. 2013) y otras esencias de especies nativas argentinas, en las que *Schinus mollis* fue el más selectivo, con un valor  $>16$  (Ruffinengo et al. 2005). Lindberg et al. (2000) establecieron que un acaricida era selectivo si causaba mortalidad en el ácaro mayor al 70 % y en abeja menor al 30 %.

Gende et al. (2009) determinaron el índice de selectividad del aceite esencial de *C. zeylanicum* para el control de *Paenibacillus larvae* en 8 - 9 ml/abeja. Los valores se obtuvieron del cociente entre la  $\text{DL}_{50}$  de la abeja adulta y la CIM de la bacteria. Si bien no se dispone de información sobre cuál sería el radio de selectividad de los aceites esenciales que han probado ser efectivos para el control *in vitro* de *A. apis*, se podría tomar como referencia el radio de selectividad de algunos aceites esenciales, considerados efectivos y seguros, propuestos por Gende et al. (2009) en *P. larvae* y Ruffinengo et al. (2005) en *V. destructor*. En este sentido, los valores de radio de selectividad obtenidos con *C. citratus* y PG se encuentran por debajo de 1 a las 48 y 72 horas, por lo que sería considerado como un diluyente inseguro para su uso en colonias de abejas (Umpiérrez et a, 2013).

## Conclusiones

El alcohol 70° resultó ser el mejor diluyente para el *C. citratus* ya que presentó una  $\text{CIM}_{90}$  de 250 mg/l, fue "virtualmente no tóxico" para abejas adultas, presentó un radio de selectividad de 6  $\mu\text{L/abeja}$  a las 72 horas y fue la formulación aceite esencial-diluyente menos tóxica para el control de *A. apis* en colonias de abejas a campo.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Proyecto de Incenti-

vos a la Investigación 11A/268 y por el Ministerio de Producción de la Nación, dirigido por Graciela Albo, y el PIP 0851 (2012-2014). Los autores agradecen a Wanda Szusz del Laboratorio Antifúngicos del INEI ANLIS "Dr. C. G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina, por la asistencia técnica.

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existen conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

## Bibliografía

- Albo GN, Henning C, Ringuelet J, Reynaldi FJ, De Giusti MR, Alippi AM. Evaluation of some essential oils for the control of american foulbrood disease in honey bees. *Apidologie* 2003; 34:417-37.
- Abbott W.S. Abbott's Formula. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Am Mosq Control Assoc* 1987; 3:302-3.
- Albo GN, Henning C, Reynaldi FJ, Ringuelet J, Cerimele E. Dosis Letal Media ( $\text{DL}_{50}$ ) de algunos aceites esenciales y biocidas efectivos para el control de *Ascosphaera apis* en *Apis mellifera* L. *REDVET* 2010; 11(10):23-9.
- Aronstein KA, Murray KD. Chalkbrood disease in honey bees. *J Invertebr Pathol* 2010; 103:S20-9.
- D'Acampora Zellner B, Dugo P, Dugo G, Mondello L. Analysis of essential oils. en: Can Baser KH, Buchbauer G. 2010. Handbook of essential oils: science, technology and applications. USA: CRC Press. Taylor & Francis Group. pp. 151-84.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi Approved Standard CLSI. Doc. M 38-A2. 2° Ed. Wayne. Pennsylvania. USA, 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi; approved guideline. CLSI doc M51-A. Ed. Wayne. Pennsylvania. USA, 2010
- Davis C, Ward W. Control of chalkbrood disease with natural products: a report for the RIRDC. Publication No. 03/107,

- Kingston, ACT, AU, 2003; pp. 1-23.
- FAO, 2014. Food and Agricultural of the United Nations. Statistical Division. Compare Data. Available in: <http://faostat3.fao.org/compare/E>.
- Fuselli SR, Gende LB, García de la Rosa SB, Eguaras MJ, Fritz R. Inhibition of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* by the essential oils of two wild plants and their emulsifying agents. Spanish J Agric Res 2005; 3(2): 220-4.
- Gende LB, Maggi MD, Damiani N, Fritz R, Eguaras MJ, Floris I. Advances in the apiary control of the honeybee american foulbrood with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil. Bull Insectol 2009; 62(1):93-7.
- Gough HJ, Mc Indoe EC, Lewis GB. The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity test on honey bees *Apis mellifera* (L.) 1981-1982 J Apicul Res 1994; 33:119-25.
- ICBB (International Commission for Bee Botany), 1985. 3rd symposium on the harmonisation of methods for testing the toxicity of pesticides to bees. Rothamsted Experimental Station, England.
- Jensen AB, Aronstein K, Flores JM, Vojvodic S, Palacio MA, Spivak M. Standard methods for fungal brood disease research. J Apicul Res. 2013; 52(1):1-20.
- Kloucek P, Smid J, Flesar J, Hvlík J, Titera D, Vojtech R, Drabek O, Kokoska L. *In vitro* inhibitory of essential oil vapors against *Ascosphaera apis* Nat Product Commun 2012; 7 (2):253-56.
- Maggi MD, Ruffinengo SR, Damiani N, Sardella NH, Eguaras MJ. First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. Exp App Acarol 2009; 47(4):317-20.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, Vanengelsdorp D, Pettis JS. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. PLoS ONE 2010; 5:e9754.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline M26-A. Wayne. PA. 2008.
- OEPP/EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization/ Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes). Side-effects on honeybees. Efficacy evaluation of plant protection products. Bulletin OEPP/EPPO 2010; 40: 313-19.
- Porrini MP, Fernández NJ, Garrido PM, Gende LB, Medici SK, Eguaras MJ. *In vivo* evaluation of antiparasitic activity of plant extracts on *Nosema ceranae* (Microsporidia) Apidologie 2011; 6:700-07.
- Reynaldi FJ, López AC, Albo GN, Alippi AM. Genome fingerprinting. J Apicul Res 2003; 42(4):68-76.
- Rossi C, Carranza M. Momificación de larvas (*Apis mellifera* L.) provocada por *Ascosphaera apis*. Rev F Agron 1980; 56:11-5.
- Roussanova N. Antibacterial activity of essential oils against the etiological agent of american foulbrood disease (*Paenibacillus larvae*) Bulgarian J Vet Medic 2011; 14 (1):17-24.
- Spiltoir CF. Life cycle of *Ascosphaera apis* (*Pericystis apis*). Am J Botany 1955; 42:501-8.
- Spiltoir CF, Olive LS. A re-classification of the genus *Pericystis* Betts. Mycologia 1955; 47:238-44.
- Theantana T, Chantawannacul P. Protease and  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. J Apicul Res 2008; 1:68-76.
- Umpiérrez ML, Santos E, Mendoza Y, Altesur P, Rossini C. Essential oil from *Eupatorium buniifolium* leaves as potential varroacide. Parasitol Res 2013; 112: 3389-400.
- Zaghloul OA, Mourad AK, El Kady MB, Nemat FM, Morsy ME. Assessment of losses in honey yield due to the chalkbrood disease with reference to the determination of its economic injury levels in Egypt. Commun Agricul Appl Biol. 2005; 70(4):703-14.