

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**“CARACTERIZACIÓN DE UN ACEITE ESENCIAL OBTENIDO
DESDE UNA ESPECIE VEGETAL NATIVA CON EFECTO
ANTIFÚNGICO FRENTE A PATÓGENOS EMERGENTES EN EL
SECTOR APÍCOLA, *NOSEMA APIS* Y *NOSEMA CERANAE*”**

**TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

Por:

JESSICA ANDREA BRAVO GARRIDO

Directores de tesis

Dra. Carla Delporte Vergara

Dr. Carlos Valdovinos Jeldes

SANTIAGO- CHILE

MAYO 2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por la candidata:

JESSICA ANDREA BRAVO GARRIDO

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 19 de mayo de 2014.

Directores de Tesis:

Dra. Carla Delporte

Dr. Carlos Valdovinos

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Paz Robert (Presidenta)

Dra. Juanita Roviroso

Dra. Inés Contreras

**A mi familia,
y Rodrigo**

AGRADECIMIENTOS

La investigación desarrollada en esta tesis se llevó a cabo gracias a la colaboración de muchas personas a quienes recordaré con mucho cariño

A mi directora de tesis, Profesora Dra. Carla Delporte Vergara, quién confió en mí en el inicio y desarrollo de esta investigación, aprendiendo de su experiencia en investigación y como docente. Agradezco también su confianza en mis capacidades para llevar a cabo estos estudios y el apoyo brindado en los momentos difíciles.

A mi director, Profesor Dr. Valdovinos, quién ha colaborado en el desarrollo de mi investigación y acompañado en este proceso.

A los profesoras miembros de la comisión evaluadora, quienes me han acompañado en este proceso de crecimiento y aportaron siempre constructivamente en la mejora de este trabajo.

Agradecer al Dr. Mariano Higes y Dra. Raquel Martín-Hernández del Centro de apicultura de Marchamalo, España, por invitarme a conocer su centro de investigación y permitirme realizar parte de mis experimentos en su laboratorio, adquiriendo conocimientos y experiencia importantísima en esta área de investigación. Siempre recordaré con cariño a Tere, Virginia, Cristina, Mari Carmen, Javier y cada uno de los integrantes del laboratorio de quienes aprendí muchísimo no sólo en lo profesional.

A mis amigas Paty, Myriam y los colegas en la Docencia en la UDP quienes siempre confiaron en mí, en mis capacidades y siempre me brindaron una palabra de aliento en los momentos difíciles. Gracias por cada momento lindo vivido y por los que vendrán.

A mi nuevos compañeros de investigación en la UDD, Dra. Martínez quien me ha apoyado en la realización de algunos ensayos de esta investigación, agradecer por lo aprendido y por que ha tenido paciencia en esta etapa. A mis colegas y amigos German, Flavia, Paola, Javiera y David

no sólo por el apoyo en esta etapa, sino además por el ambiente acogedor con que me han recibido en este nuevo trabajo.

Gracias a todos mis compañeros y amigos del laboratorio de productos naturales, en especial a la Pao por su ayuda en los ensayos, David, Marcelo, Jorge y Cata. No podría olvidar mencionar a mis compañeras de Doctorado, de laboratorio, amigas Gaby y Consu, gracias por su cariño, por aquellos momentos alegres que compartimos como en los viajes a congreso pero también por estar ahí en los momentos duros de la vida. Gracias Valeria amiga y compañera del Doctorado por alegrar nuestras juntas con tu particular acento Brasileño.

Infinitas gracias a mi familia, Madre y Padre que sería de mi sin su apoyo incondicional y cariño, seguro no hubiese logrado ni la mitad en lo profesional y en lo personal sin su amor. A mi hermano César y sobrina Josefina por escuchar mis triunfos y fracasos. A mi hermano menor Sebastián del que aprendo cada día, recibo un apoyo incondicional en todo momento y celebra cada uno mis logros.

A Rodrigo compañero de la vida, amigo y amor. Gracias por apoyar cada proyecto y decisión en este camino que ha momentos no ha sido fácil, por celebrar mis triunfos y consolar mis fracasos, por llenar mi vida de alegría y música 🎵.

FINANCIAMIENTO

FONDOS DE FINANCIAMIENTO PARA EL DESARROLLO DE TESIS DE PREGRADO Y
POSTGRADO CONSORCIO APICOLA

APOYO DE TESIS DOCTORAL CONICYT
BECA AT2012 N° 24121561

BECA ESTADÍAS CORTAS Y EVENTOS CORTOS CONICYT

BECA PASANTÍA MECESUP

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	ii-iii
FINANCIAMIENTO.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v-vii
TABLA DE ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x-xiii
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	xiii
RESUMEN.....	3-4
ABSTRACT.....	4-5
INTRODUCCIÓN	
Problema u oportunidad.....	7-8
Estado del arte	
Enfermedades fungales.....	9-13
Control de nosemosis.....	13-14
Principios activos con actividad antifúngica.....	15-18
Descripción botánica de las especies.....	18-20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos	21
METODOLOGÍA	
1. Recolección del material vegetal	
1.1. Colecta del material vegetal.....	23
1.2. Época de colecta.....	23
1.3. Procedimiento de colecta y transporte.....	23
1.4. Obtención de muestras para su herborización (testigo herbario).....	24
2. Estudio Químico	
2.1.Obtención del aceite esencial de las especies vegetales en estudio.....	24

2.2 Obtención de una mayor cantidad del aceite esencial seleccionado.....	25
3. Determinación de la calidad de la materia prima (material vegetal) utilizable para obtener un aceite esencial de uso apícola	
3.1. Determinación de material extraño a la droga vegetal.....	25
3.2. Determinación de metales tóxicos: cobre, cromo, cadmio, plomo y níquel.....	25
3.3. Determinación de dioxinas, furanos y DL-PCBs.....	25
3.4. Determinación de contaminantes microbiológico.....	26
4. Evaluar <i>in vivo</i> de la toxicidad de un aceite esencial frente a <i>Apis mellifera</i>	
4.1. Evaluación en condiciones de laboratorio de la toxicidad de los aceites esenciales, y compuestos mayoritarios de dichos aceites sobre las abejas (<i>Apis mellifera</i>).....	26
5. Determinación mediante PCR de la presencia de <i>Nosema apis</i> o <i>Nosema ceranae</i>	
5.1 Obtención de muestras concentradas de esporas de <i>Nosema</i> spp. y análisis PCR...	28
6. Evaluación <i>in vivo</i> en condiciones de laboratorio de la eficacia de los aceites esenciales, y compuestos mayoritarios de dichos aceites sobre <i>Nosema apis</i> y <i>Nosema ceranae</i>	
6.1 Ensayo preliminar de prevención frente a la infección con <i>Nosema</i> spp.....	31
6.2 Ensayos para determinar la eficacia de los aceites esenciales frente a <i>Nosema</i> spp.	32
6.3 Confirmación de la eficacia del AE _{selec} en el punto anterior a la concentración que demostraron tener mejor efecto sobre la carga de esporas.....	34
6.3.1 Obtención de abejas libres de esporas de <i>Nosema</i> spp.....	34
6.4 Evaluación <i>in vivo</i> en condiciones de laboratorio de la efectividad de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de peumo sobre <i>Nosema</i> spp.....	35
7. Caracterización del aceite esencial seleccionado	
7.1 Caracterización del aceite esencial de peumo.....	35
7.2 Cuantificación de los compuestos mayoritarios.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIONES	
1. Recolección del material vegetal	38-40
2. Estudio Químico	
2.1. Obtención del aceite esencial de las especies vegetales en estudio	41
2.2. Obtención de una mayor cantidad del aceite esencial seleccionado.....	41

3. Determinación de la calidad de la materia prima (material vegetal) utilizable para obtener un aceite esencial de uso apícola	
3.1. Determinación de material extraño a la droga vegetal	42
3.2. Determinación de metales tóxicos: cobre, cromo, cadmio, plomo y níquel.....	44
3.3. Determinación de dioxinas, furanos y DL-PCBs.....	47
3.4. Determinación de contaminantes microbiológico.....	48
4. Evaluación <i>in vivo</i> de la toxicidad de un aceite esencial frente a <i>Apis mellifera</i>	
4.1. Evaluación en condiciones de laboratorio de la toxicidad de los aceites esenciales, y compuestos mayoritarios de dichos aceites sobre las abejas (<i>Apis mellifera</i>).....	52
4.1.1. Determinación de la DL50 para el aceite de peumo.....	56
5. Determinación mediante PCR de la presencia de <i>Nosema apis</i> o <i>Nosema ceranae</i>	
5.1 Obtención de muestras concentradas de esporas de <i>Nosema spp.</i> y análisis PCR...60	
6. Evaluación <i>in vivo</i> en condiciones de laboratorio de la eficacia de los aceites esenciales, y compuestos mayoritarios de dichos aceites sobre <i>Nosema apis</i> y <i>Nosema ceranae</i>	
6.1 Ensayo preliminar de prevención frente a la infección con <i>Nosema spp.</i>	66
6.2 Ensayos para determinar la eficacia de los aceites esenciales frente a <i>Nosema spp.</i> 67	
6.3 Confirmación de la eficacia del AE _{selec} en el punto anterior a la concentración que demostraron tener mejor efecto sobre la carga de esporas.....	70
6.4 Evaluación <i>in vivo</i> en condiciones de laboratorio de la efectividad de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de peumo sobre <i>Nosema spp.</i>	73
7. Caracterización del aceite esencial seleccionado	
7.1 Caracterización del aceite esencial de peumo.....	78
7.2 Cuantificación de los compuestos mayoritarios.....	86
CONCLUSIONES.....	90
PROYECCIONES.....	91
REFERENCIAS.....	92
ANEXOS.....	104
1. Anexo carta SAG.....	104
2. Espectro de masa de los compuestos AE peumo.....	105-109

TABLA DE ABREVIATURAS

AE _{selec}	Aceite esencial seleccionado
DL ₅₀	Dosis letal 50
DL-PCBs	bifenilos policlorados
GC	<i>Cromatografía en fase gaseosa</i>
GC-MS	Cromatografía en fase gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas
I	Índices de Kovats
IR	Espectroscopía <i>infrarroja</i>
MEFS	Micro-Extracción en Fase Sólida
RMN	Resonancia magnética nuclear
UV	Espectroscopía <i>ultravioleta</i>
pb	pares de bases
PCDDs	dibenzodioxinas
PCDFs	dibenzofuranos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RSU	Residuos sólidos urbanos

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Partidores seleccionados para detectar la presencia de N. ceranae, N. apis y Apis mellifera.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 2. Especies vegetales y localidad correspondiente.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 3. Especies vegetales y fecha de recolección.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 4. Rendimiento (%) de los aceites esenciales obtenidos desde las hojas de maitén y peumo.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 5. Presencia de metales pesados en material vegetal proveniente de hojas de maitén y peumo.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 6. Contenido en Metales en RSU y límites propuestos en diferentes normativas.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 7a. Determinación de contaminantes microbiológico de las hojas de peumo.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 7b. Determinación de contaminantes microbiológico de las hojas de maitén.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 8: Resumen componentes arrojados del análisis por CG- MS del aceite esencial de peumo y sus respectivos índices de Kovats calculados (I cal) y de literatura (I lit).....</i>	<i>85</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Recolección muestras vegetales.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2. Aparato de condensación, Clevenger.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 3. Testigo herbario (a) litre, (b) boldo, (c) maitén y (d) peumo.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 4. Determinación de material extraño a las hojas de peumo.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 5. Determinación de material extraño a las hojas de maitén.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 6. Material vegetal pulverizado seco de hojas de peumo y maitén (10g).....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 7. Muestreo de abejas sanas y recién nacidas provenientes de Buin (a y b), Peñalolén (c) y Lonquén (d).....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 8. Ensayo preliminar de toxicidad frente a Apis mellifera de los aceites esenciales obtenidos de las cuatro especies nativas en estudio (control negativo jarabe de sacarosa 50%, control positivo tóxico de referencia dimetoato 0,35 µg/abeja, Cryptocaria alba 0,5 y 1µg/abeja, Lithraea caustica 4 µg/abeja, Maytenus boaria 2 y 4 µg/abeja y Peumus boldus 0,5 y 1 µg/abeja).....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 9. Jaulas con grupos de 10 abejas para ensayo de toxicidad.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 10. Porcentaje de mortalidad de abejas a las 48 h frente a las 6 diferentes dosis de aceite esencial (0,83; 1,7; 11; 21; 43; 54 µg/abeja), el tóxico de referencia aplicado en dos dosis (dimetoato 0,1; 0,35 µg/abeja) y un control alimentado con jarabe de sacarosa al 50%.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 11. Porcentaje de mortalidad de abejas v/s dosis del aceite esencial de peumo a las 4 h.....</i>	<i>57</i>

<i>Figura 12. Porcentaje de mortalidad de abejas v/s dosis del aceite esencial de peumo a las 24 h.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 13. Porcentaje de mortalidad de abejas v/s dosis del aceite esencial de peumo a las 48 h.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 14. Porcentaje de mortalidad a las 48 horas de aplicado los estándares (Sigma 99%) de los tres compuestos mayoritarios eucaliptol, y α-terpineol (0,2 μg/abeja y 0,4 μg/abeja).....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 15 Porcentaje de mortalidad a las 48 horas de aplicado el estándar (Sigma 99%) de α-terpineol a concentraciones de (20, 40, 66, 78 y 80 μg/abeja).....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 16. Porcentaje de mortalidad a las 48 horas de aplicado el estándar (Sigma 99%) de β-felandreno a concentraciones de (20, 40, 66, 78 y 80 μg/abeja).....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 17. Porcentaje de mortalidad a las 48 horas de aplicado el estándar (Sigma 99%) de eucaliptol a concentraciones de (20, 40, 66, 78 y 80 μg/abeja).....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 18. Esporas N. ceranae (a), Esporas de N. apis (b), observadas al Microscopio óptico modelo Nikon Eclipse 80i DIC (Differential Interference Contrast).....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 19. Electroforesis del producto de PCR en analizador de ácidos nucleicos QIAxcel (QIAGEN). Las muestras A1 – A4 provenientes de apiarios chilenos, A5 control negativo y A6 control positivo con patrones de N. apis y N. ceranae.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 20: Ensayo preliminar de prevención de los aceite esencial (AE) frente a la infección con esporas de Nosema spp., control (negativo, sin tratamiento), AE de litre 2 ug/abeja), AE de peumo 0,83 y 1,7 ug/abeja) y AE de maitén 2 ug/abeja).....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 21. Evolución de la infección de abejas con esporas de Nosema spp.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 22. a) Efectividad del aceite esencial de Cryptocaria alba calculada como % porcentaje de disminución de esporas en los días 4, 8, y 12 de tratamiento a diferentes dosis (1, 2, 3 y 4 μg/abeja), b) Efectividad del aceite esencial de Maytenus boaria calculada como % porcentaje de disminución de esporas en los días 4, 8, y 12 de tratamiento a diferentes dosis</i>	

(1, 2, 3 y 4 µg/abeja). El fármaco de referencia (fumagilina) se aplicó en una dosis de 240 µg/abeja.....69

Figura 23. Electroforesis del producto de PCR en analizador de ácidos nucleicos QIAxcel (QIAGEN). Las muestras A1 – A10, B1-B12 provenientes de apiarios del Centro Agrario Marchamalo, A11 control negativo y A12 control positivo con patrones de N. apis y N. ceranae.....71

Figura 24. Efecto AE peumo en la disminución del número de esporas N. ceranae. NI abejas no infectadas; IST abejas infectadas sin tratamiento; ICT abejas infectadas y tratadas con AE de peumo, la dosis aplicada de AE peumo corresponde a 0,2 µg/abeja.....72

Figura 25. Efectividad del aceite esencial de Cryptocaria alba calculada como % porcentaje de disminución de esporas en los 5 días de tratamiento aplicando una dosis diaria aproximada de 0,2 µg/abeja ad libitum.....73

Figura 26. Efecto en la disminución del número de esporas luego de aplicar el tratamiento con α-terpineol, eucaliptol y β-felandreno. Se contabilizó número de esporas a los 5, 6 y 7 días luego de aplicar tratamiento a una dosis diaria de 20 µg/abeja. El fármaco de referencia (fumagilina) se aplicó en una dosis de 240 µg/abeja y el AE peumo en una dosis de 2 µg/abeja.....75

Figura 27. Efectividad de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de peumo (Cryptocaria alba) indicada como porcentaje de disminución del número de esporas a los 5, 6 y 7 días luego de aplicar tratamiento a una dosis diaria de 20 µg/abeja de los monoterpenos α-terpineol, eucaliptol y β-felandreno. El fármaco de referencia (fumagilina) se aplicó en una dosis de 240 µg/abeja y el AE peumo en una dosis de 2 µg/abeja.....75

Figura 28. Perfil cromatográfico por GC del aceite esencial de peumo.....79

Figura 29: Espectro de masas correspondiente al β-felandreno presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.....80

<i>Figura 30: Espectro de masas correspondiente al eucaliptol presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 31: Espectro de masas correspondiente al α- terpineol presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 32. Síntesis de monoterpenos reacción que es catalizada por la prenil transferasa....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 33. Isómeros de terpineol.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 34. Curva de calibración con el estándar de β-felandreno.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 35. Curva de calibración con el estándar de eucaliptol.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 36. Curva de calibración con el estándar de terpineol.....</i>	<i>88</i>

ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1. Modelo utilizado para calcular % efectividad del tratamiento frente a <i>Nosema spp.</i>.....</i>	<i>68</i>
<i>Ecuación 2. Modelo matemático utilizado para calcular el índice de Kovats para un compuesto.....</i>	<i>83</i>
<i>Ecuación 3. Modelo matemático utilizado para calcular el índice de Kovats de una serie homóloga.....</i>	<i>84</i>

CAPÍTULO I



RESUMEN

Las enfermedades fungales que afectan a la abeja *Apis mellifera* son causadas por hongos parásitos ambientales, de los cuales destacan I) *Nosema apis* (agente etiológico de la nosemosis tipo A), II) *Nosema ceranae* (agente etiológico de nosemosis tipo C e identificado además como uno de los posibles agentes etiológicos del Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas), III) *Ascospaera apis* (agente etiológico de la cría de tiza) y IV) *Aspergillus flavus* (agente etiológico de la cría pétreo). Estos agentes etiológicos, producen casi el 50% de las patologías que se presentan en las colmenas de nuestro país, especialmente en la zona centro-sur y sur, mermando la producción de miel, propóleo y jalea real, reduciendo el tamaño poblacional de las colmenas e incluso llegando a la muerte de toda la colmena. Respecto de la nosemosis, un 20% de los apicultores declaran haber presentado esta enfermedad en sus apiarios. Sin embargo, debido a la dificultad del diagnóstico de su agente causal (*N. apis* o *N. ceranae*), no hay certidumbre acerca del real nivel de infestación de las colmenas. En Chile, no existen productos farmacéuticos de uso veterinario registrados por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para el control de estos patógenos ya que está prohibido el uso de la fumagilina, antibiótico de elección frente a la nosemosis, cuya aplicación está restringida en aquellas épocas en las que no hay flujo de néctar, pues puede depositarse en la miel y generar cuadros de alergias y resistencia al antibiótico en los consumidores. De esta manera, la única medida que actualmente se puede llevar a cabo para mantener sanas y pobladas las colmenas, es la prevención que consiste en realizar recambio de reinas constantemente y evitando que se generen las condiciones propicias para el desarrollo de hongos. Si la prevención no es suficiente, es necesario contar con un tratamiento alternativo que sea seguro para las abejas y que no deje residuos en los productos de la colmena. Nuestra hipótesis es que existen especies vegetales autóctonas del bosque nativo esclerófilo como boldo, peumo, maitén y litre que poseen aceites esenciales, con propiedades antifúngicas contra *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, siendo éstos inocuos para la abeja *Apis mellifera*. El objetivo principal de esta tesis fue evaluar y estandarizar en su o (sus) componente(s) activo(s) un aceite esencial obtenido desde una especie vegetal nativa como boldo, peumo, maitén y litre con efecto antifúngico frente a patógenos emergentes en el sector apícola, *Nosema apis* y *Nosema ceranae* e inocuidad en *Apis mellifera*. Dentro de los resultados obtenidos del ensayo de toxicidad se identificó a la esencia de boldo como la más tóxica frente a *A. mellifera*, resultando inocuos frente a las abejas melíferas los aceites de litre, maitén y peumo.

Respecto a los ensayos de efectividad 1) se logró purificar esporas, identificando por primera vez la presencia de *N. ceranae* en muestras provenientes de la región de Valparaíso; 2) se infectó abejas nacidas en laboratorio con estas esporas y se evaluó la actividad antifúngica de las esencias en estudio, seleccionando a la esencia de peumo por presentar una mayor efectividad en el control de la nosemosis; 3) el aceite de peumo fue caracterizado por GC-MS encontrando tres compuestos mayoritarios α -terpineol, eucaliptol y β -felandreno los que fueron evaluados frente a *N. ceranae* en *A. mellifera* presentando una efectividad de un 65%, 54% y 52% respectivamente, cabe destacar que el AE peumo fue el que presentó una mayor actividad antifúngica con efectividad cercana a un 80%. Los resultados de esta investigación sentarán las bases para el desarrollo de productos veterinarios que podrán ser utilizados por los apicultores por su eficacia frente a la nosemosis, seguridad para las abejas y que no generará residuos en los productos de las colmenas debido a la volatilidad de las esencias. De esta manera se logrará combatir esta patología parasitaria que en la actualidad no tiene tratamiento y que ocasiona graves daños en los apiarios.

ABSTRACT

Fungal diseases affecting the bee *Apis mellifera* are caused by environmental parasitic fungi, the most important are *I) Nosema apis* (etiologic agent of nosemosis type A), *II) Nosema ceranae* (etiologic agent of nosemosis type C and also identified as one of the possible etiologic agents of the Depopulation Colony Syndrome), *III) Ascospaera apis* (etiologic agent of chalkbrood) and *IV) Aspergillus flavus* (etiologic agent of stonebreeding). These etiologic agents are the cause of almost 50 % of the diseases that occur in the hives in our country, especially in the south-central and south areas. These diseases diminish the production of honey, propolis and royal jelly, reduce the population of hives and even provoke the death of the hive. Regarding nosemosis, 20% of beekeepers have reported this disease in their apiaries. However, due to the difficulty of diagnosing its causal agent (*N. apis* or *N. ceranae*), there is no certainty on the actual level of infestation. In Chile, there are no pharmaceutical products of veterinary use, registered by the Agricultural and Livestock Service (SAG), to control these pathogens, since the use of fumagilina is highly limited. Although it is the antibiotic chosen to fight against nosemosis, its application and use is restricted to when there is no nectar flow, since it can be deposited in the honey and generate allergies and antibiotic resistance in consumers. Therefore, the only action

that can be currently taken to maintain healthy and populated hives, is the prevention method which involves changing the queen bees constantly and avoiding conditions that may generate fungal growth. In some cases it is necessary to apply an alternative treatment safe for bees and that does not leave residues in hive products. Our hypothesis is that there are native plant species from the native sclerophyll forest such as boldo, peumo, maitén and litre which possess essential oils with antifungal properties against *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. The main objective of this thesis was to evaluate and standardize its (or their) active component (s), i.e. an essential oil obtained from a native species such as boldo, peumo, maitén and litre with antifungal effect against emerging pathogens in the beekeeping area, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and harmless to *Apis mellifera*. In the results of the toxicity test the essence of boldo was identified as more toxic to *A. mellifera*, while litre, peumo and maitén oils showed to be harmless to honeybees. In regard to the effectiveness trials: 1) spores were successfully purified, identifying for the first time the presence of *N. ceranae* in samples from the region of Valparaíso; 2) bees which were born in laboratory were infected with these spores and the antifungal activity of the essences under study were evaluated; the essence of peumo was selected as a more effective control of nosemosis; 3) peumo oil was characterized by GC-MS and three major compounds were found: α -terpineol, eucalyptol and β -phellandrene, which were evaluated against *N. ceranae* in *A. mellifera* having an effectiveness of 64%, 54% and 52%, respectively. It is important to mention that the essential oil peumo showed a higher antifungal activity, with an effectiveness near to 80%. The results of this research will lay the groundwork for the development of veterinary products that may be used by beekeepers since it is effective against nosemosis, it is safe for bees and does not generate residues in the hive products, due to the volatility of the essences. Considering that currently there is no treatment, this study will help in the fight against this parasitic disease, which now daily causes serious damage to apiaries.

CAPÍTULO II



I. INTRODUCCIÓN

Problema u oportunidad

Las enfermedades fungales que afectan a la abeja *Apis mellifera* son causadas por hongos parásitos y ambientales, entre los cuales destacan *Nosema apis* causante de la Nosemosis tipo A y *Nosema ceranae* causante de la Nosemosis tipo C. Éste último además es identificado como una de las posibles causales del Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas, al cual se han atribuido las significativas pérdidas de colmenas que han afectado a gran parte de los países de la Unión Europea y de Estados Unidos en los últimos años. En Chile, un 20% de los apicultores declaran haber presentado nosemosis en sus apiarios. Sin embargo, debido a la dificultad del diagnóstico diferenciado de su agente causal, *Nosema* spp., no hay certidumbre acerca del real nivel de infestación de las colmenas. La nosemosis es una enfermedad estacional y factorial, que provoca stress energético y un desequilibrio nutricional que debilita a las colmenas, causando incluso su muerte (Neira, 2006). En Chile, no existen productos farmacéuticos de uso veterinario registrados por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para su uso en la apicultura para el control y/o prevención de estos patógenos (Ver Anexo 1). La fumagilina, antibiótico de elección frente a *Nosema* spp., cuya importación y aplicación fue excepcionalmente permitida en Chile por el SAG desde el segundo semestre del año 2009, quedando su aplicación restringida a aquellas épocas en las que no hay flujo de néctar, pues puede depositarse en la miel y generar cuadros de alergias y resistencia al antibiótico en los consumidores. Por otro lado, son escasas las herramientas preventivas que poseen los apicultores, al desconocer acciones de monitoreo que podrían prevenir la aparición de nosemosis en sus apiarios. Con estos antecedentes, queda claro que existe una necesidad sin resolver para la apicultura nacional y ésta consiste en buscar y encontrar un tratamiento alternativo que sea seguro, de preferencia natural.

A nivel mundial, son abundantes los estudios orientados a combatir patologías humanas, animales y vegetales, producidas por microorganismos, en las que se ha evaluado la eficacia de compuestos de origen vegetal. La experiencia ancestral en el uso de plantas medicinales ha sido uno de los pilares fundamentales en la investigación de compuestos que puedan tener uso frente a distintas patologías (Montenegro, 2002). Estudios sobre la actividad antifúngica de aceites esenciales realizados durante los últimos años han sido numerosos (Thompson, 1989;

Zambonelli *et al.*, 2008; Dafera *et al.*, 2000; Karaman *et al.*, 2001; Guynot *et al.*, 2003; Abad *et al.*, 2007), demostrándose una alta eficacia en el combate contra dichos patógenos.

Respecto de la nosemosis, como respuesta a la falta de productos veterinarios, en algunos países se han formulado preparaciones en base a especies vegetales, entre ellos destacan el Api-Herb® (aceites esenciales, vitaminas y dextrosa) (Nanetti, 2009), y el Protofil® consiste en extracto etanólico al 96% en base a plantas *Taraxacum officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Achillea millefolium* y *Ocimum basilicum* (Chioveanu *et al.*, 2004), todos en base a flora nativa del lugar de origen e indicados frente a *Nosema apis* y *Nosema ceranae*.

En Chile, investigaciones realizadas con especies nativas, han arrojado algunos resultados positivos por su actividad antifúngica (Labbé *et al.*, 2002; Quiroz, 2003; Monsálvez, 2007). Bittner *et al.*, (2009) evaluaron la actividad fungistática de aceites esenciales extraídos de peumo, tepa y laurel. Por otra parte, se ha descrito que las propiedades antiparasitarias de las hojas de boldo se relacionan con su contenido de aceite esencial y boldina (Cañigüeral, 1998) y entre los diferentes hidrocarburos que componen el aceite esencial de las hojas de boldo, el ascaridol tiene un especial interés debido a que es el causante del efecto antiparasitario de dicha esencia (Gupta, 1995) y se encuentra en un alto porcentaje en las hojas (Vogel *et al.*, 1997, Espic, 2007). Por tanto, los aceites esenciales que se encuentran en especies vegetales nativas del bosque esclerófilo, se constituyen en una interesante alternativa para el tratamiento de la nosemosis.

En Chile no existen productos en base a sustancias naturales para tratar la nosemosis que estén registrados ante el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Dentro de los preparados que se expenden y que se utilizan en los apiarios chilenos, se desconocen sus principios activos o al menos, no han sido caracterizados de acuerdo a la normativa vigente o de acuerdo a las directrices de la OMS, para los productos naturales. Por consiguiente, la presente tesis tiene como objetivo principal “caracterizar, estandarizar y evaluar un aceite esencial obtenido desde una especie vegetal nativa con efecto antifúngico frente a patógenos emergentes en el sector apícola, *Nosema apis* y *Nosema ceranae*”, sobre la base de un completo y riguroso estudio químico y toxicológico del aceite esencial.

Estado del arte

Enfermedades fungales

Las enfermedades fungales que afectan a la abeja *Apis mellifera* son causadas por hongos parásitos y ambientales, de los cuales se destacan *Nosema apis* (agente etiológico de la nosemosis tipo A), *Nosema ceranae* (agente etiológico de nosemosis tipo C e identificada además como uno de los posibles causales del Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas), *Ascospaera apis* (agente etiológico de la cría de tiza) y *Aspergillus flavus* (agente etiológico de la cría pétreo). Estos agentes etiológicos, producen casi el 50% de las patologías que se presentan en las colmenas de nuestro país, especialmente en la zona centro sur y sur, mermando la producción, reduciendo el tamaño poblacional de las colmenas e incluso llegando a la muerte de toda la colmena.

Entre las condiciones que favorecen el desarrollo de enfermedades fungales se destaca el clima. Temperaturas bajas, lluvia, frío, entre otras, inducen una disminución del pecoreo o su cese y por ende, conllevan al confinamiento de las abejas, permitiendo una rápida diseminación de las enfermedades. Es por esto que en el hemisferio sur la prevalencia de enfermedades fúngicas es coincidente con el aumento de latitud.

Dentro de las enfermedades fúngicas, *Nosema* spp., tiene una mayor relevancia, tanto a nivel nacional como internacional. Esto se debe a que es un patógeno emergente, distribuido en todos los países donde existe apicultura, es altamente contagioso y de fácil diseminación, provocando daños económicos de gran importancia.

El género *Nosema* perteneciente a la familia Nosematidae, orden Microsporideos, fue considerado hasta hace pocos años como un protozoo. Sin embargo, nuevas revisiones taxonómicas lo han ubicado dentro del filo Fungi (Keeling, 2002). Algunas especies son patógenas de invertebrados de importancia económica, mientras que otras están siendo investigadas por su posible uso para el control de pestes. En insectos sociales, se han reportado en todos los grupos mayores, como termitas, avispas, hormigas y abejas entre otros (Schmid-Hempel, 1998).

En abejas melíferas se han descrito dos especies de microsporidios, *N. apis* y *N. ceranae* (Fries *et al.*, 1996). Además, Fries *et al.*, (1997) señaló que la enfermedad denominada nosemosis en abejas melíferas europeas (*Apis mellifera*) era causada por el microsporidio *N. apis*, mientras que en el este de Asia *N. ceranae* se consideraba restrictiva de *Apis ceranae*. Sin embargo, estudios recientes han señalado que *N. ceranae* puede infectar también a *A. mellifera* (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007, Huang *et al.*, 2008, Botías, 2012c) y podría ser responsable del aumento de los incidentes de la enfermedad observados en algunos países europeos (Martín-Hernández *et al.*, 2007, Paxton *et al.*, 2007).

Nosema apis es un parásito intracelular obligado formador de esporas (Fries, 1988; Fries *et al.*, 1992). Las esporas ingeridas por las abejas adultas, se localizan en las células del ventrículo o del intestino medio. Aquí, germinan y penetran células epiteliales, se reproducen y liberan nuevas esporas (Bailey, 1955; Peldoza, 2002). Éstas a su vez germinan, diseminando la infección a otras partes del intestino (Bailey, 1981) por lo que se habla de un proceso de autoinfección (Fries, 1988). De este modo, producen daños en las células encargadas de la digestión y asimilación de nutrientes, las destruyen y provocan su muerte, lo que se traduce en un aprovechamiento inadecuado de los alimentos ingeridos por las abejas (Peldoza, 2002).

Se ha señalado que el tiempo transcurrido entre la ingestión de las esporas y la formación de nuevas esporas es dependiente de la temperatura siendo 30 a 35 °C la óptima para la multiplicación, cesando ésta a los 38 °C y no esporulando por debajo de los 10 °C (Lotmar, 1943). Así, cuando la temperatura es óptima para el parásito, el ciclo de *N. apis*, desde la ingestión de las esporas hasta la producción de nuevas esporas, se completa en 2 días (Kellner, 1980) o entre 3 y 5 días (Bailey, 1981). Fries (1988) señala que independientemente del nivel de infección, el ventrículo completo puede llegar a ser infectado en 2 semanas, debido al proceso de autoinfección mencionado previamente.

La viabilidad de las esporas de *N. apis* es bastante variable. En la miel o dentro de cuerpos muertos pueden persistir por 1 a 2 años (Revell, 1960). Bailey (1962) señaló que en depósitos fecales las esporas pueden sobrevivir al menos un año, mientras que Peldoza (2002) indica que en el suelo, la sobrevivencia es de 44 a 71 días. *N. apis* afecta las abejas adultas (obreras, reinas y zánganos), siendo aparentemente incapaz de infectar las larvas recién emergidas (Hassanein,

1951). Con respecto a la susceptibilidad, los resultados del estudio realizado por Webster *et al.*, (2004) indican que tanto las abejas reinas como las obreras presentan una sensibilidad similar frente a *N. apis*, lo que sugiere que las reinas no tienen medios inherentes para protegerse contra este parásito.

Se ha determinado que tanto *N. apis* como *N. ceranae* son transmitidas horizontalmente (Fries 1988; Fries *et al.*, 1996). El contagio se produce por la ingestión de alimentos y/o agua contaminada con esporas de *N. apis*, consumo de esporas presentes en heces frescas o secas de las abejas enfermas (Fries, 1988; L'Arrivee, 1965) o por regurgitación del alimento de una abeja a otra conocido como trofalaxis (Jean-Prost, 2010), en especial, durante la realización de trabajos dentro de la colmena en períodos de confinamiento (Popa, 1965; Root, 1990). Entre colmenas próximas y distantes, el contagio se produce por pillaje de colonias enfermas, deriva, errores de manejo del apicultor, alimentación con miel contaminada y trashumancia no controlada (Peldoza, 2002).

Entre los efectos nocivos para las abejas destacan la alteración del metabolismo, debido a la menor digestión de proteínas (polen), disminución en las energías y reducción de la longevidad, anquilosamiento de glándulas hipofaríngeas, disminución de la ovoposición de las reinas y destrucción de los elementos formadores de la hemolinfa (Peldoza, 2002).

Desde un punto de vista económico, Fries (1993, 1997, 2010) señala que la nosemosis es considerada una de las enfermedades más importantes para los apicultores. Botías *et al.*, (2009) indican que nosemosis ha demostrado ser un problema creciente para los apicultores en todo el mundo. Entre los efectos nocivos en la producción se mencionan pérdidas de abejas adultas especialmente al finalizar el invierno y principios de primavera, disminución de la producción de miel en un 25%, aumento en el consumo de miel durante el invierno hasta de un 50% y nula producción de jalea real, por lo que no pueden producirse reinas de buena calidad, ni tampoco larvas saludables (Peldoza, 2002). Además, se reduce la vida productiva de las abejas (Kleinschmidt y Furgunson 1989, Fries, 1993) y se observa gran mortalidad de la colonia en invierno (Nitschmann, 1957, Fries, 1993).

La nosemosis no presenta síntomas obvios por lo que suele ser difícil de detectar. Sin embargo, las colonias afectadas exhiben una producción de miel significativamente menor y una reducción en su capacidad de polinización (Fries y Ekbom, 1984; Goodwin *et al.*, 1990; Anderson y Giacon, 1992). En consecuencia, un diagnóstico de campo debe ser confirmado por un análisis de laboratorio mediante microscopía óptica. En este caso se realiza una visualización de *N. apis* a partir de preparaciones de macerados de intestinos de abejas o de excrementos recogidos desde la colmena (Peldoza, 2002). El avance en técnicas de biología molecular ha permitido el desarrollo de nuevos métodos de detección tales como PCR (Polymerase Chain Reaction) o RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphisms). Las esporas de *N. apis* y *N. ceranae* son muy similares y difícilmente pueden ser distinguidas por el microscopio óptico, por lo que las técnicas moleculares de diagnóstico, como el PCR son herramientas muy efectivas para realizar el diagnóstico diferenciado de ambos patógenos, adicionalmente permiten detectarlos en bajos niveles de infestación (Bourgeois *et al.*, 2010).

N. apis se encuentra diseminado por todo el mundo (Fries, 1993, Matheson, 1996), aunque no parece ser un problema importante en climas tropicales y subtropicales (Wilson y Nunamaker, 1983). Por el contrario, en climas templados se considera una enfermedad seria, ya que puede llegar a producir graves daños a las colonias (Fries, 1988; Farrar, 1947; Fries y Ekbom, 1984). De acuerdo a las estadísticas del OIE (2004), la nosemosis se distribuye en el 43% de los países que tienen colonias de abejas.

N. ceranae se ha identificado como un agente patógeno en *Apis mellifera* de mayor virulencia que *N. apis* (Higes *et al.*, 2008). Sin embargo, los informes sobre la virulencia de *N. ceranae* en las abejas individuales como para las colonias de abejas indican que los parámetros climáticos como temperatura afectan en forma significativa la virulencia perdiéndose a muy bajas temperaturas (entre -18 y 8°C) (Fries *et al.*, 2010, Stevanovic *et al.*, 2011). Además de los efectos directos de las infecciones por *N. ceranae* en las abejas y las colonias, este patógeno puede promover la aparición de otras enfermedades de las abejas como cría calcificada, causada por *Ascospaera apis* (Hedtke *et al.*, 2011).

N. ceranae ha sido identificado progresivamente en países del sur de América, como Brasil, Uruguay, Argentina (Invernizzi *et al.*, 2009; Klee *et al.*, 2007; Medici *et al.*, 2011). En Chile, *N.*

apis fue detectado por primera vez en 1978, a través de los análisis realizados en los laboratorios del SAG. Hinojosa y González (2004) señalan que de acuerdo a sus resultados, en las seis comunas del sector costero e interior muestreadas de la VI Región, *N. apis* registró una prevalencia de $60,0 \pm 6,9\%$ en la primavera de 1999, en primavera de 2000 se detectó un $78,3 \pm 5,8\%$ mientras que en verano de 2000 un $14,3 \pm 5\%$, y en verano de 2001 un $23,0 \pm 6\%$. Estos resultados señalan que en esta zona la mayor incidencia ocurre en primavera, debido a la alta contaminación fecal existente dentro de la colonia a fines de invierno.

Respecto de la presencia de *N. ceranae* en Chile, el SAG no cuenta con la técnica de diferenciación de ambas especies, por lo que ha tenido que enviar durante el 2009, muestras de abejas al laboratorio de referencia del Centro de Investigación Apícola de Marchamalo en España, para diagnosticar la presencia del agente etiológico. Por otra parte, Martínez *et al.*, (2012), identificaron la presencia de *N. ceranae* en Chile sólo en la Región del Bío-Bío, la cual abarca un 42,0% de la producción de miel del país. El estudio evaluó 4 provincias de la región, obteniéndose información de un total de 26 comunas. De ellas un 49,0% arrojó la presencia de *N. ceranae* y la publicación de Rodríguez *et al.*, (2012) quien analizó colmenas de la Región del Maule encontrando *N. ceranae*. Cabe mencionar que en el resto de nuestro país no existen estudios científicos que confirmen la presencia de *N. ceranae*. Es por esta razón, que en esta tesis se planteó como objetivo identificar la especie de *Nosema* presente en colmenas de apiarios que presentaron signos de nosemosis de la Región de Valparaíso.

Control de Nosemosis

1. Uso de antibióticos

A nivel mundial, muchos productos han sido evaluados contra *Nosema* spp. Sin embargo, el único antibiótico efectivo parece ser fumagilina (Moffet *et al.*, 1969; Mutinelli, 2003; Bessi y Nanetti, 2005). No obstante, desde el 1° de enero de 2000 este producto ya no se encuentra disponible en el mercado de los países de la Unión Europea (Regulation 2377/90). Las opiniones con respecto al uso de dicho antibiótico son controversiales. Por una parte, de acuerdo a algunos autores incluso en los lugares donde se ha utilizado fumagilina hay problemas de recurrencia de la enfermedad, ya que al parecer éste sólo extermina la forma vegetativa del parásito (MacDonald, 1978, Szabo y Heikel, 1987, Wyborn y McCutcheon, 1987). Por otro lado, Liu (1973) sugiere que fumagilina es capaz de alterar la ultraestructura de la membrana de las

esporas jóvenes. En países donde está permitido su uso, la inquietud entre los apicultores con respecto a costos y posible presencia de residuos en la miel han limitado su uso (Malone y Giacon, 1996).

2. Uso de variedades resistentes

Debido a que en la mayor parte de los países de Europa, el uso de antibióticos en el tratamiento de enfermedades en las abejas está prohibido, se ha debido buscar soluciones alternativas. La cría de abejas tolerantes o resistentes a este patógeno ha sido propuesta como alternativa (Malone y Giacon, 1996). Estudios con respecto a variación y heredabilidad de la respuesta de abejas melíferas a *N. apis* han sugerido que se pueden realizar mejoras por medio de selección de crías (Syvester y Rinderer, 1978; Rinderer *et al.*, 1983). Para determinar si la introducción de *A. mellifera* subsp. *carnica* desde Australia puede alterar el impacto de *N. apis* en las razas *A. mellifera* subsp. *mellifera* y *A. mellifera* subsp. *ligustica* de Nueva Zelanda, Malone *et al.*, (1996) inocularon estas tres razas con *N. apis*. Sus resultados mostraron que *N. apis* reduce significativamente la longevidad de todas las razas de abejas usadas en este estudio. Asimismo, no se registraron diferencias significativas en la reducción de la longevidad entre las tres razas. No obstante, se destaca la capacidad de *A. mellifera* subsp. *ligustica* y de *A. mellifera* subsp. *carnica* para sobrevivir en cajas.

3. Medidas preventivas

Se ha sugerido una serie de medidas para evitar o aminorar el desarrollo de la enfermedad. Maistrello *et al.*, (2008) aconsejan ubicar las colmenas en zonas no húmedas, uso de equipos no contaminados y fumigación de celdas con ácido acético para eliminar esporas de *N. apis*.

4. Uso de sustancias de origen natural

Recientemente, ha surgido un enfoque distinto en el tratamiento de la nosemosis orientándose hacia la búsqueda de soluciones entre las sustancias de origen natural antes mencionadas (Api-Herb[®] y el Protofil[®]).

Es importante mencionar en el contexto de las sustancias de origen natural y el tratamiento de la nosemosis, que Maistrello *et al.*, (2008) comprobaron los efectos significativos del timol y resveratrol, para reducir la carga de esporas *Nosema spp.*

Principios activos con actividad antifúngica

A nivel mundial, son abundantes los estudios orientados a combatir patologías humanas, animales y vegetales, producidas por microorganismos, en los que se han evaluado y demostrado la eficacia de compuestos de origen vegetal. La experiencia ancestral en el uso de plantas medicinales ha sido uno de los pilares fundamentales en la investigación de compuestos que puedan tener propiedades farmacológicas (Montenegro, 2002). Al respecto, numerosos estudios demuestran que los aceites esenciales (mezcla compleja de compuestos volátiles producidos por las plantas) presentan diversas funciones, incluyendo la resistencia a plagas y enfermedades (Goubran y Holmes, 1993 citados por Tzortzakis y Economakis, 2007). Desde el descubrimiento de las propiedades antifúngicas y antimicrobianas de las esencias, sumado a la creciente preocupación pública por el nivel de plaguicidas en los alimentos, existe un renovado interés por desarrollar productos en base a esencias para el control de hongos, en periodos de post-cosecha y de plagas (Bishop y Thornton, 1997).

Por otra parte, durante los últimos años han sido numerosos los estudios realizados en aceites esenciales, que demuestran que muchos de éstos, exhiben una actividad antimicótica efectiva (Thompson, 1989; Zambonelli *et al.*, 2008; Dafera *et al.*, 2000; Karaman *et al.*, 2001; Guynot *et al.*, 2003; Abad *et al.*, 2007; Satish *et al.*, 2007).

En estudios recientes (Rao *et al.*, 2010) proponen un mecanismo de actividad antifúngico de los monoterpenos fenólicos presentes en el aceite esencial de orégano frente a *Saccharomyces cerevisiae*, este se relacionaría a la estructuras de estos, específicamente a la presencia del grupo hidroxilo y anillo aromático. El carvacrol afectaría a) tanto la homeostasis de Ca^{+2} como la H^+ y esto involucraría la pérdida de la viabilidad celular, b) apagando vías relacionadas con el crecimiento celular por inhibición de la actividad de genes asociados al metabolismo de ácidos nucleicos, síntesis de RNA y biosíntesis de ribosomas. Así también Lima *et al.*, (2013) proponen un mecanismo antifúngico adicional para el carvacrol, ya que éste podría unirse a esteroides de membrana en *Candida albicans* provocando una expansión y desestabilización de membrana, aumentando la fluidez de esta y la viabilidad celular.

Tal como fue señalado anteriormente en algunos países se han formulado preparaciones en base a aceites esenciales, con componentes activos de efecto fungicida, entre ellos destacan el Api-Herb® y el Protofil®.

En Chile, investigaciones realizadas con especies vegetales nativas, han arrojado algunos resultados positivos por su actividad antifúngica (Jain *et al.*, 1993 citado por Mazutti *et al.*, 2008; Labbé *et al.*, 2002; Quiroz, 2003; Monsálvez, 2007). Por otra parte, Bittner *et al.*, (2009) evaluaron la actividad fungistática de aceites esenciales extraídos de peumo (*Cryptocarya alba* Mol., Lauraceae), tepa (*Laureliopsis philipiana* Looser, Monimiaceae) y laurel (*Laurelia sempervirens* Ruiz et Pav., Monimiaceae) frente a hongos *Rhizoctonia solani* Kühn (Donk), *Pythium irregulare* Buisman, *Ceratocystis pilifera* (Fr.) C. Moreau, *Phragmidium violaceum* (Schultz) G. Winter y *Fusarium oxysporum* Schldl. También Bittner *et al.*, (2010) evaluaron la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos de canelo, queule, bailahuén y culén frente a hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Rhizopus arrhizus*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus nigra*.

Como se puede apreciar en ninguno de estos trabajos fueron incluidos los patógenos *N. apis* y *N. ceranae*. Las posibles causas de la falta de estudios con *Nosema* spp., pueden ser dos a) este hongo crece solamente en el cavidad abdominal de las abejas y por lo tanto sólo puede evaluarse la actividad antifúngica *in vivo* b) la forma de diagnóstico de la nosemosis más utilizada en Chile es por microscopia óptica, pero al ser las esporas tan similares esta técnica no permite diferenciar *N. ceranae* de *N. apis*, para esto se han desarrollado técnicas más efectivas como la técnica de biología molecular PCR, la que en nuestro país aún no es ampliamente utilizada.

En esta tesis fueron seleccionadas **4 especies nativas**, con el fin de investigar las propiedades de sus aceites esenciales frente a la nosemosis: boldo (*Peumus boldus* Mol., Monimiaceae), peumo (*Cryptocarya alba* Mol., Lauraceae), litre (*Lithraea caustica* Mol., Anacardiaceae) y maitén (*Maytenus boaria* Mol., Celastraceae). Cabe mencionar que en los apiarios que se encuentran cercanos a las zonas geográficas de bosque esclerófilo donde habitan estas especies, las colmenas presentan baja incidencia de nosemosis (comunicación personal con apicultores de la zona).

Respecto de los estudios previos de las especies seleccionadas para este estudio, se ha descrito por ejemplo que las propiedades antiparasitarias de las hojas de **boldo** se relacionan con el aceite esencial y la boldina (Cañigueral, 1998) y entre los diferentes hidrocarburos que componen el aceite esencial de las hojas de boldo, el ascaridol tiene un especial interés, debido a que es el causante del efecto antiparasitario de dicha especie (Gupta, 1995).

Vogel *et al.*, (1997 y 1999), estudiaron los rendimientos de aceite esencial y alcaloides en diferentes poblaciones de hojas de boldo y sus variaciones estacionales. Para ello, extrajeron aceite esencial desde las hojas utilizando el método de destilación por arrastre de vapor. La composición del aceite esencial extraído se analizó mediante cromatografía gaseosa, estableciendo que el contenido de aceite esencial en las hojas de esta especie presenta fluctuaciones en el transcurso de un año, con un mínimo significativo durante el verano (1%). Un estudio comparativo entre las poblaciones del norte (V Región), centro (VII Región) y sur (IX Región), demostró que los árboles del centro presentaron valores de aceite esencial significativamente más altos que las demás localidades (1,98%). Con respecto al contenido de ascaridol de la esencia, las mayores concentraciones (58,1%) fueron obtenidas en la población del norte (Cuesta La Dormida). Espic (2007) determinó que los rendimientos del aceite esencial de hojas de boldo varían entre 2,1 y 3,4%, con contenidos de ascaridol entre 54,7 y 79,3%. Las propiedades medicinales de las hojas de boldo, son atribuidas a principios activos como son la boldina y el aceite esencial, considerados los principales responsables de las propiedades hepatoprotectora, antioxidante y antiparasitaria, entre otras (Cañigueral, 1998). El aceite esencial de boldo está constituido principalmente por limoneno, p-cimeno y felandreno; monoterpenos oxigenados: cíneol, terpinen-4-ol, α -terpineol y ascaridol entre otros (Montes *et al.*, 2004). Recientemente, Bittner *et al.*, (2009) demostraron las propiedades antifúngicas de la esencia de boldo frente a hongos *Rhizoctonia solani* Kühn (Donk), *Pythium irregulare* Buisman, *Ceratocystis pilifera* (Fr.) C. Moreau, *Phragmidium violaceum* (Schultz) G. Winter y *Fusarium oxysporum* Schltdl.

El **peumo** presenta hojas con mesófilos que contienen una gran cantidad de cavidades oleíferas donde se acumulan aceites esenciales, que son evaporados lentamente a la atmósfera (Montenegro, 2000, citado por Donoso, 2006). Las hojas de peumo son muy aromáticas, debido a la presencia de aceite esencial que se encuentra en concentraciones de 0,10 a 0,35 mL por 100

g de materia seca (Vogel *et al.*, 2008). Las hojas del peumo presentan un 0,3% de aceite esencial, entre cuyos componentes se cuentan p-cimol, terpinen-4-ol (componente principal), α y β pineno, cineol, borneol, linalol y limoneno (Montes *et al.*, 2004). Avello-Lorca (2012) observó actividad del aceite esencial de *C. alba* puro frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*.

El **maitén** es un árbol nativo que pertenece a la familia Celastraceae, comprende 55 géneros y 850 especies, las cuales están distribuidas en zonas cálido-templadas del mundo. Se ha descrito para la mayoría de sus miembros la presencia de alcaloides, terpenoides, flavonoides, esteroides y xantonas. En Chile el género *Maytenus* está representado por cuatro especies, siendo *Maytenus boaria* la única utilizada medicinalmente (Montes *et al.*, 2004). Sin embargo, no se han realizado estudios en Chile, respecto de las actividades fungicidas del aceite esencial obtenido desde las hojas de maitén.

Respecto del **litre**, Garbarino *et al.*, (2002), de sus partes aéreas y usando la técnica de Micro-Extracción en Fase Sólida (MEFS), identificaron y cuantificaron los principales compuestos volátiles, los monoterpenos, mirceno, pineno, cimeno y limoneno, los cuales presentan actividades antifúngicas (Xia *et al.*, 1999).

Descripción botánica de las especies

Para el boldo se describe sólo una especie para el género *Peumus* (Gayana, 1985) árbol o arbusto dioico, de 3-6 m de altura, hojas persistentes de 3-7 cm de longitud de 1-5 cm de ancho, subsésiles, opuestas, coriáceas, enteras forma algo variada, generalmente aovada u oblonga cara superior brillante, áspera al tacto, cubierta de glándulas y pelos estrellados rígidos, envés más pálido, pubescente, generalmente los tricomas o pelos caducos. Frecuente. Florece desde julio a noviembre. Áreas de preferencia: cerros de la laguna de Aculeo, quebrada de la Plata en Rinconada de Lo Cerda-Maipú.

Según la Gayana (1985), el peumo es la única especie del género *Cryptocaria* en Chile, crece en la zona central (Navas, 1976), árbol de 4-8 m de altura, glabro, con ramas jóvenes pubescentes. Hojas enteras, subopuestas, opuestas y alternas, aovadas, ovales, de 1-8 cm de longitud, coriáceas, glabras, márgenes ondulados, verdes en el haz, glaucas en el envés. El pecíolo mide

entre 2 y 3 mm. Muy abundante. Florece desde noviembre a enero. Áreas de preferencia: cerro Manquehue, el Arrayan, quebrada de Peñalolen, quebrada de Ramón, Quebrada de Macul, cajón del Maipo, cerros de Aculeo.

El litre es la especie nativa, única del género *Lithraea* (Gayana, 1985), crece en la zona central. Es un árbol o arbusto de 1,5-3 m de altura, glabro, ramas jóvenes puberúlas, hojas alternas, peciolos de 4-6 mm de longitud, márgenes ondulados, nervadura muy sobresaliente en ambas caras, 2,5-6 cm de longitud y 2-4 de ancho (Navas, 1976). Muy abundante. Florece desde septiembre a diciembre. Áreas de preferencia: cerro San Cristóbal, termas de Colina, quebrada del Arrayán, Apoquindo, quebrada de Peñalolén, quebrada de Ramón, Cajón del Maipo, cerros de Aculeo.

El maitén es un árbol nativo de 3-15 m de altura (Gayana, 1985), crece en la zona central, es glabro, ramas generalmente péndulas. Hojas alternas, lanceoladas, de 1-8 cm de longitud, a veces discolor, los márgenes del limbo foliar son aserrados o sólo en su mitad superior, con mucrones rojizos y caducos, nervadura muy marcada en ambas caras; peciolos de 2-5 mm de longitud (Navas, 1976). Abundante. Florece desde septiembre a diciembre. Áreas de preferencia: cerros de Renca, termas de Colina, cerro San Cristóbal, cerro Manquehue, quebrada de Peñalolén, Macul, cajón del Maipo, Maipú.

Es importante destacar que el trabajo de esta tesis es original, ya que los aceites esenciales de boldo, peumo, maitén y litre no han sido evaluados frente a *Nosema* spp.

En Chile existen 13.430.602 ha con bosque nativo de las cuales un 2,6%, es decir, 345.089 ha pertenecen al Tipo Forestal Esclerófilo. Este Tipo Forestal se presenta en 9 de las 15 regiones, siendo la VI Región la que concentra el mayor porcentaje con un 28,2% (CONAF-CONAMA-BIRF, 1999a). Dentro de dicha Región, del total de bosque nativo, el 82,4% es del Tipo Forestal Esclerófilo (CONAF-CONAMA-BIRF, 1999b) y donde abundan las especies vegetales a estudiar, por tal razón la colecta del material vegetal se efectuará en dicha Región.

Hasta ahora, en Chile no existen productos registrados de origen natural para el control de la nosemosis o de otras enfermedades fungales, por lo que se hace necesaria la búsqueda de alternativas de control entre productos derivados de plantas, considerando el importante

reservorio de dichos aceites esenciales que se encuentra en especies vegetales de nuestro bosque nativo esclerófilo, por tanto, la solución es innovadora y aportará un valioso conocimiento de las capacidades fármaco terapéuticas de nuestra flora, que a su vez puede generar un mercado de proyecciones interesantes para la cadena productiva relacionada con la apicultura, así como para los propietarios de predios que cuentan con especies de dicho bosque y en particular la VI Región donde se colectará el material vegetal. Por consiguiente, la presente tesis puede entregar un importante valor agregado a las especies vegetales en estudio.

La investigación propuesta en esta tesis tiene como objetivo estudiar las potenciales propiedades frente a *Nosema* spp., de los aceites esenciales e identificarlos principios activos y cuantificarlos en las esencias obtenidas. Esto permitirá estandarizar químicamente dichos aceites, como alternativa para combatir esta patología que en la actualidad no tiene tratamiento y que ocasiona graves daños en los apiarios. Identificar la especie de nosema presente en las colmenas infectadas en la zona de muestreada, zona geográfica para la cual no se ha descrito la especie causante del despoblamiento de las colmenas.

II. HIPÓTESIS

1.1.- Hipótesis científica

Los aceites esenciales de especies vegetales autóctonas del bosque nativo esclerófilo como boldo, peumo, maitén y litre presentan propiedades antifúngicas contra *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, siendo inocuos para la abeja *Apis mellifera*.

1.2.- Objetivo general

Evaluar y estandarizar en su o (sus) componente(s) activo(s) un aceite esencial obtenido desde una especie vegetal nativa como boldo, peumo, maitén y litre con efecto antifúngico frente a patógenos emergentes en el sector apícola, *Nosema apis* y *Nosema ceranae* e inocuidad en *Apis mellifera*.

III. OBJETIVOS

1.3.- Objetivos específicos

1. Determinar la calidad del material vegetal utilizable para obtener aceites esenciales de uso apícola.
2. Obtener los aceites esenciales y realizar un estudio comparativo de actividad antifúngica frente a *Nosema* spp. e inocuidad en abejas.
3. Seleccionar uno de los aceites esenciales que presente mayor actividad antifúngica frente a *Nosema* spp. (AE_{selec}).
4. Evaluar el o (los) compuesto(s) mayoritario(s) del aceite esencial que presente mayor actividad frente a *Nosema* spp.
5. Cuantificar los componentes mayoritarios del AE_{selec}.

CAPÍTULO III



IV. METODOLOGÍA

1. Recolección del material vegetal

1.1 Colecta del material vegetal

Se colectaron hojas frescas de árboles con las características para cada especie vegetal en la zona de estudio. Las especies estudiadas correspondieron a boldo (*Peumus boldus* Mol., Monimiaceae), peumo (*Cryptocarya alba* Mol., Lauraceae), litre (*Lithraea caustica* Mol., Anacardiaceae) y maitén (*Maytenus boaria* Mol., Celastraceae).

1.2 Época de colecta

En base a la bibliografía y al seguimiento del estado fenológico de las especies en los predios elegidos, se colectaron las muestras en el período de antesis, época en que las hojas de la mayoría de las especies tienen la mayor producción de aceite esencial (Naghdi *et al.*, 2004).

1.3 Procedimiento de colecta y transporte

Se colectaron 250 g de hojas frescas de cada árbol seleccionado, hasta completar 7 kg de hojas frescas por especie, las que debieron cortarse a la altura media y alrededor de todo el árbol. Este procedimiento se realizó a mano, con guantes de látex, mascarilla, gorro y overol, con el fin de no contaminar las muestras. Las muestras fueron introducidas en bolsas de papel kraft selladas (SAGP, 2009) y se depositaron en mantenedores de temperatura (refrigeración), y se transportaron al laboratorio.



Figura 1. Recolección de las muestras vegetales

1.4 Obtención de muestras para su herborización (testigo herbario)

Se tomó una rama de la zona apical de cada especie en el período de floración, para su herborización y se guardó un testigo de herbario, en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (SQF). Una vez colectada la muestra en terreno, ésta se colocó inmediatamente entre papeles de diario o papel filtro y a continuación, se sometió a presión con una prensa. Después de un día se cambiaron los papeles, procedimiento que se repitió cada día hasta que la muestra se encontró bien seca. Dicha muestra fue montada en una carpeta de herbario que lleva una etiqueta con la siguiente información: fecha y lugar de recolección, nombre del colector, altura sobre el nivel del mar, características del sitio de colecta, densidad poblacional (escasa, frecuente o abundante).

2. Estudio Químico

2.1 Obtención del aceite esencial de las especies vegetales en estudio

Las hojas frescas de cada una de las especies en estudio, fueron sometidas a un proceso de limpieza y lavado, con el fin de eliminar las impurezas y material extraño. A continuación fueron fracturadas y sometidas a un proceso de extracción por arrastre de vapor de agua, utilizando un equipo de extracción constituido por un alambique, un condensador y un separador de la esencia. El equipo tiene una capacidad para procesar 500 g de hojas. Este equipo generaba vapor de agua en un recipiente separado del material vegetal, de tal forma que éste último está en contacto sólo con el vapor de agua (Figura 2), evitando de esta forma la descomposición de la esencia (Bandoni, 2000). Una vez obtenidos los aceites esenciales, se calculó su rendimiento y se guardó protegidos de la luz (envase de vidrio ámbar), a una temperatura entre 4 a 8 °C y en atmósfera inerte como lo es el nitrógeno. Cada aceite esencial fue evaluado *in vivo* la toxicidad que eventualmente pudiera generar en las abejas, según metodología descrita en el punto 3 y los aceites inocuos fueron evaluados frente a *Nosema spp.*, para determinar su eficacia frente a la nosemosis.

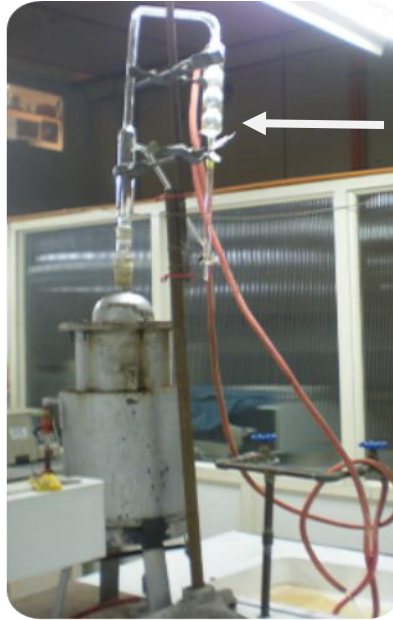


Figura 2. Aparato de condensación, Clevenger

2.2 Obtención de una mayor cantidad del aceite esencial seleccionado (AE_{selec})

Siguiendo la metodología señalada en el numerando 2.1 se obtuvo una mayor cantidad del AE_{selec} . Con este fin y de acuerdo con el rendimiento obtenido en la primera etapa del estudio químico, se extrajo aproximadamente 7 kg de hojas.

3. Determinar la calidad de la materia prima (materia vegetal) utilizable para obtener un aceite esencial de uso apícola

Se utilizaron los criterios de calidad indicados por la OMS (Solimene, 2007), por tanto, el material vegetal recolectado fue sometido a los siguientes análisis:

3.1 Determinación de material extraño a la droga vegetal

Este análisis se realizó mediante microscopía con el fin de investigar la presencia de insectos, heces de animales y otras especies de plantas (Solimene, 2007), lo cual se realizó en el

Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

3.2 Determinación de metales tóxicos

La presencia de cobre, cromo, cadmio, plomo y níquel, se realizó por Espectrometría de emisión atómica (ICP-AES), para lo cual se solicitó prestación de servicio al Centro de Ensayos y Estudios Externos de Química (CEQUC) de la Universidad Católica.

3.3 Determinación de dioxinas, furanos y DL-PCBs

Mediante la aplicación del bioensayo EROD a través del cultivo celular H4IIE (Whyte *et al.*, 2004; Valdovinos, 2009; Schoffer *et al.*, 2011) se realizó la determinación de dichos xenobióticos en el Centro de Investigaciones Ecotoxicológicas (CIEMAYOR) de la Universidad Mayor.

3.4 Determinación de contaminantes microbiológicos

Se determinó la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp, *Escherichia coli*, hongos y levaduras. Estos análisis se realizaron en el Instituto Nacional de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, para ello las muestras de hojas frescas de ambas especies (peumo y maitén) fueron enviadas en envases sellados y estériles en mantenedores de temperatura a 4°C.

4. Evaluar *in vivo* la toxicidad de un aceite esencial frente a *Apis mellifera* y la eficacia frente a *Nosema* spp.

4.1 Evaluación en condiciones de laboratorio de la toxicidad de los aceites esenciales, y compuestos mayoritarios de dichos aceites sobre las abejas (*Apis mellifera*)

Debido a que muchas veces los tratamientos contra patologías de las abejas pueden producir la muerte de las mismas por efectos tóxicos, se evaluó cuál es la cantidad de aceites esenciales o

sus extractos necesarios para que se produzca la muerte en la mitad de la población de abejas expuestas a dicho producto, procedimiento conocido como “Dosis Letal Media” (DL 50) (Albo *et al.*, 2010; Gende *et al.*, 2009). Para realizar esta actividad, se utilizó el Test de toxicidad oral aguda para abejas, descrito en el protocolo 213 de la OECD, que forma parte de la serie de documentos OECD Guidelines for the testing of chemicals (OECD, 1998). Dicho test es un ensayo de laboratorio, diseñado para evaluar la toxicidad oral aguda de plaguicidas y otros productos químicos, para las abejas obreras.

Se utilizaron abejas recién nacidas de manera de evitar susceptibilidades o presencia de tolerancia adquirida en los individuos. Se ubicaron 10 abejas en jaulas de malla de aluminio de 16 cm de largo y 4,5 cm de diámetro con un alimentador en uno de los extremos (Donovan y Elliot, 2001). Las abejas fueron mantenidas en oscuridad a $32 \pm 2^\circ \text{C}$ y a una humedad relativa de 50 - 70%, no obstante, las observaciones de los resultados del test, fueron realizadas con luz normal.

Las esencias evaluadas se obtuvieron como fue descrito anteriormente a partir de hojas de peumo (*Cryptocarya alba* Mol., Lauraceae), boldo (*Peumus boldus* Mol., Monimiaceae), maitén (*Maytenus boaria* Mol.) y litre (*Lithraea caustica* Mol., Anacardiaceae) y fueron mezcladas respectivamente con una solución de sacarosa al 50% p/v en una proporción de 1:1 y entregado a través de una punta de micropipeta de p-1000 (punta azul). La dosis fue entregada *ad libitum*. Las abejas no fueron alimentadas 2 horas previas al inicio del ensayo.

El número de concentraciones y réplicas, cumplió con los requisitos estadísticos para la determinación de la DL_{50} con límites de confianza del 95%, por tanto, se utilizaron cinco concentraciones de una serie geométrica, con un factor no superior a 2.2 y que cubre el rango para la DL_{50} , requeridos para la prueba. De acuerdo a las recomendaciones de la OECD (1998), se consideraron al menos tres réplicas para cada concentración a evaluar y tres controles, cuyas abejas fueron alimentadas sólo con una solución de sacarosa 50% p/v. Además, de acuerdo a las exigencias de la OECD (1998) se utilizó un tóxico de referencia (dimetoato) para verificar la dosis respuesta esperada, en un rango de 0,10-0,35 μg /abeja (Albo *et al.*, 2003).

La duración del test fue de 48 horas. La mortalidad se registró a las 4 horas después del inicio de la prueba, luego a las 24 y 48 horas. Finalmente, toda conducta anormal observada durante el período de prueba fue registrada.

5. Determinación mediante PCR de la presencia de *Nosema apis* o *Nosema ceranae*

5.1 Obtención de muestras concentradas de esporas de *Nosema* spp. y análisis PCR

5.1.1 Muestras

Por un lado fueron analizadas las muestras obtenidas de las colmenas del centro agrario para identificar con que agente se infectaría posteriormente en laboratorio y por otro lado se analizaron las muestras provenientes de la V Región de Valparaíso pertenecientes a colmenas de las localidades de San Antonio, Limache y la Ligua, correspondientes a colmenas que presentaron despoblamiento, presencia de enfermedades en la cría y debilitamiento en general, información proporcionada por Alianza productiva INDAP-Agro Apilcutura Ltda., y que habían sido utilizadas en los ensayos preliminares de efectividad 6.1. y ensayos de efectividad 6.2., de esta manera identificar el o los agentes presentes en muestras provenientes de nuestro país. Se recolectaron muestras de dichas colmenas, constituidas por 60 abejas pecoreadoras (aquellas que recolectan los alimentos de las flores), éstas fueron procesadas macerando los abdómenes de 30 abejas en 5 mL de agua destilada. La suspensión obtenida fue filtrada para eliminar los restos del exoesqueleto de la abeja y centrifugada a 1200 rpm durante 10 min, resuspendiendo posteriormente el pellet obtenido en 1 mL de agua destilada.

5.1.2 Purificación y concentración de esporas *Nosema* spp.

Para concentrar muestras con esporas de *Nosema* spp. se repitió el procedimiento de moler en grupos de 10 abejas hasta completar un total de 200 abejas, luego de filtrar esos tejidos mediante la utilización de Stomacher 80, fue centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm y 4° C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 15 mL de PVP (polivinilpirrolidona, percoll® Sigma) al 95%. Se realizó una segunda centrifugación pero esta vez por 40 min a 11000 rpm y a una temperatura de 10 °C. Se obtiene con una pipeta Pasteur la nube de esporas y se llevó a un tubo de 15mL

posteriormente se agregó H₂O bidestilada ultrapura (milliq) hasta completar volumen y se agitó en vortex. Posteriormente se lavaron las esporas, para ello se centrifugó a 2000 rpm por 10 min. Se eliminó parte del H₂O y se mantiene 1mL. Se añadió nuevamente H₂O hasta completar el volumen. Se elimina el H₂O con pipeta y nos quedamos con el sedimento (pellet) de 1 mL y lo pasamos a tubos de 2 mL. Se adicionó H₂O bidestilada ultrapura (milliq) hasta completar 2 mL. Se centrifugó 10 min a 8200 rpm. Nuevamente se extrajo el sobrenadante con una micropipeta y se mantiene el sedimento, con pipeta adicionar 1 mL H₂O milliq al tubo de 2 mL y se dispuso de esta manera de una muestra concentrada y purificada de esporas de *Nosema spp.* Estas muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el momento de ser utilizadas para evitar la pérdida de virulencia. (Fries *et al.*, 2010, Stevanovic *et al.*, 2011)

Posteriormente, con el concentrado de esporas se procedió a realizar dos actividades:

- 1) Determinación de la carga de esporas obtenidas en un paso posterior para ser inoculadas en las abejas sanas**
- 2) Análisis de PCR para la identificación específica del o los agentes obtenidos de las muestras de abejas**

5.1.3 Detección de esporas y extracción de DNA

El pellet fue analizado por microscopia de contraste de fases amplificada a 40x, en un microscopio óptico Nikon Eclipse 80i DIC (Differential Interference Contrast), para verificar la presencia de esporas (OIE 2004), el conteo de esporas se realizó en una cámara de Neubauer (Cantwell *et al.*, 1970). Esta metodología fue utilizada para determinar presencia o ausencia de esporas pertenecientes a *Nosema spp.* y para determinar la carga de esporas obtenidas en la etapa de purificación y concentración de esporas. Parte del pellet (400 µL) fue agitado junto con 0,1 g de perlas de vidrio (2 mm de diámetro) 30 veces por segundo (s) durante 4 min en un agitador TissueLyser (Qiagen) para romper la pared de las posibles esporas presentes. Posteriormente se procedió a la extracción del DNA (en triplicado), incubando previamente 150 µL de cada una de las muestras procesadas a 56 °C junto con 20 µL de proteinasa K y 30 µL de buffer ATL (Qiagen) durante toda una noche. Tras la incubación se realizó la extracción del DNA utilizando BioSprint™ 96 DNA Blood Kit (384) (Qiagen, Cat. No. 940057) en un robot Biosprint 96 (Qiagen) mediante el programa BS96_DNA_Tissue. Una vez obtenidos los extractos, se

procedió a analizar la presencia de *N. ceranae* y *N. apis* mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.1.4 PCR múltiple

La técnica de diagnóstico utilizada fue una PCR múltiple, en la que se detecta la presencia de *N. ceranae* y *N. apis* en una sola reacción (Martín-Hernández *et al.*, 2007) y además se amplifica un fragmento de la subunidad I del gen de la citocromo c oxidasa I (COI) de *A. mellifera*, lo cual sirve como control interno de la reacción.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler ep gradient S (Eppendorf®) en un volumen total de reacción de 25 µL, conteniendo 2,5 µL de extracto de DNA, 2,5 µL de H₂O de PCR y 20 µL del mix de PCR que contiene la polimerasa FastStart PCR Master 12,5 µL (Roche 04 710 452 001), 0,2mg/mL de albúmina de suero bovino, 0,1% de Tritón X-100, 3 mM MgCl₂, 0,4 µM de los partidores (primers) de 218MITOC y 321APIS y 0,03 µM de los partidores COI (ver Tabla 1). El programa en el termociclador consistió en 94°C por 2 min, seguido por 10 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 61,8°C, y 45 s a 72°C, 20 ciclos por 15 s de 94°C, 30 s a 61,8°C, 50 s a 72°C, unos 5 s de elongación para cada ciclo y un paso final de extensión de 72°C por 7 min. Junto con las muestras se procesó en paralelo el control negativo (H₂O destilada) para detectar posibles contaminaciones en la fase de la PCR y control positivo correspondiente a patrones de *N. apis* y *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2007).

El análisis de PCR se realizó para identificar el agente etiológico presente en las muestras de *N. apis* o *N. ceranae* y purificar por tipo de agente para posteriormente infectar abejas sanas.

Tabla 1: Partidores seleccionados para detectar la presencia de *N. ceranae*, *N. apis* y *A. mellifera*.

PARTIDORES	SECUENCIA ^a	TAMAÑO PRODUCTO DE PCR (pb)	ESPECIFICIDAD
218MITOC-FOR 218MITOC-REV	5'- <u>CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA</u> -3' 5'- <u>CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG</u> -3'	218-219 ^b	<i>N. ceranae</i>
321APIS-FOR 321APIS-REV	5'- <u>GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA</u> -3' 5'- <u>GGGGGCGTTTAAAATGTGAAACA</u> ACTATG-3'	321	<i>N. apis</i>
COI-FOR COI-REV	5'- <u>GGGTCCAAGACCAGGA</u> ACTGGAT-3' 5'- <u>GCGCGGAAATTCCTGATATATGAAGAGAAAA</u> -3'	118	<i>A. mellifera</i>

^a Las colas CG añadidas a los partidores están subrayadas; ^b Hay 1 pb (par de bases) de diferencia en el tamaño de los amplicones (producto de una replicación artificial) obtenidos de *N. ceranae* dependiendo de las distintas secuencias para esta especie disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

6. Evaluación in vivo en condiciones de laboratorio de la eficacia de los aceites esenciales, y compuestos mayoritarios de dichos aceites sobre *Nosema apis* y *Nosema ceranae*

6.1. Ensayo preliminar de prevención frente a la infección con *Nosema* spp.

Consistió en proporcionar tres aceites esenciales (litre, peumo y maitén) por siete días a un total de 9 grupos de abejas (5 abejas cada uno) y 3 grupos control negativo (5 abejas cada uno). El grupo control negativo recibió sólo jarabe de sacarosa 50% p/v antes de ser inoculadas con las esporas de *Nosema* spp., (especie que fue identificada de acuerdo con la metodología descrita en el punto 3). Los efectos obtenidos con los aceites esenciales (AE) fueron comparados con el grupo control negativo (infectadas sin tratamiento).

Se les administró por vía oral los diferentes AE a las abejas en cada uno de los grupos 7 días antes de ser inoculadas con las esporas de *Nosema* spp., de manera de poder determinar si alguno de estos compuestos permite obtener cierta “resistencia” de las abejas frente a infestaciones con esporas de este agente, traduciéndose esto entonces en un eventual efecto preventivo del AE.

Las abejas fueron mantenidas en jaulas (con 5 abejas por jaula) dentro de una incubadora a $34 \pm 1^\circ\text{C}$ y una humedad del $75 \pm 5\%$, durante todo el ensayo excepto al momento de inocular con las esporas de *Nosema* spp.

Con este fin se preparó una solución con una concentración de $3,2 \times 10^5$ esporas/mL en solución de sacarosa al 50% p/v. A cada jaula con 5 abejas se les proporcionó 25 μL de dicha solución utilizando una micropipeta y dejándolo sobre una masa preparada en base a fructosa y jarabe de sacarosa (50%). Este procedimiento fue realizado 7 días después de iniciado la ingesta de los AE y lo mismo para el grupo control que recibió sólo el jarabe de sacarosa (50%) (Fries *et al.*, 1992, Chioveanu *et al.*, 2004).

6.2 Ensayos para determinar la eficacia de los aceites esenciales frente a *Nosema* spp.

Inoculación de las abejas sanas con cargas de esporas de *Nosema* spp., vía oral para determinar la efectividad de los AE (laboratorio de productos naturales de la Facultad de Química y Farmacia)

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- A. Muestreo de abejas libres de nosemosis de la localidad de Buin, RM. Se colectaron abejas recién nacidas de colmenas de los apiarios de los socios del proyecto que mediante el muestreo en terreno y posterior análisis de laboratorio se confirmó la ausencia de esporas de *Nosema* spp.
- B. Muestreo de abejas con nosemosis provenientes de la Región de Valparaíso, determinación de la carga de esporas por microscopía óptica con cámara de Neubauer y obtención de esporas (macerando los abdómenes de 30 abejas en 5 mL de agua destilada, la suspensión obtenida fue filtrada para eliminar los restos del exoesqueleto de la abeja y centrifugada a 1200 rpm durante 10 min, resuspendiendo posteriormente el pellet obtenido en 1 mL de agua destilada) para posteriormente infectar abejas sanas en laboratorio con una carga inicial de esporas ($2,04 \times 10^6$ esporas/mL en solución de sacarosa (50%)), cada jaula contó con 5 abejas se les proporcionó 25 μL de dicha solución utilizando una micropipeta al igual que en el punto 6.1.

- C. Determinación y evaluación de la presencia de nosemosis en las abejas infectadas en el laboratorio con las esporas obtenidas (B).
- D. Se determinó la presencia de la enfermedad mediante la observación de los signos clínicos en las abejas cada 24 horas. Estos signos clínicos consisten en: excitabilidad inicial y posteriormente letargo e inactividad, pérdida de la capacidad del vuelo y de picar con el aguijón, aumento del consumo de alimento, disminución del tiempo de vida y mortalidad temprana (Bruno, 2003; De la Sota y Bacci, 2004).
- E. Determinación de la carga de esporas en el tracto intestinal de las abejas posterior a la infestación para ser utilizadas en el ensayo efectividad de los AE. Se colectó 1 abeja viva a modo de muestreo (además de las abejas que fueron muriendo) desde cada jaula para ir evaluando el desarrollo de la enfermedad y de la carga de esporas a los días posteriores a la inoculación según lo recomendado por Fries *et al.*, (1988), Higes *et al.*, (2007). Procedimiento que se realizó hasta el día 12.
- F. Las abejas infectadas restantes fueron utilizadas en el ensayo para determinar la efectividad de los AE (punto E).
- G. Determinación de la eficacia del AE frente a *Nosema* spp., que presentó mayor actividad en el ensayo preliminar de prevención descrito en el punto 6.1. Se trabajó con 3 grupos de tratamientos compuesto por 5 jaulas (con 5 abejas infectadas por jaula excepto el grupo control constituido por abejas sanas). Los 3 grupos de tratamiento fueron:
1. Grupo *Nosema* spp., control positivo tratado con fumagilina (C1),
 2. Grupo *Nosema* spp., control negativo sin tratamiento al cual sólo se le proporcionó jarabe de sacarosa 50% p/v (C2),
 3. Grupo *Nosema* spp., tratado con el AE seleccionado (T1).
- H. La administración del AE seleccionado, fumagilina y jarabe de sacarosa (C2) se administró el día 1, 4 y 8. La evolución del tratamiento entre los 3 grupos se realizó muestreando el día 4 posterior al tratamiento, día 8 y 12 con el fin determinar la carga de esporas por microscopía óptica con cámara de Neubauer por grupos de abejas tomando 1 jaula con 5 abejas cada vez (Maistrello *et al.*, 2008).

6.3 Confirmación de la eficacia del AE_{selec} en el punto anterior a la concentración que demostraron tener mejor efecto sobre la carga de esporas.

El AE_{selec} en el punto anterior (seleccionado tanto por presentar mayor eficacia y mayor rendimiento) fue sometido a un ensayo para confirmar su actividad frente a la nosemosis utilizando ensayos estandarizados en el Laboratorio de Patología del Centro Agrario de Marchámalo, España.

Para lo cual se trabajó con 3 grupos de tratamientos compuesto por 3 jaulas cada uno y con 35 abejas/jaula, nacidas en laboratorio, se esperó 7 días y se infectaron con una carga de 5×10^4 esporas por abeja, luego se dejó transcurrir 5 días para comenzar con la aplicación del tratamiento en el alimento *ad libitum* (Higes, 2007; Higes *et al.*, 2010):

1. Grupo **sin infectar** control negativo (NI),
2. Grupo **infectado** con esporas de *Nosema* spp. control positivo **sin tratamiento** al cual sólo se le proporcionará jarabe de sacarosa 50% con promotor L al 2% (IST),
3. Grupo **infectado con esporas** de *Nosema* spp. tratado con el AE_{selec} (ICT)

Para realizar esta actividad, fue necesario contar con abejas libres de la enfermedad y que estén dentro de un ambiente libre de esporas. Además, se utilizaron colmenas que presentaron la enfermedad para obtener muestras positivas y concentrar la carga de esporas mediante centrifugación (OIE, 2004).

6.3.1 Obtención de abejas libres de esporas de *Nosema* spp.

Se colectaron 2 marcos con cría operculada tardía de colmenas del Centro Agrario de Marchamalo mediante el muestreo en terreno y posterior análisis de laboratorio no presentaron esporas de *Nosema* spp. Estos marcos fueron trasladados al laboratorio y las abejas que fueron naciendo se colocaron en jaulas de 16 cm de largo x 4 cm de diámetro para ser mantenidos en condiciones de laboratorio controladas considerando temperaturas ambientales de $34 \pm 1^\circ\text{C}$, una humedad relativa del $75 \pm 5\%$ y en una habitación con luz tenue (Malone y Stefanovic, 1996). Ambas variables ambientales fueron monitoreadas mediante la instalación de un termohigrómetro ambiental.

El procedimiento de recolección se realizó según lo recomendado por Maistrello *et al.*, (2008); Malone *et al.* (1995); Malone y Giacon (1996), él que consistió en ir colectando los imagos que van naciendo de las celdillas operculadas y trasladarlos a las jaulas hasta completar un número de 35 individuos por unidad, logrando 12 unidades en total. La colecta de las abejas recién nacidas fue realizada cada 24 horas (Fries, 1988).

Cada unidad fue marcada para individualizarla y alimentada con jarabe de sacarosa al 50% más promotor L[®] al 2% como fuente de proteína y vitaminas. El jarabe sacarosa fue proporcionado con un alimentador desde la tapa con una pequeña perforación en cada jaula (Huang *et al.*, 2007).

6.4 Evaluación in vivo en condiciones de laboratorio de la efectividad de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de peumo sobre Nosema spp.

Se determinó la eficacia de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de peumo siguiendo la metodología descrita en el punto 6.3. Estos ensayos fueron realizados en el marco de una colaboración en la Universidad del Desarrollo, la que facilitó sus colmenas e infraestructura.

7. Caracterización del aceite esencial seleccionado

7.1 Caracterización del aceite esencial de peumo

El aceite esencial seleccionado (AE_{selec}) fue caracterizado cualitativamente por cromatografía en fase gaseosa (CG) acoplada a un espectrómetro de masas (EM). El equipo utilizado fue un Cromatógrafo de Gases con Espectrómetro de Masas "ion trap", Varian 431-GC, columna apolar de sílice fundida DB-5MS (0,25 mm x 30 m x 0,25 um), y detector 220-MS con tipo de ionización de impacto con electrones e ionización química y base de datos NIST 2008. La temperatura del inyector fue de 250°C la fuente de ionización se mantuvo a 70 eV. El gas de arrastre usado fue helio 99,99%, a un flujo de 1 mL/min. El rango de masas utilizado fue de 40uma – 300uma (De Heluani *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2004; Leyva, 2007). Para inyectar el aceite al equipo se preparó una dilución de 1:10 en etanol. Este análisis se realizó en el CEPEDQ de la Universidad de Chile.

7.2 Cuantificación de los compuestos mayoritarios

Con los compuestos mayoritarios identificados en el punto 7.1, y adquiridos en SIGMA ALDRICH® 99,9% se obtuvieron las curvas de calibración multiestándar, con el fin de cuantificar estas sustancias en el AE_{selec} , mediante CG-EM.

CAPÍTULO IV



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Recolección del material vegetal

Se colectaron las hojas frescas de árboles con las características “tipo” para cada especie en la zona de estudio. Las especies estudiadas se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Especies vegetales y localidad correspondiente

Espece vegetal nativa	Localidad
boldo (<i>Peumus boldus</i> Mol., Monimiaceae)	San Juan, Quirihue Región del Maule
peumo (<i>Cryptocarya alba</i> Mol., Lauraceae)	Altos de Chicauma, Lampa
litre (<i>Lithraea caustica</i> Mol., Anacardiaceae)	San Juan, Quirihue Región del Maule
maitén (<i>Maytenus boaria</i> Mol., Celastraceae)	Peñalolén, Región Metropolitana

Se colectaron las hojas de las especies en estudio, en el período de antesis, época en que la mayoría de las especies presentan un mayor contenido de aceite esencial (Naghdi *et al.*, 2004). Las fechas de recolección se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Especies vegetales y fecha de recolección

Espece vegetal nativa	Fecha floración (bibliográfica)	Fecha recolección
Boldo	julio a noviembre	19 septiembre 2011
Peumo	noviembre a enero	22 septiembre 2011
Litre	septiembre a diciembre	19 septiembre 2011
Maitén	septiembre a diciembre	19 septiembre 2011

Se colectaron inicialmente 4 kg de hojas frescas de cada una de las especies en estudio y se completó hasta llegar a los 7 kg de hojas frescas en caso de las especies *Cryptocarya alba* Mol. y *Maytenus boaria* Mol. Este procedimiento se realizó como se detalló anteriormente en la metodología.

Además se obtuvieron muestras de cada especie, para su herborización (testigo de herbario) como se detalló en la metodología (punto 1.4). Cada muestra fue montada en una carpeta de herbario (Figura 3), los códigos de registros son los siguientes: boldo (22473 SQF Quirihue), peumo (22472 SQF Altos de Chicauma), maitén (22776 SQF Peñalolén) y litre (22475 Quirihue).



Figura 3. Testigos herbarios (a) litre, (b) boldo, (c) maitén y (d) peumo

2. Estudio Químico

2.1 Obtención del aceite esencial de las especies vegetales en estudio

Los aceites esenciales de cada una de las especies vegetales se obtuvieron por extracción de arrastre de vapor de agua (Bandoni, 2000), como se describió en la metodología (punto 2.1). El procedimiento fue repetido las veces necesarias para extraer la esencia de todo el material recolectado.

Una vez obtenidos los aceites esenciales, se calculó su rendimiento y se guardaron protegidos de la luz, a una temperatura entre 4 a 8 °C y en atmósfera inerte como lo es el nitrógeno. Cada aceite esencial fue evaluado frente a *A. mellifera* para determinar la toxicidad que genera en las abejas melíferas.

2.2 Obtención de una mayor cantidad del aceite esencial seleccionado

Siguiendo la metodología señalada en el numerando 2.1 se obtuvo una mayor cantidad de los aceites esenciales seleccionados en el punto 6.2. Con este fin y de acuerdo con el rendimiento obtenido en la primera etapa del estudio químico, se extrajeron aproximadamente 7 kg de hojas de las especies estudiadas.

Tabla 4. Rendimiento (%) de los aceites esenciales obtenidos desde las hojas de maitén y peumo

ACEITE ESENCIAL	RENDIMIENTO %
Peumo	0,63
Maitén	0,05

Los rendimientos obtenidos (Tabla 4) para el AE de peumo está de acuerdo a lo publicado por Avello Lorca *et al.*, (2012). Para maitén no se encontraron datos bibliográficos que hicieran referencia de obtención de aceite esencial.

3. Determinación de la calidad de la materia prima (material vegetal) utilizable para obtener un aceite esencial de uso apícola

Utilizando los criterios de calidad indicados por la OMS (Solimene, 2007), el material vegetal recolectado fue sometido a los siguientes análisis:

- Determinación de material extraño a la droga vegetal
- Determinación de metales tóxicos
- Determinación de contaminantes microbiológicos

Como se explica en un paso posterior (4. y 6.), fueron seleccionadas dos especies vegetales considerando dos aspectos: baja toxicidad frente a *A. mellifera* y mayor efectividad frente a *Nosema* spp., dichas especies fueron maitén y peumo. Finalmente el aceite esencial de maitén se descartó del estudio por el bajo rendimiento obtenido y se continuó el estudio sólo con el aceite esencial de peumo.

3.1 Determinación de material extraño a la droga vegetal

Se investigó la presencia de insectos, heces de animales y otras especies de plantas (Solimene, 2007), lo cual se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales. Las hojas contaminadas no fueron utilizadas en el proceso de obtención del aceite esencial (ver Figuras 4 y 5).



Figura 4. Determinación de material extraño a las hojas de peumo.



Figura 5. Determinación de material extraño a las hojas de maitén.

3.2 Determinación de metales tóxicos: cobre, cromo, cadmio, plomo y níquel

Se realizó por espectroscopía de emisión atómica (ICP-AES), para lo cual se solicitó una prestación de servicio al CEQUC de la Universidad Católica. Las muestras fueron enviadas en las condiciones indicadas en la Figura 6.

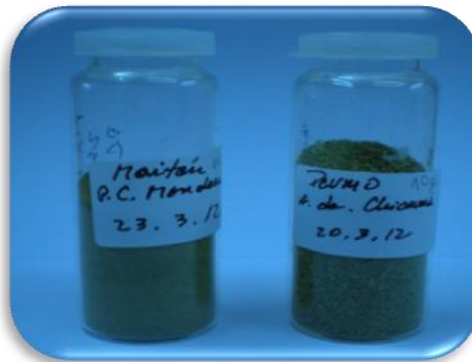


Figura 6. Material vegetal pulverizado seco de hojas de peumo y maitén (10g).

Los resultados obtenidos del análisis de metales pesados en hojas pulverizadas de peumo y maitén se presentan en la Tabla 5. De acuerdo a lo publicado por Rosal *et al.*, (2007), la presencia de metales pesados en el material vegetal proveniente de hojas de maitén y peumo se encuentra dentro de los límites permitidos por la ley española (ver tabla 6).

Según el Reglamento Sanitario de los Alimentos DS 977/96 (SAG, 2009) los límites de metales pesados permitidos en alimentos son: para el cadmio un límite de 0,5 mg/kg (de producto final), cobre un límite de 20 mg/kg y plomo un límite de 2 mg/kg. Al respecto, las muestras en estudio no excedieron los límites señalados.

Tabla 5. Presencia de metales pesados en material vegetal proveniente de hojas de maitén y peumo

Determinación (mg/kg de material vegetal)	Maitén	Peumo
Cadmio	< 1	<1
Cobre	8,7	7,5
Cromo	1,5	<1
Níquel	<1	<1
Plomo	<1	<1

Tabla 6. Contenido en Metales en RSU y límites propuestos en diferentes normativas

	Cd (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Zn (mg/Kg)
<i>RSU</i>	4	47	104	98	120	90
Compost 1 ^{er} año	3	276	30	50	165	415
Compost 2 ^o año	3	252	57	57	120	579
Compost 3 ^{er} año	2	373	84	64	144	603
<i>Ley Española</i>						
RD 824/2005 – A	0.7	70	70	25	45	200
RD 824/2005 – B	2	300	250	90	150	500
RD 824/2005 – C	3	400	300	100	250	1000
<i>Etiqueta ecológica</i>						
Decisión 2001/688/CE	1.5	75	140	50	140	300
<i>2^{da} Draft B.T.B.</i>						
Compost 1 ^a categoría	0.7	100	100	50	100	200
Compost 2 ^a categoría	1.5	150	150	75	150	400
Bio-residuo estabilizado	5	600	600	150	500	1500

Estos metales pesados son un potencial riesgo para la salud humana. El cadmio es sumamente tóxico, además de cancerígeno. En madres expuestas al cadmio produce serias afecciones con lesiones para el embarazo, presencia de proteína en la orina, irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos y dolor. La intoxicación crónica causa severos daños renales, debido a que este elemento se acumula en los riñones. Además disminuye la actividad pulmonar, produciendo enfisema y cáncer pulmonar.

El cobre es una sustancia esencial para la vida humana, pero en altas dosis puede causar anemia, daño al hígado, riñón y la irritación del estómago e intestino. Este metal aparece normalmente en agua potable de las tuberías de cobre, también como de los añadidos diseñados para controlar el crecimiento de algas.

El cromo genera afecciones locales sobre la piel causando dermatitis, sensibilización de la piel, irritación de la piel y mucosas, bronquitis crónica, ulceraciones del tabique nasal, dolores respiratorios y de cabeza, hemorragia nasal y dermatitis aguda.

El cuerpo humano requiere pequeñas cantidades de níquel para producir las células de sangre, sin embargo, en cantidades excesivas, pueden llegar a ser suavemente tóxico. La exposición a largo plazo puede causar pérdida de peso corporal, el daño del corazón, del hígado y la irritación de

piel. El níquel puede acumularse en la vida acuática, pero su presencia no se magnifica a lo largo de cadenas de alimentos.

Es importante comentar que este análisis es muy aplicado en productos a base de hierbas importadas. En un análisis publicado por la Food and Drug Administration (FDA) de tales productos, 24 de 251 productos contenía plomo, en cantidades que oscilan desde 10 hasta 319 ppm. El arsénico se encontró en 36 productos (20-114 000 ppm) y mercurio en 35 productos (22 a 5070 ppm), generando en la población reacciones de hipersensibilidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad entre otros (Smolinske, 2005).

Por estas razones es importante descartar presencia de metales pesados en materia prima utilizada para obtener un aceite esencial de uso apícola, sobre todo si pensamos en desarrollar un fitofármaco de uso veterinario, en un estudio posterior a esta tesis.

3.3 Determinación de dioxinas, furanos y DL-PCBs

Mediante la aplicación del bioensayo 7-etoxiresofurina-o-deetilasa (EROD) como biomarcador de exposición a dioxinas y compuestos similares a dioxinas a través de un cultivo celular H4IIE (hepatoma de rata) (Whyte *et al.*, 2004; Valdovinos, 2009) se realizó la determinación de dichos xenobióticos en el Centro de Investigaciones Ecotoxicológicas (CIEMAYOR) de la Universidad Mayor.

La muestra identificada correspondiente a hojas de peumo presentó un valor de 0,15 TCDD-EQ/pg de muestra (Equivalente tóxico de 2,3,7,8- tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina), por tanto, ésta no presentó contaminación por dioxinas. Cabe mencionar que las dioxinas que se encuentran frecuentemente en material contaminado son: dibenzo-*p*-dioxinas policlorados (PCDDs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs) y bifenilos policlorados semejantes a dioxinas (DL-PCBs).

El bioensayo con línea celular H4IIE es una herramienta útil, alternativa y/o complementaria para estimar la presencia de las dioxinas antes mencionadas, tanto en material vegetal como en otras matrices. Según Whyte *et al.*, (2004) entre las ventajas que posee el bioensayo se

encuentran: a) utiliza un mecanismo de acción común para la detección de dioxinas, b) la presencia de compuestos inductores del citocromo P4501A1 en la muestra es medida en conjunto, c) puede evaluar estos compuestos aun en concentraciones menores al límite de detección del análisis químico y d) es más económico que la cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrofotometría de masas de alta resolución (10-25%) (Schoffer *et al.*, 2011).

En humanos y otros vertebrados, las dioxinas son consideradas como factores de riesgo para el desarrollo del cáncer, inmunodeficiencia, reducción del peso testicular y de la espermatogénesis (EC, 2001), desarrollo de patologías del sistema nervioso central y periférico (Guo *et al.*, 2003), disrupción endocrina y mayor incidencia de diabetes entre otras patologías, por esto que se determinó la presencia de dioxinas en las muestras de hojas de peumo certificando este material vegetal libre de dioxinas como materia prima para futuros fitofármacos.

3.4 Determinación de contaminantes microbiológico

Se determinó la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp, *Escherichia coli*, hongos y levaduras. Estos análisis se realizaron en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos de la Universidad de Chile (INTA), obteniendo los resultados presentados en las Tablas 7a y 7b para hojas de peumo y maitén respectivamente.

Tabla 7a. Determinación de contaminantes microbiológicos de las hojas de peumo

Parámetro	Resultados
NMP <i>E. coli</i>	< 3 <i>E. coli</i> UFC /g
<i>H. filamentosos</i>	60 x 10 ¹ UFC/g
<i>H. levaduriformes</i>	19 x 10 ³ UFC/g
<i>P. aeruginosa</i>	<100 UFC/g
<i>S. aureus</i>	<10 UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausente
<i>Shigella sp</i>	Ausente

UFC: unidad formadora de colonia.

NMP: número más probable

Tabla 7b. Determinación de contaminantes microbiológico de las hojas de maitén

Parámetro	Resultados
<i>NMP E. coli</i>	< 3 <i>E. coli</i> UFC /g
<i>H. filamentosos</i>	25x 10 ² UFC/g
<i>H. levaduriformes</i>	33 x 10 ⁴ UFC/g
<i>P. aeruginosa</i>	<100 UFC/g
<i>S. aureus</i>	<10 UFC/g
<i>Salmonella sp.</i>	Ausente
<i>Shigella sp.</i>	Ausente

UFC: unidad formadora de colonia.

NMP: número más probable

Según el Reglamento Sanitario de los Alimentos 977 (SAG, 2009) son considerados de riesgo para la salud en productos alimenticios con valores iguales o superiores de *E. coli* 10² UFC/g, *H. filamentosos* 10³ UFC/g, *H. levaduriformes* 5x10³ UFC/g, *S. aureus* 10² UFC/g, para *Salmonella sp.* el límite es igual 0 UFC/g. No se encontraron valores de referencia para *P. aeruginosa* y *Shigella sp.* Para el caso de té y hierbas para infusiones se encontró sólo un valor límite de *Enterobacteriaceas* 10³ UFC/g. De acuerdo a estos valores las muestras de hojas de peumo y maitén se encuentran dentro de los valores microbiológicos permitidos, excepto en el caso de las hojas de maitén que presentó *H. levaduriformes* 33 x 10⁴ UFC/g sobrepasando el valor límite antes mencionado.

Como se mencionó anteriormente el material vegetal debe estar libre de contaminantes, tales como insectos, excrementos, polvo o cualquier otro.

Las especies aromáticas pueden hallarse en el mercado enteras o con diferentes tipos de corte. Su transporte se realiza en diferentes envases o recipientes como sacos, bolsas de papel. Una vez revisadas, las plantas son sometidas a cuarentena, hasta evaluar su calidad.

De cada lote se toma una muestra la cual sigue un esquema predeterminado y basado en peso total de la partida, el número de sacos o recipientes que comprende y el grado de trituración del material vegetal. Esa muestra se somete a control de calidad (Flores, 2010).

El control de calidad tiene como objetivo asegurar la identidad del material, es decir confirmar que corresponde a la parte de la planta y la especie vegetal. Asegurar que se encuentra en las condiciones adecuadas de comercialización en lo que se refiere a su estado de conservación y pureza, es decir, que no ha sufrido alteraciones, adulteraciones ni excede los límites de materiales extraños u otros contaminantes (Bandoni, 2000).

El Reglamento del Sistema Nacional de Control de Productos Farmacéuticos D.S. N° 1876/95 publicado en el Diario Oficial 09 de septiembre de 1996 define lo siguiente:

Artículo 4, letra a) “Producto farmacéutico o medicamento: toda sustancia natural o sintética o mezcla de ellas, que se destine a la administración al hombre o a los animales, con fines de curación, atenuación, tratamiento, prevención y diagnóstico de las enfermedades o de sus síntomas”

Artículo 4° letra a2): “Preparación vegetal es la planta o partes de la planta pulverizadas, extracto, tintura, jugo exprimido, aceite graso o esencial, goma o resina procesada. Los constituyentes aislados, definidos químicamente o sus mezclas no constituyen preparaciones vegetales. Las preparaciones vegetales pueden contener otros constituyentes, tales como solventes, diluyentes o preservantes, los que deben ser declarados”

Título II Artículo 26°: los productos farmacéuticos comprenderán los grupos que se indican:

Letra h): “los fitofármacos o productos herbarios, que son productos farmacéuticos terminados y etiquetados cuyos principios activos son exclusivamente drogas vegetales o preparaciones vegetales”

De acuerdo a lo anterior los aceites esenciales utilizados por la industria farmacéutica se encuentran contemplados en la normativa sanitaria de productos farmacéuticos.

4. Evaluación *in vivo* de la toxicidad de un aceite esencial frente a *Apis mellifera* y la eficacia frente a *Nosema* spp.

4.1 Evaluación en condiciones de laboratorio de la toxicidad de los aceites esenciales, y compuestos mayoritarios de dichos aceites sobre las abejas (*Apis mellifera*)

Estas etapas se llevaron a cabo gracias a los apicultores colaboradores del proyecto, que nos aportaron abejas recién nacidas provenientes de Buin, Peñalolén y Lonquén (Figura 7).



Figura 7. Muestreo de abejas sanas y recién nacidas provenientes de Buin (a y b), Peñalolén (c) y Lonquén (d).

Se determinaron en este estudio de forma preliminar los efectos tóxicos de los 4 aceites esenciales estudiados en esta tesis. Los resultados mostraron que el aceite esencial de boldo fue muy tóxico para las abejas, por lo que fue eliminado de este estudio (Figura 8).

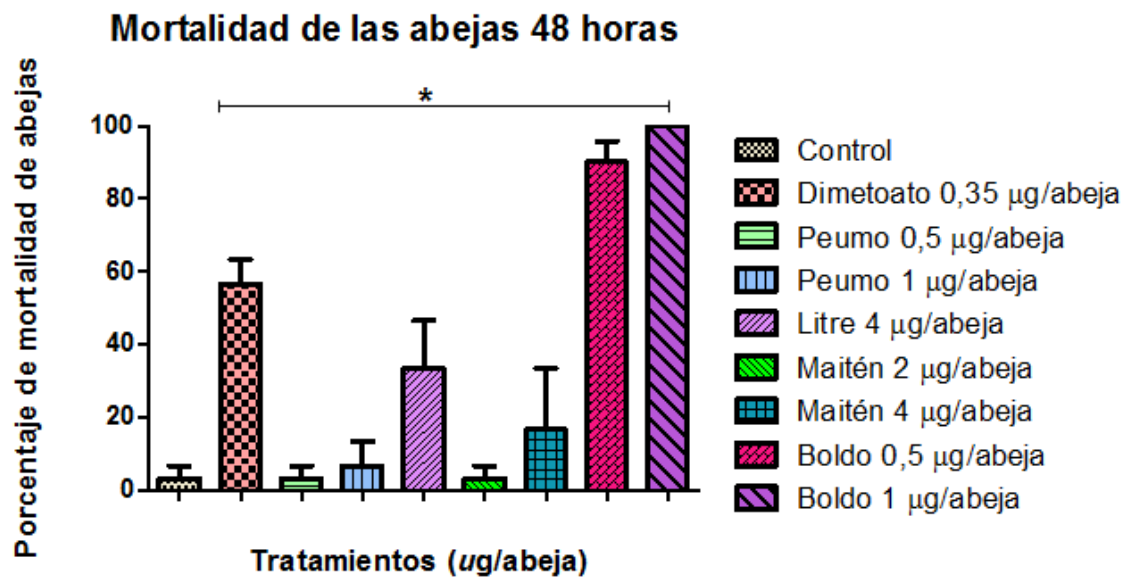


Figura 8. Ensayo preliminar de toxicidad frente a *Apis mellifera* de los aceites esenciales obtenidos de las cuatro especies nativas en estudio (control negativo jarabe de sacarosa 50%, control positivo tóxico de referencia dimetoato 0,35 μg/abeja, *Cryptocaria alba* 0,5 y 1 μg/abeja, *Lithraea caustica* 4 μg/abeja, *Maytenus boaria* 2 y 4 μg/abeja y *Peumus boldus* 0,5 y 1 μg/abeja).

De manera de cumplir con lo propuesto por la OECD (1998), se realizaron salidas a terreno con el fin de recolectar abejas obreras jóvenes de manera de evitar susceptibilidad o presencia de tolerancia adquirida respecto de las muestras a evaluar. Utilizando para ello muestras de abejas que no hayan sido sometidas a algún tipo de tratamiento contra *Nosema* spp. u otro patógeno.

Para mantenerlas en laboratorio se replicó lo presentado por Gende (2009) para esto las abejas fueron mantenidas en las jaulas (ver figura 9) en una incubadora por las 48 horas que duró el ensayo a temperatura de 34 ± 1 ° C y una humedad del 50-70%, para mantener las condiciones similares a las de la colmena.

Se realizó un análisis estadístico usando test chi-cuadrado (Aupenil *et al.*, 2007) para comparar la frecuencia de mortalidad al aplicar los aceites esenciales en relación al control (el tóxico de referencia dimetoato 0,35 μg/abeja), este arrojó un $p < 0,0001$, lo que permite indicar que hay una mayor toxicidad presentada por la esencia de boldo, esta aumenta a dosis mayores en un 80% a

un 100% aproximadamente, incluso presentó mayor toxicidad que el tóxico de referencia, las esencias litre, peumo y maitén presentaron menor toxicidad que el dimetoato (Figura 8).

Es importante destacar que este ensayo se realizó de manera preliminar en el laboratorio de productos naturales de la Facultad de Química y Farmacia y luego fue confirmado en el Centro Agrario de Marchamalo, España dentro del marco de una pasantía.



Figura 9. Jaulas con grupos de 10 abejas para ensayo de toxicidad.

Para el aceite esencial seleccionado (peumo) se determinó la mortalidad de abejas muertas a diferentes dosis de la esencia de peumo. La variable de estudio fue el número de abejas muertas/jaula a las 4, 24 y 48 horas, y se expresó como porcentaje de mortalidad, tal como lo recomienda OECD (1998). Se aplicó el test de Chi-cuadrado utilizando el programa GraphPad Prism 5, el que arrojó a las 4 horas de tratamiento un $p < 0,001$, se observó una mayor mortalidad a mayores concentraciones de la esencia de peumo y específicamente las concentraciones de 43 y 54 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ superando la mortalidad en abejas del tóxico de referencia (dimetoato 0,1 y 0,35 $\mu\text{g}/\text{abeja}$). El valor obtenido al aplicar el test de Chi-cuadrado a las 24 horas de tratamiento fue de $p < 0,0001$, se observó una mayor frecuencia en la mortalidad desde la dosis 11 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ a 54

$\mu\text{g}/\text{abeja}$ superando la mortalidad causada por dimetoato. También fue aplicado el test de Chi-cuadrado a las 48 horas de tratamiento obteniendo un $p < 0,0001$ y observándose una mayor frecuencia de mortalidad en abejas a concentraciones más altas de esencia de peumo 11, 43 y 54 $\mu\text{g}/\text{abeja}$, para simplificar el análisis sólo se muestra el gráfico a las 48 horas (Figura 10) pero se observó tendencia similar a las 4 y 24 horas.

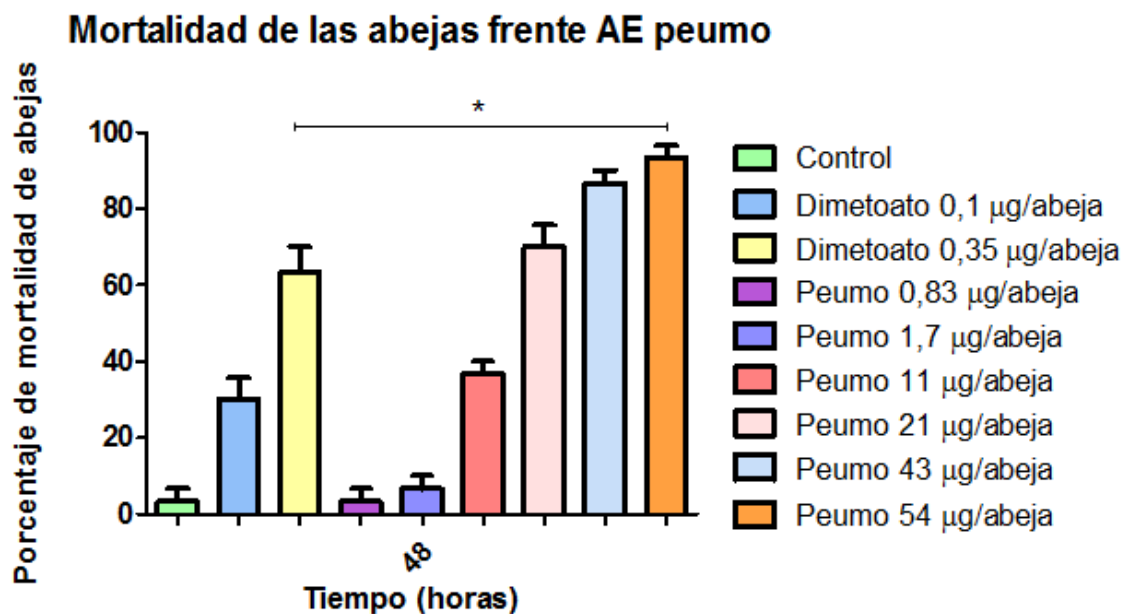


Figura 10. Porcentaje de mortalidad de abejas alas 48 h frente a las 6 diferentes dosis de aceite esencial (0,83; 1,7; 11; 21; 43; 54 $\mu\text{g}/\text{abeja}$), el tóxico de referencia aplicado en dos dosis (dimetoato 0,1; 0,35 $\mu\text{g}/\text{abeja}$) y un control alimentado con jarabe de sacarosa al 50% (Test chi-cuadrado $*p < 0,0001$ vs dimetoato).

4.1.1 Determinación de la DL_{50} para el aceite esencial de peumo

A partir de los resultados de la Figura 10 para el aceite esencial de peumo, se determinó la dosis letal cincuenta (DL_{50} dosis que produce la muerte en el 50% de la población de abejas expuestas a dicho producto) (Albo *et al.*, 2010; Gende *et al.*, 2009). La DL_{50} fue calculada utilizando un modelo de regresión lineal a diferentes intervalos de tiempo (4, 24 y 48 horas), dando los siguientes resultados:

- a las 4 h (Figura 11), $DL_{50} = 7,1 \mu\text{g}/\text{abeja}$,
- a las 24 h (Figura 12), $DL_{50} = 5,5 \mu\text{g}/\text{abeja}$
- a las 48 h (Figura 13), $DL_{50} = 5,7 \mu\text{g}/\text{abeja}$.

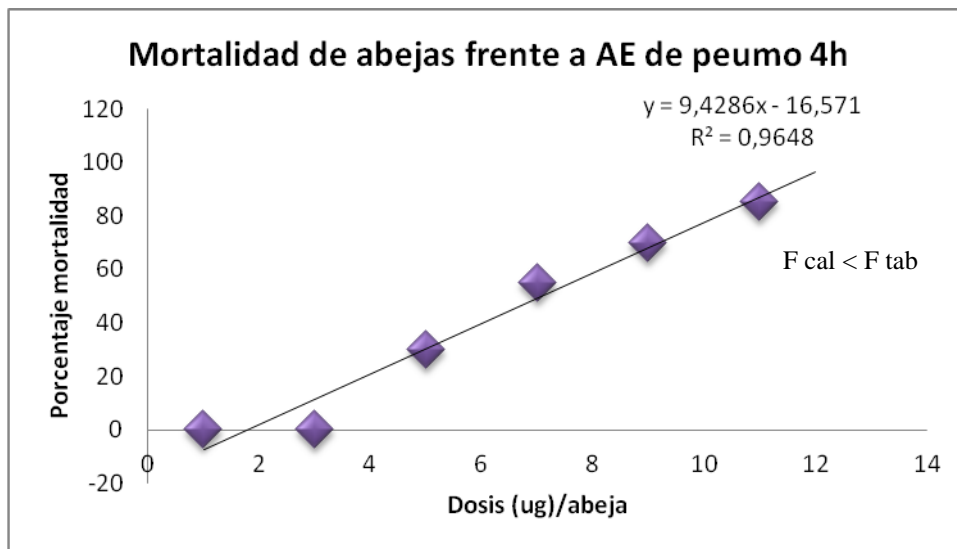


Figura 11. Porcentaje de mortalidad de abejas vs dosis del aceite esencial de peumo a las 4 h

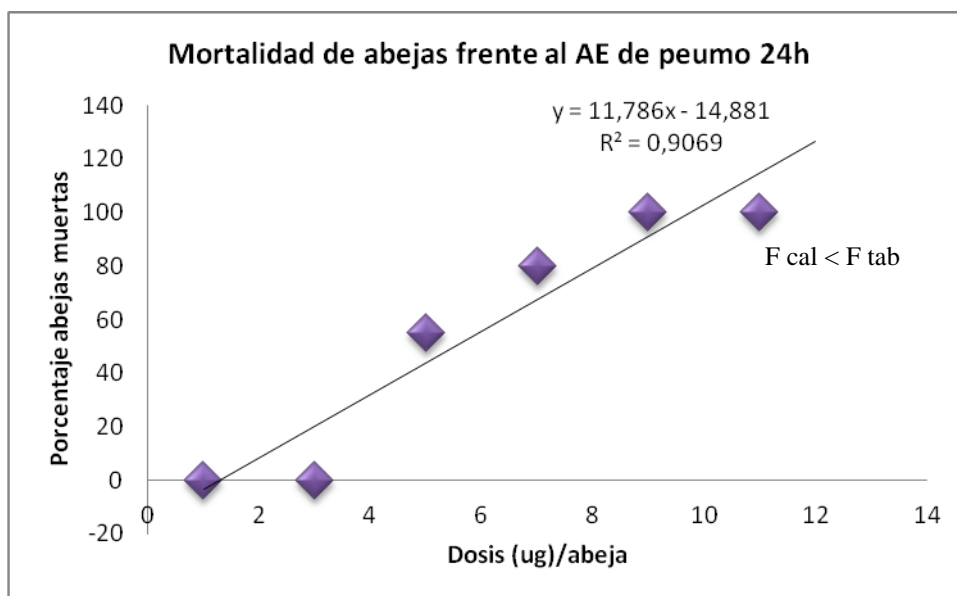


Figura 12. Porcentaje de mortalidad de abejas vs dosis del aceite esencial de peumo a las 24 h

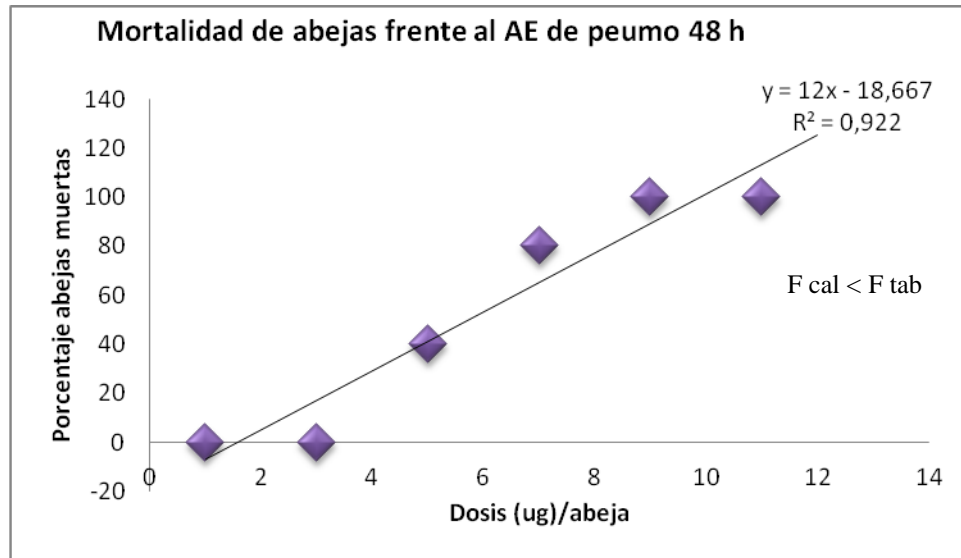


Figura 13. Porcentaje de mortalidad de abejas vs dosis del aceite esencial de peumo a las 48 h

Se aplicó una prueba de carencia de ajuste para chequear linealidad obteniendo un valor de F calculado 3,08, F tabla 3,49 y p value 0,08 como $F_{cal} < F_{tab}$ y $p\ value > 0,05$ no hay evidencia para rechazar el modelo lineal.

En el Centro Agrario de Marchamalo se llevó a cabo un ensayo preliminar de toxicidad en abejas melíferas de los compuestos mayoritarios presentes en la esencia de peumo a las 48 horas de aplicado estos como estándares (SIGMA ALDRICH® 99,9%) eucaliptol, β -felandreno y α -terpineol (ver Figura 14). Mostrando un bajo porcentaje de mortalidad al probar una concentración de 0,4 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ de cada compuesto.

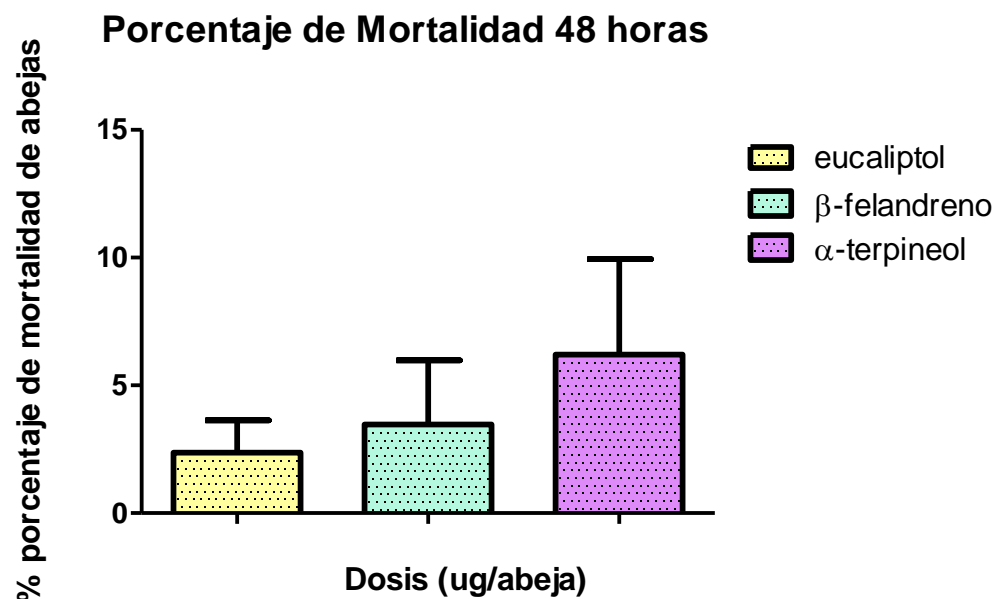


Figura 14: Porcentaje de mortalidad a las 48 horas de eucaliptol, β -felandreno y α -terpineol estándar (Sigma 99%) a una dosis de 0,4ug/abeja.

Para determinar el DL_{50} de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite de peumo, se evaluó el porcentaje de mortalidad a diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos adquiridos en Sigma Aldrich (99,9%). A partir de los gráficos mortalidad vs concentración se obtuvieron las DL_{50} después de 48 h de la administración de las muestras (figuras 15, 16, y 17). Se demostró la linealidad de las curvas mediante el método de carencia de ajuste ($F_{cal} < F_{tabla}$ y $p \text{ value} > 0,05$). Los valores de la DL_{50} se muestran a continuación:

- a las 48 h (Figura 15): $DL_{50} = 66 \mu\text{g/abeja}$,
- a las 48 h (Figura 16): $DL_{50} = 63 \mu\text{g/abeja}$
- a las 48 h (Figura 17): $DL_{50} = 74 \mu\text{g/abeja}$.

Este estudio permitió además determinar aquella dosis inocua para las abejas, que resultó ser 20 $\mu\text{g/abeja}$ para los tres compuestos evaluados.

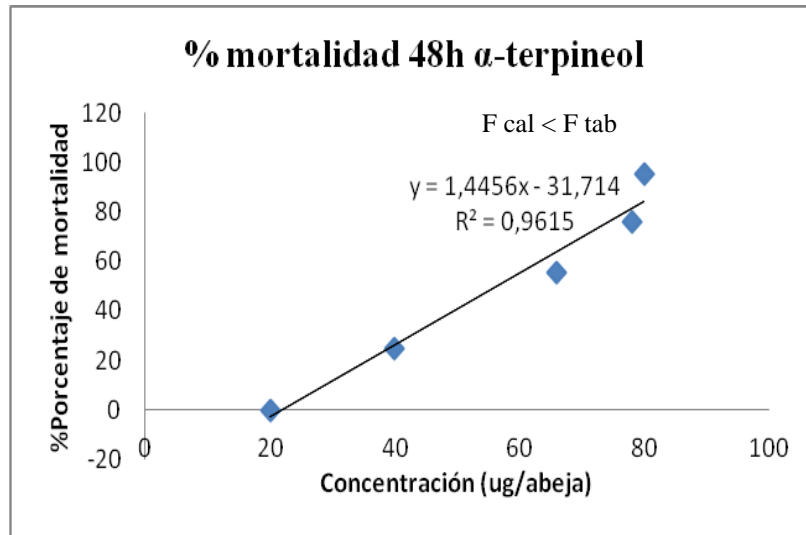


Figura 15 Porcentaje de mortalidad a las 48 horas de aplicado el estándar (Sigma 99%) de α-terpineol a concentraciones de (20, 40, 66, 78 y 80 μg/abeja).

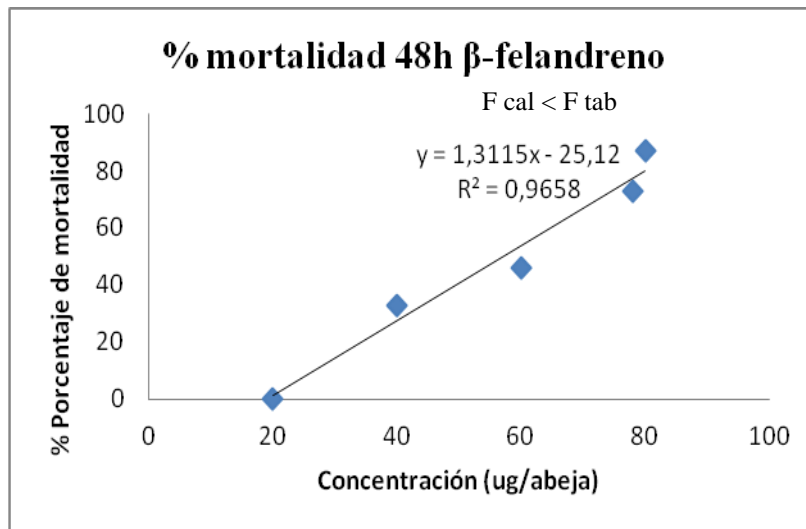


Figura 16. Porcentaje de mortalidad a las 48 horas de aplicado el estándar (Sigma 99%) de β-felandreno a concentraciones de (20, 40, 66, 78 y 80 μg/abeja).

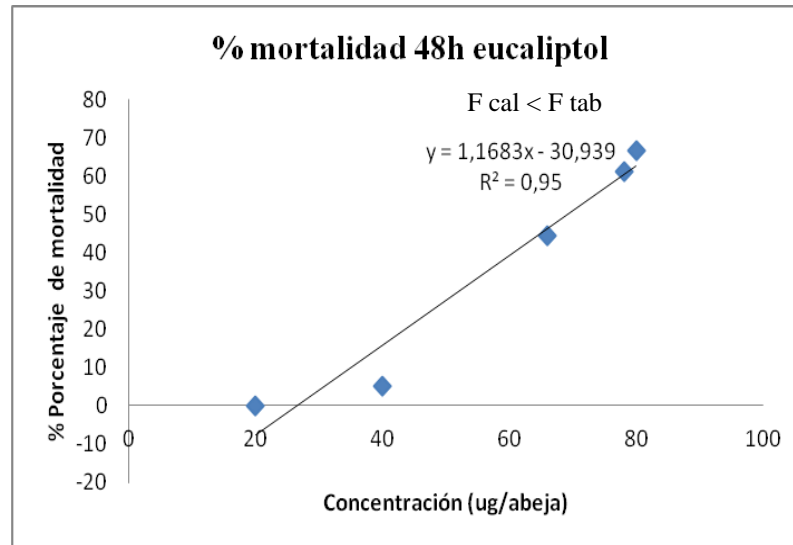


Figura 17. Porcentaje de mortalidad a las 48 horas de aplicado el estándar (Sigma 99%) de eucaliptol a concentraciones de (20, 40, 66, 78 y 80 $\mu\text{g}/\text{abeja}$).

5. Determinación mediante PCR de la presencia de *Nosema apis* o *Nosema ceranae*

5.1 Obtención de muestras concentradas de esporas de *Nosema* spp. y análisis PCR

El análisis microscópico de las muestras provenientes de colmenas que presentaron nosemosis en tres zonas de la V Región de Valparaíso (San Antonio, Limache y La Ligua) arrojaron presencia de esporas de *Nosema ceranae* mediante microscopía óptica, y confirmado por microscopía de contraste de fases (ver Figura 18 a). Mediante PCR se demostró la presencia de *N. ceranae* y ausencia de *N. apis* (ver Figura 19) de las muestras en estudio. **Esta investigación confirma por primera vez la presencia de *Nosema ceranae* en la V Región de Chile**, en nuestro país sólo existe la publicación de Martínez *et al.*, (2012) estudio en el cual analizó muestras de la Región del Bio-Bío encontrando presencia de *N. ceranae* y la publicación de Rodríguez *et al.*, (2012) quién analizó colmenas de la Región del Maule encontrando *N. ceranae*. La nosemosis no presenta síntomas obvios por lo que suele ser difícil de detectar. Sin embargo, las colonias afectadas exhiben una producción de miel significativamente menor y una reducción en su capacidad de polinización (Anderson y Giacon 1992). En consecuencia, un diagnóstico de campo debe ser confirmado por un análisis de laboratorio mediante microscopía óptica

realizando una visualización de *Nosema* spp. a partir de preparaciones de macerados de intestinos de abejas o de excrementos recogidos desde la colmena (Peldoza, 2002). Las esporas de *N. apis* y *N. ceranae* son muy similares y difícilmente pueden ser distinguidas por el microscopio óptico tal como se observa en la Figura 18 (a) y (b), por lo que las técnicas moleculares de diagnóstico, como el PCR son herramientas muy efectivas para realizar el diagnóstico diferenciado de ambos patógenos, adicionalmente permiten detectarlos en bajos niveles de infestación (Bourgeois *et al.*, 2010). Es por esto que en este estudio las muestras fueron analizadas a través de esta técnica molecular, en la Figura 19 se pudo observar que las muestras A1-A4 provenientes de apiarios de la Región de Valparaíso (San Antonio A1-A2, Limache A3 y La Ligua A4) presentaron *Nosema ceranae* y ausencia de *Nosema apis*, encontrando por primera vez en la V Región la presencia de *N. ceranae* lo que indica un cambio importante en la condición de las colmenas respecto a lo presentado por Neira (2006) donde hasta ese año la V Región no presentaba muestras positivas para nosemosis.

En el período de ejecución del presente estudio se observó la caída de la producción de miel por colmena de 14,23 kg a 8,2 kg, reduciéndose en 42,4%, lo que podría deberse principalmente al despoblamiento de colmenas debido a *N. ceranae*. Esto se produciría al igual que lo descrito en Europa, a la falta de capacitación en el manejo y control sanitario de las colmenas. En un estudio epidemiológico realizado en España durante la primavera del año 2006, registró una prevalencia de nosemosis superando el 50%. Estos datos indican que *N. ceranae* representa actualmente un riesgo sanitario de primera magnitud para las explotaciones apícolas españolas dada su alta prevalencia y su gran capacidad patógena, pudiendo provocar por sí sola el despoblamiento y muerte de las colmenas, como se ha comprobado en colmenas experimentales parasitadas de manera natural por *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2006, Fries *et al.*, 2006, Higes *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos de nuestra investigación permiten demostrar la necesidad de desarrollar políticas de capacitación a los apicultores en el manejo de las colmenas y el control sanitario, ya que el monitoreo oportuno permitiría controlar el desarrollo de este patógeno.

Tal como comenta Botias (2012a) la nosemosis tipo A parece encontrarse en una situación endémica en nuestro país así como en España y en otras regiones del mundo (Martín-Hernández *et al.*, 2007, 2012; Giersch *et al.*, 2009; Yoshiyama y Kimura, 2011) y en las condiciones

favorecedoras para su desarrollo y proliferación, esta enfermedad ha mostrado ser muy dañina para las colonias de abejas (Fries, 1988; Yücel y Dogaroglu, 2005). Sin embargo, los estudios que han analizado la prevalencia de microsporidios en las colonias de abejas en los últimos años han encontrado una alta tasa de detección de *N. ceranae* en general (Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Stevanovic *et al.*, 2011) con respecto a la encontrada para *N. apis*. De este modo, *N. ceranae* parece haber incrementado de manera notable su prevalencia en un breve periodo de tiempo, y tanto en Sudamérica, Europa, como en otras áreas del mundo, este microsporidio respondería a una situación epidémica (Chen *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2010; Stevanovic *et al.*, 2011; Traver y Fell, 2012). Debido al descubrimiento relativamente reciente de *N. ceranae*, el impacto de este patógeno en las colonias de abejas melíferas se ha ido conociendo de manera paulatina y por ello, los factores desconocidos sobre la nosemosis tipo C son numerosos. Los estudios futuros probablemente aportarán la información necesaria para lograr el control de esta enfermedad emergente de las abejas melíferas. A su vez, los métodos de control de la nosemosis tipo C permitirán controlar y prevenir un posible incremento en la prevalencia y virulencia de *N. apis* en las colonias de abejas, ya que el efecto de los métodos de control y profilaxis para ambas enfermedades parece ser similar.

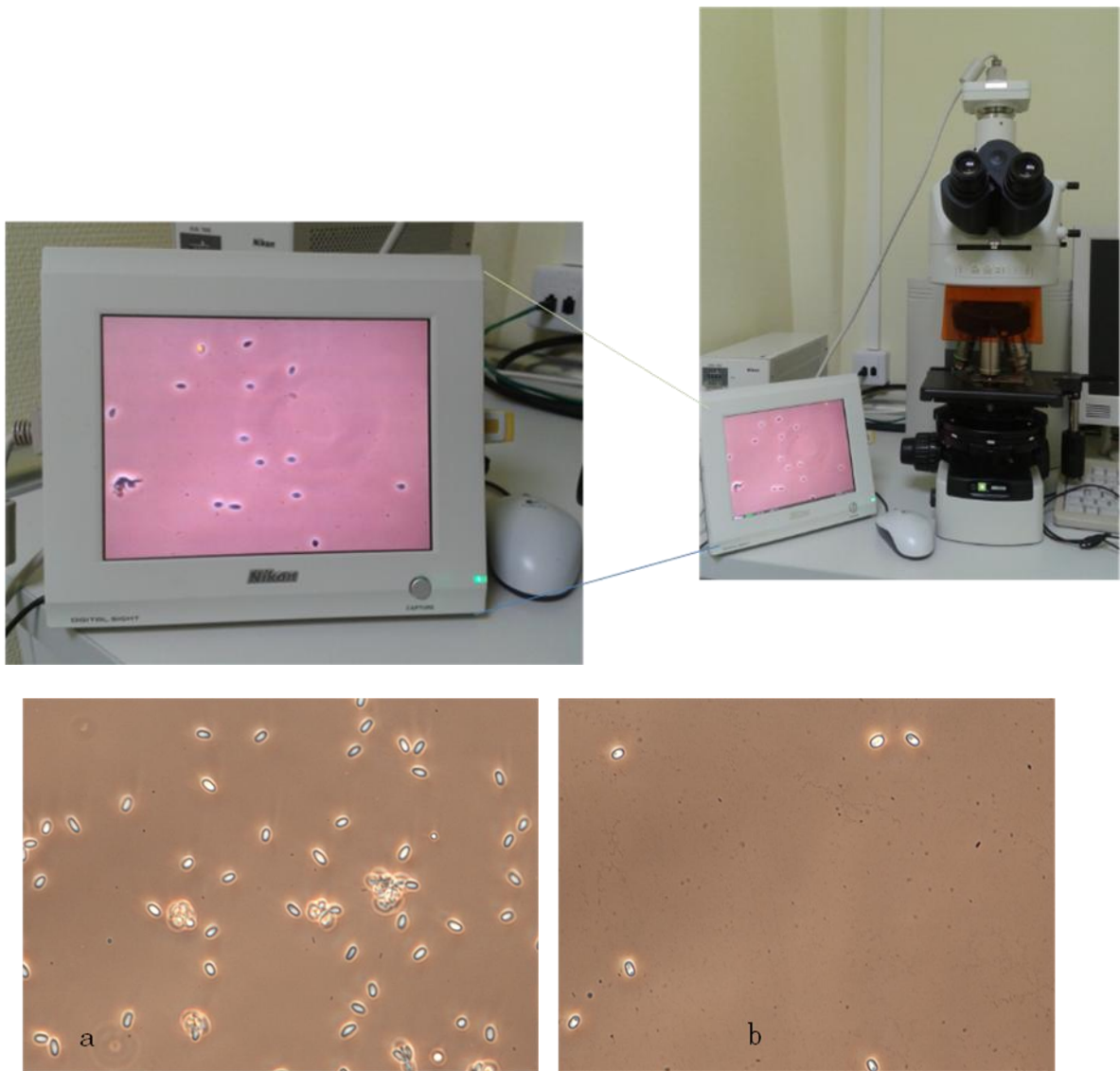


Figura 18. Esporas *N. ceranae* (a), Esporas de *N. apis* (b), observadas al Microscopio óptico modelo Nikon Eclipse 80i DIC (Differential Interference Contrast).

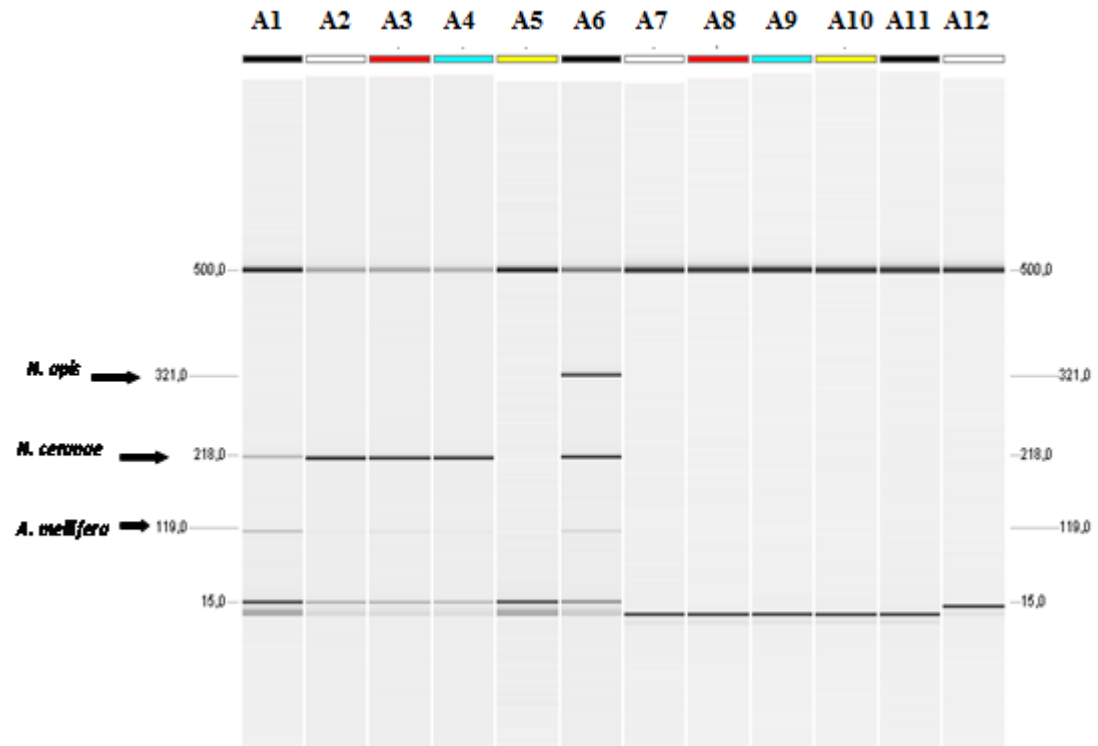


Figura 19. Identificación de *Nosema apis* o *Nosema ceranae* por PCR. Electroforesis del producto de PCR en analizador de ácidos nucleicos QIAxcel (QIAGEN). Las muestras A1 – A4 provenientes de apiarios chilenos (San Antonio A1-A2, Limache A3 y La Ligua A4), A5, A7-A12 control negativo y A6 control positivo con patrones de *N. apis* (321 pb), *N. ceranae* (218 pb) y el control interno COI *Apis mellifera* (119 pb).

6. Evaluación in vivo en condiciones de laboratorio de la eficacia de los aceites esenciales y compuestos mayoritarios de dichos aceites sobre *Nosema apis* y *Nosema ceranae*

6.1. Ensayo preliminar de prevención frente a la infección con *Nosema* spp.

Los resultados preliminares luego de proporcionados los AE a los grupos de abejas por 7 días antes de ser inoculadas con esporas de *Nosema* spp. (Figura 20), muestran que los AE de peumo y maitén presentaron un efecto preventivo frente a la infección con esporas de *Nosema* spp., de aproximadamente un 50% en comparación con el grupo control (jarabe sacarosa 50%), efecto significativo (mediante Anova de una vía obteniendo un $p < 0,0001$). El aceite esencial de litre no presentó actividad por lo que se descartó continuar con su estudio para determinar efectividad.

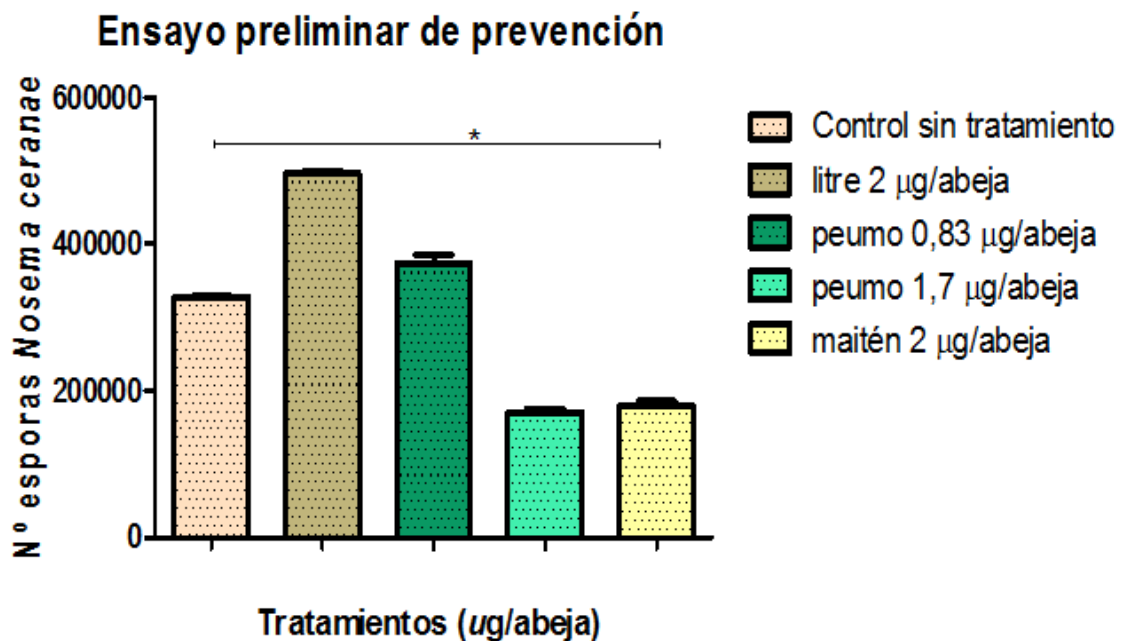


Figura 20: Ensayo preliminar de prevención de los aceite esencial (AE) frente a la infección con esporas de *Nosema ceranae*, control (negativo, sin tratamiento), AE de litre 2 ug/abeja), AE de peumo 0,83 y 1,7ug/abeja) y AE de maitén 2 ug/abeja) Anova * $p < 0,0001$.

6.2 Ensayos para determinar la eficacia de los aceites esenciales frente a *Nosema* spp.

Inoculación de las abejas sanas con cargas de esporas de *Nosema ceranae*, vía oral para determinar la efectividad de los AE (laboratorio de productos naturales de la Facultad de Química y Farmacia)

Se realizó un muestreo de abejas libres de nosemosis en la localidad de Buin, RM y se recolectó abejas con nosemosis, provenientes de la Región de Valparaíso, se determinó la carga de esporas por conteo en cámara de Neubauer y se infectó abejas sanas con una carga inicial de esporas *N. ceranae* ($2,04 \times 10^6$ esporas/mL/abeja), cada jaula contó con 5 abejas, este ensayo se realizó con un $n=5$, la Figura 21 muestra la evolución de la infección del día 1 hasta llegar al día 12 donde se observó aumento en la carga de esporas por abeja, que está de acuerdo con lo publicado por Fries (1988).

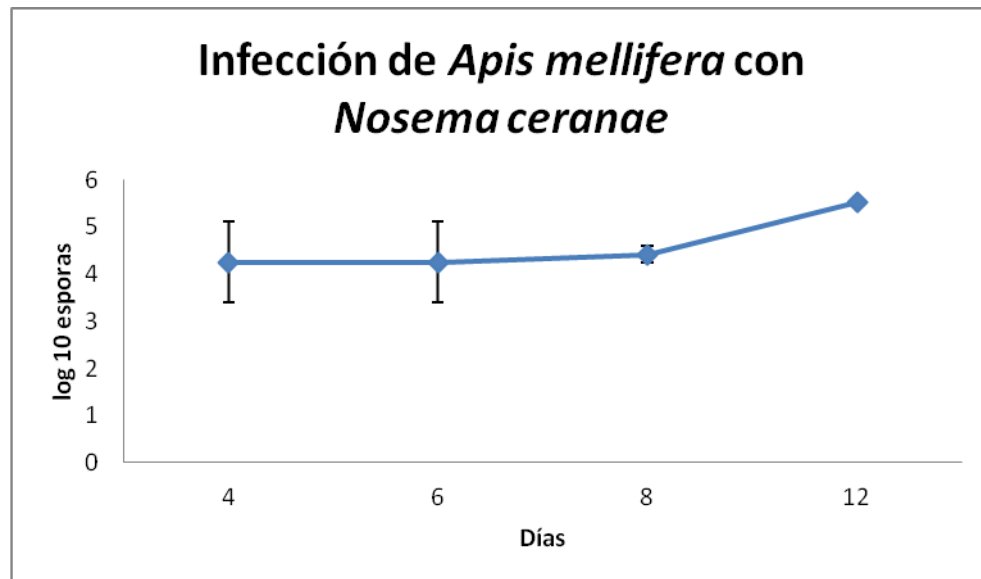


Figura 21. Evolución de la infección de abejas con esporas de *Nosema ceranae*

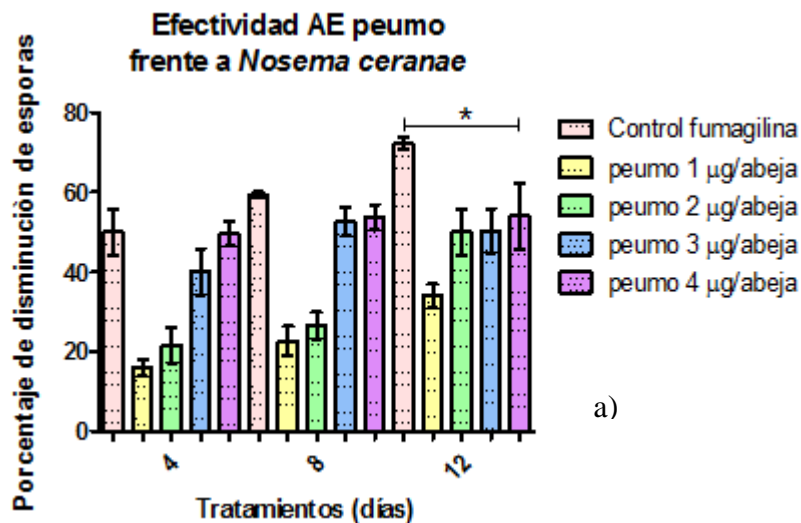
Una vez obtenido una infección equivalente a 3×10^5 esporas/mL/abeja (día 12 de infección), se comenzó a administrar el tratamiento con el AE de peumo y maitén el cual fue evaluado en un total de 3 aplicaciones, que fueron el día 1 (que corresponde al día 12 de infección) luego día 4 y día 8, finalizando el ensayo 12 días después de aplicado la primera dosis de tratamiento. Se

consideró un grupo control negativo (control de la multiplicación de esporas) grupo control positivo (grupo de abejas a las que se les administró el fármaco de referencia fumagilina). Cada grupo constituido por 5 abejas, se colectó 1 abeja viva (y las abejas que fueron muriendo) desde cada jaula para ir evaluando el control de la enfermedad, mediante el recuento de esporas en la cámara de Neubauer al microscopio óptico 400x.

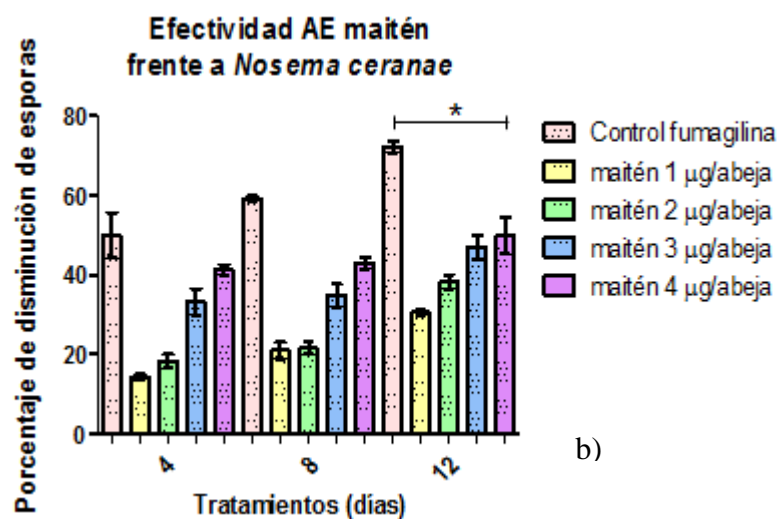
Una vez aplicado el tratamiento a diferentes dosis de aceite esencial de peumo y maitén. Se observó que el AE peumo fue más efectivo en disminuir la carga de esporas en los días 4, 8, y 12 luego de aplicado el tratamiento (Figura 22a). Se realizó un test de ANOVA de una vía arrojando un $p < 0,0001$, se observa diferencia significativa de la efectividad del AE_{selec} siendo esta más alta a mayores dosis, la efectividad fue calculada en función del porcentaje de disminución de esporas de *Nosema ceranae*, en grupos de abejas a los que se les aplicó tratamiento y grupos a los que no se les aplicó tratamiento tal como se indica en la Ecuación 1. La efectividad obtenida al día 4 de tratamiento cercano a un 50% corresponde al tratamiento aplicado a dosis más altas de la esencia (4 µg/abeja) lo que también se observó al día 8 y 12 respectivamente. Si bien la esencia de maitén presentó actividad (Figura 22b) se descartó del estudio por presentar una efectividad frente a *N. ceranae* menor que el AE de peumo y por el bajo rendimiento al momento de extraer el aceite esencial

$$\% \text{Efectividad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{esporas en abejas no tratadas} - \text{N}^{\circ} \text{esporas en abejas tratadas}}{\text{N}^{\circ} \text{esporas en abejas no tratadas}} \times 100$$

Ecuación 1. Modelo utilizado para calcular % efectividad del tratamiento frente a *Nosema* spp.



a)



b)

Figura 22. a) Efectividad del aceite esencial de *Cryptocaria alba* calculada como % porcentaje de disminución de esporas en los días 4, 8, y 12 de tratamiento a diferentes dosis (1, 2, 3 y 4 µg/abeja), b) Efectividad del aceite esencial de *Maytenus boaria* calculada como % porcentaje de disminución de esporas en los días 4, 8, y 12 de tratamiento a diferentes dosis (1, 2, 3 y 4 µg/abeja). El fármaco de referencia (fumagilina) se aplicó en una dosis de 240 µg/abeja.

6.3 Confirmación de la eficacia del AE_{selec} en el punto anterior a la concentración que demostraron tener mejor efecto sobre la carga de esporas.

De los ensayos realizados en el paso 6.3 se pudo determinar que el aceite esencial de peumo presentó mayor efectividad frente a *Nosema ceranae*, esto se confirmó **dentro del marco de una pasantía que se llevó a cabo en el Centro Agrario de Marchamalo, España**. El ensayo fue realizado con abejas nacidas en el laboratorio, de esta forma se aseguró partir el estudio con abejas libres de *Nosema spp.*, y las abejas obtenidas se organizaron en jaulas alimentadas con jarabe de sacarosa al 50% y promotor L al 2% este proceso duró aproximadamente 7 días. Una vez transcurrido este periodo se infectaron las abejas individualmente con una carga de esporas de 5×10^4 como se indica en la metodología (6.2). Para ello se confirmó por PCR si las esporas correspondían a *N. ceranae* o *N. apis* (Figura 23) sólo se infectó con *N. ceranae*, debido a la ausencia de muestras con *N. apis*.

Se determinó el número de esporas por abeja mediante microscopía óptica de contraste de fases (Figura 24) una vez aplicado el tratamiento día 1, 2, 3, 4 y 5 grupos de 35 abejas infectadas y tratadas con aceite esencial de peumo (ICT), así también a los grupos que fueron infectados pero que no se les aplicó tratamiento (IST) y grupos de 35 abejas control (NI) que consistió en grupos de abejas que no fueron infectadas con esporas de *N. ceranae* y alimentadas sólo con jarabe de sacarosa 50% más promotor L al 2%, este último permitió descartar contaminación cruzada en el estudio. Se observa en la Figura 25 un menor número de esporas en las abejas correspondientes a grupos tratados con el AE peumo en comparación con los grupos no tratados con la esencia.

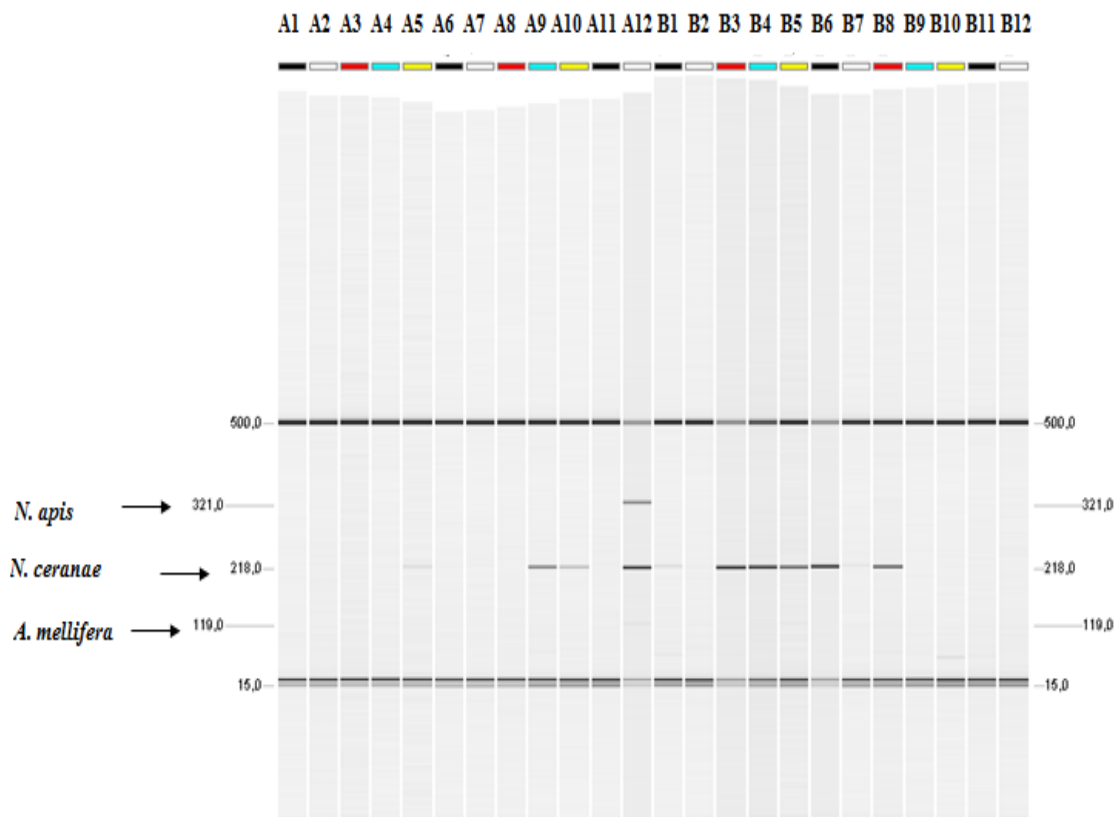


Figura 23. Identificación de *Nosema apis* o *Nosema ceranae* por PCR. Electroforesis del producto de PCR en analizador de ácidos nucleicos QIAxcel (QIAGEN). Las muestras A1 – A10, B1-B12 provenientes de apiarios del Centro Agrario Marchamalo, A11 control negativo y A12 control positivo con patrones de *N. apis* (321 pb), *N. ceranae* (218 pb) y el control interno COI *Apis mellifera* (119 pb).

Efecto del AE peumo en la disminución del número esporas *Nosema ceranae*

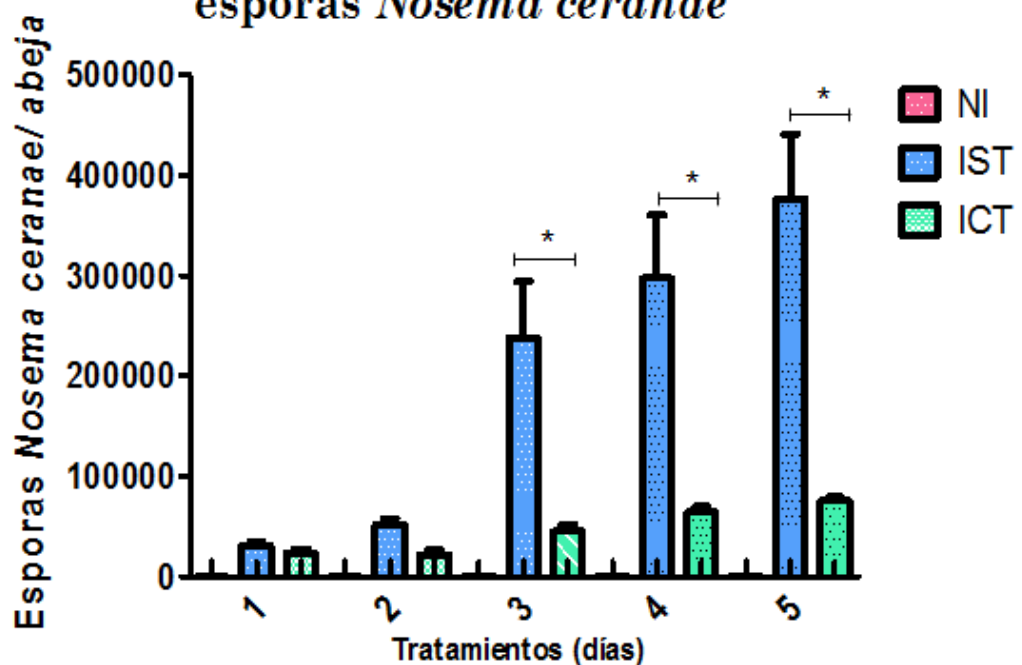


Figura 24. Efecto AE peumo en la disminución del número de esporas *N. ceranae*. NI abejas no infectadas; IST abejas infectadas sin tratamiento; ICT abejas infectadas y tratadas con AE de peumo, la dosis aplicada de AE peumo corresponde a 0,2 μg /abeja (* $p < 0,0001$).

Los resultados obtenidos indican efectividad contra *N. ceranae* de la esencia de peumo en un ensayo que se extendió por cinco días de tratamiento y en el cual se comparó la presencia de esporas contabilizadas al microscopio (cámara de Neubauer) en grupos (IST), grupos (ICT) y grupos control (NI). Todos los grupos antes mencionados se evaluaron por triplicado y el conteo de número de esporas se realizó por abeja. El análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism 5 aplicando ANOVA de una vía el que arrojó un $p < 0,0001$, observándose una diferencia significativa entre los grupos de abejas infectados con esporas de *N. ceranae* tratados con aceite esencial y los grupos de abejas infectados no tratados con la esencia.

En la Figura 25 se muestran los resultados de la efectividad del AE de peumo calculada según la Ecuación 1 (página 67). El tratamiento duró 5 días (el alimentador contenía un volumen total de 4 μL del AE por 1 mL de jarabe de sacarosa para las 35 abejas), lo que proporcionó una dosis diaria aproximada de 0,2 μg /abeja), en el primer día de tratamiento el AE de peumo presentó un

22% de efectividad, el segundo día de tratamiento un 58% de efectividad y para el tercer, cuarto y quinto día un 80% de efectividad (Figura 25), mediante el test ANOVA de una vía los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,0001$). Estos resultados nos permiten comprobar la efectividad del AE de peumo por dos metodologías diferentes. En la primera metodología la efectividad fue de 50% (punto 6.2) y la segunda un 80%. Este aumento en la efectividad se podría explicar debido a que el tratamiento se aplicó *ad libitum* durante 5 días en forma continua y no en tres aplicaciones en los días 1, 4 y 8 como se explicó en el punto 6.2.

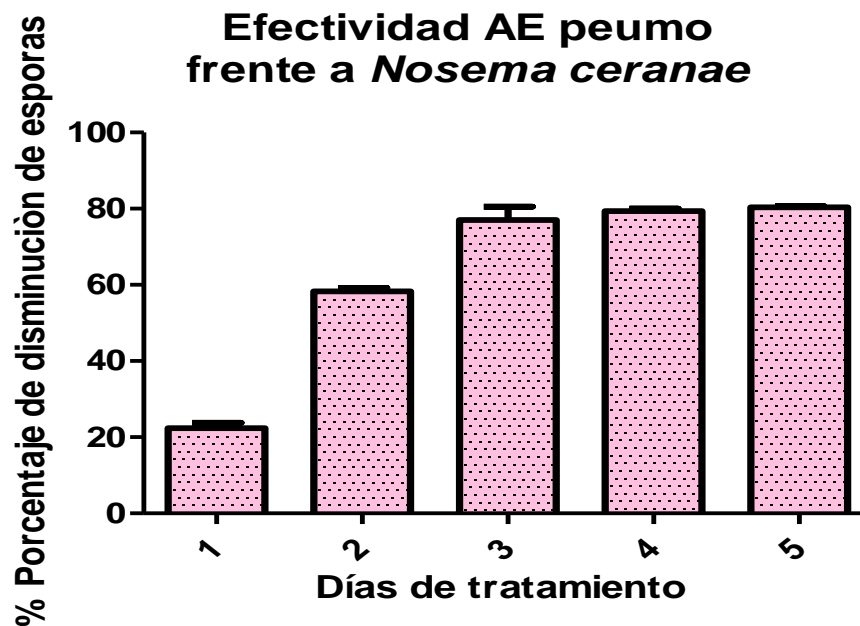


Figura 25. Efectividad del aceite esencial de *Cryptocaria alba* calculada como % porcentaje de disminución de esporas en los 5 días de tratamiento aplicando una dosis diaria aproximada de 0,2 μg /abeja *ad libitum*.

6.4 Evaluación in vivo en condiciones de laboratorio de la efectividad de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de peumo sobre *Nosema* spp.

Se evaluó la efectividad de los compuestos mayoritarios presentes en la esencia de peumo frente a *Nosema ceranae*, en la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos para el AE de peumo y de sus tres monoterpenos mayoritarios. La efectividad fue calculada según la Ecuación 1 a partir de los datos obtenidos en la Figura 26. El tratamiento se extendió por 7 días y se utilizó la dosis

que resultó ser inocua en el ensayo de toxicidad para los tres monoterpenos que correspondió a 20 µg/abeja. La efectividad determinada el día 5 de tratamiento de α -terpineol, eucaliptol y β -felandreno fue de 62%, 52% y 52% respectivamente, el día 6 de tratamiento el α -terpineol presentó un 65% de efectividad, eucaliptol 53% y β -felandreno 52%; finalmente en el día 7 de tratamiento el α -terpineol presentó un 65% de efectividad, el eucaliptol 54% y β -felandreno un 52% (Figura 27). Todos los efectos fueron significativos ya que el p fue menor a 0,05 al comparar los resultados del tratamiento con el control negativo mediante el método Dunn's. Mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del método Dunn's se demostró que los efectos antifúngicos de los 3 compuestos evaluados no presentaron diferencias significativas entre ellos.

Cabe resaltar que el AE peumo inhibió el crecimiento de esporas *N. ceranae* ($p=0,0001$) cercana al 80% el día 7 (confirmando los resultados obtenidos en dos ensayos anteriores (Fig. 22a y 25) y similar a la presentada por el fármaco de referencia, la fumagilina. La efectividad del AE de peumo fue significativamente mayor a la de los compuestos mayoritarios evaluados, esto podría explicarse por la contribución al efecto antifúngico de los distintos monoterpenos que lo componen (ver tabla 8, página 85).

Respecto a un estudio realizado por Damiani *et al.*, (2014) donde evaluaron el compuesto 1,8-cineol (eucaliptol) obtenido en Sigma® (99,9%) frente a la infección con esporas de *Nosema ceranae*, ellos no encontraron un efecto significativo en el control de la infección de *N. ceranae* al aplicar 1,8-cineol.

Efectividad de los compuestos mayoritarios presentes en AE de peumo frente a *Nosema ceranae*

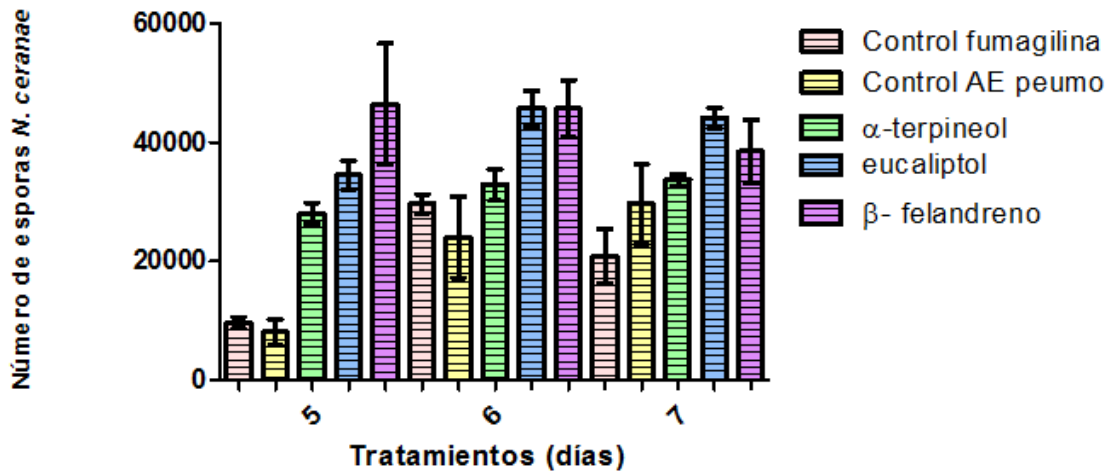


Figura 26. Efecto en la disminución en el número de esporas luego de aplicar el tratamiento con α -terpineol, eucaliptol y β -felandreno, se contabilizó número de esporas a los 5, 6 y 7 días luego de aplicar tratamiento a una dosis diaria de 20 μ g/abeja. El fármaco de referencia (fumagilina) se aplicó en una dosis de 240 μ g/abeja y el AE peumo en una dosis de 2 μ g/abeja.

Efectividad de los compuestos mayoritarios presentes en AE de peumo frente a *Nosema ceranae*

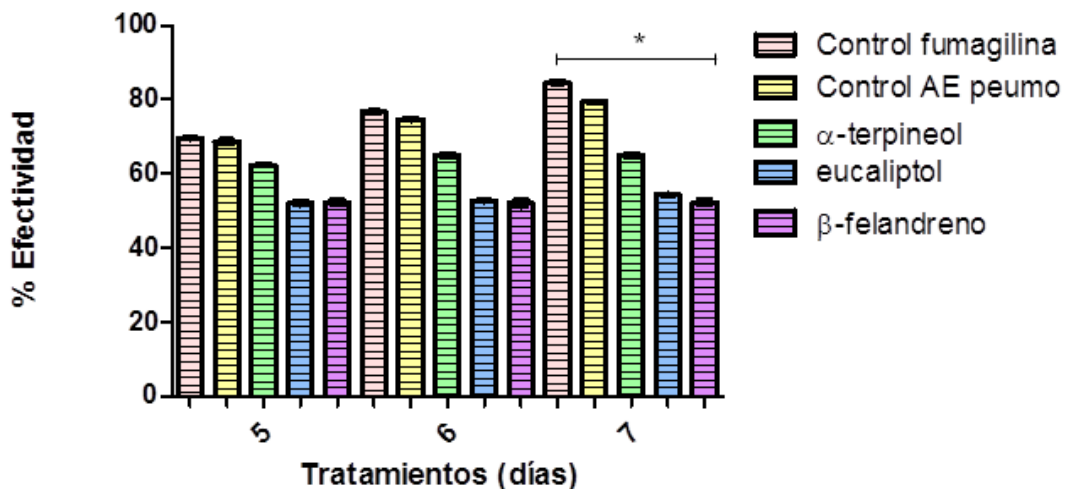


Figura 27. Efectividad de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de peumo (*Cryptocaria alba*) indicada como porcentaje de disminución del número de esporas a los 5, 6 y 7 días luego de aplicar tratamiento a una dosis diaria de 20 μ g/abeja de los monoterpenos α -terpineol, eucaliptol y β -felandreno. El fármaco de referencia (fumagilina) se aplicó en una dosis de 240 μ g/abeja. El AE peumo en una dosis de 2 μ g/abeja.

En la literatura podemos encontrar otros aceites esenciales activos frente a *Nosema ceranae*, por ejemplo un estudio publicado por Maistrello *et al.*, (2008) evaluaron un aceite esencial proveniente de la especie vegetal *Vetiveria zizanioides*, además de timol y resveratrol frente a *Nosema ceranae* mostrando un potencial control frente a la infección con este agente patógeno.

Hasta el momento, son numerosas las sustancias que se han evaluado como alternativas al uso de la fumagilina para el control de las nosemosis (Maistrello *et al.*, 2008; Nanetti, 2009; Costa *et al.*, 2010), y aunque varios de estos agentes terapéuticos han mostrado actividad frente a *Nosema* spp, de manera significativa a nivel de laboratorio, éstos requieren de una confirmación de eficacia en condiciones de campo y de un estudio sobre los excipientes más apropiados con los que aplicar los mismos, lo cual debería abordarse en futuros estudios.

Por ejemplo Botías (2012b) evaluó la eficacia de tres posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de las nosemosis en las colonias de abejas melíferas (cada una de las clases de individuos de la colmena (Jean-Prost *et al.*, 2010), comparando su acción con la mostrada por la fumagilina, cuya eficacia ha sido anteriormente probada en el control de las nosemosis en pruebas de laboratorio. Los productos evaluados fueron Nosestat® (4 g yodo, 5 g ácido fórmico, glicerina, KI más tintura de menta en 100 mL), salicilato de fenilo (éster salicílico del fenol) y Vitafeed Gold® (*Beta vulgaris*). Ninguno de los productos evaluados mostró eficacia contra las nosemosis en pruebas de campo directamente en las colmenas, ya que éstas continuaron presentando infección por *Nosema* spp después de la aplicación de los mismos. La investigadora concluye que la falta de un consumo adecuado de las distintas dosis suministradas de estos productos, sobre todo en otoño, pudieron haber influido en esta ausencia de eficacia, por lo que los estudios con este tipo de productos potencialmente terapéuticos deberían continuar a nivel de las colmenas, evaluando la metodología óptima de aplicación.

Botías (2013) confirmó la eficacia del tratamiento con fumagilina (Fumidil B®) para controlar la infección por *N. ceranae* y *N. apis* en las colonias de abejas a corto plazo, coincidiendo con lo mostrado por estudios previos (Higes *et al.*, 2008, 2011; Williams *et al.*, 2008). Según los resultados obtenidos, la fumagilina es capaz de reducir la carga parasitaria dentro de las colonias de abejas, ya que aquéllas en las que se suministró este medicamento bajaron sus porcentajes de parasitación de manera significativa, sin embargo se carece de una eficacia a largo plazo, ya que

muchas de las colonias que tras la aplicación de los tratamientos se mostraron libres de estos microsporidios, volvieron a mostrar infección pocos meses después. Por tanto, para el control a largo plazo de las nosemosis sería necesario realizar una serie de tratamientos periódicos durante la temporada apícola. Según resultados obtenidos sobre los niveles de infección, y apoyándose en los datos de vitalidad y producción de las colonias, la investigadora sugiere que un tratamiento en otoño y otro en primavera podrían ser suficientes para controlar la infección por *Nosema* spp. a largo plazo en las colonias, y de este modo disminuir los efectos negativos de la infección (bajada en población, cría, producción y en la tasa de supervivencia de las colonias).

Es importante para el sector apícola encontrar un sustituto de la fumagilina ya que distintos estudios han mostrado una acción genotóxica y mutagénica de esta molécula en condiciones experimentales (Stevanovic *et al.*, 2011), por lo que su impacto negativo sobre el estado sanitario de las abejas no es descartable. Además, estudios recientes han sugerido posibles efectos dañinos a corto plazo sobre el estado general de las colonias de abejas tras el tratamiento con este producto (Eischen *et al.*, 2012). Por otro lado, la posibilidad de un efecto negativo de este antibiótico sobre la flora bacteriana de las abejas, y por tanto, sobre sus defensas contra determinados patógenos también debería ser evaluada, teniendo en cuenta que la microbiota intestinal es capaz de formar una barrera protectora esencial contra los patógenos intestinales (Koch y Schmid-Hempel, 2011). En cuanto a la seguridad alimentaria para los humanos, los estudios sobre los límites máximos de residuos en miel de la fumagilina serían esenciales para determinar la idoneidad de esta molécula como medicamento.

Por otro lado Mendoza (2012) realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar cómo *N. ceranae* afecta a las colonias en invierno, época de mayor hacinamiento de abejas y por lo tanto las colmenas presentan un mayor incidencia de nosemosis, y que son retiradas en otoño desde las plantaciones de *E. grandis* (eucaliptus). Los autores demostraron que las colonias retiradas de la plantación de eucaliptus presentaron nosemosis no así las que se mantuvieron cercanas a la plantación.

Similar situación ha sido informada por apicultores chilenos pero que no ha sido demostrada científicamente, ellos reportan que las colmenas cercanas al bosque esclerófilo de nuestro país en

los que habitan peumo, maitén, boldo y litre entre otras presentan baja incidencia de nosemosis. Este hecho fue la base de la hipótesis de esta tesis.

7. Caracterización del aceite esencial seleccionado

7.1 Caracterización del aceite esencial de peumo

El aceite esencial de peumo seleccionado por su rendimiento y actividad frente a la nosemosis e inocuidad para las abejas, fue caracterizado cualitativamente por cromatografía en fase gaseosa (CG) acoplada a un espectrómetro de masas (EM) (Figura 28).

Se determinó la composición total del aceite esencial de peumo y por las áreas relativas del cromatograma se establecieron los compuestos mayoritarios. La determinación de los compuestos presentes se realizó comparando los espectros de masas obtenidos con los espectros de la base de datos NIST 2008, se calculó índice de Kovats para cada compuesto y luego se comparó con la literatura.

Chromatogram Plot

File: ...2012.abr/aceites esenciales/4-10-2012 4:46:07 pm aa-peumo 101.sms
Sample: AE-Peumo 101
Scan Range: 1 - 5939 Time Range: 0.00 - 50.58 min.

Operator: oda
Date: 4/10/2012 4:46 PM

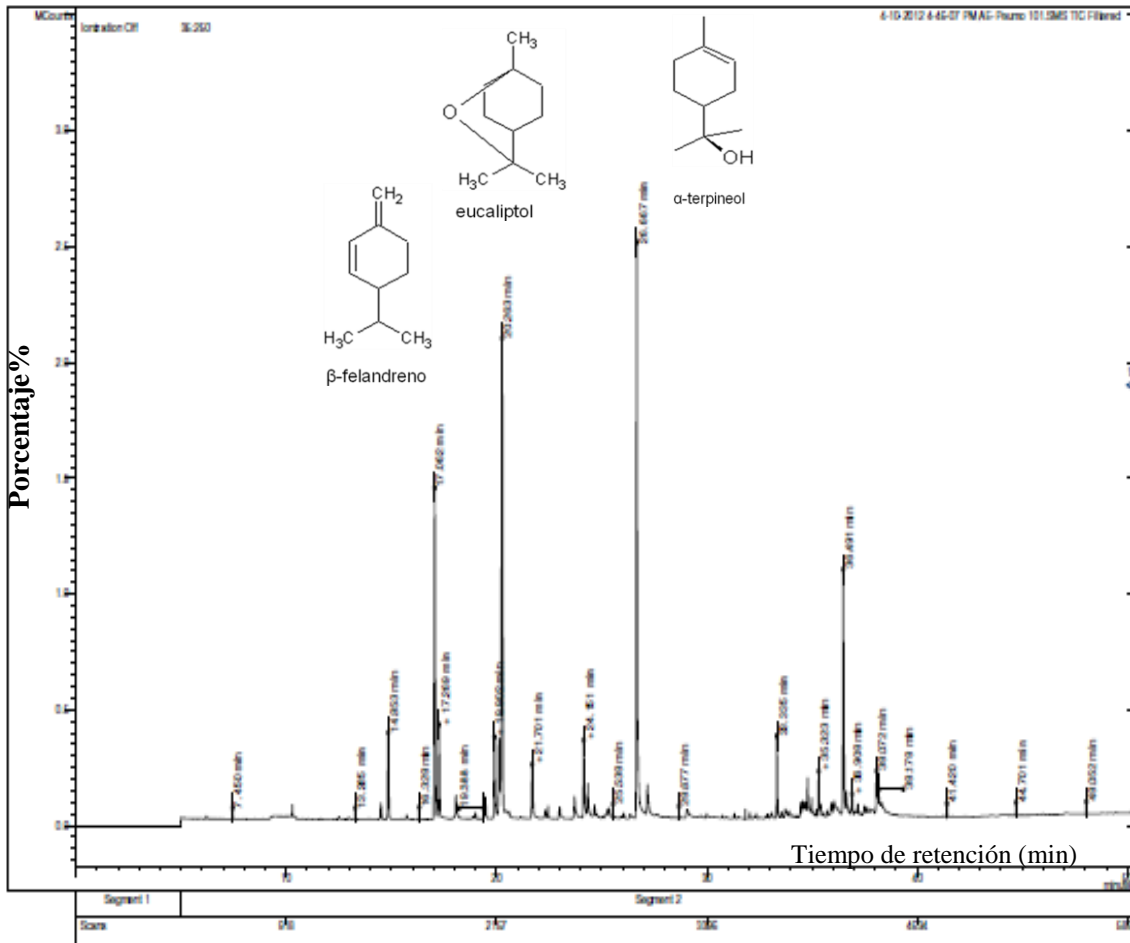


Figura 28. Perfil cromatográfico por GC del aceite esencial de peumo.

Los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de peumo comparando los espectros de masas obtenidos con los espectros de la base de datos NIST 2008 se observan en la Figura 29, 30 y 31 correspondientes a los monoterpenos β -felandreno (con un pico en su $[M]^+$ 136), eucaliptol (con un pico en $[M]^+$ 154) y α -terpineol (con un pico en su $[M]^+$ 154).

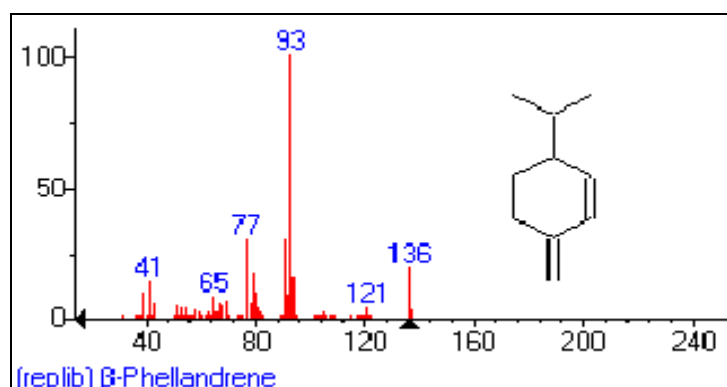
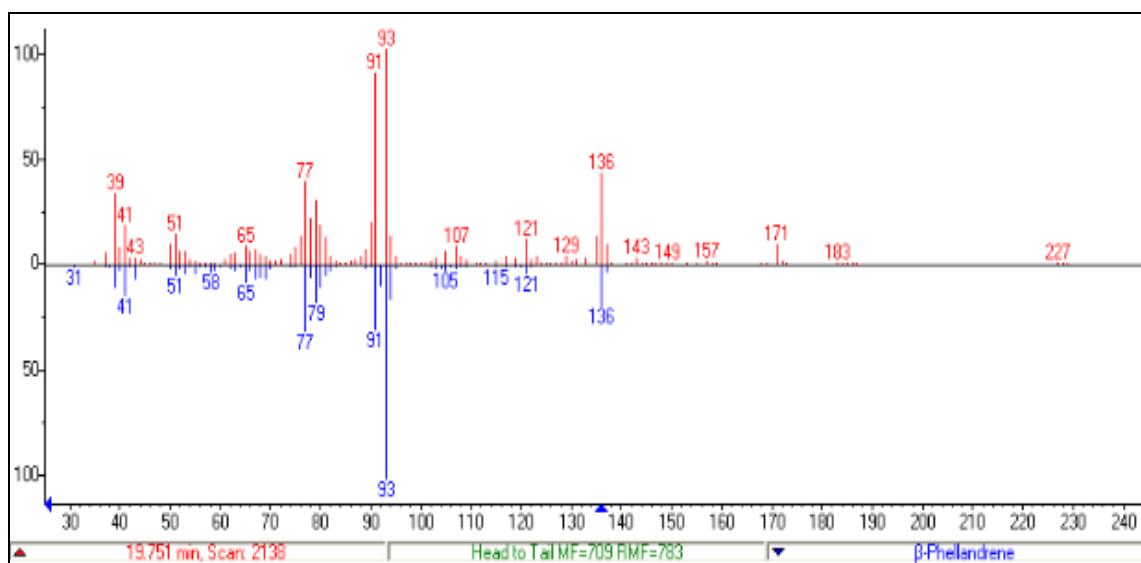
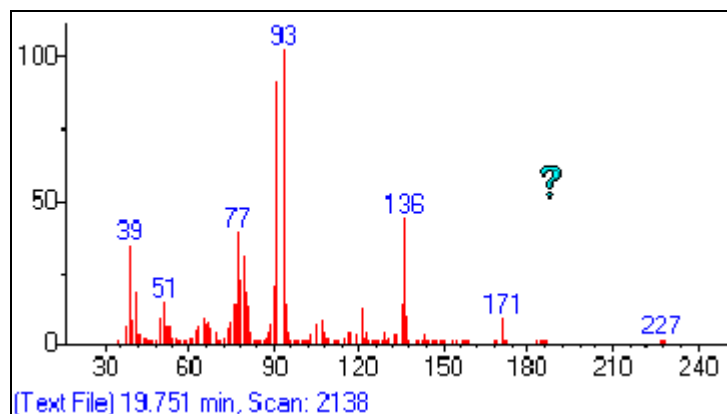


Figura 29: Espectro de masas correspondiente al β - felandreno presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

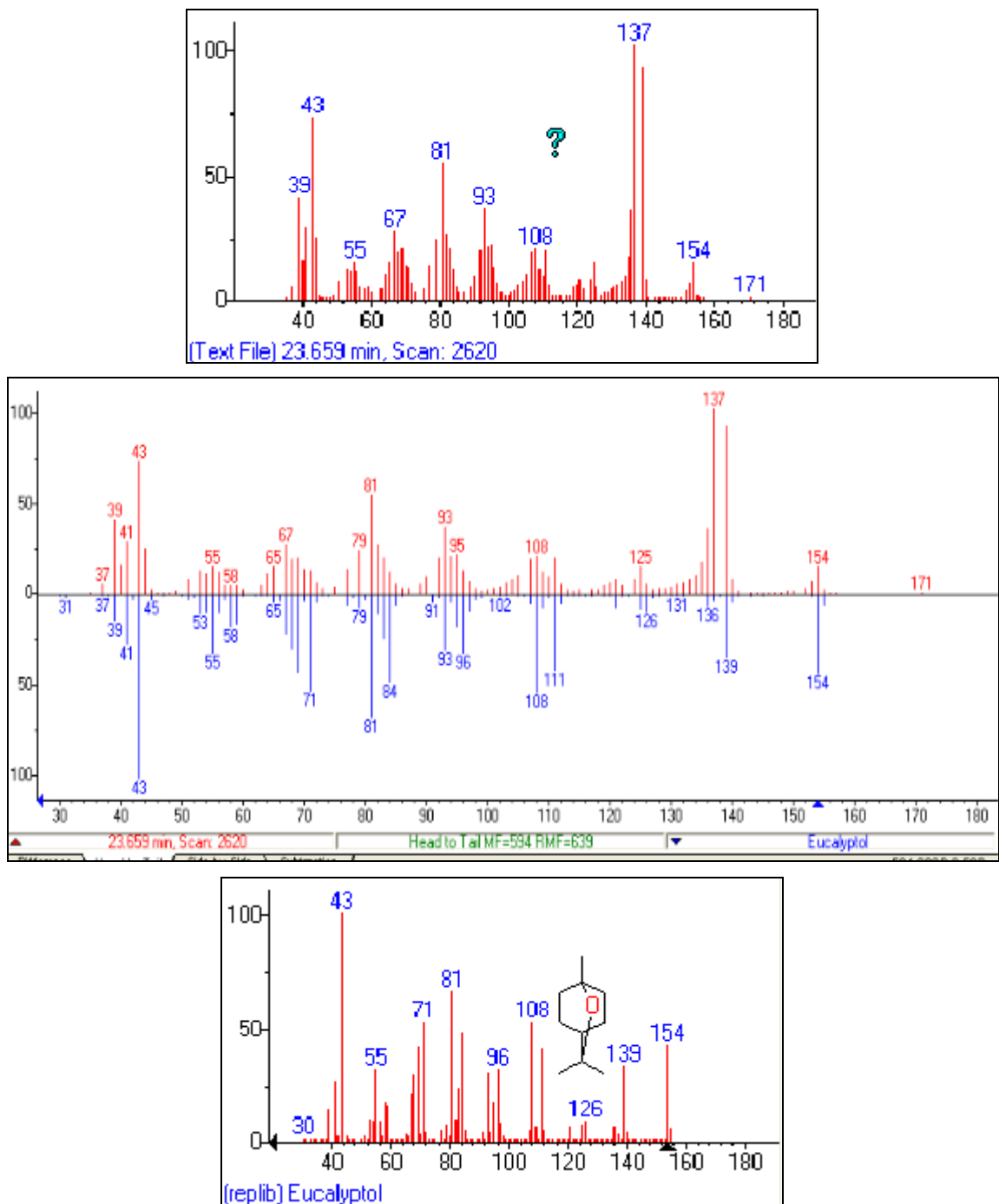


Figura 30: Espectro de masas correspondiente al eucaliptol presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

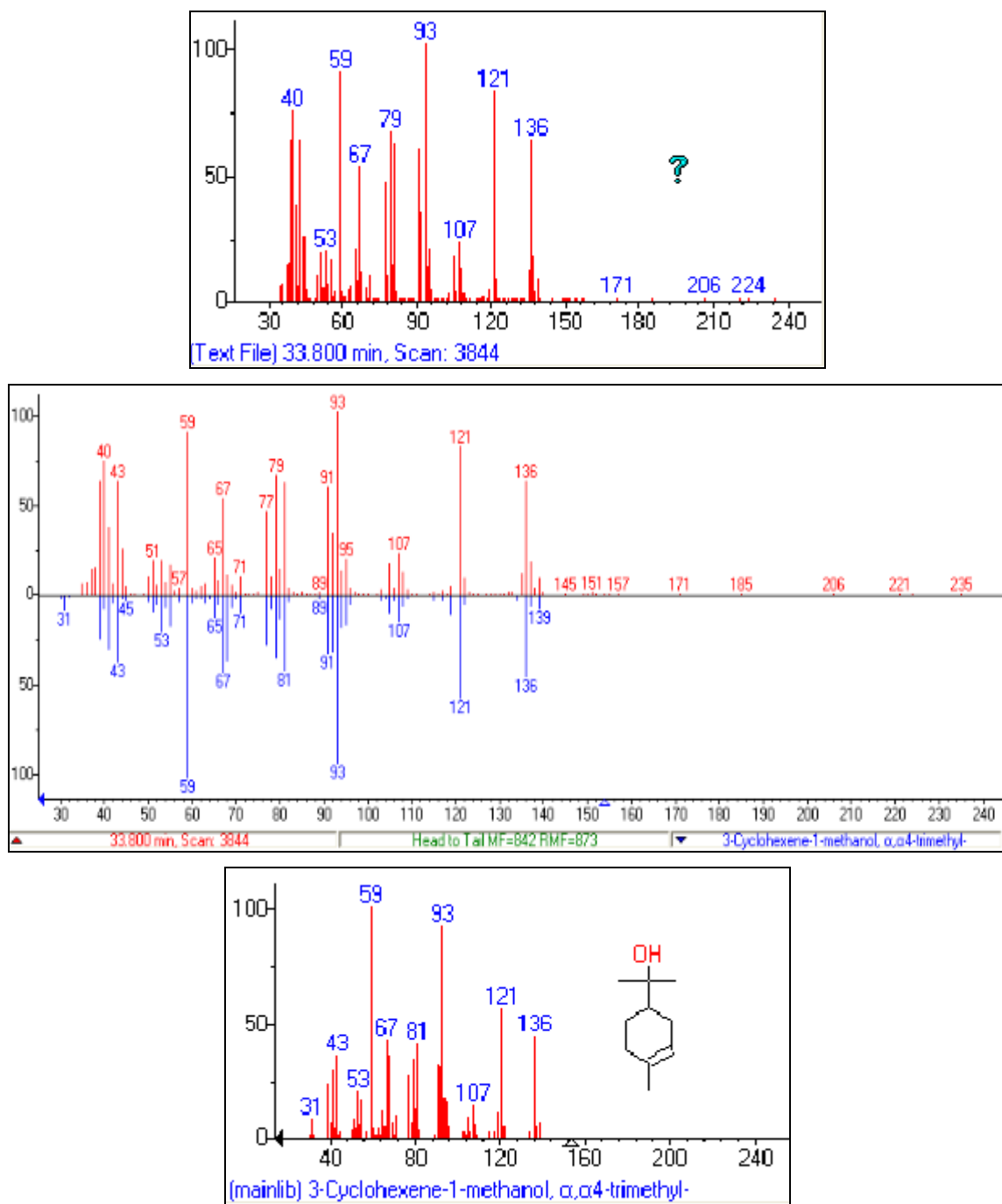


Figura 31: Espectro de masas correspondiente al α - terpineol presente en el aceite de pino y comparado con la base de datos NIST 2008.

Los tiempos de retención o los datos de espectrometría de masa no son información suficiente por si sola para asegurar una identificación positiva en el caso de mezclas complejas. Una aproximación adicional consiste en combinar la especificidad y/o reproductibilidad de los índices de retención con los patrones de fragmentación obtenidos por espectrometría de masa, para el componente correspondiente al tiempo de retención considerado.

Los índices de retención de Kovats, I , se definen de modo tal de asignar un valor de 100 veces el número de carbonos de cada uno de los hidrocarburos lineales. En este sistema el hexano tiene un valor de 600 y el heptano de 700, en todas las fases líquidas. De esta forma, cuando se cromatografía una serie homóloga de n -hidrocarburos, las fuerzas intermoleculares son relativamente constantes y la separación está controlada fundamentalmente por las diferencias en la presión de vapor (relacionada con los puntos de ebullición).

El cromatograma que se obtiene muestra una relación logarítmica entre el número de carbonos y los tiempos de retención, reflejando la tendencia en los puntos de ebullición entre los miembros de una serie homóloga. De esta forma, se obtiene una relación lineal cuando se grafica el logaritmo de los tiempos de retención *v/s* los índices de Kovats. Para encontrar el índice de Kovats para un determinado soluto en una fase estacionaria dada, se requiere cromatografiar y registrar unos pocos miembros de la serie homóloga de hidrocarburos lineales. Luego el soluto se corre en las mismas condiciones y el valor de su Índice se determina a partir de la gráfica correspondiente ($\log I$ vs t_R). Para obtener resultados confiables es deseable que los hidrocarburos seleccionados tengan índices de retención menores y mayores que el del soluto de interés. La ecuación resultante para el cálculo de los índices de retención para un soluto x , puede expresarse de la siguiente forma:

$$I_x^s = 100N + 100n \left(\frac{\log t_{R,x} - \log t_{R,N}}{\log t_{R,(N+n)} - \log t_{R,N}} \right)$$

Ecuación 2: Modelo matemático utilizado para calcular el índice de Kovats para un compuesto

I_x^s = índice de retención para el componente “x” en la fase estacionaria “s”

N = número de átomos de carbono del n -alcano menor

n = diferencia en número de átomos de carbono de los n -alcanos entre los que se encuentra el componente

$t_{R,x}$, $t_{R,N}$, $t_{R(N+n)}$ = tiempos de retención del componente x , y los n -alcanos entre los que se encuentra este componente

De esta forma, en condiciones cromatográficas isoterma, los tiempos de retención crecen en forma logarítmica con el número de carbonos.

Por esta razón, para mezclas con un rango amplio de puntos de ebullición, se prefiere trabajar en condiciones de temperatura programada. En estas condiciones, los tiempos de retención de una serie homóloga aumentan en forma lineal con el número de carbonos y la ecuación que los relaciona tiene la siguiente expresión:

$$I_x^s = 100N + 100n \left(\frac{t_{R,x} - t_{R,N}}{t_{R,(N+n)} - t_{R,N}} \right)$$

Ecuación 3: Modelo matemático utilizado para calcular el índice de Kovats de una serie homóloga

Los índices de Kovats de los compuestos del aceite de peumo fueron calculados según ecuación 2 y comparados con los encontrados en la literatura, ver en resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Resumen de los componentes arrojados del análisis por CG- MS del aceite esencial de peumo y sus respectivos índices de Kovats calculados (I cal) y de literatura (I lit)

Nº Frac.	Tiempo de retención (min)	CAS	I cal	I lit	[M+]	Fragmentos	Nombre
1	14,5	99-83-2	-	1007	136	91 (100), 93 (62), 77 (52)	α -felandreno
2	14,8	7785-70-8	1025	939	136	91(100), 93 (88), 92 (50)	1R- α -pineno
3	15,7	79-92-5	1041	953	136	44 (100), 40 (77), 39 (46)	Canfeno
4	17	555-10-2	1081	1035	136	93 (100), 91(88), 136 (42)	β -felandreno
5	17,3	18172-67-3	1012	981	136	93 (100), 91 (80), 39 (51)	β -pineno
6	19,5	586-62-9	1085	1088	136	40 (100), 44 (85), 93 (49)	Terpinoleno
7	19,9	527-84-4	1067	1014	134	119 (100), 91 (29), 134 (19)	o-cimol
8	20,1	5989-54-8	1050	1031	136	67 (100), 93 (67), 91 (50)	Limoneno
9	20,3	470-82-6	1013	1030	154	43 (100), 93 (80), 81 (62)	Eucaliptol
10	21,7	99-85-4	1035	1057	136	91 (100), 93 (88), 40 (60)	γ -terpineno
11	24,3	54410-94-5	1053	1116	170	68 (100), 57 (43), 41 (39)	3 metil 3 butenil 3 metil butanoato
12	26,6	562-74-3	1079	1177	154	37 (100), 38 (43), 40 (12)	4-terpineol
13	27,2	98-55-8	1009	1189	154	93 (100), 59 (90), 121 (86)	α - terpineol
14	33,3	17699-05-7	1580	1434	204	93 (100), 41(88), 119 (85)	α -bergamoleno
15	34,8	339154-91-5	1575	1430	204	121 (100), 93 (69), 41 (63)	γ -elemeno
16	35,3	483-77-2	1515	1523	202	159 (100), 40 (24), 160 (13)	Calameneno
17	38,1	473-15-4	1733	1645	222	59 (100), 149 (46), 108 (25)	β -eudesmol
18	36,5	-	-	-	-	-	no identificado

Según el análisis cromatográfico por CG-MS se determinó la presencia de aproximadamente 39 compuestos de los cuales 18 son presentados en esta tesis, considerando tres mayoritarios β -felandreno (16,28%), eucaliptol (23,27%) y α - terpineol (27,38%) en el aceite esencial de *C. alba*, los cuales ya se encontraban descritos anteriormente (Muñoz *et al.*, 1999). En el análisis realizado por Avello-Lorca (2012) se destacan monoterpenos monocíclicos sintetizados a partir de dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e isopentenil pirofosfato (IPP) (Pérez-Urria, 2009)

(Figura 32), en los cuales se destaca el α -pineno (11,05 %), eucaliptol (18,9%). Además se observó la presencia de hidrocarburos terpénicos y destacando el 1-terpinen-4-ol (28,19 %), que ha sido reconocido como el compuesto mayoritario de esta especie (Muñoz *et al.*, 1999), este corresponde a un isómero del α -terpineol (Brito, 2009) encontrado del análisis por GC-MS realizado en esta tesis (Figura 33).

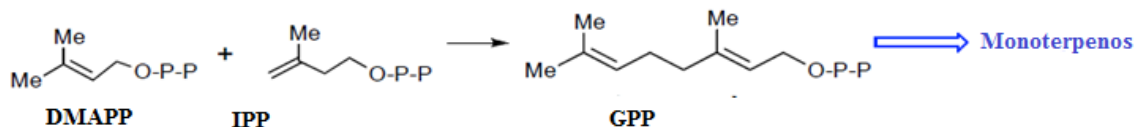


Figura 32. Síntesis de monoterpenos reacción que es catalizada por la prenil transferasa

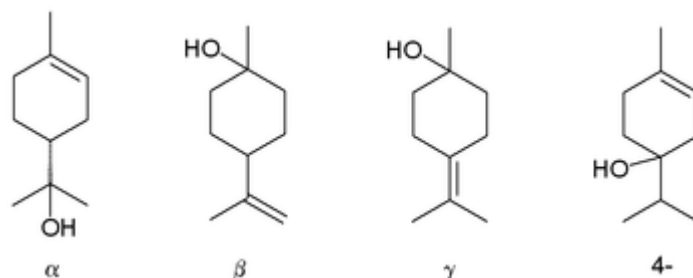


Figura 33. Isómeros de terpineol

La cromatografía de gases es una técnica muy útil para de separación y determinación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles que sean térmicamente estables. Acoplada a la espectrometría de masas, permite una identificación casi inequívoca de los distintos componentes separados sin necesidad de disponer de patrones de los mismos.

7.2 Cuantificación de los compuestos mayoritarios por CG

Se cuantificaron los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de peumo, con este fin se construyó la curva de calibración con cada uno de los patrones a diferentes concentraciones. Los correspondientes patrones fueron adquiridos en SIGMA ALDRICH® (99,9% de pureza).

A partir de la curva de calibración con el estándar de β -felandreno (ver Figura 34) se pudo determinar la concentración de este monoterpeno en el aceite esencial de peumo que

corresponde a 14262 ppm, para el eucaliptol se determinó la concentración correspondiente a 87799 ppm (ver Figura 35) y para α -terpineol la concentración en el aceite de peumo fue 13509 ppm (ver Figura 36).

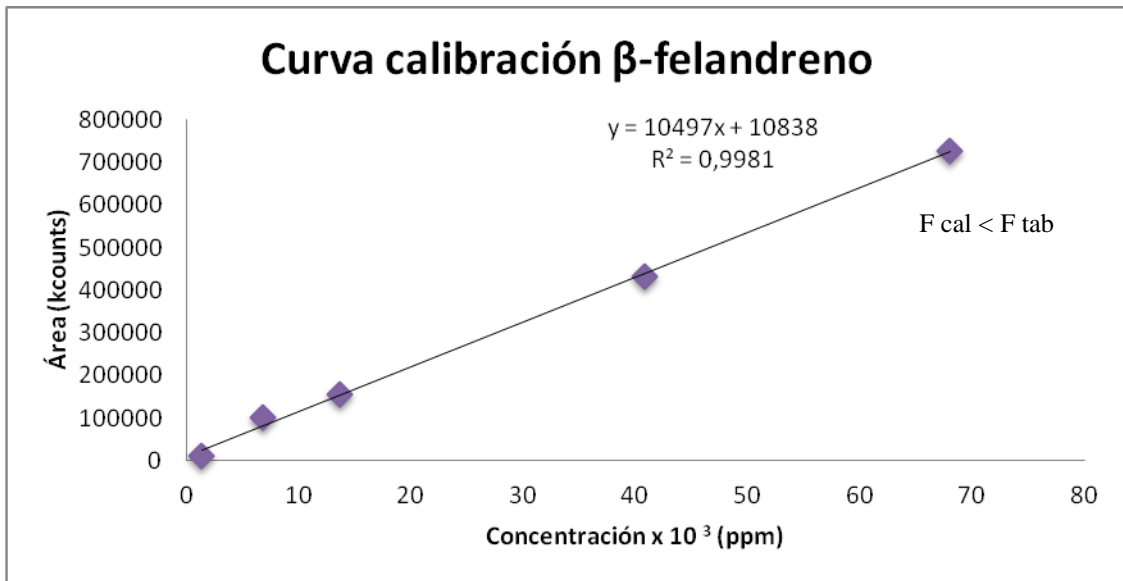


Figura 34. Curva de calibración con el estándar de β -felandreno

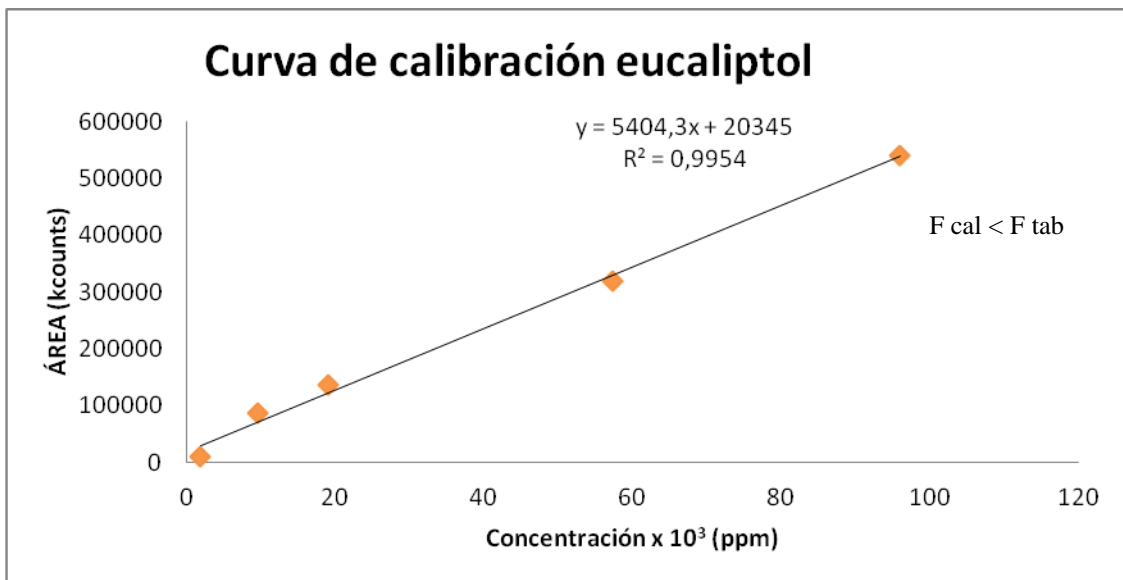


Figura 35. Curva de calibración con el estándar de eucaliptol

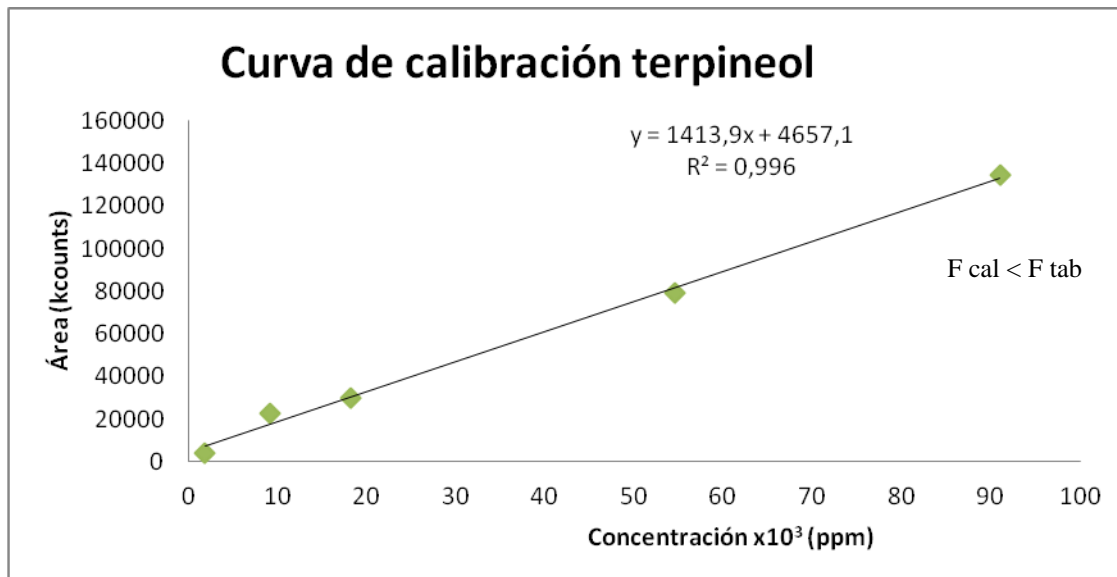
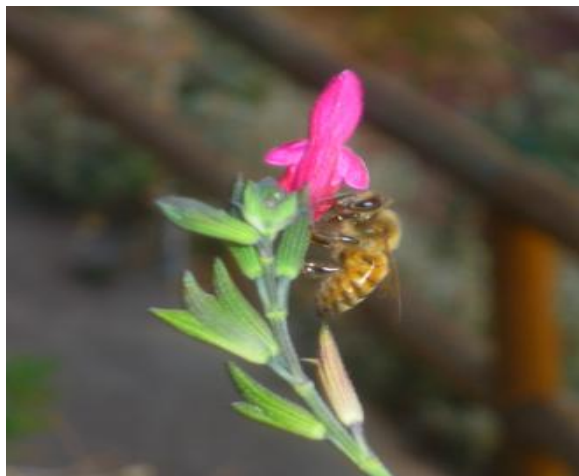


Figura 36. Curva de calibración con el estándar de α -terpineol

CAPÍTULO V



VI. CONCLUSIONES

En la presente tesis se confirmó la hipótesis al demostrar que el aceite esencial obtenido desde las hojas de *Cryptocaria alba* presenta actividad antifúngica dosis dependiente contra *Nosema ceranae*, siendo inocuo para la abeja *Apis mellifera*.

Estudios de calidad y rendimiento

- El material vegetal utilizado para la obtención de aceites esenciales cumplió con los estándares de calidad establecidos mediante normas nacionales e internacionales.
- Se obtuvieron los aceites esenciales a partir de las hojas de peumo, boldo, litre y maitén, mediante la técnica de arrastre de vapor utilizando un equipo Clevenger, resultando la de mayor rendimiento la esencia de peumo.

Estudios *in vivo*

- El estudio comparativo de toxicidad frente a *Apis mellifera*, demostró que la esencia de boldo fue la más toxica.
- En el estudio de efectividad *in vivo*, sólo se utilizaron aquellos aceites esenciales que resultaron ser inocuos para las abejas melíferas, presentando mayor actividad antifúngica frente a *N. ceranae* las esencias de peumo y maitén.
- Fue seleccionado el aceite esencial de peumo por presentar una mayor actividad frente a *N. ceranae* en abejas.
- Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de peumo, α -terpineol, eucaliptol y β -felandreno mostraron un efecto significativo frente a *Nosema ceranae* en *Apis mellifera*.

- El efecto antifúngico de aceite esencial de peumo frente a *N. ceranae* fue mayor que el efecto de α -terpineol, eucaliptol y β -felandreno.

Estudios moleculares

- Se determinó por primera vez la presencia de *N. ceranae* en colmenas de apiarios de la Región de Valparaíso y ausencia de *N. apis* mediante la técnica de PCR múltiple.

VII. PROYECCIONES

En los últimos años se ha observado un creciente interés en la búsqueda de nuevas fuentes naturales con actividad biológica para desarrollar nuevos productos de importancia terapéutica en la prevención y el tratamiento de enfermedades que afectan a la *Apis mellifera* (Damiani *et al.*, 2014), por esta razón los resultados presentados en esta tesis permiten proyectar el uso de esta esencia de peumo contra *N. ceranae* promoviendo estudios en campo para determinar el efecto en colmenas infectadas y promover nuevos estudios con el fin de evaluar su actividad contra otros patógenos de abejas como el ácaro *Varroa destructor* o la bacteria *Paenibacillus larvae*.

REFERENCIAS

- Abad, M.J.; Ansuategui, M.; Bermejo, P. 2007. Active antifungal substances from natural sources. *ARKIVOC* (7) 116 – 145.
- Albo, G.; Henning, C. 2003. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie* (34) 417–427.
- Albo, G.; Henning, C. 2010. Median Lethal Dose (LD50) of some essential oils and biocides effective for the control of *Ascosphaera apis* on *Apis mellifera* L.. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 11 (10) 1-12.
- Anderson, D. L.; Giacon H. 1992. Reduced pollen collection by honey bee (*Hymenoptera, Apidae*) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *J. Econ. Entomol.* (85) 47 – 51.
- Aupenil, P., Fortini, D., Michaud, B., Marolleau, F. 2007. Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new *in vitro* standardized feeding method. *Pest Manag Sci* (63)1090–1094.
- Avello Lorca, M., López, C., Gatica, C., Bustos, E., Brieva, A., Pastene, E., Bittner, M. 2012. Antimicrobial effects of extracts from Chilean plants of Lauraceae and therospermataceae families. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 17(1)73-83
- Bailey, L. 1955. The infection of the ventriculus of the adult honey bee by *Nosema apis* Z. *Parasitology*, (45) 86 – 94.
- Bailey, L. 1962. Rep. Rothampsted Exp. St. 1961, 160 – 161.
- Bailey, L. 1981. Honey bee pathology. *Academic Press*, London.
- Bandoni, A. 2000. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. 1ºEdicion. *Editorial de la Universidad Nacional de La Plata*.
- Bessie, E.; Nanetti, A. 2005. Evaluation of three different strategies to *Nosema* control (poster) Abstracts 39th Apimondia International Apicultural Congress, 21 – 26 August 2005, Dublin, Ireland: 137.
- Bishop, C.D.; Thornton, I.B. 1997. Evaluation of the antifungal activity of the essential oils of *Monarda citriodora* var. *citriodora* and *Melaleuca alternifolia* on post-harvest pathogens. *Journal of Essential Oil Research*, 9 (1) 77-82.
- Bittner, M., Aguilera, M., Hernández, V., Arbert, C., Becerra, J. y Casanueva, M. 2009. Actividad Fungistática de Extractos de Aceites Esenciales de *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde y *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. (Monimiaceae chilenas). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69 (1) 30-37.

- Bittner, M., Becerra, J., Hernández, V., Brintrup, C, Becerra, J. 2010. Actividad de aceites esenciales de Canelo, Queule, Bailahuén y Culén frente a hongos fitopatógenos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (3) 212-215.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Meana, A., Higes, M. 2009. *Nosema spp.* infection in Spain: Consequences in colony productivity and vitality, in Action FA0803 Coloss Workshop. Nosema disease: lack of knowledge and work standarization. Guadalajara, Spain.
- Botías C., Martín-Hernández R., Meana A., Higes M. 2012a. Critical aspects of the *Nosema spp.* Diagnostic sampling in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Parasitology Research*. 110(6) 2557-2561.
- Botías C., Martín-Hernández R., Barrios L., Garrido-Bailón E., Nanetti A., Meana A., Higes M. 2012b. *Nosema spp.* parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology Reports*., 4(1) 57-65.
- Botías C, Anderson D, Meana A, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Higes M. 2012c. Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 110(1): 108-113.
- Botías C, Martín- Hernandez R, Meana A, Higes M. 2013. Screening alternative therapies to control Nosemosis type C in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Research in Veterinary Science* 95: 1041–1045.
- Bourgeois, A.L., Rinderer, T.E., Beaman, L.D., Danka, R.G. 2010. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103 (1) 53-58.
- Brito, H., Mitsuo, P., Vilela de Melo, C. 2009. Preparação do (+)- α -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental; *Quím. Nova vol.32 no.4 São Paulo*; [doi: 10.1590/S0100-40422009000400042](https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400042)
- Bruno S.B. 2003. Enfermedades de las abejas: Nociones prácticas. *Ed. Ciencia y Abejas*, Buenos Aires, Argentina. p 106.
- Cañigual, S. 1998. Plantas Medicinales y Drogas Vegetales para infusión y tisana. Ed. OEMF International SRL. p 111 – 113.
- Chen YP, Evans JD, Smith JB, Pettis JS. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidian infection of the European honeybee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* (97) 186–188.
- Chioveanu, G., Ionescu, D., Mardare, A. 2004. Control of nosemosis – the treatment with “Protofil”. *Apiacta*, (39) 31 – 38.

- CONAF-CONAMA-BIRF. 1999a. Catastro y evaluación de recursos vegetacionales nativos de Chile. Informe Nacional con variables ambientales. p 89.
- CONAF-CONAMA-BIRF. 1999b. Catastro y evaluación de recursos vegetacionales nativos de Chile. Informe Regional Sexta Región. p 108.
- Cantwell, G.E. Standard methods for counting nosema spores. 1970. *American Bee Journal* 110 (6) 222-223.
- Costa C, Lodesani M Maistrello L. 2010. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. *Apidologie* 41(2) 141-150.
- Dafera, D., Ziogas, B., Polissio, M. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* (48) 2576 – 2581.
- Damiani N., Fernández NJ., Porrini MP., Gende LB., Alvarez E., Buffa F., Brasesco C., Maggi MD., Marcangeli JA., Eguaras MJ. 2014. Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: antimicrobial, microsporidial, and acaricidal activity. *Parasitol Res.* 113(2):701-9.
- De Heluani C.S., De Lampasona M.P., Vega M.I., Catalán C.A.N. 2003. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential Oil of leaves and roots of *Croton hieronymi* Griseb. *Molecular Medicinal Chemistry.* (1) 52.
- De la Sota, M. y Bacci, M. 2004. Manual de procedimientos para enfermedades apícolas. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Buenos Aires, Argentina p 46.
- Donoso, C. 2006. Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina, Autoecología. Marisa Cúneo Ediciones. Valdivia, Chile. p 420.
- Donovan B.J., Elliot G.S. 2001. Honey bee response to high concentrations of some new spray adjuvants. *New Zealand Plant Protection Society* (54) 51-55.
- Eischen FA, Graham RH, Rivera R. 2012. Impact of *Nosema ceranae* on honey bee colonies: A 14 month study. *American Bee Research Conference: 7-8 Febrero 2012; Greenbelt MD; 6-7.*
- Espic, M. 2007. Evaluación de la producción de biomasa aérea y del rendimiento en aceite esencial y boldina, de boldo (*Peumus boldus* Mol.) en la comuna de Papudo, V Región. Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile.
- EC (European Commission). 2001. Opinion of the Scientific Committee on food on the risk assessment of dioxins and dioxin-Like PCBs in food. Update based on new scientific

information available since the adoption of the SCF opinion of 22nd November 2000. Adopted on 30 May 2001. Health & Consumer Protection Directorate-General. Directorate C - Scientific Opinions.C2 - Management of scientific committees II; scientific co-operation and networks.

- Farrar, C. 1947. Nosema losses in package bees as related to queen supersedure and honey yields. *J. Econ. Entomol.* (40) 333 – 338.
- Fries, I., Ekbom, G. 1984. *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *Journal of apicultural research.* (23) 102 – 105.
- Fries, I. 1988. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee (*Apis mellifera* L.) *Apidologie*, (19) 319 – 328.
- Fries, I., Granados, R.R., Morse, R.A. 1992. Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie*, (23) 61 – 70.
- Fries, I. 1993. *Nosema apis* a parasite in the honey bee colony. *Bee World*, (74) 5 – 19.
- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemnda, S.B., Pieniasek, N.J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae), *Eur. J. Protistol.*, (32) 356 – 365.
- Fries, I., Morse, R.A., Flottum, K. 1997. Protozoa, in: Honey bee, pest, predators and diseases. A.I. Root company, Medina, Ohio, pp. 59 – 76.
- Fries I, R Martin, A Meana, P García-Palencia, M Higes. 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *J. Apicult. Res* 45, 230–233.
- Fries, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal Invertebrate Pathology* 103: 73 – 79.
- Flores, MC. 2010. Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso. Análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo. Tesis Universidad de Chile.
- Garbarino, J., Salvatore, G., Piovano, M., Chamy, M.C., Nicoletti, M. 2002. Volatile Compounds of *Lithraea caustica* (Litre) determined by Solid Phase Micro-extraction (SPME) *Bol. Soc. Chil. Quím* (47) 567-569.
- Gayana Botánica. 1985. Universidad de Concepción, vol 42.
- Gende, L., Maggi. M. 2009. Advances in the apiary control of the honeybee American Foulbrood with Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil. *Bulletin of Insectology* 62 (1) 93-9.

- Giersch T, Berg T, Galea F, Hornitzky M. 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* (40) 117-123.
- Goodwin, M., Ten Houten, P., Blackmann, R. 1990. Cost benefit analysis of using fumagillin to treat nosema. *N. Z. Beekeeper*. (208) 11 – 12.
- Guo, Y., Yu, M., Hsu, C. 2003. The Yucheng rice oil poisoning incident. In: Schechter A, Gasiewicz TA (eds). *Dioxins and Health*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, pp 893-920.
- Gupta, M. 1995. 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Colombia. p. 403-404.
- Guynot, M. 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of barley products. *J. Appl. Microbiol.* (94) 893 – 899.
- Hassanein, M. H. 1951. The influence of *Nosema apis* on the larval honey bee. *Ann. Appl. Biol.* (38) 844 – 846.
- Hedtke K, Jensen, P M., Jensen, A B., Genersch, E. 2011. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *J Invertebr Pathol* (108) 167–173.
- Higes M, Martín-Hernández, R., Meana, A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol*, (92) 93 – 95.
- Higes, M. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate*, (94) 211–217.
- Higes M, Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido, A., González-Porto, A V., Barrios, L., Del Nozal, M J., Bernal, J L., Jiménez, J J ., García, P, Meana, A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* (10) 2659–2669.
- Higes M, Martín-Hernández, R., Meana, A. 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010019>.
- Higes M, Nozal MJ, Barrios L, Meana A, Martín-Hernández R, Bernal JL. 2011. The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie* 42(3): 364-377.
- Hinojosa A., González., D. 2004. Prevalencia de parásitos en *Apis mellifera* en colmenares del secano costero e interior de la VI Región, Chile. *Parasito. Latinoam* (59) 137 – 141.
- Huang, W F, Jiang, J H., Chen, Y W., Wang, C H. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, (38) 30 – 37.

- Huang, W. F. 2008. The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *J. Invertebr. Pathol.*, (97) 9 – 13.
- Invernizzi C, Abud, C., Tomasco, I H., Harriet, J., Ramallo, G., Campa, J., Gardiol, G., Mendoza, Y. 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J Invertebr Pathol N.* 101:150–153
- ISPCH. 1996. Reglamento del sistema nacional de control de productos farmacéuticos dto. N° 1876/95.
- Jean-Prost P, Le Conte Y. 2010. Apicultura: Conocimiento de la Abeja. Manejo de la Colmena. *Mundi-Prensa Libros.* P 180.
- Karaman,S., Digrak, M., Ravid, U., Ilcim, A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol.* (76) 183 – 186.
- Keeling, P., Fast, N. 2002. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology.* 56 pp. 93-116.
- Kellner, N. 1980. Studie van de levenscyclus van *Nosema apis* Zander in de honigbij (*Apis mellifera* L) Dissertation, Fac Wetenschappen, Rijksuniversitet Gent, Belgium.
- Klee J, Besana, AM ., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D Q., Chinh, T X., Puerta, F., Ruz, J M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R J. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 96:1–10
- Kleinschmidt, G. J., Furgunson, F. 1989. Honey bee protein fluctuations in the channel country of south west Queensland. *Australas Beekeeper.* (91) 163 – 165.
- Koch H, Schmid-Hempel P. 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* (108) 19288–19292.
- L'Arrivee, J. C. M. 1965. Sources of nosema infection. *Am. Bee J.* (105) 246 – 248.
- Labbé, C. 2002. Bioactive flavonones from *Luma chequen*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* (67) 115 –123.
- Leyva M., Tacoronte J.E., Marquetti M.C. 2007. Composición química y efecto letal del aceite esencial de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) sobre *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) *Revista Cubana Medicina Tropical* 59(2).

- Lima, I., De Oliveira, F, Araújo de Oliveira., W., Albuquerque E. 2013. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *The Journal of Essential Oil Research*, 25 (2) 138–142.
- Liu, T.P. 1973. Effects of Fumidil B on the spore of *Nosema apis* and on lipids of the host cell as revealed by freeze-etching. *J. Invertebr. Pathol.*, (22) 364 – 368
- Lotmar, R. 1943. Über den Einfluss der Temperatur auf den Parasiten *Nosema apis* Beih. Schweiz Bienenztg. (1) 261 – 284.
- MacDonald, D. N. 1978. Diseases of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in British Columbia, with special emphasis on nosema disease, *Nosema apis* (Sporozoa: Nosematidae) in the lower Fraser Valley, 13. Simon Fraser University, Canada.
- Maistrello, L., Lodesani, M., Costa, C., Leonardi, F., Marani, G., Caldon, M., Mutinelli, F., Granato, A. 2008. Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, (39) 436 – 445.
- Malone, L.A., Giacon H.A. y Newton M.R. 1995. Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera*) to *Nosema apis* Z. *Apidologie*, (26) 495 – 502.
- Malone, L.A., Giacon, H.A. 1996. Effects of *Nosema apis* Zander on inbred New Zealand honey bees (*Apis mellifera ligustica* L). *Apidologie*, (27) 479 – 486.
- Martín-Hernández R, A Meana, L Prieto, S Martinez, E Garrido-Bailon, M Higes. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol*, 73, 6331 – 6338.
- Martínez J, Leal, G., Conget, P. 2012. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol Research* Aug 111 (2) 601-7.
- Matheson, A. 1996. World bee health update 1996. *Bee world*, (77) 45 – 51.
- Mazutti, M., Mossi, A. J., Cansian, R. L., Corazza, M. L., Dariva C., Vladimir Oliveira, J. 2008. chemical profile and antimicrobial activity of boldo (*peumus boldus* Mol.) extracts obtained by compressed carbon dioxide extraction. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 25 (02) pp. 427-434.
- Medici, SK., Sarlo, E G., Porrini, MP., Braunstein, M., Eguaras, JM. 2011. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitol Res* 110 (2) 859-64.
- Mendoza, Y., Díaz, S., Ramallo, G., Invernizzi, C. 2012. Incidence of *Nosema ceranae* during winter in honey bees colonies removed from *Eucalyptus grandis* Plantations. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (188) 13-19.

- Moffet, J.O., Lockett, J.J., Hitchcock, J.D. 1969. Compounds tested for control of nosema in honey bee. Report n. 01/46. Australian Government, Rural Industries Research and Development Corporation.
- Monsálvez, M. 2007. Inhibición del crecimiento in vitro de *Gaumannomyces graminis* var. *tritici* empleando corteza de canelo (*Drimys winteri* J.R. et G. Forster). Memoria de título. Facultad de Agronomía Universidad de Concepción.
- Montenegro, G. 2002. Nuestra flora útil. Universidad Católica de Chile. 267 pp.
- Montes, M., Muñoz, O., Wilkomirsky, T. 2004. Plantas medicinales de uso en Chile, Química y Farmacología. *Editorial Universitaria*. Santiago, Chile. p 330.
- Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T. 1999. Plantas medicinales de uso en Chile. Química y farmacología. Santiago, Chile: Edit. Universitaria S.A. p. 330.
- Mutinelli, F. 2003. Practical application of antibacterial drugs for the control of honey bee diseases. *Apiacta* (38) 149 - 155.
- Naghdi, H; Yazdani, D; Mohammad, S y Nazari, F. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*. 19(2004) 231–236 p.
- Nanetti A. 2009. ApiHerb as an alternative product to treat *Nosema* infection. En: Proc. Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara
- Navas, L. 1976. Monografías, Universidad de Chile, tomo 2.
- Neira, M. 2006. Contribución a la sustentabilidad de la apicultura chilena, entre las regiones IV y X, a partir del monitoreo de residuos en miel y cera, para incrementar la inocuidad y competitividad de acuerdo a las exigencias de los mercados de destino. Proyecto Apícola Fondo SAG N°64 2003-2007.
- Nitschmann, J. 1957. Die Füllung der Rektalblase von *Apis mellifera* L. im Winter. *Dtsche. Entomol. Z.* (n.s.). (4) 143 – 171.
- OECD. 1998. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 214. Adopted: 21st September 1998.
- OIE - Office International des Epizooties. 2004. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.
- Paxton, R J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558–565.

- Peldoza, J. 2002. Sanidad apícola Nosemosis. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y pecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Curso de producción apícola.
- Pérez-Urria, E., Ávalos García, A. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2 (3), 119-145.
- Popa, A. 1965. Bees and Silk-worms diseases. Ed Agro-Silvica, Buc., pp 131 – 135
- Quiroz, K. 2003. Determinación del efecto fungicida de canelo (*Drimys winteri*), matico (*Buddleja globosa*), peumo (*Cryptocarya alba*), boldo (*Peumus boldus*) y bailahuén (*Haplopappus taeda* y *H. multifolius*) sobre hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium* spp.). Memoria de título Ing. Agron. Universidad de Talca. Fac. Cs. Agrarias. Talca, Chile
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., y Rao, R. 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 5062–5069
- Revell, I L. 1960. Longevity of refrigerated nosema spores – *Nosema apis*, a parasite of honey bees. *J. Econ. Entomol.* (53) 1132 – 1133.
- Rinderer, T.E., Collin, A.M., Brown, M.A. 1983. Heritability and correlations of the honey bee: response to *Nosema apis*, longevity and alarm response to isopentyl acetate. *Apidologie*, (14) 79 – 85.
- Rinderer, T.E., Syvester, H.A. 1978. Variation in response to *Nosema apis*, longevity and hoarding behavior in a free-mating population of the honey bee. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, (71) 372 – 374.
- Rodríguez M, Vargas M, Gerding M, Navarro H, Antúnez K. 2012. Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *J Apic Res* 51, 285-287.
- Rojas L., Usubillaga A., Cegarra J., Borregale E., Carrero S. 2004. Composición química y actividad antimicótica del aceite esencial de la *Lepechinia schiedeana* (Schlecht) Vathek. Instituto de Investigación, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes. Revista de la Facultad de Farmacia (1)
- Root, A. 1990. Nosema in ABC XYZ of bee culture . Ed Root company, pp 129 – 132.
- Rosal, A., Pérez, JP., Arcos, MA. 2007. La incidencia de metales pesados en compost de residuos sólidos urbanos y en su uso Agronómico en España. *Información Tecnológica* Vol. 18 (6), 75-82.

- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2009. Reglamento sanitario de los alimentos Documento n° 977/96
- SAGP, Secretaría de Agricultura, Ganadería Pesca y Alimentos. 2009. Control de calidad para orégano. Resolución SAGPyA N°: 76.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Genersch, E., Kovacevic, S R., Ljubenkovic, J., Radakovic, M., Aleksic, N. 2011. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 42, 49–58.
- Satish, S.; Mohana, D.C.; Raghavendra, M. P., Raveesha, K.A. 2007. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. *Journal of Agricultural Technology*. 3 (1) 109-119.
- Schmid-Hempel, P. 1998. Parasitism in social insects. Monographs in Behavior and Ecology. Princeton University press, Princeton. N.J.p 413.
- Schoffer, JF., Bustos-López, C., Sotomayor, P., Mattar, C., González, A., Robles, C., Samsing, F., Acevedo, O., y Valdovinos., C. 2011. Aplicación del bioensayo EROD-H4IIE para la determinación de dioxinas en carnes de pollos broiler: un estudio de equivalencia con la cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. *Arch. Med. Vet.* 43, 259-266.
- Syvester, H.A., Rinderer, T.E. 1978. Assessing longevity, hoarding behavior, and response to *Nosema* in honey bee. *Am. Bee J.*, (118) 806 – 807.
- Smolinske, S.; PharmD; DABAT. 2005. Herbal product contamination and toxicity. *Journal of Pharmacy Practice*. 18 (188).
- Solimene, U., Alkofahi, A., Allemann, C., Amigoni, M., Aspan, R., Azimova, S., & Wierer, M. 2007. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues.
- Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic SR, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N. 2011. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* (42) 49-58.
- Szabo, T. I., Heikel, D.T. 1987. Effect of dry fumafillin feeding on spring *Nosema* spore counts in overwintered colonies. *Am. Bee J.*, (127) 210 – 211.
- Thompson, D. P. 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycology*. (81) 151 – 153.
- Traver BE, Williams MR, Fell RD. 2012. Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies. *Journal Invertebrate Pathology*. 109(2): 187-193.

- Tzortzakis, N.; Economakis, C. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 8 (2) pp. 253-258.
- Valdovinos CE. 2009. Dioxinas y furanos en Chile: Riesgos potenciales de contaminación en la producción avícola y porcina. Monografía, Programa de Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Campus Sur, Universidad de Chile, Santiago, Chile, pp 3-4.
- Vogel H., Razmilic I., Doll U. 1997. Contenido de aceite esencial y alcaloides en diferentes poblaciones de boldo (*Peumus boldus* Mol.). *Revista Ciencia e Investigación Agraria* 24(1). Santiago, Chile. 1-11 p.
- Vogel H., Razmilic I., Muñoz M., Doll U., San Martín J. 1999. Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in boldo (*Peumus boldus* Mol.). *Planta Medica* (65) 90-91.
- Vogel H.; Razmilic, I.; San Martín, J.; Doll, U. y Gonzalez, B. 2008. Plantas medicinales chilenas: experiencias de domesticación y cultivo de boldo, matico, bailahuén, canelo, peumo y maqui. Segunda edición. Universidad de Talca p 194.
- Webster, T., Pomper, K., Hunt, G., Thacker, E., Jones. S.J. 2004. *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie* (35) 49 – 54.
- Whyte. J, Schmitt. C, Tillitt. D. 2004. The H4IIE Cell bioassay as an indicator of dioxin-like chemicals in wildlife and the environment. *Crit Rev Toxicol* 34, 1-83.
- Wilson, W.T., Nunamaker, R.A. 1983. The incidence of *Nosema apis* in honeybees in Mexico. *Bee world*, (64) 132 – 136.
- Williams GR, Shafer AB, Rogers RE, Shutler D, Stewart DT. 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 189-192.
- Wyborn, M.H., McCutcheon, D.M. 1987. A comparison of dry and wet fumagillin treatments for spring nosema disease suppression of overwintered colonies. *Am. Bee. J.*, (127) 207 – 209.
- Xia, Z.; Mao, X., Luo, Y. 1999. Study on antifungal mechanism of alpha-pinene. *NCBI*, 24(6) 507-509.
- Yoshiyama M, Kimura K. 2011. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 106(2) 263-267.
- Yücel B, Dogaroglu M. 2005. The impact of *Nosema apis* Z. infestation of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies after using different treatment methods and their effects on the population levels of workers and honey production on consecutive years. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8(8) 1142-1145.

Zambonelli, A. 2008. Effects of essential oils on phytopathogenic Fungi *in vitro*. *Journal of Phytopathology*. (144) 491 – 494.

V.- ANEXOS

1. Anexo carta SAG



Fax N°: 001963	Fecha: 28 OCT. 2010
N° de páginas incluyendo cubierta: 1	
Señores: UNIVERSIDAD MAYOR	
Teléfono: 3281241	Fax: 3281258
Atención: Nancy Rojas, Directora CEAPIMAYOR ceapi@mayor.cl	
Asunto: Lo indicado	
Enviado por: Jefe División Protección Pecuaria	

Urgente Conocimiento Responder

Con relación a su carta de fecha 22/10/2010 mediante la cual informa respecto al proyecto "Desarrollar una formulación de uso veterinario en base a aceites esenciales, caracterizados y estandarizados, de especies nativas como tratamiento frente a *Nosema apis* y *Nosema cerenae*" y consulta sobre la presencia de *Nosema sp.* En el país y requerimientos de autorizaciones por parte del Servicio, informo a Ud. lo siguiente:

1. En Chile existe la presencia de *Nosema sp.*, sin embargo, no existen productos farmacéuticos registrados por el Servicio para el control y/o prevención de esta enfermedad.
2. Considerando que el producto en cuestión se encuentra en una fase experimental y que no se contempla la comercialización del producto farmacéutico ni de ninguno de los productos que se puedan cosechar de los apiarios experimentales, no existe inconveniente desde el punto de vista regulatorio y no se requiere ninguna autorización especial por parte del Servicio.

SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO / SAG
División de Protección Pecuaria, Avenida Presidente Bulnes 140, piso 7, Santiago.
Fono: (2) 3451 401; Fax: (2) 3451 403; E-mail: propec@sag.gob.cl
Web: <http://www.sag.cl>



2. Anexo

Espectro de masa de los compuestos AE peumo

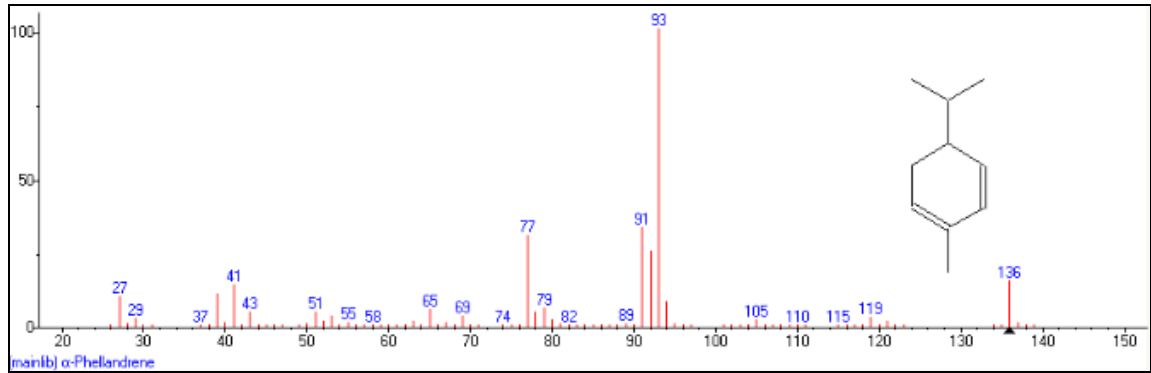


Figura 1: Espectro de masa correspondiente al α - felandreno presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

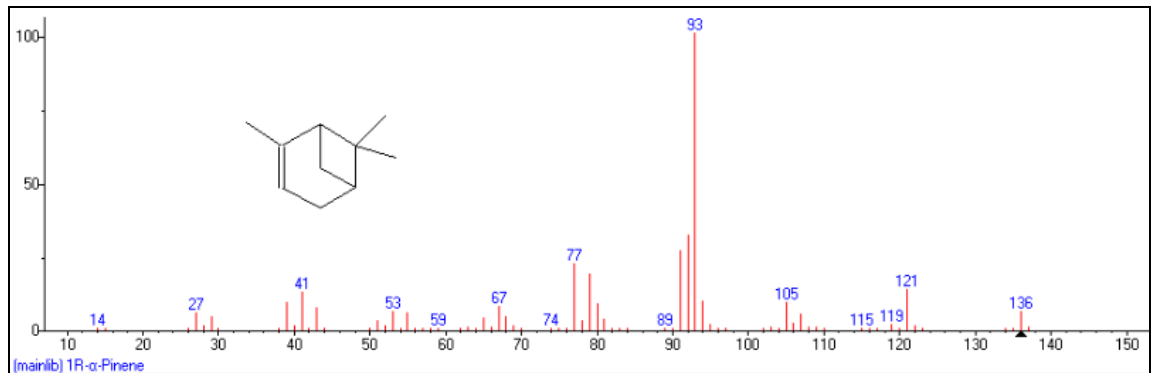


Figura 2: Espectro de masa correspondiente al 1R- α - pineno presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

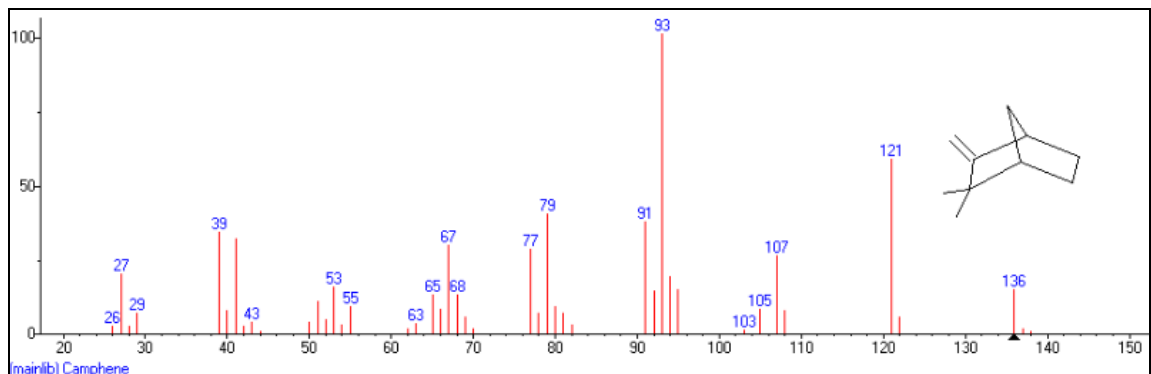


Figura 3: Espectro de masa correspondiente al canfeno presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

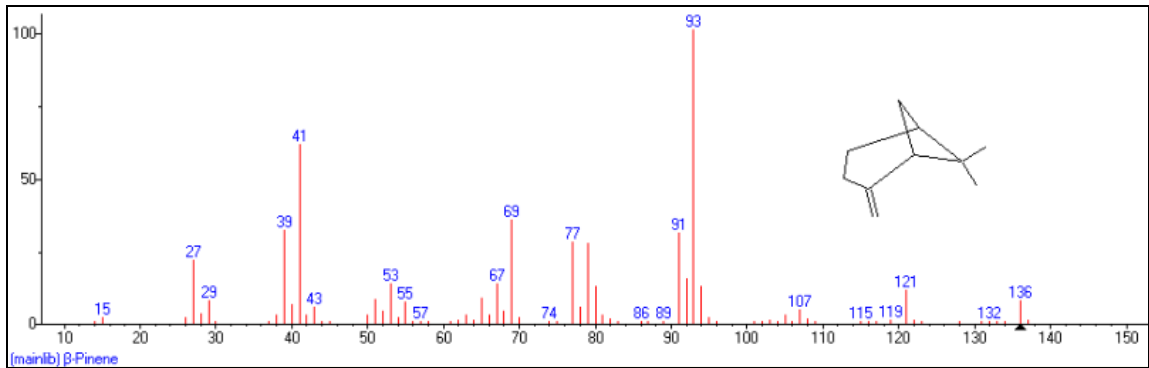


Figura 4: Espectro de masa correspondiente al β -pineno presente en el aceite de pumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

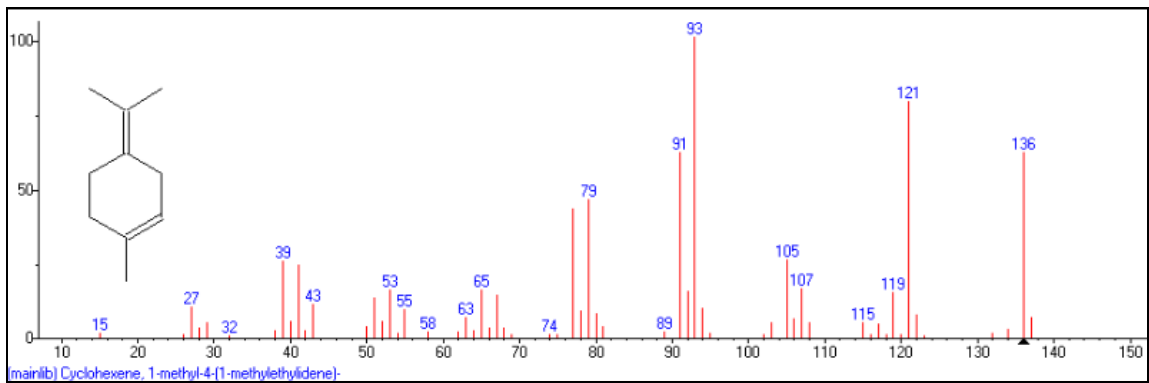


Figura 5: Espectro de masa correspondiente al terpinoleno presente en el aceite de pumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

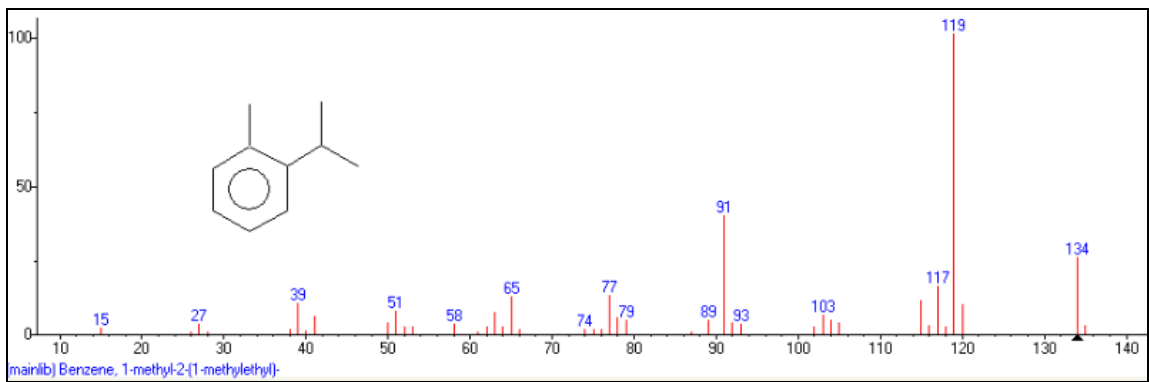


Figura 6: Espectro de masa correspondiente al o-cimol presente en el aceite de pumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

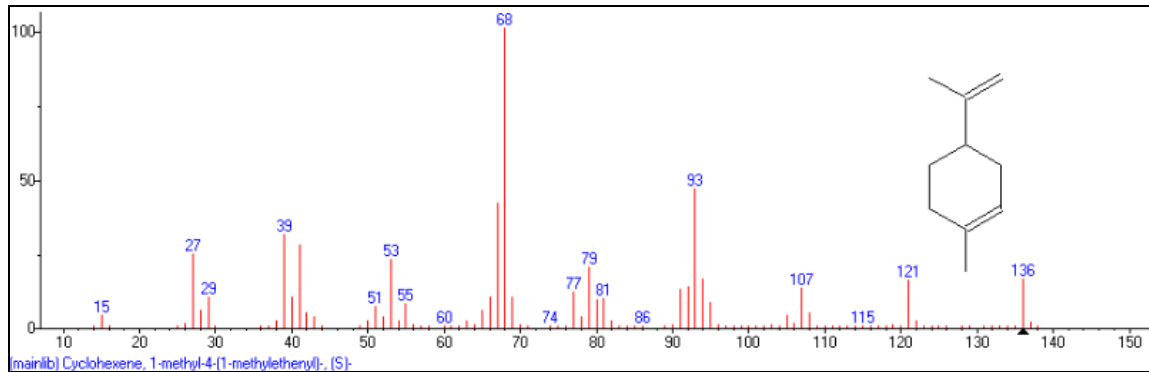


Figura 7: Espectro de masa correspondiente al limoneno presente en el aceite de pumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

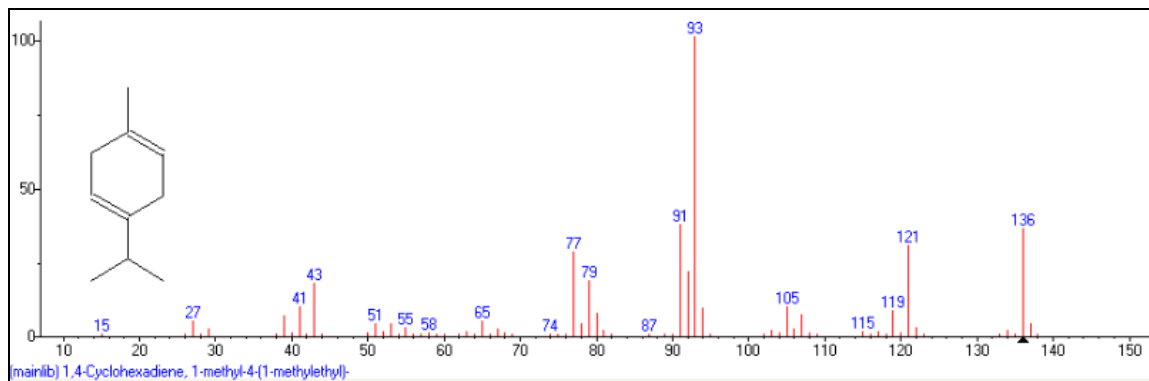


Figura 8: Espectro de masa correspondiente al γ -terpineno presente en el aceite de pumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

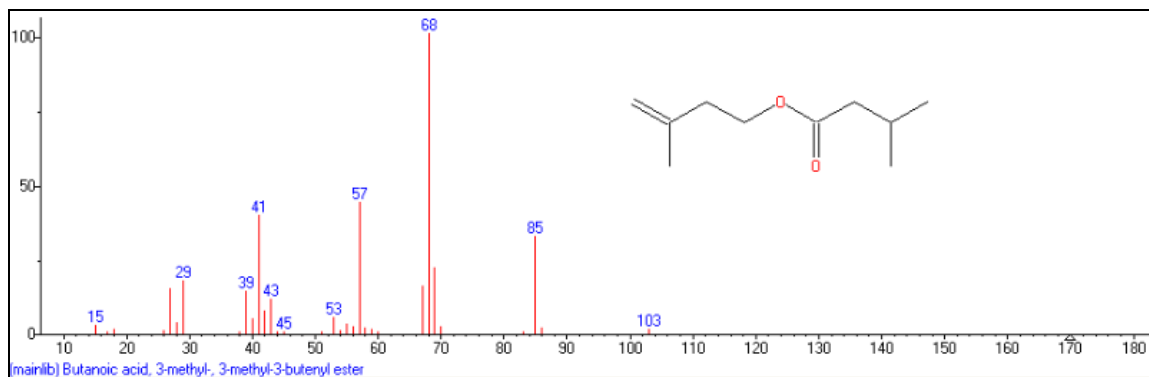


Figura 9: Espectro de masa correspondiente al 3-metil-3-butenil-3-metil-butanoato presente en el aceite de pumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

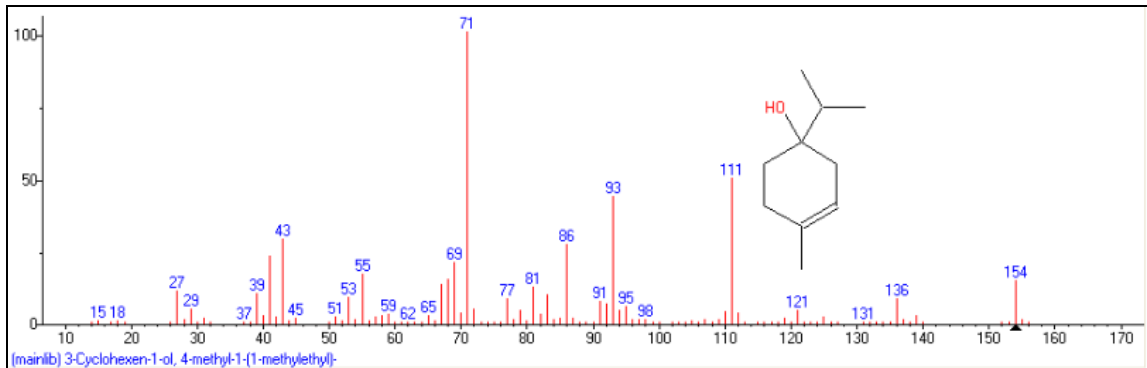


Figura 10: Espectro de masa correspondiente al 4-terpineol presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

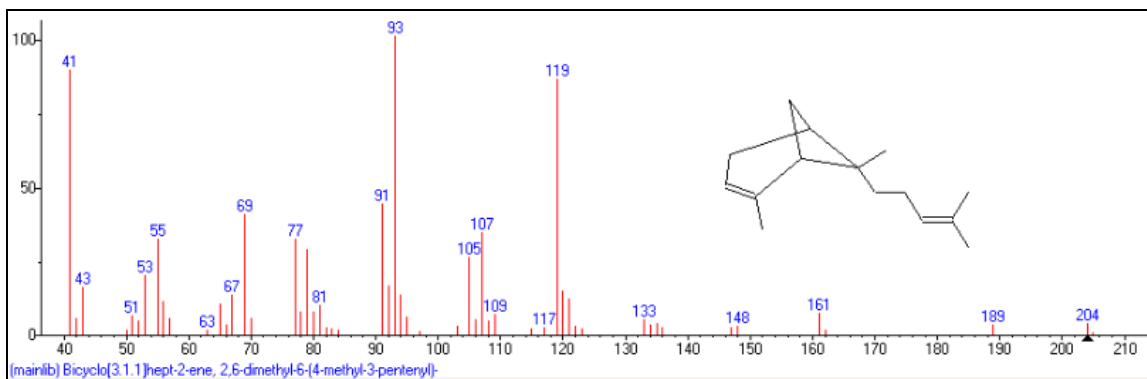


Figura 11: Espectro de masa correspondiente al α -bergamoleno presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

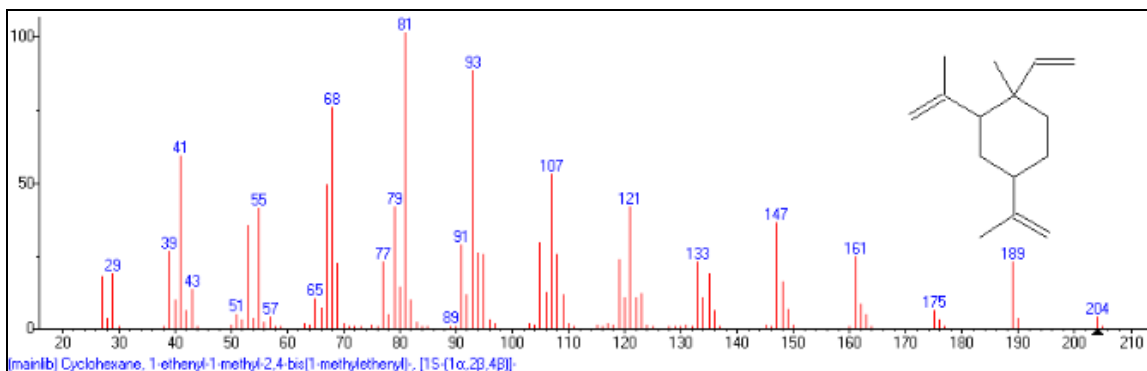


Figura 12: Espectro de masa correspondiente al γ -elemeno presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

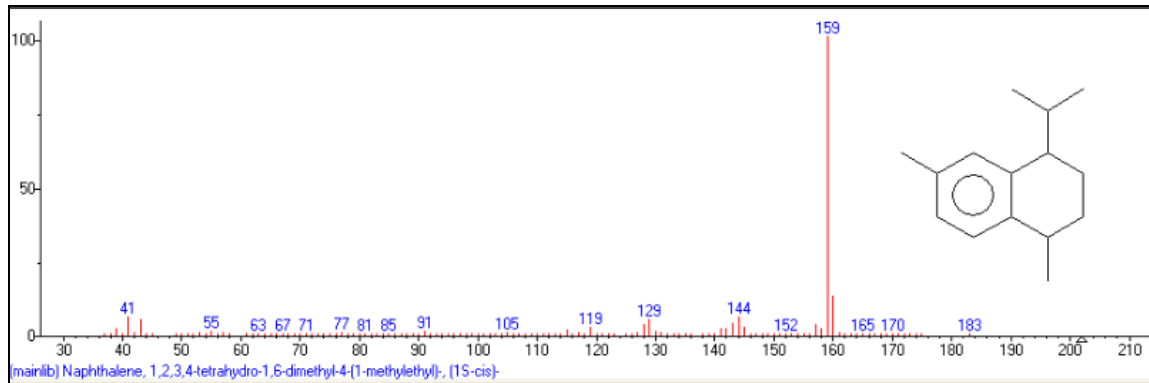


Figura 13: Espectro de masa correspondiente al calameneno presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.

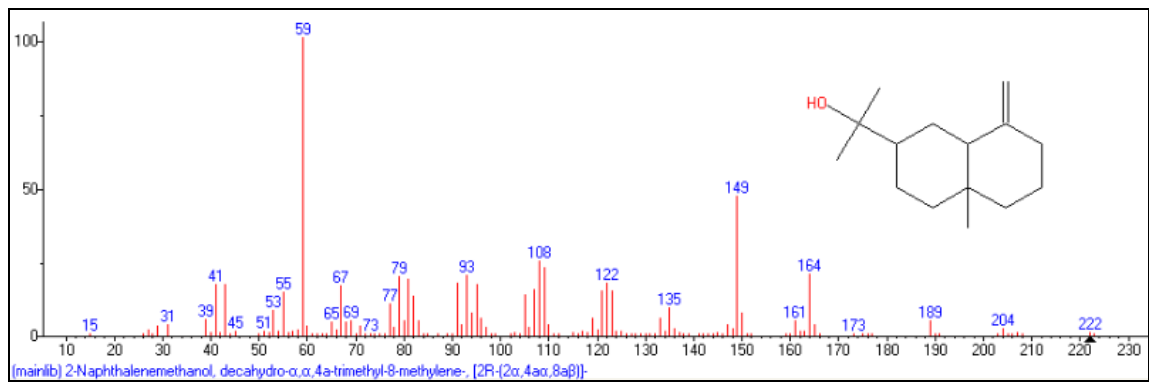


Figura 14: Espectro de masa correspondiente al β -eudesmol presente en el aceite de peumo y comparado con la base de datos NIST 2008.