



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ACARICIDA DE
EXTRACTOS DE *Lonchocarpus punctatus*, *Critonia
aromatisans*, *Cymbopogon citratus* Y *Plectranthus
amboinicus* SOBRE *Varroa destructor* E
INOCUIDAD EN SU HOSPEDERO *Apis mellifera* Y
LEVADURAS ASOCIADAS**

Tesis que presenta

NADIA STEPHANY TREVIÑO ORTIZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de la QFB. **Nadia Stephany Treviño Ortiz**, titulado "**Evaluación del efecto acaricida de extractos de *Lonchocarpus punctatus*, *Critonia aromatisans*, *Cymbopogon citratus* y *Plectranthus amboinicus* sobre *Varroa destructor* e inocuidad en su hospedero *Apis mellifera* y levaduras asociadas**" fue realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de las Unidad de Biotecnología y en el Laboratorio de Química y Microbiología Aplicada a la Ecología con el Grupo de Interacción Planta-Animal de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., así como en el Laboratorio de Sanidad Apícola del Departamento de Apicultura Tropical de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección de la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 30 de enero de 2020.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Nadia Stephany Treviño Ortiz

Este trabajo se llevó a cabo en las Unidades de Biotecnología y de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, así como en el Laboratorio de Sanidad Apícola del Departamento de Apicultura Tropical de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Nutrición y sanidad de las colonias de *Apis mellifera* a través de aceites esenciales de la flora nativa y levaduras simbióticas", con número 219922 (CONACYT), a cargo de la Dra. María Azucena Canto Aguilar.

AGRADECIMIENTOS

Al Conacyt, por la beca otorgada (633976), ya que sin ella no habría podido continuar con mis estudios.

Al CICY, por sus instalaciones y equipos, los cuales nos facilitan la realización de los trabajos de investigación.

A los doctores Carlos Mariano Oropeza Salín, Felipe Augusto Vázquez Flota, María Azucena Canto Aguilar, Rocío de Lourdes Borges Argáez y al M. en C. Pablo Sansores Peraza, miembros de mi comité tutorial y de examen de grado, por su tiempo y sus comentarios en cada tutorial, los cuales ayudaron a darle forma a este trabajo de investigación y finalmente a este documento.

A la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez, por la confianza y la oportunidad que me brindo al permitirme formar parte del Laboratorio de Productos Naturales, por su gran apoyo y por el conocimiento que obtuve por la realización de este trabajo.

A la QBB. Mirbella del Rosario Cáceres Farfán y a todos los integrantes del Laboratorio de Productos Naturales, por su apoyo y orientación para realizar las evaluaciones.

Al Dr. Luis Abdelmir Medina Medina, al M. en C. Humberto Moo Valle y a los técnicos Victor Manuel Luit Chí, Jose Filiberto Luit Bacab y Rodolfo Tut Ho del Departamento de Apicultura de la UADY, por el conocimiento, tiempo, apoyo y orientación que me brindaron, así como por el acceso a sus instalaciones y el material biológico requerido para este proyecto.

Al M.V.Z. Jaisamarai E. Cuxím Canul y a los técnicos Roberto Jesús Couoh y Francisco Lugo González del Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado (CEFPPY), por todo el tiempo brindado y su gran apoyo para culminar este proyecto. Así como al Sr. Bacilio Pisté Matos, por permitirnos el acceso a sus apiarios y por su gran apoyo altruista.

A la Dra. María Azucena Canto Aguilar, por su apoyo y guía en las evaluaciones con *Apis mellifera*.

A la Biól. María Rosalina Rodríguez Román, por su gran apoyo en las colectas del parásito *Varroa destructor*, por su tiempo y por todos los días que hubo que madrugar.

A Luis Enrique Tzacún y Alejandro Pérez Morfi, por su tiempo y gran apoyo en las salidas a campo para coleccionar al parásito *Varroa destructor*.

A Viady Poot Chay y Marco Antonio Caamal Poot, por su gran apoyo en la evaluación de actividad acaricida.

A CONACYT, por el apoyo del proyecto "Nutrición y sanidad de las colonias de *Apis mellifera* a través de aceites esenciales de la flora nativa y levaduras simbióticas" (clave 219922) a cargo de la Dra. María Azucena Canto Aguilar.

A la Unidad de Biotecnología del CICY, por gestionar el apoyo otorgado para presentar este trabajo en el "XVIII National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress - XI Symposium México-USA & 1st. ASPB México Section Meeting", realizado del 28 al 31 de octubre del 2019 en Mérida, Yucatán.

DEDICATORIAS

A mi familia y amigos, porque a pesar del silencio y el tiempo que he permanecido lejos, me apoyan y alientan a seguir adelante.

A Roberto Hamilton, mi Honey. Porque más que nadie tú me has demostrado tu apoyo incondicional, siempre me ayudas, me procuras y me alientas a seguir mis sueños, aun cuando para ello debamos estar lejos.

A la Dra. Rosa Mariana Montiel Ruiz, al Ing. Armando García Soto y al Q.I. Enrique González Rodríguez, por alentarme y apoyarme en la decisión de realizar este posgrado. Gracias a ustedes esto fue posible.

ÍNDICE	I
LISTADO DE ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1 El género <i>Varroa</i>	3
1.1 <i>Varroa destructor</i>	5
1.1.1 Morfología	6
1.1.2 Ciclo de vida	7
1.1.3 Medidas de control	10
1.1.3.1 Consecuencias del uso de acaricidas	14
1.1.3.1.1 Efectos secundarios de los tratamientos químicos en las abejas	14
1.1.3.1.2 Efectos secundarios de los tratamientos alternativos actuales en las abejas	15
1.1.4 Importancia de la microbiota de los insectos	18
1.2.4.1 Importancia de la microbiota de las abejas	18
1.1.5 Levaduras asociadas a las abejas	20
1.1.6 Alternativas para el control de <i>Varroa destructor</i>	22
1.1.6.1 <i>Lonchocarpus punctatus</i> Kunt	22
1.1.6.1.1 Uso tradicional	24
1.1.6.1.2 Conocimiento fitoquímico	24
1.1.6.2 <i>Critonia aromatisans</i> (DC.) R. M. King & H. Rob	26
1.1.6.2.1 Uso tradicional	27
1.1.6.2.2 Conocimiento fitoquímico	27
1.1.6.3 <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	28
1.1.6.3.1 Uso tradicional	29
1.1.6.3.2 Conocimiento fitoquímico	30
1.1.6.4 <i>Plectranthus amboinicus</i> Lour	30
1.1.6.4.1 Uso tradicional	32

1.1.6.4.2 Conocimiento fitoquímico	32
JUSTIFICACIÓN	33
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
CAPÍTULO II	39
ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE EXTRACTOS DE BAJA POLARIDAD DE <i>Lonchocarpus punctatus</i>, <i>Critonia aromatisans</i>, <i>Cymbopogon citratus</i> Y <i>Plectranthus amboinicus</i>	
2.1 INTRODUCCIÓN	39
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.2.2 Material vegetal	40
2.2.3 Obtención de los extractos	40
2.2.4 Obtención de los extractos de baja polaridad	41
2.2.5 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	41
2.3 RESULTADOS	42
2.3.1 Obtención de extractos crudos y de baja polaridad	42
2.3.2 Análisis de la composición de los extractos de baja polaridad por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	43
2.3.2.1 Extracto de baja polaridad de <i>Critonia aromatisans</i>	43
2.3.2.2 Extracto de baja polaridad de hojas <i>Plectranthus amboinicus</i>	46
2.3.2.3 Extracto de baja polaridad de <i>Cymbopogon citratus</i>	49
2.3.2.4 Extracto de baja polaridad de flores de <i>Lonchocarpus punctatus</i>	52
2.3.2.5 Extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Cymbopogon citratus</i> A y B	55
2.3.2.6 Extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Plectranthus amboinicus</i>	60
2.4 DISCUSIÓN	62

CAPÍTULO III	65
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACARICIDA DE LOS EXTRACTOS DE BAJA POLARIDAD DE <i>Lonchocarpus punctatus</i>, <i>Critonia aromatisans</i>, <i>Cymbopogon citratus</i> Y <i>Plectranthus amboinicus</i> CONTRA <i>Varroa destructor</i>	
3.1 INTRODUCCIÓN	65
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	67
3.2.2 Tratamientos a evaluar	67
3.2.3 Ácaros <i>Varroa destructor</i>	67
3.2.4 Bioensayo de contacto residual en vial	68
3.3 RESULTADOS	71
Evaluación de la actividad acaricida de los extractos de baja polaridad	71
3.4 DISCUSION	73
CAPÍTULO IV	75
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE BAJA POLARIDAD DE <i>Lonchocarpus punctatus</i>, <i>Critonia aromatisans</i>, <i>Cymbopogon citratus</i> Y <i>Plectranthus amboinicus</i> SOBRE <i>Apis mellifera</i> Y EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE LAS LEVADURAS ASOCIADAS	
4.1 INTRODUCCIÓN	75
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	78
4.2.1 Fármacos y Reactivos	78
4.2.2 Extractos de baja polaridad	78
4.2.3 Alimento para las abejas	78
4.2.4 Cajas experimentales	78
4.2.5 Abejas	78
4.2.6 Levaduras	80
4.2.7 Toxicidad aguda por contacto	80
4.2.8 Método de Kirby-Bauer	81
4.2.9 Método de microdilución en caldo	83
4.3 RESULTADOS	88
4.3.1 Evaluación de inocuidad en <i>Apis mellifera</i>	88
4.3.2 Evaluación actividad antimicrobiana en las levaduras	89

4.3.2.1 Método de Kirby-Bauer	89
4.3.2.2 Método de microdilución en caldo	96
4.4 DISCUSIÓN	98
CAPÍTULO V	103
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	103
5.1 DISCUSIÓN	103
5.2 CONCLUSIONES GENERALES	105
5.3 PERSPECTIVAS	106
BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXOS	127
ANEXO 1 Resultados del análisis Probit de los datos obtenidos mediante la evaluación de la actividad acaricida de <i>P. amboinicus</i> y <i>C. aromatisans</i>	127
ANEXO 2 Resultados de las evaluaciones complementarias de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz	129
ANEXO 3 Complementos de la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución	132

LISTADO DE ABREVIATURAS

LMR	Límites máximos de residuos
Ppb	Partes por billón
UICN	Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza
Hx	Hexano
ACN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
AR	Abundancia Relativa
PS	Porcentaje de Similitud
TR	Tiempo de Retención
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
UADY	Universidad Autónoma de Yucatán
CICY	Centro de Investigación Científica de Yucatán
URN	Unidad de Recursos Naturales
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Aspecto de las diferentes especies de <i>Varroa</i>	4
Figura 1.2 Estadios del ácaro <i>Varroa destructor</i>	7
Figura 1.3 Ciclo de vida de <i>Varroa destructor</i>	9
Figura 1.4 Productos para el control de <i>Varroa destructor</i>	13
Figura 1.5 <i>Lonchocarpus punctatus</i> en floración	23
Figura 1.6 Metabolitos aislados de <i>Lonchocarpus punctatus</i> .	25
Figura 1.7 <i>Critonia aromatisans</i>	26
Figura 1.8 Metabolitos aislados de <i>Critonia aromatisans</i>	27
Figura 1.9 <i>Cymbopogon citratus</i>	28
Figura 1.10 Metabolitos aislados de <i>Cymbopogon citratus</i>	30
Figura 1.11 <i>Plectranthus amboinicus</i>	31
Figura 1.12 Metabolitos aislados de <i>Plectranthus amboinicus</i>	32
Figura 1.13 Estrategia experimental	37
Figura 2.1 Cromatograma de la fracción de baja polaridad de <i>Critonia aromatisans</i>	43
Figura 2.2 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de <i>Critonia aromatisans</i> .	45
Figura 2.3 Cromatograma de la fracción de baja polaridad de <i>Plectranthus amboinicus</i>	46
Figura 2.4 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de <i>Plectranthus amboinicus</i> .	48
Figura 2.5 Cromatograma de la fracción de baja polaridad de <i>Cymbopogon citratus</i>	49
Figura 2.6 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de <i>Cymbopogon citratus</i> .	51
Figura 2.7 Cromatograma del extracto de baja polaridad de flor de <i>Lonchocarpus punctatus</i> .	52

Figura 2.8 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de flores de <i>Lonchocarpus punctatus</i> .	54
Figura 2.9 Cromatograma del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Cymbopogon citratus A</i>	55
Figura 2.10 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Cymbopogon citratus A</i> .	56
Figura 2.11 Cromatograma del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Cymbopogon citratus B</i>	57
Figura 2.12 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Cymbopogon citratus B</i> .	59
Figura 2.13 Cromatograma del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Plectranthus amboinicus</i>	60
Figura 2.14 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Cymbopogon citratus A</i> .	61
Figura 3.1 Colecta de ácaros <i>Varroa destructor</i> .	68
Figura 3.2 Evaluación de toxicidad aguda en los ácaros.	70
Figura 4.1 Fotografías de actividades.	79
Figura 4.2 Evaluación de toxicidad aguda por contacto en <i>Apis mellifera</i> .	81
Figura 4.3 Distribución de los discos con los tratamientos a evaluar.	82
Figura 4.4 Metodología en general para microdilución	86
Figura 4.5 Organización de las placas de 96 pocillos para la evaluación mediante microdilución.	87
Figura 4.6 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de baja polaridad de la primera colecta mediante el método Kirby-Bauer.	90
Figura 4.7 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de baja polaridad de la segunda colecta mediante el método Kirby-Bauer.	92

Figura 4.8 Resultados de la primera evaluación de la actividad antimicrobiana del timol, amitraz y ácido oxálico sobre las levaduras por el método Kirby-Bauer.	95
ANEXO 2.1 Resultados de la segunda evaluación de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz por el método Kirby-Bauer.	129
ANEXO 2.2 Resultados de la evaluación individual de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz sobre <i>Zygosaccharomyces mellis</i> por el método Kirby-Bauer (tercer ocasión)	130
ANEXO 2.3 Resultados de la evaluación individual de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz sobre <i>Kurtzmaniella cleridarum</i> por el método Kirby-Bauer (tercer ocasión)	130
ANEXO 2.4 Resultados de la evaluación individual de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz sobre <i>Candida versatilis</i> por el método Kirby-Bauer (tercer ocasión)	131
ANEXO 2.5 Resultados de la evaluación individual de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz sobre <i>Candida apicola</i> por el método Kirby-Bauer (tercer ocasión).	131
ANEXO 3.1 Organización de las placas de 96 pocillos para la evaluación del fluconazol mediante microdilución.	132
ANEXO 3.2 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana del fluconazol.	133
ANEXO 3.3 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos	134
ANEXO 3.4 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz.	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Taxonomía y especies del género <i>Varroa</i>	3
Tabla 1.2 Reportes de <i>Varroa</i> en diferentes zonas geográficas.	5
Tabla 1.3 Tratamientos utilizados para el control de <i>Varroa destructor</i> .	11
Tabla 1.4 Levaduras aisladas en colonias de abejas productoras de miel en Yucatán	21
Tabla 1.5 Levaduras aisladas de néctar floral en Yucatán.	21
Tabla 1.6 Taxonomía de <i>Lonchocarpus punctatus</i>	23
Tabla 1.7 Taxonomía de <i>Critonia aromatisans</i>	27
Tabla 1.8 Taxonomía de <i>Cymbopogon citratus</i>	29
Tabla 1.9 Taxonomía de <i>Plectranthus amboinicus</i>	31
Tabla 2.1 Características de la extracción de la primera colecta	42
Tabla 2.2 Características de la extracción de la segunda colecta	42
Tabla 2.3 Datos de CG-EM del extracto de baja polaridad de <i>Critonia aromatisans</i>	44
Tabla 2.4 Datos de CG-EM de la fracción de baja polaridad de <i>Plectranthus amboinicus</i>	47
Tabla 2.5 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de <i>Cymbopogon citratus</i>	50
Tabla 2.6 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de flor de <i>Lonchocarpus punctatus</i>	53
Tabla 2.7 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Cymbopogon citratus A</i>	56
Tabla 2.8 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Cymbopogon citratus B</i> .	58
Tabla 2.9 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de <i>Plectranthus amboinicus</i> .	61
Tabla 3.1 Resultados del monitoreo de la actividad acaricida de los extractos de baja polaridad.	71
Tabla 3.2 Resultados del bioensayo de toxicidad aguda en ácaros hembra adultos <i>Varroa destructor</i> .	72

Tabla 3.3 Resultados del análisis Probit de los datos obtenidos de la evaluación de actividad acaricida.	72
Tabla 4.1 Características para la evaluación con las levaduras.	80
Tabla 4.2 Concentraciones evaluadas de fluconazol para la determinación de la CMI.	84
Tabla 4.3 Concentraciones evaluadas de los extractos y tratamientos para la determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método microdilución en caldo.	85
Tabla 4.4 Resultados del bioensayo de toxicidad aguda por contacto en abejas.	88
Tabla 4.5 Resultados de la evaluación actividad antimicrobiana de los extractos de baja polaridad de la primera colecta de material vegetal en las levaduras por el método de Kirby-Bauer.	89
Tabla 4.6 Resultados de la evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos de baja polaridad de la segunda colecta de material vegetal en las levaduras por el método de Kirby-Bauer.	91
Tabla 4.7 Resultados de las evaluaciones de actividad antimicrobiana de los tratamientos acaricidas en las levaduras por el método de Kirby-Bauer.	93
Tabla 4.8 Resultados de concentración mínima inhibitoria de fluconazol	96
Tabla 4.9 Resultados de la evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos sobre las levaduras por el método de microdilución	97
Tabla 5.1 Resumen de resultados de todas las evaluaciones.	103
ANEXO 1.1 Resultados del análisis Probit de la actividad acaricida del extracto de <i>P. amboinicus</i> .	127
ANEXO 1.2 Resultados del análisis Probit de la actividad acaricida del extracto de <i>C. aromatisans</i>	128

RESUMEN

Debido al riesgo que el ácaro *Varroa destructor* representa para la apicultura a nivel mundial y las desventajas del uso de acaricidas sintéticos, resulta imprescindible la búsqueda de alternativas de origen natural para controlarlo. En este sentido, *Lonchocarpus punctatus*, *Cymbopogon citratus*, *Plectranthus amboinicus* y *Crotona aromatisans* son especies de plantas de las cuales se ha reportado en su composición fitoquímica compuestos como estilbenos e isoprenoides, tipos de compuestos que suelen tener actividad acaricida, por lo que sus extractos pueden presentar actividad contra este parásito. En este trabajo se evaluó la actividad acaricida de los extractos de baja polaridad de flores de *L. punctatus* y de hojas de *C. citratus*, *P. amboinicus* y *C. aromatisans* sobre *V. destructor* y se verificó su toxicidad sobre *Apis mellifera* mediante el bioensayo de toxicidad aguda por contacto y su actividad antimicrobiana sobre las levaduras *Candida apicola*, *Candida versatilis*, *Kurtzmaniella cleridarum* y *Zygosaccharomyces mellis*, las cuales forman parte de la microbiota de las abejas. Los extractos fueron analizados mediante CG-EM para tener referencia de su composición. En la evaluación de toxicidad aguda realizada en ácaros hembra *V. destructor* mediante el método de contacto residual en vial, los extractos de *C. aromatisans* y *P. amboinicus* generaron un 100% de mortalidad a 250 µg de extracto por vial y ambos mantuvieron esta actividad a 200 y 150 µg, respectivamente. Así mismo, estos extractos ocasionaron la mayor mortalidad en el ensayo de inocuidad en *A. mellifera* (200 µg) y en la evaluación de actividad antimicrobiana sobre las levaduras después del timol y el amitraz, realizada mediante el método de Kirby-Bauer y de microdilución en caldo. Mediante el análisis por CG-EM se identificaron carvacrol en el extracto de *P. amboinicus* y ciclocoloronona en el de *C. aromatisans* entre los componentes con mayor abundancia relativa; este último con actividad ixodocida reportada, por lo que se sugiere que la actividad detectada pueda deberse a la presencia de estos componentes, sin embargo, no se descarta un efecto sinérgico entre otros componentes presentes en estos extractos. A pesar de los resultados obtenidos en la evaluación de inocuidad, no deben eliminarse estos dos extractos como alternativa para el control de *V. destructor*, ya que este trabajo nos da las bases científicas para plantear la forma más adecuada de aplicar un tratamiento con dichos extractos y estos resultados sustentan la realización de un estudio de aislamiento biodirigido con el fin de identificar los metabolitos responsables de la actividad acaricida.

ABSTRACT

Due to the risk that the mite *Varroa destructor* represents for beekeeping worldwide and the disadvantages of using synthetic acaricides, it is essential to find alternatives of natural origin to control it. In this sense, *Lonchocarpus punctatus*, *Cymbopogon citratus*, *Plectranthus amboinicus* and *Critonia aromatisans* are plants species with distribution in the Yucatan Peninsula with reported secondary metabolites in their composition such as stilbenes and isoprenoids which usually have acaricidal activity, so their extracts can present activity against *V. destructor*. In this work the acaricidal activity of the low polarity extracts of *L. punctatus*, *C. citratus*, *P. amboinicus* and *C. aromatisans* on *V. destructor* was evaluated and the safety on *Apis mellifera* was verified by an acute contact toxicity bioassay and the sensitivity of the yeasts *Candida apicola*, *Candida versatilis*, *Kurtzmaniella cleridarum* and *Zygosaccharomyces mellis*, which are part of the bees microbiota, were verified. The extracts were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry to have reference of their composition. In the acute toxicity evaluation on female *V. destructor* mites by the glass vial residual bioassay, the extracts of *C. aromatisans* and *P. amboinicus* showed 100% mortality at 200 and 150 µg, respectively. Likewise, these extracts caused the highest mortality in the safety test on *A. mellifera* and in the yeasts sensitivity evaluation after thymol and amitraz, carried out using the Kirby-Bauer method and broth microdilution. GC-MS analysis showed the presence of carvacrol and cyclocolorenone among the majority compounds in the *P. amboinicus* and *C. aromatisans* extracts, respectively. Despite the results obtained, these two extracts should not be eliminated as an alternative for the *V. destructor* control, since this work provides us with the bases to identify the most appropriate way to apply a treatment with these extracts. In addition, these results support the carry out of a bio-guided isolation assay.

INTRODUCCIÓN

La apicultura se define como la actividad de crianza de abejas melíferas con el fin de obtener y aprovechar los productos que éstas elaboran, como la miel, el polen, la jalea real, la cera y el propóleo. En México son alrededor de 200,000 familias las que se dedican a esta actividad (SAGARPA, 2017) y durante los últimos 24 años se ha mantenido una producción entre 50,000 a 60,000 toneladas anuales (INEGI, 2015), lo que posiciona a México entre los diez principales productores de miel a nivel mundial. En el año 2014, Yucatán, Campeche, Jalisco y Chiapas fueron los estados con mayor producción, aportando el 50% de la producción nacional. En el 2016 se exportaron alrededor de 30,000 toneladas de miel al extranjero, con un valor aproximado de 93 millones de dólares; por lo que esta actividad desempeña un papel fundamental en la economía. En ese año, Alemania adquirió más de 14,000 toneladas, es decir, casi el 50% del total de miel exportada, seguida por Estados Unidos, Reino Unido y Bélgica (SAGARPA, 2017).

Apis mellifera, comúnmente conocida como abeja europea, es una de las especies con mayor importancia para la industria apícola debido a que es de las más productivas, por lo que su crianza resulta más rentable que la de otras especies. Lamentablemente, esta especie de abeja es propensa a presentar enfermedades y plagas de parásitos que pueden mermar su productividad; entre ellas destaca *Varroa destructor*, el cual es un ácaro ectoparásito considerado como uno de los principales problemas sanitarios en la apicultura a nivel mundial (Genersch, 2010). Desde la aparición de este ácaro en 1963 en Filipinas, ha representado una gran amenaza para la apicultura, tras ocasionar la pérdida total de las colonias de abejas manejadas de la especie *A. mellifera* en esa isla (Coronado *et al.*, 1997). La infestación por este parásito provoca varios tipos de daño, entre ellos, el acortamiento de la vida de las abejas, pérdida de peso, cambios en su comportamiento y aumenta la posibilidad de que se presenten otras enfermedades (De Jong *et al.*, 1982), ya que compromete el sistema inmunológico de las abejas y a su vez actúa como vector de algunos virus (Tarpay y Summers, 2000). Debido a lo anterior, puede provocar la reducción de la producción de miel en más de un 50% y ocasionar la pérdida total de colonias sin tratamiento en un período de dos a cuatro años (Mors y Nowogrodzki, 1997)[. Aunque existen diversos productos utilizados para el control de este ácaro, resulta imprescindible

la búsqueda de nuevas alternativas para su control, debido a que se han presentado casos de resistencia (Milani, 1999; Maggi *et al.*, 2010), así como de contaminación de los productos de la colmena. Además, todos los productos que comúnmente se utilizan, sean de origen natural o sintéticos, generan efectos adversos en las abejas y a su vez representan un riesgo para los apicultores y consumidores (Stanimirovic *et al.*, 2005; Radakovic *et al.*, 2013; Ruffinengo *et al.*, 2014). Asimismo, algunos de ellos afectan la calidad de la miel, lo cual limita el mercado y la venta del producto, afectando así la economía de los apicultores y del país (Magaña *et al.*, 2016).

Por lo anterior, resulta imprescindible la búsqueda de alternativas para el control de *V. destructor* que sean de preferencia de origen natural, debido a que la miel para ser exportada a países europeos, debe cumplir con los requisitos de la normatividad de la Unión Europea, entre los cuales están los límites máximos de residuos (LMR), donde se establece que la miel y demás productos de la apicultura no debe contener una concentración mayor a 100 partes por billón (ppb) de coumafos y 200 ppb de amitraz [Diario Oficial de la Unión Europea, 2017]. La miel o producto que contenga cantidades superiores a estas quedan fuera del mercado. Así también, para ser considerada como miel orgánica no debe presentar estos compuestos, sin embargo, es permitido utilizar tratamientos de origen natural para el control de este parásito. En la búsqueda de alternativas para el tratamiento de la varroosis que sean eficaces y seguras, ha sido evaluada la actividad acaricida de una gran cantidad de extractos vegetales (Calderone *et al.*, 1997; Ariana *et al.*, 2002; El Zalabani *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2012; Goswami *et al.*, 2014) y algunos estudios han mostrado resultados prometedores.

México ocupa el cuarto lugar en el mundo en riqueza de plantas, que además de contar con una gran diversidad, ésta se caracteriza por estar compuesta de un gran número de especies que son nativas y originarias de nuestro país o que solo pueden encontrarse aquí, es decir, endémicas (CONABIO, 2006). Lamentablemente, la mayoría no han sido estudiadas y en ellas podría encontrarse una buena alternativa a los tratamientos convencionales para la varroosis.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. El género *Varroa*

El género *Varroa* lo conforman varias especies de ácaros ectoparásitos obligados (Tabla 1.1) que parasitan abejas que anidan en cavidades (Dietemann, 2013), entre ellas están *Apis cerana*, *Apis nigrocincta*, *Apis koschevnikovi* y *Apis mellifera* (Rosenkranz, 1904). Las especies más conocidas de este género son *Varroa jacobsoni* y *Varroa destructor*.

Tabla 1.1 Taxonomía y especies del género *Varroa*.

Dominio	Eukarya
Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Arachnida
Superorden	Parasitiformes
Orden	Mesostigmata
Familia	Varroidae
Género	Varroa
Especies	<i>Varroa jacobsoni</i> Oudemans 1904 <i>Varroa underwoodi</i> Delfinado-Baker y Aggarwal 1987 <i>Varroa rindereri</i> de Guzman y Delfinado-Baker 1996 <i>Varroa destructor</i> Anderson y Trueman 2000

(Dietemann *et al.*, 2013; Arctos, 2017)

En 1904 fue descrito por primera vez el ácaro *V. jacobsoni*, siendo la primera especie de este género en ser reportada. Edward Jacobson fue quien descubrió y colectó especímenes de este ácaro al encontrarle parasitando a la especie de abeja *A. cerana*, en la isla de Java, en Indonesia; posteriormente fue clasificado por Anthonie Cornelis Oudemans, quien describió al parásito y propuso el nuevo género *Varroa* (Oudemans, 1904). Algunos años después se descubrió que este ácaro también podía parasitar a *A. mellifera*, sin embargo, más adelante se reveló que el ácaro capaz de parasitar a *A. mellifera* era diferente al descrito anteriormente en *A. cerana*, y recibió el nombre de *V.*

destructor (Anderson y Trueman, 2000), esto fue posible mediante análisis con técnicas de biología molecular, así como análisis morfológicos meticulosos, ya que estas dos especies resultan muy similares a simple vista, a diferencia de las otras especies (Figura 1.1).

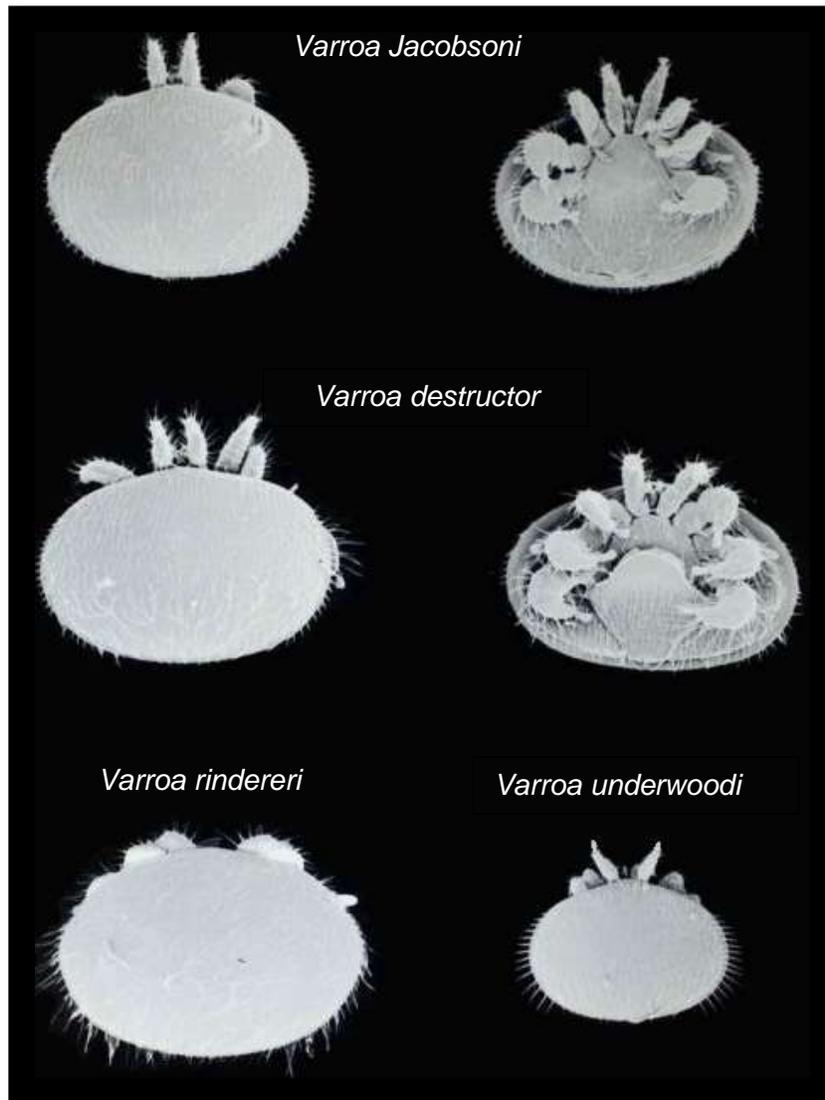


Figura 1.1 Aspecto de las diferentes especies de *Varroa*.
(Imagen modificada de Anderson y Trueman,2000).

Varroa destructor además de parasitar a *A. mellifera* también parasita a *A. cerana*, mientras que *V. jacobsoni* solo parasita a esta última (Rosenkranz, 1904). Esta nueva especie *V. destructor*, que se creía era *V. jacobsoni* con un nuevo huésped (*A. mellifera*), se propagó lentamente entre los territorios vecinos y debido a la comercialización de material biológico infestado este parásito llegó hasta el continente americano. No está del todo claro en qué momento *V. jacobsoni* entro en contacto con *A. mellifera*, sin embargo, se cree que fue en Japón, dado que *A. mellifera* se encontraba en esa región desde 1877 y gracias a los reportes realizados en aquella época (Tabla 1.2) se estima que esta interacción ocurrió a finales de la década de 1950 (De Guzmán *et al.*, 1997). En 1992 se reportó por primera vez en México, en apiarios procedentes de Veracruz (Chihu *et al.*, 1992) y en 1994 este parásito llegó a Yucatán (Villanueva y Colli-can, 1996).

Tabla 1.2 Reportes de *Varroa* en diferentes zonas geográficas.

Año	Huésped	Parásito	Zona geográfica
1904			Isla de Java, Indonesia
1909	<i>Apis cerana</i>	<i>Varroa jacobsoni</i>	Japón
1952			Rusia Oriental
1971			Paraguay
1972			Brasil
1987			Wisconsin, Estados unidos
1989	<i>Apis mellifera</i>	<i>Varroa destructor</i>	Puerto Rico
1992			Veracruz, México
1994			Yucatán, México

(De Guzmán *et al.*, 1977; Chihu *et al.*, 1992; Villanueva y Colli-can, 1996).

1.1 *Varroa destructor*

Este ectoparásito se alimenta de la hemolinfa y del cuerpo graso (Ramsey *et al.*, 2019) de las abejas adultas y de la cría, lo que afecta el estado nutricional e inmunológico de la colonia (Aronstein *et al.*, 2012), ocasionando así la susceptibilidad a presentar otros padecimientos, como propagación de hongos, bacterias y virus. Además, *V. destructor* actúa como vector de algunos virus (Di Prisco *et al.*, 2011; Di Prisco *et al.*, 2016). Por lo anterior, la infestación por este parásito provoca una disminución en la producción de miel

(Medina-Floresca *et al.*, 2011) e incluso puede ocasionar la pérdida completa de colonias si no reciben tratamiento (Mors y Nowodrodzki, 1997).

El ciclo de vida de *V. destructor* está acoplado al de *A. mellifera*, por lo que durante los meses de mayor producción de cría es cuando mayor número de ácaros se presentan en las colmenas. A pesar de ello los niveles de infestación pueden resultar disminuidos, debido a la creciente población de abejas durante esta temporada (OIE, 2004).

Los ácaros hembra adultos se introducen en las celdas con larvas de *A. mellifera* que están próximas a ser operculadas, permanecen ocultas en el alimento larval por debajo de la larva hasta que es operculada la celda y durante el desarrollo de la cría el ácaro hembra adulto coloca los huevecillos; dentro de la celda los ácaros se desarrollan y se aparean, por lo que al emerger la nueva abeja, también lo hacen con ella una nueva generación de ácaros hembra fecundadas.

De Guzmán *et al.* demostraron que este parásito es capaz de sobrevivir sin un huésped vivo e incluso sin alimento hasta por 70 horas (De Guzmán *et al.*, 1993), lo que le da al parásito un período suficiente para encontrar un nuevo huésped en caso de que se desprenda de su huésped original. Además, suelen adherirse entre las placas abdominales o en el tórax de la abeja, lo que hace difícil para la abeja su detección y eliminación (Chihu-Ampara *et al.*, 1992; Ramsey *et al.*, 2019).

1.1.1 Morfología

Los ácaros *V. destructor* presentan dimorfismo sexual, así como variadas características morfológicas dependiendo de su estadio (Figura 1.2). Las hembras adultas tienen un cuerpo de color castaño rojizo, de forma elipsoidal, deprimido dorso-ventralmente y pueden medir hasta 1.5 mm de ancho, mientras que los machos solo pueden llegar a medir hasta 0.4 mm, su cuerpo es casi esférico y de color amarillo-grisáceo, ambos en su último estadio poseen cuatro pares de patas que terminan en ventosas.

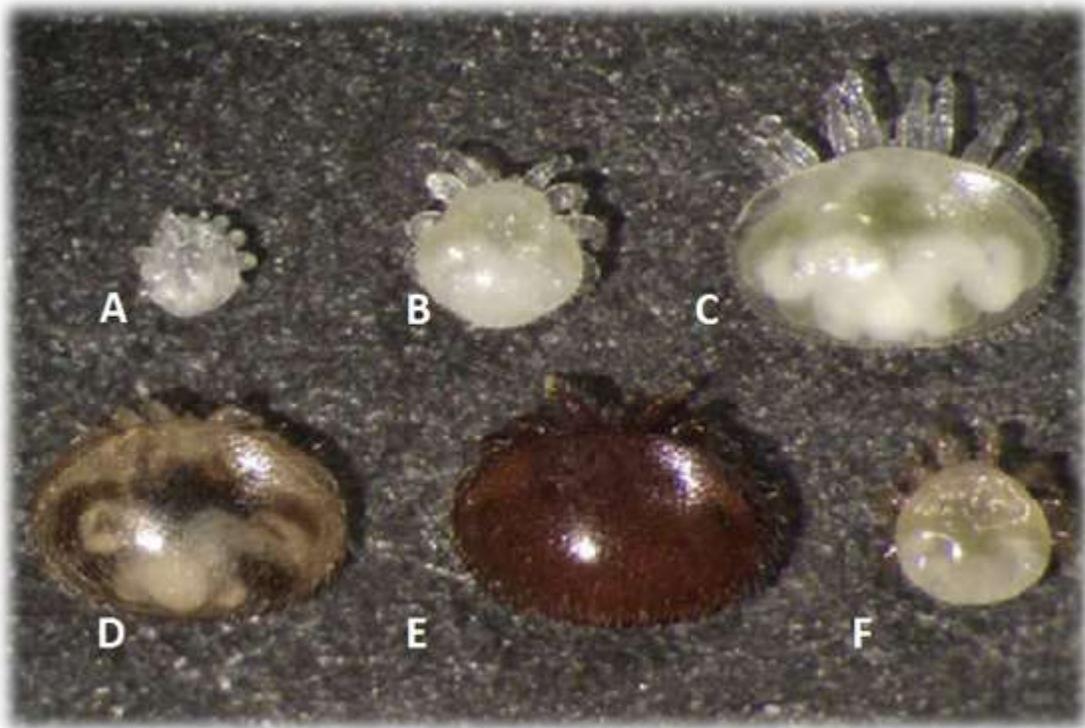


Figura 1.2 Estadios del ácaro *Varroa destructor*. A) Protoninfa, B) Deutoninfa, C) Deutocrisalida, D) Hembra joven, E) Ácaro madre, y F) Macho adulto (Modificado de Rosenkranz *et al.*, 2009).

1.1.2 Ciclo de vida

Varroa destructor carece de una etapa de vida libre, ya que su ciclo reproductivo está estrechamente relacionado al ciclo de desarrollo larvario de su huésped *A. mellifera* (Rosenkranz *et al.*, 1904). Su ciclo de vida es comprendido por dos fases, la fase forética y la fase reproductiva (Figura 1.3). La fase forética es cuando estos ácaros están adheridos a las abejas adultas y ocurre por completo sobre ellas, puede durar de cinco a once días cuando hay cría en la colmena, pero el ácaro es capaz de permanecer por más tiempo en esta fase durante la ausencia de cría (Huang, 2012), incluso se ha reportado que puede tener una duración de hasta seis meses, durante los períodos de bajas temperaturas (Huang, 2012; NCSEP, 2016). En cambio, la fase reproductiva se lleva a cabo dentro de las celdas que contienen larvas en desarrollo, con una marcada preferencia por desarrollarse en las celdas que contienen cría de zánganos, tendencia

que se aprovecha para controlar la población de estos ácaros (Marcangeli *et al.*, 2003; Wantuch y Tarpy, 2009), práctica denominada control biológico. La fase reproductiva inicia cuando un ácaro hembra grávida entra a una celda con cría de abeja en estado larval de cinco a seis días de edad, esta se mantiene en el fondo junto con el alimento larval para evitar ser detectada (Fig. 1.3, No. 1). Transcurridas 60 horas después de la operculación de la celda, el ácaro hembra inicia la oviposición de un primer huevo (Fig.1.3, No. 2), seguido de uno nuevo cada 30 horas (Fig. 1.3, No. 3). El primer huevo dará origen a un ácaro macho y los seguidos de éste serán hembras (Fig. 1.3, No. 4). Tras cinco o seis días, el ácaro macho alcanza la etapa adulta (Fig. 1.3, No. 5), mientras que las hembras tardan de siete a ocho días (Fig. 1.3, No. 6). Cuando el ácaro hembra adulto entra en una celda de un zángano puede colocar más huevos, hasta seis, mientras que en una celda de obrera coloca menos, hasta cinco. Sin embargo, las abejas obreras y los zánganos emergen a los 11 y 14 días respectivamente, lo cual limita el número de ácaros que pueden emerger de ellas (Huang, 2012). Inmediatamente tras alcanzar la etapa adulta, se realiza el apareamiento dentro de la celda (Fig. 1.3, No. 7 y 8). Los ácaros que no lograron alcanzar la etapa adulta en la celda mueren después de que emerge la abeja que se desarrollaba en dicha celda, al igual que el ácaro macho, en ambos casos por deshidratación debido a la inmadurez de su cutícula. Normalmente, solo de dos a tres ácaros hija alcanzan la etapa adulta (Huang, 2012) y logran emerger junto con el ácaro madre de la celda para continuar el ciclo (Fig. 1.3, No. 9). Estos ácaros hembra son capaces de pasar por la fase reproductiva hasta por cuatro ocasiones.

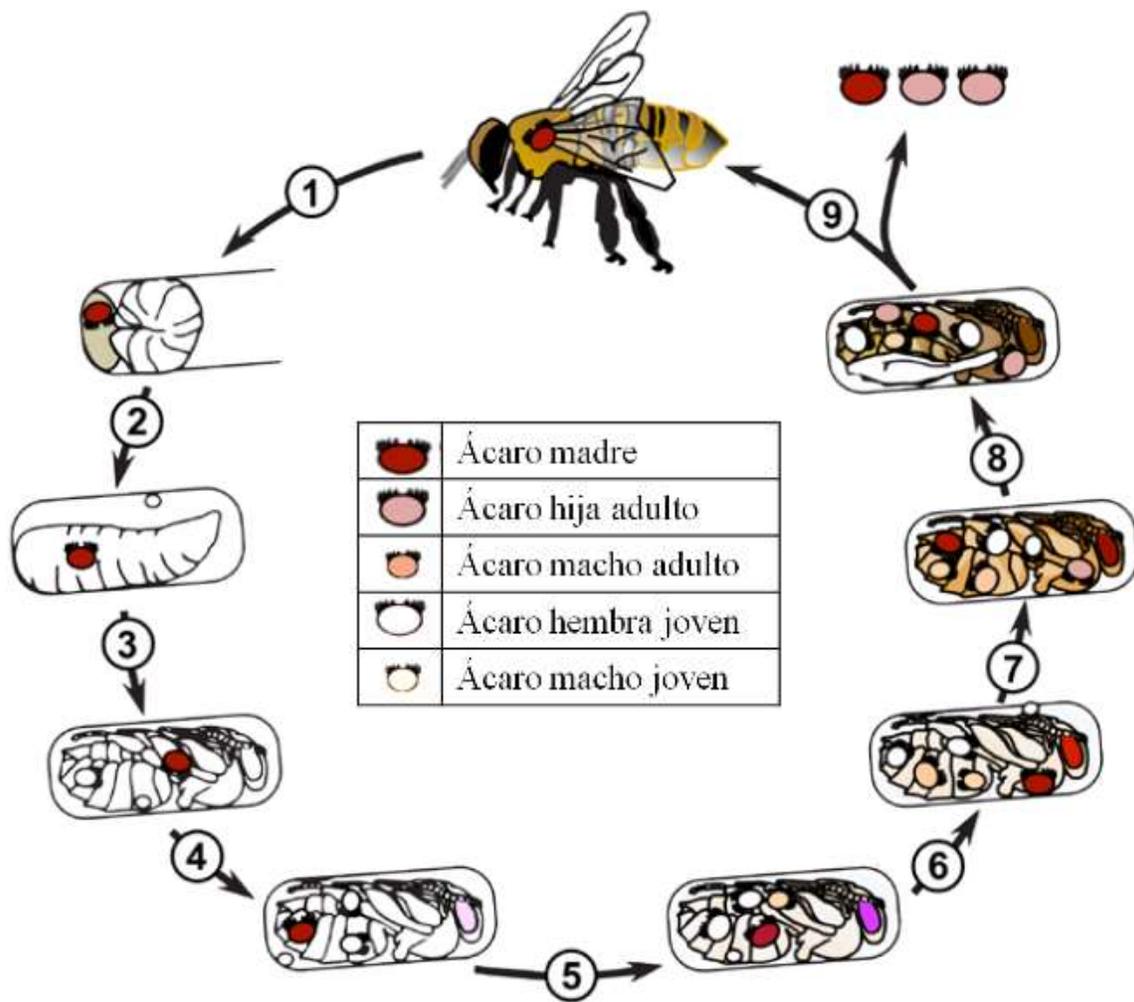
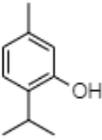
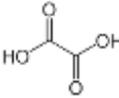
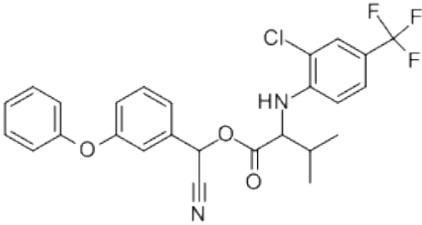
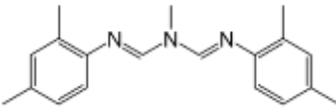
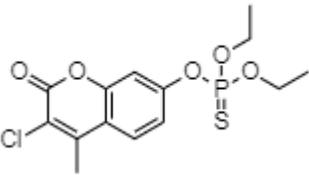
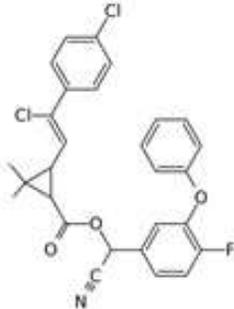


Figura 1.3 Ciclo de vida de *Varroa destructor*. La fase reproductiva de *Varroa destructor* se lleva a cabo dentro de las celdas con cría en desarrollo, y la fase forética en las abejas adultas (Modificado de Harris *et al.*, 2016).

1.1.3 Medidas de control

Tras el descubrimiento del ácaro *V. destructor* se han desarrollado diferentes productos para su control, tanto de origen sintético, como natural (Tabla 1.3) (SAGARPA, 2005; Martínez *et al.*, 2011). Los acaricidas sintéticos o también llamados químicos, generalmente de alta eficiencia y fácil aplicación, suelen tener un costo elevado, lo que limita su uso por parte de los apicultores, los cuales recurren al uso de tratamientos no autorizados o a aplicarlos de manera inadecuada, provocado así, el surgimiento de resistencia por parte de los ácaros (Knolhoff, 2013). Entre los productos más usados se encuentran el amitraz, coumafós, flumetrina y el fluvalinato (Rosenkranz *et al.*, 1904), los cuales tienen la desventaja del gran riesgo de contaminación de los productos de la colmena, como la miel y la cera con sus residuos que, además de afectar la calidad de éstos (Rosenkranz *et al.*, 1904; Le Conte *et al.*, 2010), pueden afectar la salud de los mismos apicultores y de los consumidores (Stanimirovic *et al.*, 2005).

Tabla 1.3 Tratamientos utilizados para el control de *Varroa destructor*. Datos de los tratamientos de origen natural (o alternativos) y sintéticos (o químicos) utilizados para el control de *V. destructor*.

Nombre comercial	Principio activo	Estructura química	Tipo de tratamiento
Apiguard® Thymovar®	Timol		Alternativo
Ecoxal®	Ácido oxálico		
MAQS™	Ácido fórmico		
Apistan®	Fluvalinato		Químico
Apitraz® Apivar®	Amitraz		
Check-Mite+® Perizin®	Coumafos		
Bayvarol®	Flumetrina		

Entre las ventajas de los tratamientos de origen natural, denominados también como tratamientos alternativos, están la alta eficiencia en el control del ácaro, un menor costo y mayor accesibilidad de los apicultores a dichos tratamientos. Sin embargo, al igual que los

tratamientos sintéticos éstos generan efectos adversos en las abejas y algunos requieren de una aplicación laboriosa, como en el caso del ácido oxálico, el cual se aplica en forma de jarabe. Entre los tratamientos alternativos promisorios se encuentran los aceites esenciales y sus componentes, así como algunos ácidos orgánicos. La principal ventaja del uso de este tipo de tratamientos es que están permitidos en la apicultura orgánica, por lo que le dan un valor agregado a los productos de la colmena.

Existen diferentes formas farmacéuticas para la administración de los tratamientos (Figura 1.4, A), podemos encontrarlos en tiras de polímeros impregnadas con el principio activo, esta matriz permite una liberación constante y sostenida; en forma de polvo o gránulos, que se aplican directamente en bandejas dentro de la colmena o en forma de jarabe (Figura 1.4, B), sin embargo, la sublimación y por lo tanto, el efecto de este tipo de tratamientos sobre los ácaro e incluso sobre las abejas dependerá de la temperatura ambiental, representando un reto en clima tropicales o en los que se alcanzan temperaturas por encima de los 34 °C.

Por lo general los tratamientos tienen una duración de 21 días y los productos deben colocarse en la cámara de cría. Cada producto tiene indicaciones particulares para su aplicación, que han sido estipuladas por su casa comercial, desde los períodos del año recomendados, así como la frecuencia, cantidad y duración de la aplicación del tratamiento.



Figura 1.4 Productos para el control de *Varroa destructor*. A) Formas farmacéuticas de los productos y B) forma de aplicación.

1.1.3.1 Consecuencias del uso de acaricidas

Los compuestos de origen sintético han sido ampliamente utilizados para el control de esta plaga, sin embargo, a pesar de ser muy eficaces suelen provocar el surgimiento de

ácaros resistentes debido a su uso inadecuado. Además de la contaminación de los productos de la colmena, los acaricidas pueden provocar daños graves en el humano, como en el caso del hidrocloruro de cimiazol, que es un acaricida sistémico (es consumido por la abeja) y ha mostrado ser un agente genotóxico en estudios realizados en cultivos de linfocitos humanos (Stanimirovic *et al.*, 2005); lo que pone en riesgo la salud de los apicultores y de los consumidores si es usado de manera inadecuada y entra en contacto con los productos de la colmena.

1.1.3.1.1 Efectos secundarios de los tratamientos químicos en las abejas

Los acaricidas sintéticos o llamados también tratamientos químicos, utilizados para el control del ácaro *V. destructor* son el amitraz, el coumafós y el fluvalinato. En evaluaciones que se han realizado con estos tratamientos se ha encontrado que reducen la vida de la colonia y la viabilidad del esperma de los zánganos (Burley *et al.*, 2008), así como del esperma que se encuentra almacenado en la espermateca de las reinas (Rinderer *et al.*, 1999; Burley *et al.*, 2008; Chaimanee *et al.*, 2016). Los efectos secundarios que genera el coumafós han sido los más estudiados, entre ellos destacan las alteraciones que presentan las abejas reinas y los zánganos. Se ha comprobado que la exposición a este compuesto y a fluvalinato provoca la disminución de la viabilidad del esperma contenido en la espermateca de las reinas (Rangel y Tarpy, 2015; Tihelka, 2018). Además, disminuye el nivel de expresión de genes relacionados con la subfamilia P450 y suprime la expresión de genes relacionados con la inmunidad, actividad antioxidante y el desarrollo (Chaimanee *et al.*, 2016), ocasionando reinas de menor peso e incluso la pérdida de crías de reina. Por lo tanto, ocasiona el acortamiento del período de vida, reduce la capacidad reproductiva e incrementa el estrés oxidativo en las abejas reinas (Rinderer *et al.*, 1999; Burley *et al.*, 2008). Se ha reportado también, que la exposición al coumafós y fluvalinato perjudica el aprendizaje olfativo, la memoria, locomoción y el comportamiento de aseo, así como la trofolaxis en las abejas, y en un estudio se observó que abejas desarrolladas en panales con residuos de ambos productos fueron más susceptibles a presentar infecciones como el virus de alas deformadas y por *Nosema ceranae*, lo que podría ocasionar el colapso de la colmena (Tihelka, 2018). Otros efectos demostrados de la exposición a coumafós son el desarrollo fallido y rechazo de reinas y de lograr desarrollarse presentan menor peso corporal. Así

como con la exposición al coumafos, las abejas reinas expuestas a fluvalinato presentan una alta mortalidad, ovarios de menor peso, menor masa corporal, menos número de esperma, anormalidades físicas y comportamiento atípico, así como otras características que hacen inviable su uso comercial (Tihelka, 2018). Además, la exposición a fluvalinato ocasiona alteraciones en el peso, número de espermatozoides y viabilidad, y en el peso de las vesículas seminales de los zánganos, donde todos ellos se ven disminuidos e incluso puede ocasionar su muerte. También se reportó que el tratamiento durante seis meses con tiras de 250 mg de fluvalinato ocasiono el cese de oviposición y muerte de la reina en un experimento, mientras que la contaminación de las celdas ocasiona que las nuevas reinas coloquen huevos no fertilizados.

Un efecto indeseable es que estos productos se acumulan dentro de la colmena en la miel, la cera y el polen. Aun cuando se acumulen en concentraciones bajas, éstas pueden afectar subletalmente la fisiología, neurología, metabolismo y/o el comportamiento de las abejas (Dai *et al.*, 2018; Tihelka, 2018). Además, esta acumulación conduce a una exposición crónica de las abejas adultas y la cría, comprometiendo el futuro de la colonia, ya que los efectos subletales, como la fisiología alterada, la función deteriorada o la vida útil reducida de las abejas adultas dentro de la colmena pueden provocar la disminución de la población de abejas (Dai *et al.*, 2018).

1.1.3.1.2 Efectos secundarios de los tratamientos alternativos actuales en las abejas

Dentro de los tratamientos que se utilizan para controlar al ácaro *V. destructor*, existen algunos de origen natural, los cuales pueden clasificarse en dos grupos, en componentes de aceites esenciales y en ácidos orgánicos, siendo las sustancias más representativas el timol, el ácido fórmico y el ácido oxálico (Tihelka, 2018). A diferencia de los compuestos de origen sintético, por lo general, los compuestos derivados de plantas suelen ser menos peligrosos para las abejas, los humanos (Imdorf *et al.*, 1999) y otros organismos en la colmena, se presenta un menor riesgo de contaminación de los productos de la colmena y se dice que existe una baja posibilidad de desarrollo de resistencia a estos (Qamar, 2000; Singh, 2014). Sin embargo pese a tratarse de productos naturales, han sido descrito algunos efectos adversos a éstos, al igual que los productos sintéticos. Así mismo, se ha

considerado que los acaricidas, cual sea su origen, pueden contribuir al colapso de la colmena al combinarse con otros estresores como microorganismos patógenos, plaguicidas, e incluso con las condiciones climáticas, donde los acaricidas estarían contribuyendo al provocar una susceptibilidad ante estos factores (Tihelka, 2018). Se ha observado también, que la susceptibilidad o resistencia individual de las abejas a los acaricidas esta mediada por múltiples factores, como la edad, casta, el estrés, la temperatura ambiental, la carga de patógeno (si se encuentra enferma) y la dosis de acaricida a la que fue expuesta (Tihelka, 2018).

El timol ha sido utilizado para combatir a *V. destructor*, sin embargo, se han reportado que genera múltiples efectos secundarios. En 1997 se realizó una evaluación con algunos monoterpenoides, entre ellos el timol, donde se encontró que éste al igual que el mentol resultaron los compuestos más tóxicos para las abejas (Imdorf *et al.*, 1995; Ellis y Baxendale, 1997). El tratamiento con este producto incrementa la agresividad de la colonia y se ha descrito que es tóxico principalmente para las larvas, provoca un aumento en la remoción y disminución del área cría (Ellis *et al.*, 2001; Floris *et al.*, 2004; Tihelka, 2018), así como su desplazamiento. Además, se ha comprobado que produce efectos negativos sobre la longevidad de abejas adultas que han sido expuestas a este tratamiento y en abejas que durante su estadio larval fueron expuestas a concentraciones de 50 ppm y a concentraciones mayores disminuye la supervivencia de las larvas. En zánganos provoca la disminución de la producción de esperma en mayor grado que el coumafos y el fluvalinato (Burley, 2007). También se ha comprobado que es capaz de acumularse en los diferentes productos de la colmena, y a pesar de que se ha reportado que después de dos semanas de la aplicación del tratamiento los residuos en miel y cera se evaporan y reducen (Floris *et al.*, 2004), en un estudio se observó que en la cera de panales provenientes de colmenas que habían sido tratadas con timol un año atrás presentaron en promedio 10 mg de timol por cada kilogramo de cera y la cantidad máxima de timol detectada fue de 1g/kg de cera (Carayon *et al.*, 2014).

Entre las ventajas de utilizar ácido fórmico para el control de *V. destructor*, esta su volatilidad, lo que favorece que se evapore fácilmente e incluso logra atravesar las celdas operculadas, por lo que es posible eliminar los ácaros en fase reproductiva que se encuentran en el interior de las celdas. De igual manera como resulta ventajosa su

volatilidad, es la limitante que presenta este compuesto, debido a que las condiciones ambientales estarían influenciando su evaporación. El rango de temperatura recomendable para su uso es de 10 a 29 °C, en temperaturas superiores genera la muerte de la cría y reinas, mientras que por debajo de los 10 °C pierde efectividad y a 37 °C provoca muerte de la colonia (Johnson, 2015). Además, el tratamiento con este ácido puede ocasionar que las abejas remuevan las crías de zánganos, retrasen la producción de ellos, así como la reducción de la supervivencia de los mismos (Tihelka, 2018). Bajo condiciones de laboratorio se ha demostrado que a altas concentraciones inhibe la toma de oxígeno en las abejas jóvenes y ocasiona la disminución del número de sensillas antenales, las cuales poseen una función sensorial. A su vez, las colmenas tratadas con este ácido, así como las tratadas con ácido oxálico, suelen presentar una menor cantidad de cría; el tratamiento con 20 a 40 mL de este ácido al 60% reduce la tasa de respiración y alimentación de las larvas, con lo que puede explicarse lo anterior (Tihelka, 2018). El ácido fórmico también es capaz de alterar la inmunidad de las abejas adultas, se ha observado que la cutícula de abejas bajo este tratamiento presentan una disminución de actividad antimicrobiana, por lo que son susceptibles a presentar otras enfermedades, principalmente de origen fúngico (Tihelka, 2018).

El tratamiento con ácido oxálico es aceptado en la producción de miel orgánica, una de las formas de administración consisten en atomizar sobre los cuadros de la colmena una solución de esta sustancia, o por goteo, en solución con sacarosa. El empleo de este ácido ha mostrado ser eficaz para controlar al ácaro *V. destructor*, sin embargo, las únicas limitantes son lo laborioso de las aplicaciones y que el tratamiento no elimina a los ácaros que se encuentran dentro de las celdas operculadas, por lo que la temporada ideal para su uso es cuando no hay presencia de cría. Además, existe riesgo si las abejas lo consumen y se ha demostrado que provoca muerte celular (Gregorc *et al.*, 2004; Johnson, 2015; Tihelka, 2018). Puede ocasionar la muerte tanto de la cría como de las reinas, y las abejas presentan susceptibilidad a este compuesto durante la primavera y el verano, debido al estrés al que son expuestas durante esta temporada. Además, la colonia queda susceptible a bajas temperaturas durante la aplicación del tratamiento, lo que puede ocasionar la muerte de algunos individuos y el surgimiento de enfermedades.

Todos estos tratamientos son aceptados en la producción de miel orgánica, sin embargo, de todos ellos se han reportado efectos adversos en las abejas, y a su vez, la eficacia y seguridad de todos ellos depende de la temperatura ambiental, lo cual convierte su alta volatilidad en su principal desventaja.

1.1.4 Importancia de la microbiota de los insectos

Es común que existan asociaciones entre insectos y microorganismos, en algunos casos puede ser debidas a interacciones casuales o de carácter obligatorio. En comparación con la gran diversidad de microorganismos que existen, son relativamente pocos los casos en los que se ha identificado la función o papel específico que cumplen (Vega y Dowd, 2005). Estos descubrimientos han sido posibles gracias a la capacidad de criar insectos en condiciones asépticas, lo que permite controlar su microbiota, ya sea que se provoque una reducción de esta, o la presencia o ausencia de la misma.

En numerosos estudios se ha comprobado que la alteración de la microbiota de los insectos afecta las tasas de supervivencia, el crecimiento e incluso la reproducción y esto se debe a que la microbiota juega un papel importante en la nutrición del huésped, ya que generalmente los insectos carecen de enzimas necesarias para degradar polisacáridos e incluso hasta moléculas de azúcar más simples, por lo que es la microbiota quien se encarga de la digestión no solo de azúcares (polisacáridos, almidones), sino también, de proteínas, péptidos, grasas y ácidos grasos. Además de estas funciones digestivas, se ha demostrado que la microbiota también es capaz de degradar compuesto tóxicos presentes en la dieta de su huésped (Vega y Dowd, 2005).

1.1.4.1 Importancia de la microbiota de las abejas

Desde su origen evolutivo tanto animales como plantas han estado expuestos a microorganismos, como resultado de estas interacciones es que existen comunidades microbianas que son específicas de cada huésped e incluso exclusivas de un tejido en particular; siendo el tracto gastrointestinal (en el caso de los animales) donde se encuentran las más densas y diversas comunidades microbianas. Como consecuencia de esta interacción la microbiota cumple algunas funciones simbióticas en los animales relacionadas con el metabolismo, el desarrollo, la resistencia a patógenos y hasta la

maduración del sistema inmunológico. Esta microbiota está compuesta por comunidades especializadas que son taxonómica y funcionalmente diversas, dado que es afectada por factores fisiológicos como la dieta, el metabolismo, el sistema inmunológico y la anatomía intestinal, así como por factores ecológicos, como las interacciones con otros microorganismos (Bonilla-Rosso y Engel, 2018). En las abejas melíferas no es la excepción, se ha comprobado que existen microorganismos en común presentes en abejas obreras de diferentes regiones geográficas. Además, estos microorganismos están relacionados con otras abejas corbiculadas y que generalmente no se encuentran en otros sistemas, lo que sugiere que se trata de asociaciones simbióticas antiguas y especializadas. También es normal encontrar otros microorganismos que no son comunes entre las abejas de diferentes regiones y edades, esto se debe a que son microorganismos que se encuentran solo en el entorno donde se desarrolla el huésped en cuestión. A su vez, los cambios que se presentan en el entorno del huésped, como las diferentes épocas del año, provocan variaciones en la composición de la microbiota, debido a los cambios en sus fuentes de alimento (Bonilla-Rosso y Engel, 2018).

Mediante experimentos *in vivo* y con ayuda de la genómica, se ha logrado descubrir que la microbiota de las abejas resulta relevante para que el desarrollo, la salud y la vida de las abejas sean óptimos. La dieta de las abejas es altamente específica, ya que solamente se basa en néctar y polen, así como de los productos que forman a partir de ellos; algunos de los microorganismos que conforman su microbiota son capaces de degradar la pectina presente en el polen (Engel *et al.*, 2012) y dan lugar al llamado pan de abeja. Éste es el resultado de la mezcla de néctar, polen, secreciones de las abejas y microorganismos, estos últimos permiten su degradación y fermentación. Estos procesos de transformación que sufre el polen hacen posible que las abejas puedan aprovechar los nutrientes presentes en el interior de éste. Algunos microorganismos tienen la capacidad de degradar azúcares del néctar que son tóxicas para las abejas (Barker, 1977; Crane, 1978; Engel *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2017; Bonilla-Rosso y Engel, 2018), como la manosa, arabinosa, xilosa y ramnosa (Zheng *et al.*, 2016).

Por lo anterior, habría consecuencias graves en la nutrición y por lo tanto en la salud de las abejas, así como en el desarrollo de las colonias si éstas carecieran de su microbiota o ésta se viera afectada. Se ha demostrado también, que esta microbiota le confiere a las

abejas cierta protección contra infecciones por microorganismos patógenos (Burley *et al.*, 2008; Chaimanee *et al.*, 2016), al competir por nutrientes y por sitios de unión en el epitelio del intestino (Ptaszynska *et al.*, 2016).

A pesar de que el conocimiento sobre la microbiota de las abejas no es un campo virgen en la investigación y se sabe que tiene un papel importante en la vida de las abejas, actualmente no existen trabajos en los que sea evaluado el efecto de los compuestos acaricidas usados contra *V. destructor* sobre la microbiota de las abejas. Sin embargo, existe evidencia de que las sustancias a las que se exponen las abejas tienen efecto sobre su microbiota, como lo es la exposición al glifosato, un plaguicida utilizado a nivel mundial en la agricultura, del cual recientemente se ha demostrado que es capaz de alterar la composición de la microbiota de las abejas, provocándoles susceptibilidad e incremento en la mortalidad ante patógenos oportunistas (Motta *et al.*, 2018).

1.1.5 Levaduras asociadas a las abejas

La mayoría de los estudios relacionados con la microbiota de las abejas se basan principalmente en las bacterias que la conforman, sin embargo, también forman parte de ella algunos hongos y entre ellos se encuentran algunas levaduras (Ptaszynska *et al.*, 2016), de las cuales se han reportado principalmente especies de los géneros *Candida*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces*.

En Yucatán existen reportes de levaduras asociadas a abejas productoras de miel (Lizama, 2011) y recientemente fueron aisladas algunas levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Kurtzmaniella* y *Zygosaccharomyces* de abejas de la especie *Scaptotrigona pectoralis*, *Melipona beechi* y *Apis mellifera* (Tabla 1.4), en el Meliponario y Apiario de abejas africanizadas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), ubicados en Xmatkuil (Lizama, 2011; comunicación personal Dra. María Azucena Canto Aguilar).

Tabla 1.4 Levaduras aisladas en colonias de abejas productoras de miel en Yucatán.

Levadura	Sitio de aislamiento (especie)
<i>Candida versatilis</i>	Celda de cría con alimento (<i>Scaptotrigona pectoralis</i>)
<i>Candida apicola</i>	Estómago, pan de abeja y miel (<i>Apis mellifera</i>)
<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	Ánfora de miel (<i>Melipona beecheii</i>) Miel (<i>Apis mellifera</i>)
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	Ánfora de polen (<i>Scaptotrigona pectoralis</i>) Miel (<i>Apis mellifera</i>)

(Lizama, 2011; Dra. María Azucena Canto Aguilar, comunicación personal)

A excepción de *K. cleridarum*, fue reportado con anterioridad el aislamiento de estas levaduras en el néctar de algunas especies de plantas (Tabla 1.5) en Yucatán (Canto *et al.*, 2011). Esto indica que en la región existe una microbiota conformada por levaduras que están asociadas a las fuentes de alimento de las abejas y a las colonias de abejas, por lo que es importante considerarlas al momento de desarrollar nuevos productos para el control de plagas.

Tabla 1.5 Levaduras aisladas de néctar floral en Yucatán. Plantas visitadas por *Scaptotrigona pectoralis*, *Melipona beechi* y *Apis mellifera*.

Levadura	Sitio de aislamiento (especie)
<i>Candida versatilis</i>	<i>Gossypium hirsutum</i> (Malvaceae) <i>Malvaviscus arboreus</i> (Malvaceae)
<i>Candida apicola</i>	<i>Cordia sebestena</i> (Boraginaceae)
<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	<i>Opuntia dillenii</i> (Cactaceae)

(Canto *et al.*, 2017)

1.1.6 Alternativas para el control de *Varroa destructor*

Debido a la resistencia a los tratamientos y a los riesgos de su empleo, es necesaria la búsqueda de alternativas que además de ser eficaces, sean seguras tanto para las abejas como para los microorganismos asociados a éstas, así como para los consumidores y el

ambiente. Con este fin, se han realizado estudios con extractos de algunas especies vegetales y han mostrado actividad en bioensayos con ácaros de otras especies (Rosado-Aguilar *et al.*, 2008; Rosado-Aguilar *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010; Rosado-Aguilar *et al.*, 2010; Sepúlveda *et al.*, 2013). También se ha evaluado el uso de aceites esenciales en bioensayos con *V. destructor* y han demostrado ser eficaces, principalmente los de *Zaratia multiflora*, *Saturea hortensis* y *Mentha spicata* (Ariana *et al.*, 2002), pero se requiere de más estudios para comprobar su inocuidad en *A. mellifera* y microorganismos asociados. En este sentido, *Lonchocarpus punctatus*, *Critonia aromatisans*, *Cymbopogon citratus* y *Plectranthus amboinicus* son algunas especies de plantas que presentan distribución en la Península de Yucatán de las que se han reportado metabolitos con actividad insecticida y acaricida (Menéndez y Pavón, 1999; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Ayvaz *et al.*, 2010; Meza y Taborda, 2010; Méndez-Gonzalez *et al.*, 2012; Owino y Matasyoh, 2015), por lo que podrían emplearse como alternativas para el control de *V. destructor* y a continuación se describen sus características principales.

1.1.6.1 *Lonchocarpus punctatus* Kunth

Lonchocarpus punctatus (Figura 1.5) conocida también bajo los sinónimos *L. longistylus* Pittier; *L. violaceus* (Jacq.) Kunth ex D.C. y *Ceasalina violácea* (Mill.) Standl es una especie arbórea que se distribuye a lo largo de la Península de Yucatán, Chiapas, Belice, Guatemala, Venezuela y Brasil. En Yucatán es comúnmente conocido como balché (Maya), es una planta melífera que es utilizada como fuente de leña y en la preparación de una bebida ancestral Maya llamada “balché”, en la que se utiliza su corteza en combinación con agua y miel. Puede llegar a medir hasta 18 metros de altura, con tallo lenticelado de hasta 30 cm de diámetro y hojas con 15 folíolos y ovaladas. Su inflorescencia se presenta en racimos de 20 a 25 cm de largo y de color lila o azul-purpura (Figura 5) y sus frutos en vainas, (característico de las Fabáceas, Tabla 1.6) cortas y anchas de 10 a 15 cm de largo y de 3 a 4 cm de ancho, de color café claro en la madurez y con solo 2 o 3 semillas de forma arriñonada de 1 a 1.25 cm, planas y de color café amarillento. Florece solamente en los meses de Octubre y Noviembre, pero su fruto puede encontrarse desde Noviembre a Junio.



Figura 1.5 *Lonchocarpus punctatus* Kunth en floración.

Tabla 1.6 Taxonomía de *Lonchocarpus punctatus*.

Dominio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión	<i>Spermatophytina</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Subfamilia	<i>Papilionoideae</i>
Género	<i>Lonchocarpus</i>
Especie	<i>Lonchocarpus punctatus</i> Kunth

1.1.7.1.1 Uso tradicional

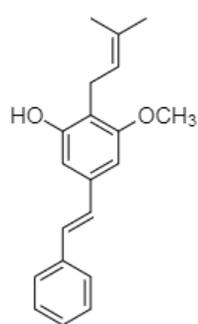
Uso medicinal contra infecciones orales en general, como estomatitis aftosa y úlceras bucales (Arellano-Rodríguez, 2003; Levy-Tacher *et al.*, 2006; Grandtne y Chevrette, 2013; Rodríguez, 2015). También, contra dolor de cabeza, asma, broncoespasmo y catarro

(Méndez-González *et al.*, 2012). La infusión de las hojas se utiliza para tratar la tos y en la limpieza de heridas infectadas. Usado en forma de enema el licor de balché tiene efecto laxante (Avilés-Peraza., 2015).

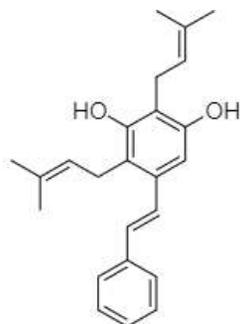
1.1.7.1.2 Conocimiento fitoquímico

El género *Lonchocarpus* es buena fuente de diferentes clases de polifenoles, como auronas, chalconas, derivados de dibenzoilmetano, pterocarpanos, rotenoides (Duke *et al.*, 2010), flavanonas, flavonoides, flavanos, flavonoles e isoflavonas (Baskin, 2004).

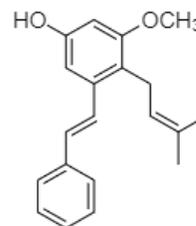
Lonchocarpus punctatus contiene en su mayoría compuesto de tipo estilbeno y en menor proporción de tipo flavonoide. De las partes aéreas (hojas y flores) se han aislado los estilbenos isoméricos *cis* y *trans* de 3, 5,4'-trimetoxiestilbeno y 3,5-dimetoxiestilbeno, 3, 4,4',5- tetrametoxi-*trans*-estilbeno y la flavona 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (Borges-Argáez, 2017) y en la corteza de la raíz los estilbenos longistilina A, B y C (Méndez-González *et al.*, 2012). En la Figura 1.6 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.



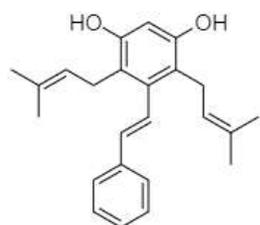
Longistilina A



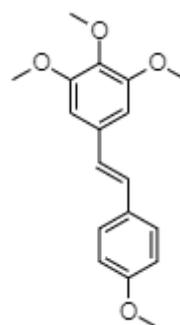
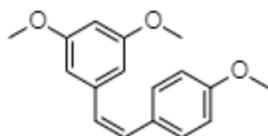
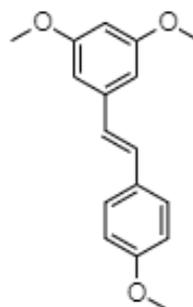
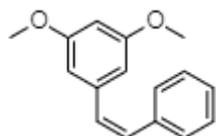
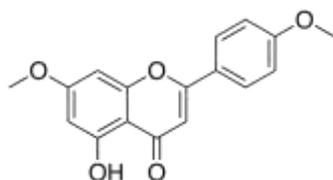
Longistilina B



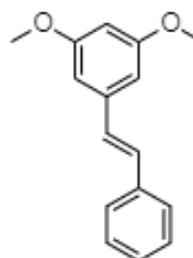
Longistilina C



Longistilina D

3,4,4',5- tetrametoxi-*trans*-estilbeno3,5,4'-trimetoxi-*cis*-estilbeno3,5,4'-trimetoxi-*trans*-estilbeno3,5-dimetoxi-*cis*-estilbeno

5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona

3,5-dimetoxi-*trans*-estilbeno**Figura 1.6** Metabolitos aislados de *Lonchocarpus punctatus*.

1.1.6.2 *Critonia aromatisans* (DC.) R. M. King & H. Rob

Critonia aromatisans (Figura 1.7) es una especie herbácea distribuida en las Antillas, principalmente en Cuba, naturalizada y cultivada en la región de la península de Yucatán, donde se le llama comúnmente Chiople. Pertenece a la familia Asteraceae (Tabla 1.7) y entre los sinónimos de su nombre se encuentra *Eupatorium aromatisans* DC. Y *Eupatorium hemipteropodum* B.L. Rob. Es una hierba robusta de tallo leñoso, que puede medir hasta tres metros de alto, con hojas opuestas, las inferiores son ovadas y delgadas de 18 a 25 cm de largo y de 12 a 15 de ancho y las hojas superiores tienen forma deltoide-ovadas, de 8 a 10 cm de largo y 5 a 7 cm de ancho. Su inflorescencia se presenta en panícula, ovoide y de 7 cm de diámetro. La inflorescencia y los frutos se presentan al inicio de la primavera, su fruto indehisciente, conocido como aquenio, puede medir hasta 4.5 mm de largo y de coloración oscura.



Figura 1.7 *Critonia aromatisans*. (DC.) R. M. King & H. Rob.

1.1.6.2.1 Uso tradicional

De uso medicinal como antiinflamatorio y para tratar el dolor de cabeza, reumáticos y musculares, aplicando las hojas directamente en el área afectada o como tintura o en pomadas junto con otras plantas (Méndez-González *et al.*, 2012; Villa, 2014).

Tabla 1.7 Taxonomía de *Critonia aromatisans*.

Dominio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Género	<i>Critonia</i>
Especie	<i>Critonia aromatisans</i> (DC.) R. M. King & H. Rob

1.1.6.2.2 Conocimiento fitoquímico

En extractos no polares se ha reportado que su composición es principalmente de ácidos grasos y terpenoides, además de componentes mayoritarios como cumarina y derivados, ciccolorenona, acetato de lupenilo, palmitato de metilo y estigmasterol (Méndez-González *et al.*, 2012; Villa *et al.*, 2017). En la siguiente Figura (Figura 1.8) se muestran las estructuras químicas de algunos de estos compuestos.

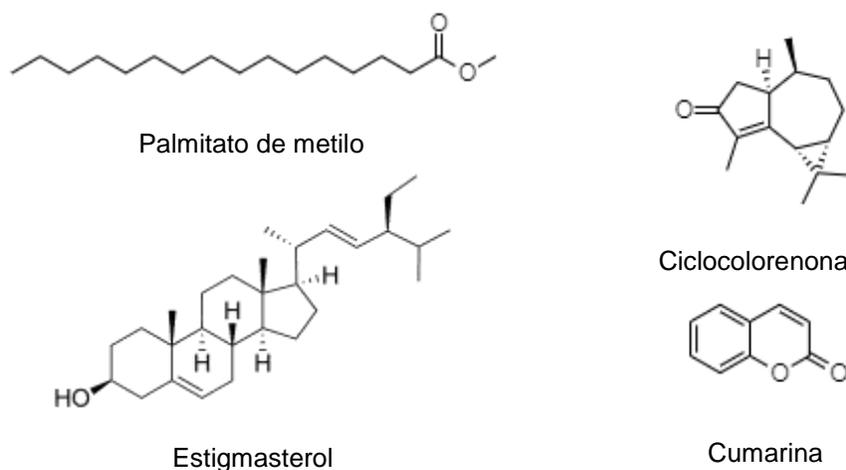


Figura 1.8 Metabolitos aislados de *Critonia aromatisans*.

1.1.6.3 .*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Cymbopogon citratus (Figura 1.9) (sinónimo: *Andropogon citratus* D.C.) pertenece a la familia Poaceae (Tabla 1.8) y es una planta originaria de la zona tropical de Asia, India y Sri Lanka. En la actualidad se encuentra distribuido en gran parte de México, principalmente en regiones de clima cálido, semicálido y templado. Asociado a la selva caducifolia, subcaducifolia y perennifolia. Se cultiva en regiones tropicales y subtropicales como planta medicinal y como especia, también para techar y controlar la erosión. En México es conocida por el nombre de zacate limón o té de limón. Se utiliza como repelente de insectos y como barrera viva alrededor de apiarios para ahuyentar a las hormigas. Es una planta herbácea perenne, puede medir entre 0.5 a 2 m de altura, aromática, con un ligero olor a limón. Hojas arrosetadas en la base de la planta, lineales y de hasta un metro de longitud. Su inflorescencia en se presenta en panículas de espiguillas (Fonnegra y Jiménez, 2007).



Figura 1.9 *Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf

Las especies pertenecientes al género *Cymbopogon* se cultiva en numerosos países para la obtención de aceite esencial, el cual es de gran importancia para la industria, donde es utilizado principalmente para la extracción de citral (mezcla de neral y geranial) (Ramírez-Ortega, 2013) uno de sus componentes mayoritarios y el responsable de su característico olor a limón (Vázquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2017). Los aceites esenciales ricos en este compuesto presentan propiedades bactericidas y fungicidas (Vázquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2017) y es importante para la perfumería, confitería, licores, y empleado como materia prima en la síntesis de iononas y de vitamina A (Soto *et al.*, 2002).

Tabla 1.8 Taxonomía de *Cymbopogon citratus*.

Dominio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Poales</i>
Familia	<i>Poaceae</i>
Género	<i>Cymbopogon</i>
Especie	<i>Cymbopogon citratus</i>

1.1.6.3.1 Uso tradicional

Las hojas y el tallo tienen uso medicinal como infusión para calmar los nervios, como antitusivo, para el tratamiento de la tuberculosis, el asma y la malaria, ya que posee actividad febrífuga y moderadamente sedante, por lo que se utiliza también para combatir el insomnio. Además, es excelente estimulante digestivo y útil en todo tipo de trastornos digestivos, por lo que se utiliza como laxante, antihelmíntico, carminativo, para aliviar el malestar estomacal y antiespasmódico (Arellano-Rodríguez, 2003; Germosén-Robineau, 2014). Es un ingrediente de varios licores por sus propiedades digestivas. La infusión de hojas también actúa como tónico y antineurálgico. La maceración de sus hojas es empleada para combatir el vértigo, neuralgias y trastornos digestivos y ayuda a calmar el dolor dental en forma de compresas o mediante su masticación (Veléz-Rodríguez, 2015).

1.1.6.3.2 Conocimiento fitoquímico

En la Figura 1.10 se muestran las estructuras químicas de algunos compuestos que se han detectado en esta especie. De sus hojas se puede extraer entre 0.20 a 0.25% de aceite esencial y en algunos casos más de 1.0%, el cual está compuesto por limoneno, citral (mezcla de neral y geranial), β -mirceno, citronelal, geraniol, 40 a 45% de sesquiterpenos, verbenona, aldehídos y cetonas entre los componentes mayoritarios (Veléz-Rodríguez, 2015). En el aceite esencial de sus partes aéreas se han identificado compuestos como sesquiterpenos y monoterpenos y de sus hojas secas se han aislado flavonoides y fenilpropanoides (Fonnegra y Jiménez, 2007; Méndez-González *et al.*, 2012). Además, mediante el tamizaje fitoquímico del extracto hexánico se han identificado la presencia de esteroides, triterpenos y mucilagos, mientras que en el extracto metanólico además de lo anterior se presentan catequinas, fenilpropanoides, cumarinas y metilencetonas (Veléz-Rodríguez, 2015).

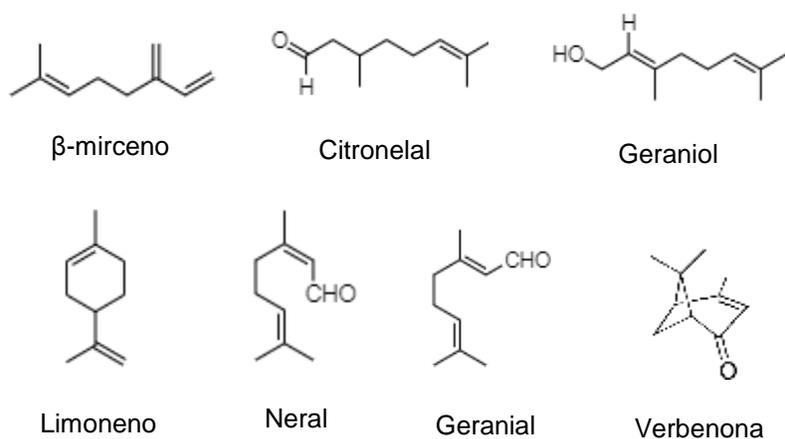


Figura 1.10 Metabolitos aislados de *Cymbopogon citratus*.

1.1.6.4 *Plectranthus amboinicus* Lour

Plectranthus amboinicus (Figura 1.11) es una planta herbácea perenne, es originaria de Asia tropical y se encuentra de manera natural en los trópicos y regiones cálidas de África, Asia y Australia; actualmente presenta distribución en América tropical. Pertenece a la familia Lamiaceae (Tabla 1.9) y como sinónimos se encuentran *Coleus amboinicus* Lour., *Coleus aromaticus* Benth, *Majana amboinica* (Lour.) Kuntze y *Ocimum vaalae*

Forssk. Es conocido como orégano francés y es utilizado como condimento y como planta medicinal, ya que posee propiedades terapéuticas y nutricionales que le son atribuidas a sus componentes fitoquímicos. Es una planta aromática de olor fuerte, puede medir hasta un metro de altura. Sus hojas son opuestas, ovadas y crenadas, de cuatro a diez centímetros de largo, pelosas en ambas caras y con la base del peciolo decurrente. Su Inflorescencia es de color violeta agrupada en verticilos y dispuestos en racimos terminales de 10 a 30 cm de largo.



Figura 1.11 *Plectranthus amboinicus* Lour.

Tabla 1.9 Taxonomía de *Plectranthus amboinicus*.

Dominio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Género	<i>Plectranthus</i>
Especie	<i>Plectranthus amboinicus</i> Lour

1.1.6.4.1 Uso tradicional

La infusión de sus hojas es utilizada en la medicina tradicional como remedio para el resfriado, fiebre, asma, como antitusivo, para el dolor de cabeza, estreñimiento y para tratar afecciones de la piel (Germosén-Robineau, 2014; Méndez-González *et al.*, 2012; Arumugam *et al.*, 2016). Además, se le confieren propiedades como anticonvulsiva, antidepresiva, antiinflamatoria, broncodilatadora, antiespasmódica y antimicrobiana (Nuñez *et al.*, 2006; Méndez-González *et al.*, 2012)

1.1.6.4.2 Conocimiento fitoquímico

En la Figura 1.12 se muestran las estructuras químicas de algunos compuestos que se han detectado en esta especie. En su composición fitoquímica han sido descritos alrededor de 76 compuestos volátiles y 30 no volátiles, entre los que se encuentran monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, alcoholes, aldehídos, ésteres y compuestos fenólicos (Arumugam *et al.*, 2016). El carvacrol y timol son compuestos mayoritarios del aceite esencial, también se presentan undecanal, γ -terpineno, p-cimeno, cariofileno, α -terpineol y β -selineno (Menéndez y Pavón, 1999; Patel *et al.*, 2010; Méndez-González *et al.*, 2012).

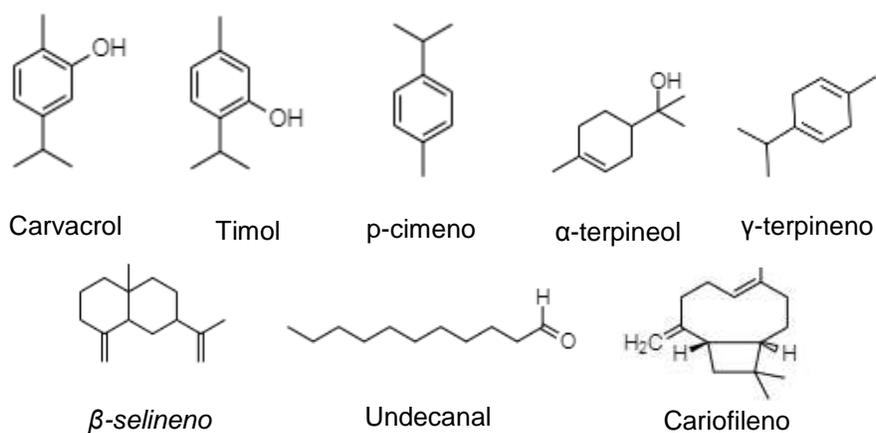


Figura 1.12 Metabolitos aislados de *Plectranthus amboinicus*.

JUSTIFICACIÓN

Desde la aparición del ácaro *Varroa destructor* la apicultura se ha visto seriamente amenazada. Los acaricidas sintéticos fueron la primera arma utilizada para controlarlo, sin embargo, el uso inadecuado resultó en el surgimiento de resistencia hacia estos tratamientos. Además, este tipo de productos provocan efectos negativos en las abejas, pueden contaminar los productos de la colmena y ponen en riesgo la salud humana.

La tendencia actual de producción y consumo de alimentos orgánicos, es un mercado donde la miel no es la excepción, por lo que la miel mexicana cuya producción se destina principalmente a la exportación hacia países europeos debe cumplir con estrictos estándares de calidad. En la producción de miel orgánica únicamente es permitido el uso de tratamientos de origen natural, como aceites esenciales o sus componentes; actualmente entre los tratamientos de origen natural que se utilizan se encuentran el timol, el ácido oxálico y el ácido fórmico. Sin embargo a pesar de ser naturales, se ha reportado que provocan algunos efectos negativos en las abejas y su efectividad se ve alterada por las condiciones climáticas

Dado que los tratamientos actuales para el control de *V. destructor*, incluso los de origen natural generan efectos adversos en las abejas y se desconoce el efecto que estos puedan tener sobre la microbiota de estos insectos, resulta imprescindible la búsqueda de nuevas alternativas para su control y la verificación del impacto que tienen sobre la microbiota asociada, tales como las levaduras; para contar con alternativas que sean principalmente de origen natural, inocuos, eficaces y comercialmente viables.

HIPÓTESIS

Debido a la composición fitoquímica reportada de las flores de *Lonchocarpus punctatus* y de las hojas de *Critonia aromatisans*, *Cymbopogon citratus* y *Plectranthus amboinicus*, sus extractos poseen actividad acaricida contra *Varroa destructor*. Además, estos extractos serán activos selectivamente contra los ácaros, por lo que resultaran inocuos para *Apis mellifera* y para las levaduras asociadas a las abejas *Candida versatilis*, *Candida apicola*, *Kurtzmaniella cleridarum* y *Zygosaccharomyces mellis*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad acaricida de los extractos de baja polaridad de flores de *Lonchocarpus punctatus* y de hojas de *Critonia aromatisans*, *Cymbopogon citratus* y *Plectranthus amboinicus* contra *Varroa destructor* y su inocuidad sobre *A. mellifera* y levaduras asociadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Analizar la composición de los extractos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- II. Evaluar la actividad acaricida de los extractos de baja polaridad de flores de *Lonchocarpus punctatus* y de hojas de *Critonia aromatisans*, *Cymbopogon citratus* y *Plectranthus amboinicus* sobre *V. destructor* mediante el bioensayo de efecto residual.
- III. Determinar la toxicidad de los extractos en *Apis mellifera* mediante el bioensayo de toxicidad aguda por contacto.
- IV. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de baja polaridad sobre *Candida apicola*, *Candida versatilis*, *Kurtzmaniella cleridarum* y *Zygosaccharomyces mellis*, empleando el método de Kirby-Bauer y el método de microdilución en caldo.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para abordar este trabajo la estrategia experimental se dividió en tres bloques: El primer bloque comprendió la selección, colecta y extracción del material vegetal. Fueron seleccionadas plantas con distribución en la península de Yucatán que en su composición fitoquímica presentaran compuestos relacionados con actividad acaricida. Se colectó el material vegetal en sitios al azar en Mérida y sitios aledaños a la ciudad; se realizó una extracción mediante maceración en lugar de realizarlo mediante arrastre de vapor, debido al bajo rendimiento que caracteriza a este último método de extracción, seguida de una partición líquido-líquido para obtener el extracto de baja polaridad. El segundo bloque comprendió el análisis de todos los extractos mediante CG-EM, con la finalidad de contar con un perfil de la composición de cada uno de los extractos y poder relacionar su composición con el comportamiento en los bioensayos, así como la similitud en la composición con colectas posteriores; aun cuando se desconociera la identidad de los componentes de los extractos. En el tercer bloque fueron abordados todos los bioensayos, la evaluación de la actividad acaricida sobre *V. destructor* mediante el método de efecto residual en vial; las evaluaciones de toxicidad sobre *A. mellifera* y las levaduras *C. apicola*, *C. versatilis*, *K. cleridarum* y *Z. mellis*, que fueron realizadas mediante el método de toxicidad aguda por contacto; y mediante el método de Kirby-Bauer y de microdilución en caldo, respectivamente. En el capítulo siguiente (II) se presenta lo relativo a la obtención de los extractos y en análisis de los mismos, mientras que en los capítulos III y IV se abordan las evaluaciones de actividad acaricida de los extractos y de inocuidad en *A. mellifera* y sobre las levaduras asociadas, respectivamente.

En la Figura 1.13 se muestra de manera general el diseño de la estrategia experimental para la realización de este trabajo.

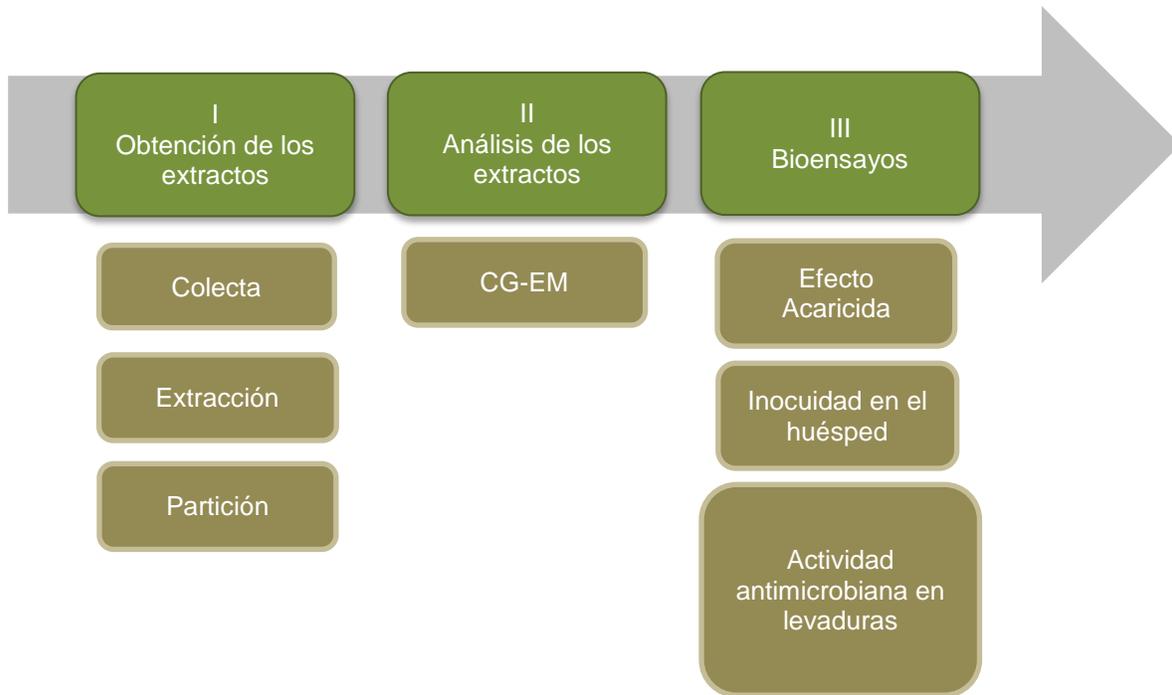


Figura 1.13 Estrategia experimental.

CAPÍTULO II

ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LOS EXTRACTOS DE BAJA POLARIDAD DE FLORES DE *Lonchocarpus punctatus* Y HOJAS DE *Critonia aromatisans*, *Cymbopogon citratus* Y *Plectranthus amboinicus*

2.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas pueden definirse como aquellas que producen y exudan sustancias aromáticas, se caracterizan por sus fácilmente perceptibles aromas y en su mayoría pertenecen a las familias *Lauraceae*, *Apiaceae*, *Myrtaceae* y *Lamiaceae*. Los compuestos volátiles que producen este tipo de plantas son esenciales para su supervivencia, ya que son claves en algunos procesos, como la polinización, la defensa contra patógenos y la comunicación entre las plantas (Calvo-Irabién, 2013). La forma más común para extraer los compuestos volátiles de este tipo de plantas es mediante destilación por arrastre de vapor y a los extractos resultantes se les denomina aceites esenciales; si bien, el conjunto de estos compuestos para poder recibir tal nombre (aceites esenciales) deben ser extraídos mediante esta técnica en específico, no es la única forma de obtener este tipo de compuestos. Una gran desventaja de esta técnica de extracción es el bajo rendimiento obtenido, por lo que se requiere una gran cantidad de material vegetal. Una alternativa a esta técnica es la maceración, seguida por una partición líquido-líquido para obtener el extracto de baja polaridad o la extracción directamente con un disolvente de baja polaridad. Generalmente, estos aceites presentan una amplia gama de actividades, entre ellas, fungicida, bactericida, acaricida e insecticida; Estas dos últimas actividades se le atribuyen principalmente a los isoprenoides, como monoterpenos, terpenos y sesquiterpenos (Ávalos, 2009; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). Las especies *C. aromatisans*, *C. citratus* y *P. amboinicus* pertenecen a este tipo de plantas (plantas aromáticas) y en la composición fitoquímica de todas ellas han sido descritos compuesto como los antes mencionados; Las técnicas analíticas como la cromatografía de gases acoplada a un detector másico nos ofrecen desde identificaciones preliminares, hasta la identificación definitiva de compuestos, así como su cuantificación y resulta de gran utilidad para el análisis de compuestos volátiles, característica que representa a los componentes de los aceites esenciales.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Todo el material vegetal fue colectado en el municipio de Mérida, Yucatán y sus alrededores. Fueron colectadas flores de *L. punctatus* en las instalaciones del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en el mes de octubre del 2017, hojas de *C. citratus*, *P. amboinicus* en noviembre del 2017, y *C. aromatisans* en enero del 2018, en la zona de la hacienda Xcunyá (Yucatán, México). Se realizaron dos colectas de material, en la primera colecta se obtuvo material vegetal de todas las especies con motivo de realizar un monitoreo de actividad y en la segunda colecta se obtuvo sólo el material necesario para continuar con los demás experimentos. El material vegetal de la segunda colecta de *C. citratus* se colectó en abril del 2018 en dos sitios, del mismo sitio donde se realizó la primera colecta (denominado más adelante como "A") y de un sitio nuevo (denominado más adelante como "B"); y el material de *P. amboinicus* fue obtenido en junio del 2018 de un sitio diferente al de la primera colecta de esta especie.

2.2.2 Obtención de los extractos

Para el material obtenido en la primera colecta todas las extracciones se realizaron en fresco y se inició con la maceración en etanol (EtOH; J. T. Baker, Pensilvania, EUA) inmediatamente tras la colecta del material, cada 24 horas durante tres días se le cambio el disolvente y tras la maceración se procedió a la concentración de los extractos con un evaporador rotatorio (BUCHI R-300). La extracción del material procedente de la segunda colecta se realizó mediante sonicación con hexano (Hx; J. T. Baker, Pensilvania, EUA) en fresco durante 60 minutos por tres veces, filtrando y colocando nuevo disolvente tras cada lapso de tiempo; tras la extracción se procedió a la concentración del extracto mediante la recuperación del disolvente con ayuda de un evaporador rotatorio (BUCHI R-300). Todos los extractos fueron almacenados en congelación hasta el momento de utilizarse.

2.2.3 Obtención de los extractos de baja polaridad

Para obtener los extractos de baja polaridad de los extractos obtenidos del material procedente de la primera colecta se realizó una partición líquido-líquido. El extracto crudo concentrado se disolvió en acetato de etilo (AcOEt)/Metanol (MeOH) (J. T. Baker, Pensilvania, EUA) en una proporción 3:2, tras la disolución total, se transfirió a un embudo de separación y se le agregó Hx en proporción 2:1, con respecto a la mezcla de AcOEt/MeOH. Tras agitación vigorosa se dejó reposar para permitir la separación de sus fases y se colectó la parte de baja polaridad (parte hexánica). Este proceso se realizó por triplicado y se concentró la parte de baja polaridad con ayuda del evaporador rotatorio (BUCHI R II).

2.2.4 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Se realizó el análisis de cada uno de los extractos mediante cromatografía de gases (Agilent technologies 6890N Network) acoplada a espectrometría de masas (Agilent technologies 5975B inert MSD), utilizando una columna capilar 100% dimetilpolisiloxano (ULTRA1, modelo 19091^a-112) de 25 m de longitud, 0.320 mm de diámetro y 0.52 μm de espesor. El programa de temperatura fue $T_1=140\text{ }^\circ\text{C}$ (3 min), $T_2=280\text{ }^\circ\text{C}$ (30 min) con un gradiente de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ y se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Obtención de extractos crudos y de baja polaridad

Los rendimientos de todas las extracciones realizadas al material procedente de la primera colecta fueron muy bajos (Tabla 2.1), entre ellos el mayor rendimiento de extracción fue el de las hojas de *C. aromatisans*, que resultó del 1.19%. Para la extracción de la segunda colecta de *C. citratus* y *P. amboinicus* se utilizó Hx y se realizó por sonicación mediante la inmersión del recipiente con el material vegetal en un baño ultrasónico (Cole-Parmer, 08895-52), de esta manera se logró aumentar el porcentaje de rendimiento de extracción de *C. citratus*, de 1.55 % a 11.18 % y 21.27 %, respectivamente. (Tabla 2.2). El rendimiento de las extracciones realizadas de ambas colectas de *P. amboinicus* fueron muy similares, del material procedente de la primera colecta se obtuvo un rendimiento del 0.15% (Tabla 2.1), mientras que en la segunda fue de 0.149%(Tabla 2.2).

Tabla 2.1 Características de la extracción de la primera colecta.

Planta	Parte	Forma de extracción	Disolvente	Porcentaje de Rendimiento
<i>Critonia aromatisans</i>	Hoja	En fresco	Etanol	1.19 %
<i>Plectranthus amboinicus</i>	Hoja	En fresco	Etanol	0.15 %
<i>Cymbopogon citratus</i>	Hoja	En fresco	Etanol	1.55 %

Tabla 2.2 Características de la extracción por sonicación de la segunda colecta.

Planta	Parte	Forma de extracción	Disolvente	Porcentaje de Rendimiento
<i>Cymbopogon .citratus</i> A	Hoja	En fresco	Hexano	21.27 %
<i>Cymbopogon citratus</i> B	Hoja	En fresco	Hexano	11.18 %
<i>Plectranthus amboinicus</i>	Hoja	En fresco	Hexano	0.149%

2.3.2 Análisis de la composición de los extractos de baja polaridad por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

A continuación se muestran los cromatogramas de cada uno de los extractos de baja polaridad, así como los compuestos con abundancia relativa mayor al 1%, y los que presentaron un porcentaje de similitud mayor al 93% con las moléculas de la base de datos (NIST 05) del equipo.

2.3.2.1 Extracto de baja polaridad de *Critonia aromatisans*

Mediante el análisis del extracto de baja polaridad de *C. aromatisans* (Figura 2.1) se detectaron 49 componentes, en la Tabla 2.3 se encuentran 26 de estos componentes, los cuales presentaron una abundancia relativa (AR) mayor al 1%, así como tres componentes con una AR menor al 1%, que presentaron un porcentaje de similitud (PS) superior al 90% con respecto a los compuestos en la base de datos del equipo; Además en esta se describen algunas de sus características y se indican las sustancias con la que presentan similitud, así como el PS.

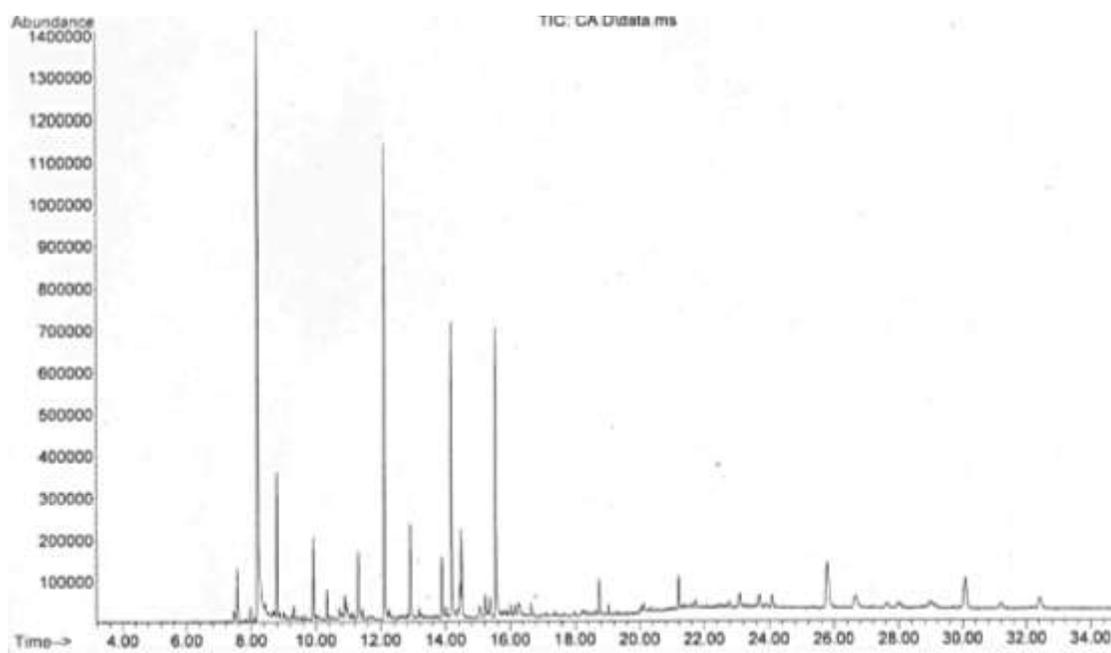


Figura 2.1 Cromatograma del extracto de baja polaridad de *Critonia aromatisans*.

Tabla 2.3 Datos de CG-EM del extracto de baja polaridad de *Critonia aromatisans*.

No.	TR (min)	AR (%)	Compuestos similares	% de similitud
1	7.57	1.38	β -Elemeno	64
2	7.97	0.42	Cariofileno	99
3	8.21	19.46	Cumarina	96
4	8.80	3.82	β -cubebeno	97
5	9.32	0.78	δ -Cadineno	98
6	9.92	2.63	Palustrol	99
7	10.35	0.96	Ledol	93
8	10.91	1.29	1,2,4-Trietilbenceno	89
9	11.31	2.24	Óxido de ledeno (II)	66
10	12.11	9.74	Isolongifolen-5-ona	86
11	12.90	2.69	4,4-Dimetil-2-pentino	53
12	13.18	1.02	trans-Longipinocarveol	50
13	13.88	1.36	3-[(1E)-Buta-1,3-dienil]-4-eteniclopenteno	44
14	14.18	7.18	Calicanina	40
15	14.49	3.3	8,9-Deshidro-9-formilcycloisolongifoleno	38
16	15.54	7.50	Fitol	83
17	16.02	1.01	Linolenato de etilo	90
18	16.14	1.8	(2-Adamantilideneamino)urea	46
19	20.12	1.05	1-Etoxi-2-[(Z)-2-nitroprop-1-enil]benceno	30
20	21.20	2.64	(6E,10E,14E,18E)-2,6,10,14,18-Pentametilicosa-2,6,10,14,18-pentaeno	93
21	21.72	1.28	2-Etilacridina	25
22	22.47	1.94	1-Hidroxi-4-metoxi-3,3-dimetilindol-2-ona	46
23	23.09	1.21	1-Hidroxi-4-metoxi-3,3-dimetilindol-2-ona	46
24	23.69	1.21	Estigmastan-3,5-dieno	38
25	25.79	3.30	Estigmasterol	60
26	26.66	1.32	2-Etilacridina	50
27	28.98	1.54	Vitamina E	46
28	30.07	2.54	Acetato de lupenilo	64
29	32.43	1.03	2- (1-Adamantil) -N- metilacetamida	38

Se presentaron cuatro componentes mayoritarios con una AR superior al 5%, entre ellos el componente con tiempo de retención (TR) de 8.21 minutos (min) tuvo un PS del 96% con la cumarina, mientras que el de los otros dos componentes fue menor del 90%, el de TR de 12.11 min tuvo 86% de similitud con la isolongifolen-5-ona y el de TR de 15.54 min 83% con el fitol. Además de estos, otros componentes con menor AR presentaron un PS

significativo con compuestos de la base de datos, siendo identificados con un PS del 93 al 99%, los cuales corresponden posiblemente a cariofileno (TR= 7.97 min y AR= 0.42%), β -cubebeno (TR= 8.80 min y AR= 3.82%), δ -cadineno (TR= 9.32 min y AR= 0.78%), palustrol (TR= 9.92 min y AR= 2.63%), ledol (T.R.= 10.35 min y A.R.= 0.96%) y (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,14,18-pentametilicosa-2,6,10,14,18-pentaeno (TR= 21.20 min y AR= 2.64 %). En la Figura 2.2 se presentan las estructuras de todos los compuestos anteriores.

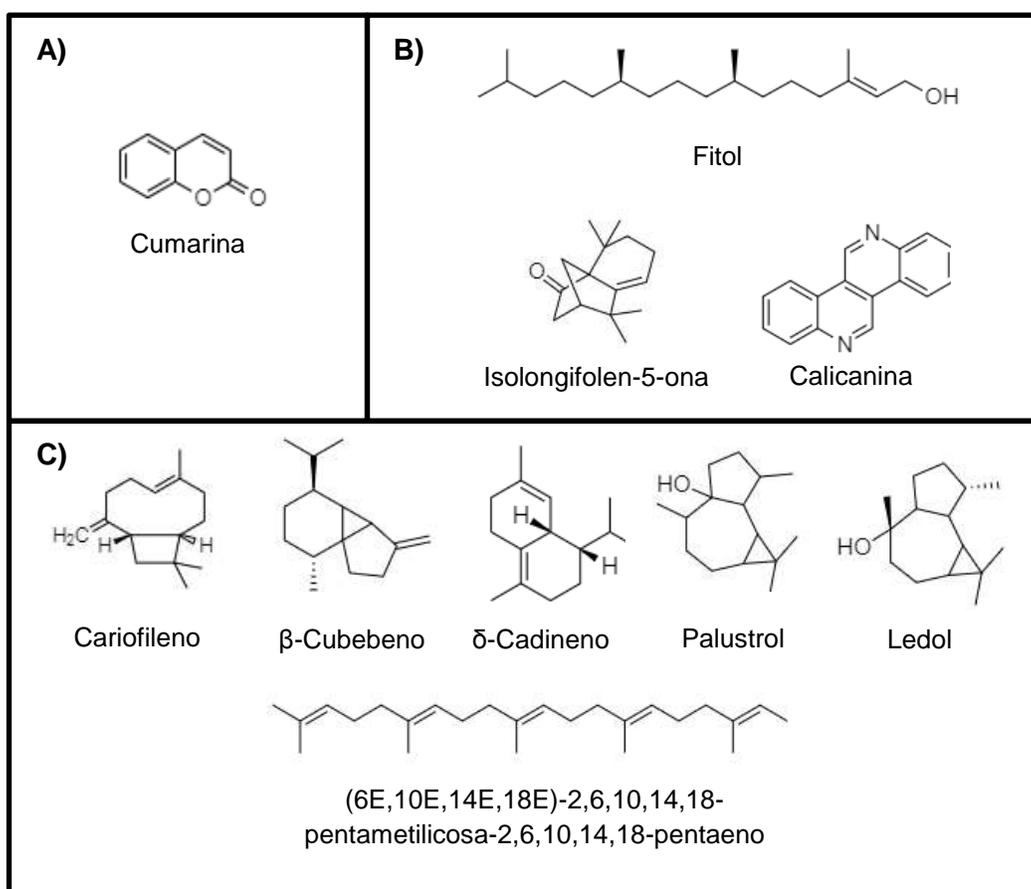


Figura 2.2 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de *Critonia aromatisans*. A) Componentes con AR mayor al 5% y PS mayor a 93%, B) componentes con AR mayor al 5% y PS menor a 93% y C) componentes con AR menor al 5% y PS mayor a 93%.

2.3.2.2 Extracto de baja polaridad de hojas *Plectranthus amboinicus*

En el análisis por CG-EM del extracto de baja polaridad de *P. amboinicus* se detectaron un total de 36 componentes, los cuales pueden apreciarse en el cromatograma (Figura 2.3), solo 9 de éstos obtuvieron un PS alto con compuestos de la base de datos. En la Tabla 2.4 se muestran los datos de 28 de estos componentes, estos corresponden a los componentes presentes en mayor proporción y con mayor PS con compuestos de la base de datos, se indican las sustancias con la que presentaron similitud, así como el PS, TR y AR.

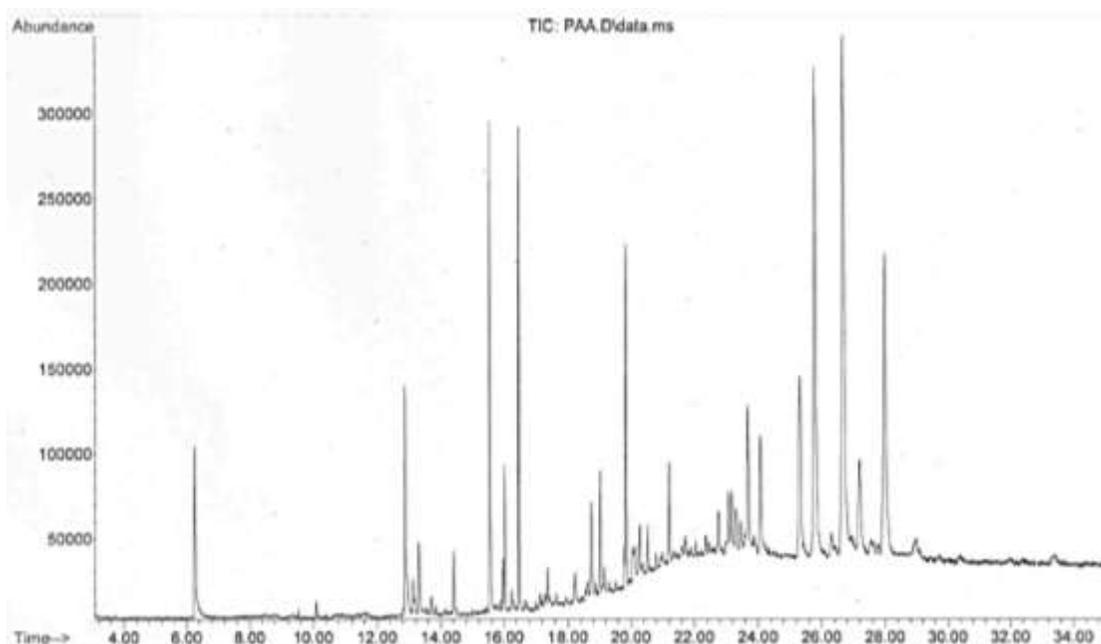


Figura 2.3 Cromatograma del extracto de baja polaridad de *Plectranthus amboinicus*.

Se detectaron cuatro componentes con porcentaje de AR superior al 5%, de los cuales se identificaron dos con PS del 99 y 95%, los cuales posiblemente corresponden a β -sitosterol (T.R.= 26.66 min y A.R.= 14.89%) y α -amirina (T.R.= 27.98 min y A.R.= 8.68%), respectivamente. Los otros dos componentes tuvieron un PS del 87% con el fitol el de TR= 15.54 min y 64% con el estigmasterol el de TR= 25.77 min. Además de éstos, otros siete componentes con AR inferior al 5% presentaron un PS de 93 a 99% con compuestos de la base de datos del equipo, por lo que es posible que se trate de p-timol (TR= 6.25

min y AR= 2.61%), palmitato de etilo (TR= 14.40 min y AR= 0.81%) linolenato de etilo (TR= 16.02 min y AR= 1.62%), (E)-8-acetato de hexadecenilo (TR= 17.39 min y AR= 0.89%), eicosano (TR= 20.26 min y AR= 1.48%), estigmastan-3,5-dieno (TR= 23.68 min y AR= 3.39 %) y vitamina E (TR= 24.08 min y AR= 2.56 %). En la Figura 2.4 se presentan las estructuras de todos los compuestos con los que los componentes con mayor AR tuvieron PS significativos y con los que hubo mayor PS.

Tabla 2.4 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de *Plectranthus amboinicus*.

No.	TR (min)	AR (%)	Compuestos similares	% de similitud
1	6.25	2.61	p-Timol	94
2	12.87	3.41	2,6,6-Trimetil-biciclo[3.1.1]heptano	70
3	14.40	0.81	Palmitato de etilo	96
4	15.54	5.07	Fitol	64
5	16.02	1.62	Linolenato de etilo	99
6	16.47	3.43	Acetato de 11,13-dimetil-12-tetradecen-1-ol	38
7	17.39	0.89	Acetato de E-8-hexadecen-1-ol	93
8	18.75	1.84	1-(2-Fenilciclopropil) sulfonil-3,4-dihidro-2 H –quinolina	45
9	19.01	1.06	1,2-Epoxinonadecano	91
10	19.83	3.10	1-(2H-Piridin-1-il)butan-1-ona	55
11	20.10	1.43	6-Nitrotricciclo[10.2.2.2(5,8)]octadeca-5,7,12,14,15,17-hexano	25
12	20.26	1.48	Eicosano	95
13	20.53	1.40	(Z)-Acetato de 11-hexadecenilo	49
14	20.99	1.60	N-Metil-1-adamantaneacetamida	38
15	21.20	3.15	Escualeno	76
16	21.72	2.20	Metil-(E)-15-metilhexadec-11-enoato	53
17	22.36	3.26	2-Etilacridina	41
18	22.76	2.31	N-(4,7-dioxo-2,1,3-benzoxadiazol-5-il)acetamida	30
19	23.18	3.04	β -Tocoferol	78
20	23.31	1.17	Trimetil-(2-trimetilsililfenil)silano	38
21	23.46	0.93	2-Etilacridina	86
22	23.68	3.39	Estigmastan-3,5-dieno	94
23	24.08	2.56	Vitamina E	98
24	25.31	4.48	Campesterol	86
25	25.77	11.90	Estigmasterol	87
26	26.66	14.89	β -Sitosterol	99
27	27.19	2.97	α -Amirina	55
28	27.98	8.68	α -Amirina	95

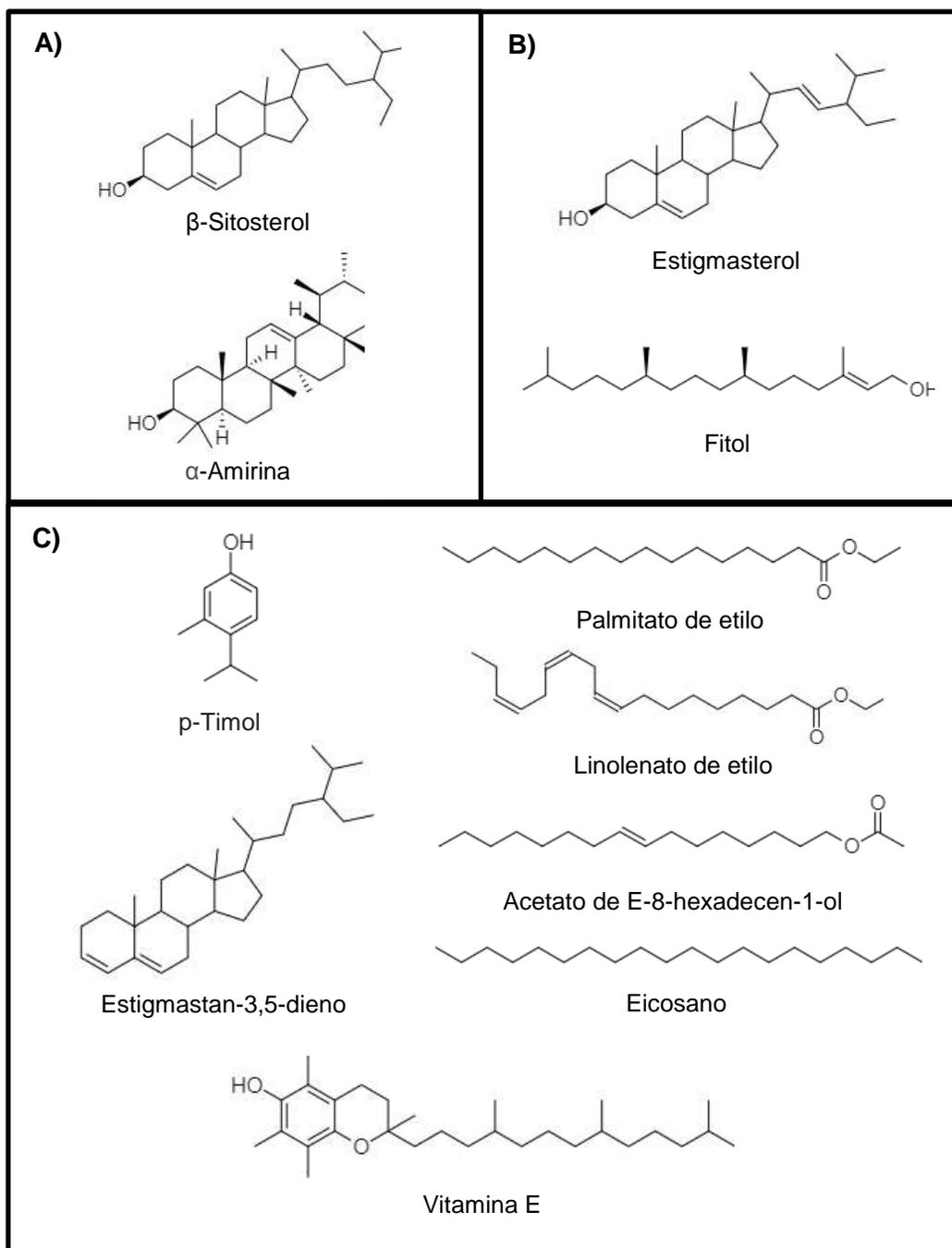


Figura 2.4 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de *Plectranthus amboinicus*. A) Componentes con AR mayor al 5% y PS mayor a 93%, B) componentes con AR mayor al 5% y PS menor a 93% y C) componentes con AR menor al 5% y PS mayor a 93%.

2.3.2.3 Extracto de baja polaridad de *Cymbopogon citratus*

En el análisis por CG-EM del extracto de baja polaridad de *C. citratus* se detectaron un total de 60 componentes, los cuales pueden apreciarse en el cromatograma siguiente (Figura 2.5), únicamente cinco de éstos obtuvieron un porcentaje alto de similitud con compuestos de la base de datos. En la Tabla 2.5 se muestran los datos de 25 de estos componentes, los cuales corresponden a los presentes en mayor proporción, así como a los que presentaron un mayor PS con compuestos de la base de datos del equipo.

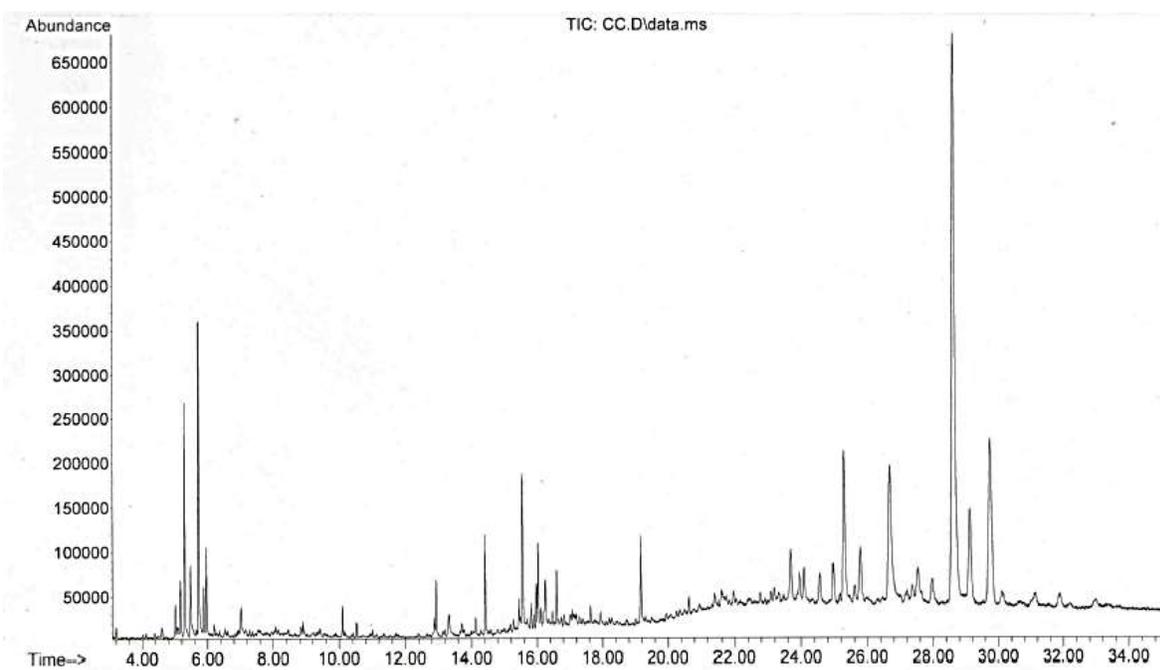


Figura 2.5 Cromatograma del extracto de baja polaridad de *Cymbopogon citratus*.

Tabla 2.5 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de *Cymbopogon citratus*.

No.	TR (min)	AR (%)	Compuestos similares	% de similitud
1	5.29	2.67	β -Citral o Neral	96
2	5.48	1.16	Geraniol	80
3	5.73	3.83	α -Citral o Geranial	97
4	5.97	1.73	3-Isopropilpiperidina	22
5	14.40	1.36	Palmitato de etilo	98
6	15.54	3.66	Fitol	80
7	16.02	1.97	2-Ciclopropil- <i>N</i> - (1-ciclopropiletil) -2-metilciclopropano-1-carboxamida	55
8	16.24	1.21	Octadecanoato de etilo	91
9	17.08	1.40	[4-(Dimetilamino)-3-metilfenil] <i>N</i> - metilcarbamato	35
10	19.16	1.56	Ftalato de dioctilo	50
11	21.42	1.07	2-(1Adamantil)- <i>N</i> -metilacetamida	30
12	21.60	1.28	2-Etilacridina	25
13	23.67	1.76	Estigmastan-3,5-dieno	42
14	23.94	1.15	3β -Hidroxi-27-norcolest-5-en-25-ona	91
15	24.09	1.07	Vitamina E	76
16	24.56	1.01	5-Metil-2-fenilindolizina	35
17	24.96	1.20	(3 <i>Z</i>)-3 -[(4-Metil-5-oxo-3-fenilsulfaniloxolan-2-il) oximetilideno] -4,6 <i>a</i> -dihidro-3 <i>a</i> <i>H</i> -ciclopenta [b] furano-2-ona	35
18	25.29	4.67	(3 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>R</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>S</i> , 17 <i>R</i> -10,13-Dimetil-17-[(<i>Z</i> , 2 <i>R</i>) - pent-3-en-2-ilo]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidro-1 <i>H</i> -ciclopenta[a]fenantren-3-ol	51
19	25.78	1.89	Estigmasterol	74
20	26.68	7.16	β -Sitosterol	95
21	27.52	2.09	2-[(2-Cloroacetil) amino]-3,3,3-trifluoro-2- (4-fluoroanilino) propanoato de etilo	38
22	27.96	1.15	2,4-Dimetilbenzo [h] quinolina	45
23	28.62	23.63	4,4'-Difluorobenzofenona	46
24	29.11	4.16	β -Sitostenona	95
25	29.74	7.56	2,2-Dimetil-3-[(3 <i>E</i> , 7 <i>E</i> , 11 <i>E</i>) -3,7,12-trimetil-14- (1,4,4-trimetilciclohex-2-en-1-il)tetradeca-3,7,11-trienil] oxirano	50

Se presentaron tres componentes con AR mayor al 5%, solo uno de ellos presentó un PS significativo (95%) y es posible que se trate del β -sitosterol (TR= 26.68 min y AR= 7.16%). Cuatro componentes con abundancia relativa menor al 5% presentaron un porcentaje de similitud de 95 a 98% con componentes de la base de datos del equipo, siendo posible que se trate de β -citral o neral (TR= 5.29 min y AR= 2.67%), α -citral o geranial (TR= 5.73 min y AR= 3.83%), palmitato de etilo (TR= 14.40 min y AR= 1.36%) y β -sitostenona (TR=

29.11% y AR= 4.16%). En la siguiente Figura (Figura 2.6) se presentan las estructuras de todos los compuestos con los que los componentes del extracto con mayor AR tuvieron PS significativos y con los que hubo mayor PS.

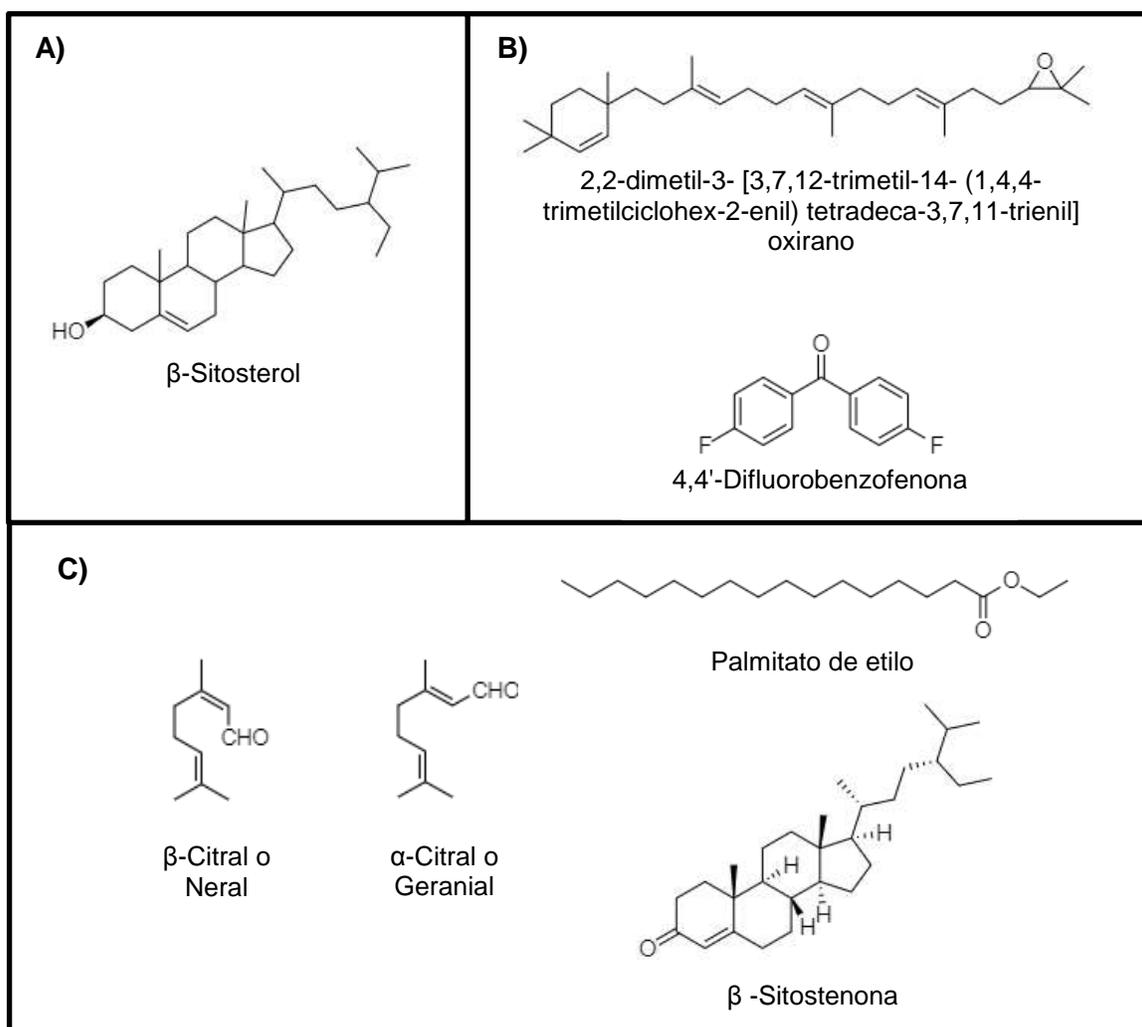


Figura 2.6 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de *Cymbopogon citratus*. A) Componentes con AR mayor al 5% y PS mayor a 93%, B) componentes con AR mayor al 5% y PS menor a 93% y C) componentes con AR menor al 5% y PS mayor a 93%.

2.3.2.4 Extracto de baja polaridad de flores de *Lonchocarpus punctatus*

En el análisis por CG-EM del extracto de baja polaridad de flores de *Lonchocarpus punctatus* se detectaron un total de 67 componentes (Figura 2.7), solo 13 de éstos obtuvieron un porcentaje alto de similitud con compuestos de la base de datos del equipo. En la Tabla 2.6 se muestran los datos de 17 de estos, que corresponden a los componentes presentes en mayor proporción y con mayor PS, se indican las sustancias con la que presentan similitud, así como el PS y TR.

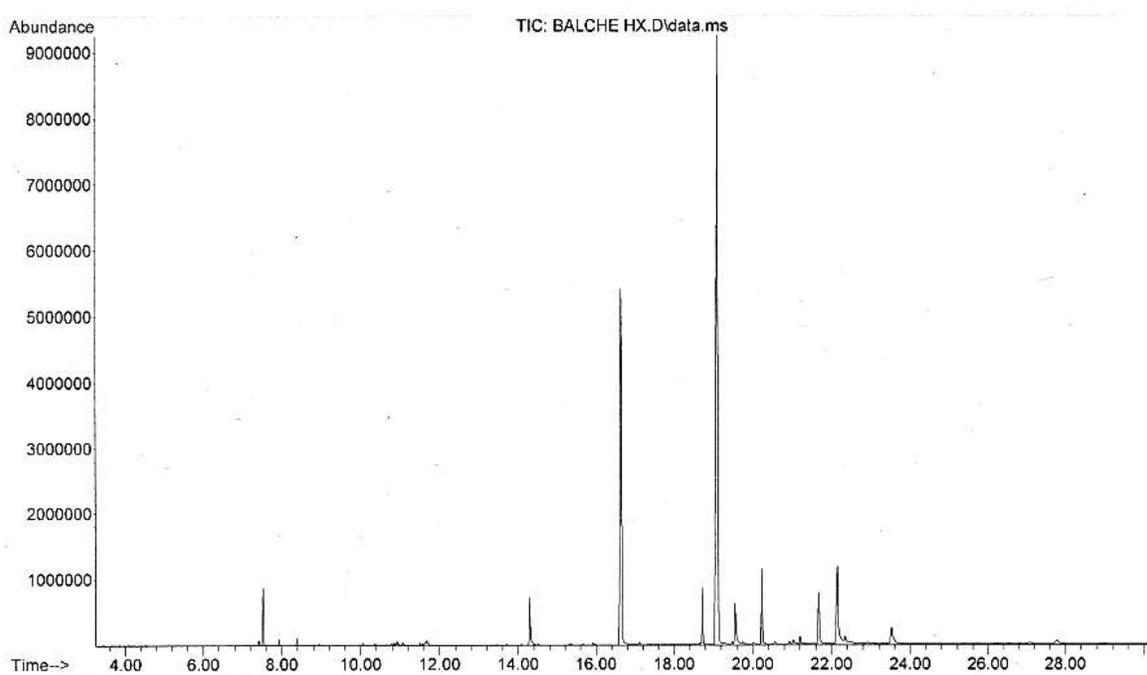


Figura 2.7 Cromatograma del extracto de baja polaridad de flor de *Lonchocarpus punctatus*.

Tabla 2.6 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de flor de *Lonchocarpus punctatus*

No.	TR (min)	AR (%)	Compuestos similares	% de similitud
1	7.53	2.16	(-)- β -Elemeno	92
2	7.93	0.23	Cariofileno	99
3	8.39	0.29	(1 Z , 4 Z , 7 Z) -1,5,9,9-tetrametilcicloudeca-1,4,7-trieno	97
4	14.30	2.54	Ácido 4- [2- (4-hidroxi-fenil) –vinil] –benzoico	58
5	16.65	22.89	Ácido 4- [2- (4-hidroxi-fenil) –vinil] –benzoico	49
6	17.11	0.12	Heptadecano	97
7	18.73	2.50	Pentacosano	94
8	19.48	0.14	Heptadecano	95
9	19.11	44.96	10-fenilantrona	64
10	19.55	2.63	7-Metoxi-5-hidroxi flavona	97
11	20.23	3.37	Tricosano	95
12	20.92	0.17	Eicosano	96
13	21.20	0.39	Octadecanal	94
14	21.67	3.05	Heptadecano	95
15	22.14	6.27	5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavona	95
16	22.42	0.17	5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavona	94
17	23.52	1.63	Hentriacontano	97

Se presentaron tres componentes con AR mayor al 5%, solo uno de ellos presentó un PS significativo y es posible que se trate del 5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavona (TR= 22.14 min y AR= 6.27%). Los otros dos componentes mayoritarios presentaron 64% similitud con la 10-fenilantrona, el de TR de 19.11 min y AR de 44.96% y 49% similitud con el ácido 4- [2- (4-hidroxi-fenil) –vinil] –benzoico, el de TR de 16.65 min y AR= 22.89%. También se presentaron 12 componentes con una AR menor al 5% con PS de 94 a 99% con componentes de la base de datos del equipo, siendo posible que se trate de cariofileno (TR=7.93 min y AR= 0.23%), (1 Z , 4 Z , 7 Z) -1,5,9,9-tetrametilcicloudeca-1,4,7-trieno (TR= 8.39 min y AR= 0.29%), pentacosano (TR= 18.73 min y AR= 2.50%), 7-metoxi-5-hidroxi flavona (TR= 19.55 min y AR= 2.63%), tricosano (TR= 20.23 min y AR= 3.37%), eicosano (TR= 20.92 min y AR= 0.17%), octadecanal (TR= 21.20 min y AR= 0.39%) y hentriacontano (TR= 23.52 min y AR= 1.63%). Además, los componentes con tiempos de retención de 17.11 min, 19.48 min y 21.67 min presentaron similitud con el Heptadecano en 97, 95 y 95%, respectivamente.

En la siguiente Figura (Figura 2.8) se presentan las estructuras de todos los compuestos con los que los componentes del extracto con mayor AR tuvieron PS significativos y con los que hubo mayor PS.

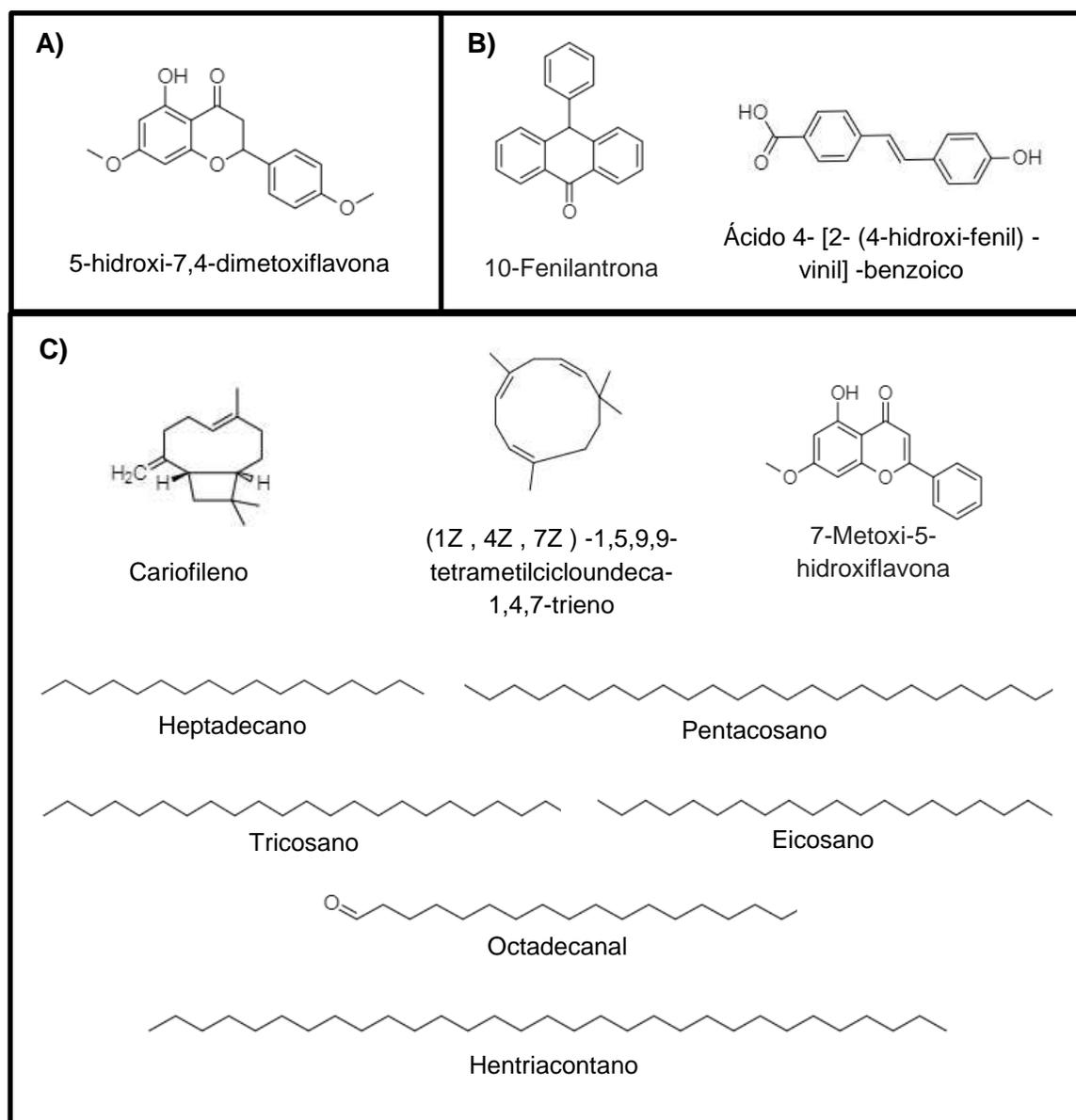


Figura 2.8 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de flores de *Lonchocarpus. Punctatus*. A) Componente con AR mayor al 5% y PS mayor a 93%, B) componentes con AR mayor al 5% y PS menor a 93% y C) componentes con AR menor al 5% y PS mayor a 93%.

2.3.2.5 Extracto de baja polaridad de la segunda colecta de *Cymbopogon citratus* A y B

Los extractos de la segunda colecta de *C. citratus* se analizaron por separado (sitio A y sitio B). En el análisis por CG-EM del extracto de baja polaridad de *C. citratus* A se detectaron un total de 37 componentes, los cuales pueden apreciarse en el cromatograma siguiente (Figura 2.9). En la Tabla 2.7 se muestran los datos de 14 de estos componentes, los cuales corresponden a los presentes en mayor proporción, únicamente dos de éstos obtuvieron un porcentaje alto de similitud con compuestos de la base de datos.

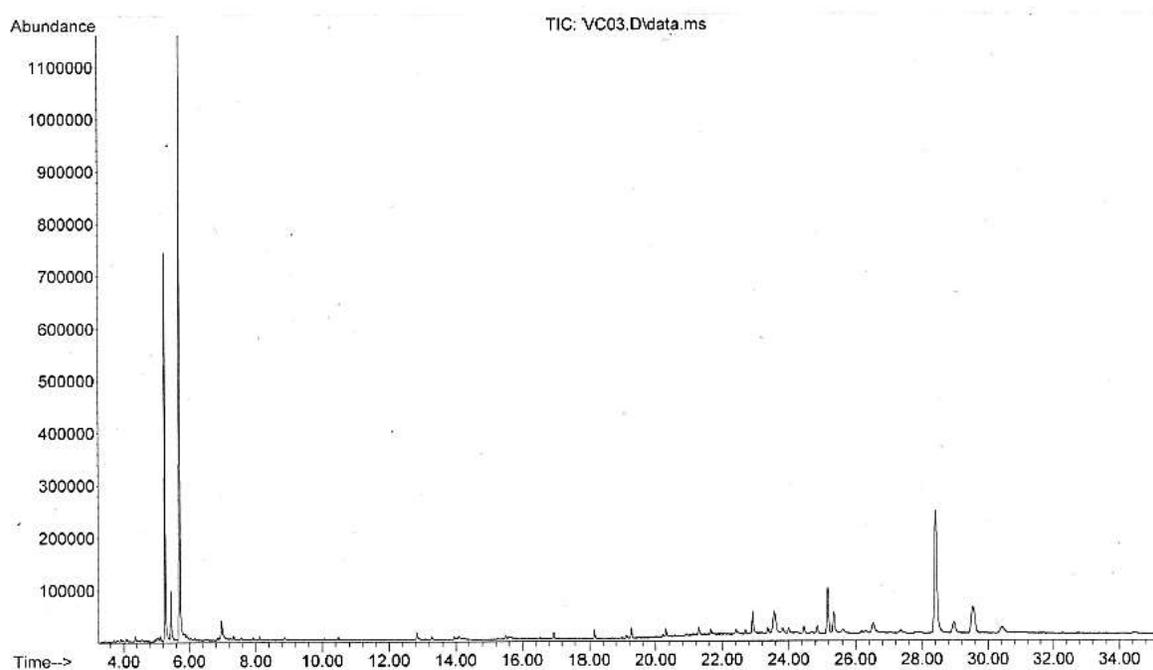


Figura 2.9 Cromatograma del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de *Cymbopogon citratus* A .

Se presentaron cuatro componentes con AR mayor al 5%, solo dos de ellos presentaron un PS mayor al 93% y es posible que se trate de α -citral o geranial (TR= 5.70 min y AR= 28.77%) y cimbopogona (TR= 28.42 min y AR= 17.70%). Los dos componentes mayoritarios restantes con TR de 5.25 y 29.53 min presentaron 87 y 46% de similitud con

β -citral o neral y *N*-(2-metoxifenil)-3-oxobutanamida, respectivamente. En la figura 2.10 se presentan las estructuras de los compuestos anteriores.

Tabla 2.7 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de *Cymbopogon citratus* A

No.	TR (min)	AR (%)	Compuestos similares	% de similitud
1	5.25	17.15	β -Citral o Neral	87
2	5.43	2.82	Esteroisomero del geraniol	87
3	5.70	28.77	α -Citral o Geranial	97
4	6.97	1.91	Ácido Geránico	72
5	22.92	1.72	2-Hexadecyloxirane	64
6	23.56	3.52	Hentetracontan-1-ol	64
7	25.17	4.12	Clorofenilpirrolediona	15
8	25.34	2.38	(Z)-14-Formiato de tricosenilo	70
9	26.51	1.18	Trimetilsilil éter de o-hidroxipropiofenona	50
10	28.42	17.70	Cimbopogona	93
11	28.96	1.65	Trímero cíclico de dimetilsiloxano	38
13	29.53	5.43	<i>N</i> -(2-metoxifenil)-3-oxobutanamida	46
14	30.39	1.36	Trimetil- (5-metil-2-propan-2-ilfenoxi) silano	47

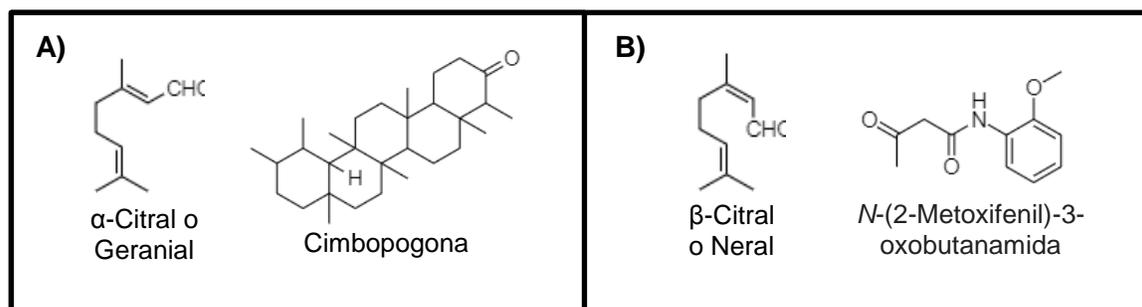


Figura 2.10 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de la segunda colecta de *Cymbopogon citratus* A. A) Componentes con AR mayor al 5% y PS mayor a 93%, B) componentes con AR mayor al 5% y PS menor a 93%.

En el análisis del extracto de *C. citratus* B se detectaron 32 componentes (Figura 2.11), de los cuales se describen algunas características como TR, AR y PS de 13 de ellos en la Tabla 2.8, los cuales corresponden a los presentes en mayor proporción, únicamente tres

de éstos obtuvieron un porcentaje alto de similitud con compuestos de la base de datos. Se presentaron cinco componentes con AR mayor al 5%, solo dos de ellos presentaron un PS a partir de 93% y es posible que se trate de α -citral o geranial (TR= 5.70 min y AR= 26.40%) y geraniol (TR= 5.44 min y AR= 5.26%). Los tres componentes mayoritarios restantes presentaron un PS menor a 93% con β -citral o neral (TR= 5.26 min y AR= 16.19%), *N*-(2-metoxifenil)-3-oxobutanamida (TR= 29.53 min y AR= 5.18%) y 2,2,6-trimetil-1-(3-metilbuta-1,3-dienil)-7-oxabicyclo [4.1.0] heptan-3-ol (TR= 28.41 min y AR= 16.65%). Además de lo anterior, se presentó un componente minoritario con 93% de similitud con el eicosano (TR= 21.66 min y AR= 0.63%). En la Figura 2.12 se presentan las estructuras de los compuestos anteriores.

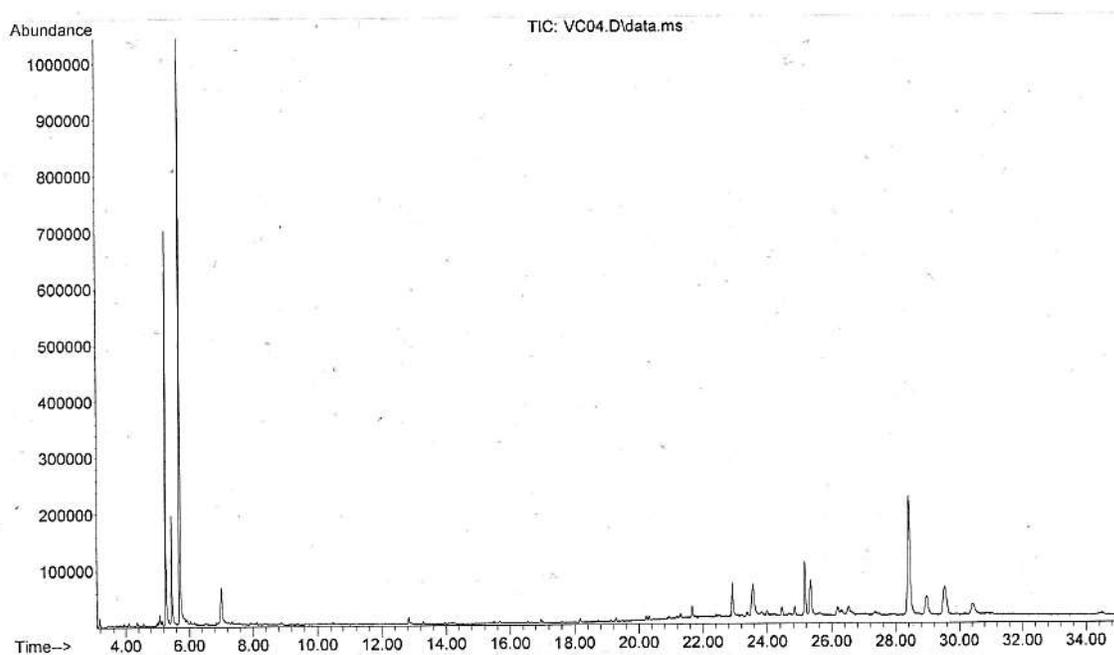
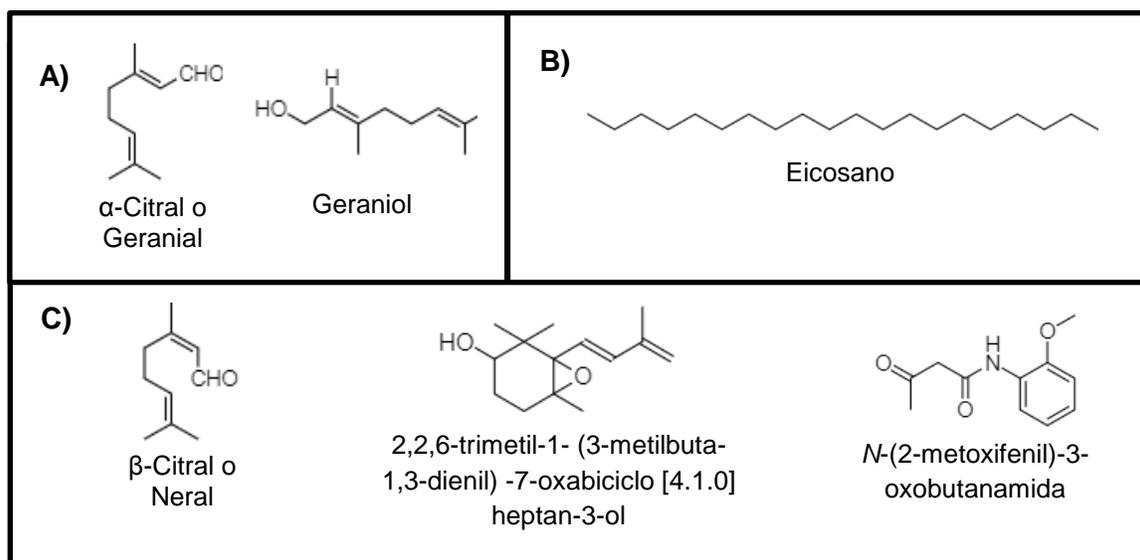


Figura 2.11 Cromatograma del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de *Cymbopogon citratus* B.

Tabla 2.8 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de *Cymbopogon citratus* B.

No.	TR (min)	AR (%)	Compuestos similares	% de similitud
1	5.26	16.19	β -Citral o Neral	86
2	5.44	5.26	Geraniol	93
3	5.70	26.40	α -Citral o Geranial	97
4	7.01	2.51	Ácido geránico	72
5	21.66	0.63	Eicosano	93
6	22.92	2.37	2-Heptadeciloxirano	89
7	23.56	4.69	Hentetracontan-1-ol	70
8	25.16	4.51	Acetato de cicloeucaalenol	38
9	25.34	3.64	Ciclopentanona de amilo	50
10	28.41	15.65	2,2,6-Trimetil-1- (3-metilbuta-1,3-dienil) -7-oxabicyclo [4.1.0] heptan-3-ol	43
11	28.97	2.92	2-Hexadeciloxirano	53
12	29.53	5.18	<i>N</i> -(2-Metoxifenil)-3-oxobutanamida	46
13	30.42	2.07	Trimetil-(2-trimetiilsililfenil)silano	43

**Figura 2.12** Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de la segunda colecta de *Cymbopogon citratus* B. A) Componentes con AR mayor al 5% y PS mayor a 93%, B) componentes con AR menor al 5% y PS mayor a 93% y C) componentes con AR mayor al 5% y PS menor a 93%

2.3.2.6 Extracto de baja polaridad de hojas de la segunda colecta de *Plectranthus amboinicus*

En el análisis del extracto de la segunda colecta de *P. amboinicus* se detectaron 13 componentes (Figura 2.13), de los cuales se describen algunas características como TR, AR y PS en la Tabla 2.9, los cuales corresponden a los presentes en mayor proporción; además, todos ellos obtuvieron un porcentaje alto de similitud con compuestos de la base de datos.

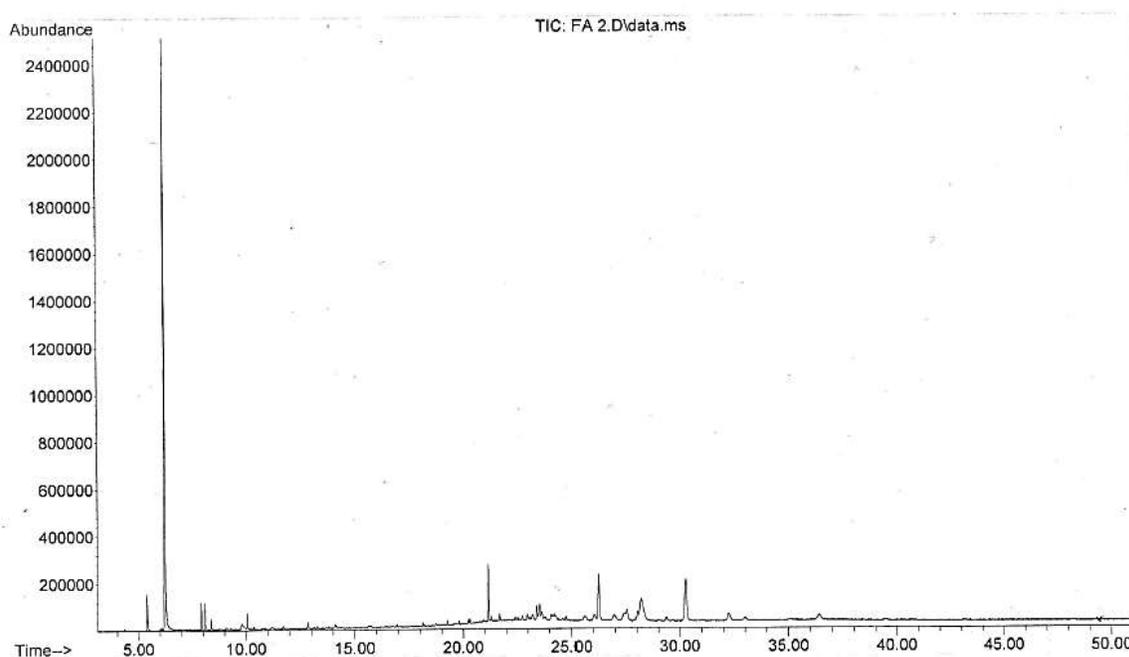


Figura 2.13 Cromatograma del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de *Plectranthus amboinicus*

Se presentaron tres componentes con AR mayor al 5%, todos ellos con un PS superior al 93% por lo que puede tratarse de escualeno (TR= 21.16 min y AR= 5.17%), eicosano (TR= 30.27 min y AR= 13.33% y TR= 26.23 min y AR= 10.02%) y carvacrol (TR= 6.23 min y AR= 64.39%). Los tres componentes restantes presentaron una AR menor a 5% y PS superior a 94% con timoquinona (TR= 5.41 min y AR= 3.12%), cariofileno (TR= 7.92 min y AR= 2.06%) y α -Bergamoteno (TR= 8.10 min y AR= 1.88%). En la Figura 2.14 se presentan las estructuras de los compuestos anteriores.

Tabla 2.9 Datos del CG-EM del extracto de baja polaridad de la segunda colecta de *Plectranthus amboinicus*

No.	TR (min)	AR (%)	Compuestos similares	% de similitud
1	5.41	3.12	Timoquinona	95
2	6.23	64.39	Carvacrol	94
3	7.92	2.06	Cariofileno	99
4	8.10	1.88	α -Bergamoteno	97
5	21.16	5.17	Escualeno	99
6	26.23	10.02	Eicosano	96
7	30.27	13.33	Eicosano	97

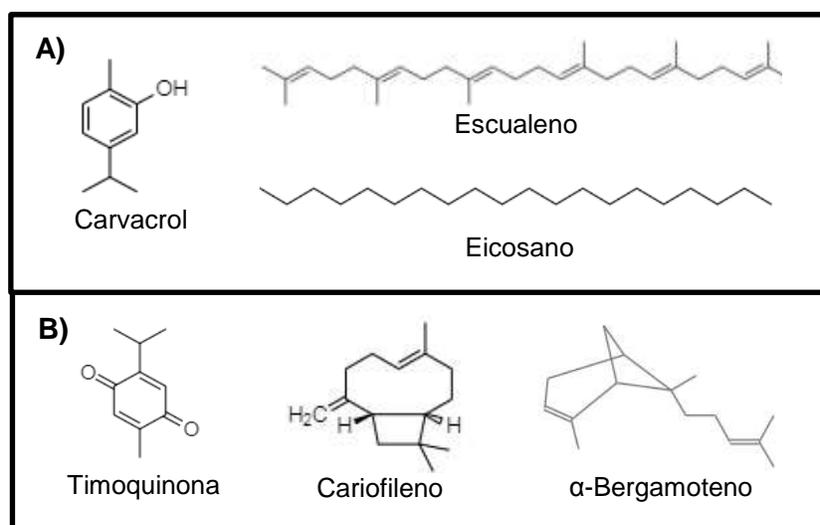


Figura 2.14 Estructura química de los compuestos con los que presentaron similitud los componentes detectados en el extracto de baja polaridad de la segunda colecta de *Plectranthus amboinicus* A) Componentes con AR mayor al 5% y PS mayor a 93%, y B) componentes con AR menor al 5% y PS mayor a 93%.

2.4 DISCUSIÓN

El análisis por CG-EM de *C. aromatisans*, *P. amboinicus*, *L. punctatus* y *C. citratus*, reveló que a pesar de tratarse de extractos de baja polaridad estos son aun complejos, es decir, presentan muchos componentes, de los cuales solo una pequeña parte pudo ser identificada por medio de su porcentaje de similitud con compuestos registrados en la base de datos del equipo.

Los principales componentes identificados en el extracto de *C. aromatisans* fueron la cumarina y la ciclocolorenona, esta última apareció registrada en los resultados como isolongifolen-5-ona, que es el compuesto con el que el equipo lo relaciona, sin embargo, este componente fue identificado como ciclocolorenona en un trabajo previo (Villa, 2014; Villa *et al.*, 2017). Otros componentes identificados, aunque presentes en menor proporción fueron el β -cubebeno, palustrol, ledol, δ -cadineno y cariofileno. A la ciclocolorenona se le atribuye la actividad ixodocida que presentan los aceites esenciales obtenidos de hojas y tallo de *Drimys brasiliensis* (Ribeiro *et al.*, 2007) y de la resina de *Araucaria columnaris* (Lebouvier *et al.*, 2013). También, la Cumarina aislada del fruto de *Dipterix odorata*, conocido como haba tonka, ha sido reportada como componente acaricida contra *Dermatophagoides pteronyssinus* (Gleye *et al.*, 2003); a otras cumarina y derivados se les ha atribuido también actividad acaricida (Owino y Matasyoh, 2015), insecticida (Hussain *et al.*, 2018) y antimicrobiano (López-Rojas *et al.*, 2018; Naik *et al.*, 2017; Ferrer, 2007) y debido a su actividad acaricida se les considera con potencial para su aplicación en el control de garrapatas.

En el extracto de *P. amboinicus* obtenido de la primera colecta de material vegetal se identificaron β -sitosterol y α -amirina, mientras que en el de la segunda colecta predominó el carvacrol con más del 60% de abundancia relativa, seguido de eicosano y escualeno, por lo que podríamos clasificar éstos como quimiotipo β -sitosterol y quimiotipo carvacrol, respectivamente. Otros de los componentes identificados fueron estigmastan-3,5-dieno, p-timol, vitamina E, linolenato de etilo, eicosano, acetato de E-8-hexadecen-1-ol y palmitato de etilo, en el extracto de la primera colecta, así como, timoquinona, cariofileno y α -bergamoteno en el de la segunda colecta. Se ha reportado que los compuestos β -sitosterol, α -amirina, carvacrol y escualeno poseen actividad acaricida, el β -sitosterol, ha sido evaluado contra *Tetranychus cinnabarinus* (Li *et al.*, 2018), y aislado tras un estudio

biodirigido, donde resultó uno de los fitoesteroles con mejor actividad acaricida (Moawad *et al.*, 2017); también se ha reportado que posee actividad antimicrobiana (Sen *et al.*, 2012; Odiba *et al.*, 2014; Ododo *et al.*, 2016), así como el escualeno y el carvacrol (García-García y Palou-García, 2008; Martínez *et al.*, 2015; Hsu y Ho, 2019). El escualeno ha sido evaluado contra *Tetranychus cinnabarinus* (Yan-Wang *et al.*, 2012), al igual que el β -sitosterol, e incluso en el 2010 se concedió una patente de un producto acaricida para plantas cuyo principio activo es el escualeno (Chunya *et al.*, 2010). También, ha sido identificado entre los componentes en una fracción de hojas de *Ocotea aciphylla* activa contra larvas de *Rhipicephalus microplus* (Souza *et al.*, 2017). Por otro lado, la α -amirina ha sido reportada entre los compuestos mayoritarios de extractos que han presentado actividad acaricida (Duan *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2012).

En el extracto de *C. citratus* obtenido de la primera colecta se presentaron tres componentes mayoritarios, los dos más abundantes entre ellos no pudieron ser identificados debido a que presentaron un porcentaje de similitud muy bajo con compuestos en la base de datos, sin embargo, el componente restante se identificó como β -sitosterol. También se identificaron neral, geranial, palmitato de etilo y β -sitostenona, presentes entre 1 a 4% de abundancia. En los extractos obtenidos de la segunda colecta (A y B) de *C. citratus* se identificó geranial y resultó el componente más abundante, presente en similar proporción en ambos extractos; además de éste, en ambos extractos se identificó un componente semejante al neral, presente también con una abundancia similar en ambos. Además, estos dos extractos también presentaron componentes que los diferencian, solo en el extracto de *C. citratus A* se identificó cimnopogona, presente entre los componentes con mayor abundancia relativa, el cual es un triterpenoide que forma parte de la cera de las hojas (Shah *et al.*, 2011); mientras que en el extracto de *C. citratus B* se presentó geraniol, compuesto ausente en el extracto de *C. citratus A*.

El extracto de *L. punctatus* presentó tres componentes predominantes, dos de ellos tuvieron un porcentaje de similitud bajo con 10-fenilantrona (64%) y con el Ácido 4- [2- (4-hidroxi-fenil) –vinil] –benzoico (49%), por lo que no puede asegurarse que se trate realmente de estos compuestos, sin embargo, el componente restante logro identificarse como 5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavona, por su alto porcentaje de similitud con este compuesto (95%)., de este compuesto se ha reportado que presenta una leve actividad

antimicrobiana (Palacios *et al.*, 1983; Martini *et al.*, 2004). También, aunque presentes en menor proporción, se identificaron cariofileno, hepadecano, tricosano, pentacosano, hentriacontano y 7-metoxi-5-hidroxi-5-flavona.

Los componentes mayoritarios identificados en cada uno de los extractos coinciden con los compuestos reportados en cada una de las especies, como la cumarina y la ciclocoloronona en *C. aromatisans* (Méndez-González *et al.*, 2012; Villa-De la Torre *et al.*, 2017), el carvacrol, β -sitosterol y α -amirina en *P. amboinicus* [20, 29, 31–33] (Menéndez y Pavón, 1999; Patel *et al.*, 2010; Méndez-González *et al.*, 2012; Arumugam *et al.*, 2016; Hsu *et al.*, 2019), β -sitosterol, neral, geranial, geraniol y cimnopogona en *C. citratus* (Shah *et al.*, 2011; Veléz-Rodríguez, 2015) y la flavona 5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavona en *L. punctatus* (Argáez *et al.*, 2011; Borges-Argáez *et al.*, 2017). Cabe destacar que se presentaron diferencias significativas en la composición de los extractos obtenidos de la primera y segunda colecta de *P. amboinicus* y *C. citratus*, los cuales pueden atribuirse a las condiciones a las que estuvieron expuestas las plantas, como el clima, la presencia de patógenos, la temporada en que fueron colectadas, e incluso la edad, por lo que en el caso de resultar con potencial biotecnológico deben estandarizarse las condiciones de cultivo, así como de la obtención de los extractos, con el fin de obtener la composición fitoquímica esperada. Además, de todos ellos se ha reportado que presentan tanto actividad acaricida como antimicrobiana, ambos contra diferentes especies, por lo que es posible que resulten activos contra *V. destructor*, dado que existen algunos tratamientos que se utilizan en común para el combate de diferentes especies de ácaros. Por otra parte, es posible también que además de ser activos contra el ácaro *V. destructor* también lo sean contra las levaduras, debido a que se tratan de componentes de aceites esenciales y debido a las variaciones de composición de los extractos se esperaría también una diferencia de actividad tanto en las evaluaciones de la actividad acaricida, como en las de inocuidad en *A. mellifera* y en las levaduras, lo que podría apoyarnos en la identificación de los componentes responsables de la actividad.

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACARICIDA DE LOS EXTRACTOS DE BAJA POLARIDAD DE *Lonchocarpus punctatus*, *Critonia aromatisans*, *Cymbopogon citratus* Y *Plectranthus amboinicus* CONTRA *Varroa destructor*

3.1 INTRODUCCIÓN

Desde su surgimiento, el ácaro *Varroa destructor* ha constituido uno de los mayores problemas en la apicultura a nivel mundial, provocando grandes pérdidas económicas al mermar desde la producción de miel (Medina-Flores *et al.*, 2011), hasta la población de abejas (Mors y Nowogrodzki, 1997). Los tratamientos químicos que han sido utilizados para su control son el fluvalinato y la flumetrina (piretroides), el coumafos (organofosforado) y el amitraz (formamidina) (Rosenkranz *et al.*, 1904). El uso frecuente e incorrecto de estos tratamientos provoca desde la presencia de residuos en miel y en los otros productos de la colmena, así como el desarrollo de resistencia de estos ácaros y estragos en las abejas (Wahida *et al.*, 2008; Le Conte *et al.*, 2010; Boncristiani *et al.*, 2012; Knolhoff y Onstad, 2013).

La NOM-001-ZOO-1994 desde su modificación del 2005, permite el empleo de componentes de aceites esenciales y ácidos orgánicos como alternativas naturales para el control de este parásito. Esto, aunado a la tendencia actual por consumir alimentos orgánicos y debido a que el principal destino de la miel mexicana es la exportación a países europeos, por lo cual para satisfacer los requisitos de la normatividad europea, donde se establecen LMR para tratamientos químicos como el coumafos y el amitraz (DOUE, 2017), resulta imprescindible la búsqueda de alternativas naturales para el control de *V. destructor*. Entre los tratamientos alternativos que actualmente se utilizan se encuentran el timol y los ácidos orgánicos, oxálico y fórmico; los cuales están autorizados en la producción de miel orgánica (DOF, 2013; SAGARPA-SENASICA, 2018). Lamentablemente estos compuestos pese a ser naturales, también ocasionan efectos adversos en las abejas (Ellis y Baxendale, 1997; Ellis *et al.*, 2001; Burley, 2007; Floris *et al.*, 2004; Tihelka, 2018) y a pesar de los reportes de toxicidad, este compuesto sigue siendo utilizado en la apicultura, por lo que resulta importante encontrar nuevas

alternativas naturales que sean más seguras para las abejas, además de contar con una mayor gama de opciones de tratamiento. Se ha realizado una extensa búsqueda de nuevos tratamientos que permitan el control de este ácaro (Calderone *et al.*, 1997; Ariana *et al.*, 2002; El Zalabani *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2012; Goswami *et al.*, 2014), que reduzcan el potencial de aparición de resistencia y la contaminación de los productos de las abejas, así como del medio ambiente. Sin embargo, a pesar de lo intensivo de estas investigaciones y de los resultados obtenidos, esto no se ha visto reflejado en los tratamientos actuales, ya que no ha habido cambios en los tratamientos que se comercializan para su control. En esta búsqueda resulta vital la selección de un método adecuado para obtener resultados fiables y reproducibles al escalar las evaluaciones de laboratorio al campo. En este sentido, el método de contacto residual (Plapp y Vinson, 1977) descrito en 1977, representa una buena alternativa. Originalmente este método fue desarrollado y utilizado para evaluar la resistencia de plagas (Miller *et al.*, 2010) y la toxicidad (Plapp y Vinson, 1977; Snodgrass, 1996; Aliano *et al.*, 2006; Gashout y Guzman-Novoa, 2009; Sabahi *et al.*, 2018) de sustancias sobre varios organismos, de manera rápida y en condiciones controladas. Desde 1996 y aun en la actualidad, este método ha sido utilizado en la búsqueda de sustancias con actividad acaricida contra *V. destructor*, por lo que con este bioensayo es posible determinar el potencial de los extractos vegetales, para seleccionar candidatos para el desarrollo de nuevas alternativas para el control del ácaro *V. destructor*.

Por lo anterior, en este trabajo se realizó una evaluación de la actividad acaricida mediante el método de contacto residual en vial de los extractos de baja polaridad de *Lonchocarpus punctatus*, *Critonia aromatisans*, *Cymbopogon citratus* y *Plectranthus amboinicus*; especies de plantas con distribución en la Península de Yucatán, de las que se han reportado metabolitos con actividad insecticida y acaricida (Menéndez y Pavón, 1999; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Ayvaz *et al.*, 2010; Meza y Taborda, 2010; Méndez-Gonzalez *et al.*, 2012; Owino y Matasyoh, 2015), por lo que podrían emplearse como alternativas para el control de *V. destructor*

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Tratamientos a evaluar

Fueron utilizados los extractos de baja polaridad de *L. punctatus* (octubre 2017), *C. aromatisans* (enero 2018), *C. citratus* (B, abril 2018) y *P. amboinicus* (junio 2018) descritos en el Capítulo II

3.2.2 Ácaros *Varroa destructor*

Fueron utilizados ácaros hembra adultos obtenidos mediante la desoperculación de celdas de cría de *A. mellifera* (Dietemann *et al.*, 2013) (Figura 3.1, A1 y A2) procedentes de dos zonas, en apiarios ubicados en los alrededores de Izamal, Yucatán y en la comisaría de Xmatkuil, Yucatán. Para ello, en los meses de enero a marzo del año 2019 se colectaron cuadros de cría de colmenas infestadas con *V. destructor*, procedentes del Apiario de Abejas Africanizadas (ubicado en Xmatkuil) de la FMVZ de la UADY. Previo a esto, se determinó el nivel de infestación de cada una de las colonias del apiario y fueron seleccionadas las colonias con mayores niveles de infestación en abejas adultas mediante la prueba de David De Jong (De Jong *et al.*, 1982). En los meses junio y julio del mismo año se realizó la colecta de ácaros en los apiarios localizados en los alrededores de Izamal, esta colecta se realizó únicamente mediante la desoperculación de celdas de cría de zánganos (Figura 3.1, B). Todos los ácaros fueron colectados justo antes de realizar cada experimento y se colocaron en un vial tras ser retirados de las celdas (Figura 3.1, C), donde permanecieron hasta el momento de utilizarse.



Figura 3.1 Colecta de ácaros *Varroa destructor*. A) Desoperculación de celdas de cría, B) desoperculación de celdas de cría de zánganos con cepillo desoperculador y C) ácaros en vial.

3.2.3 Bioensayo de contacto residual en vial

Este bioensayo se realizó en el Laboratorio de Sanidad Apícola del Departamento de Apicultura Tropical de la FMVZ de la UADY y en el laboratorio de Interacciones Planta-Animal, ubicado en la URN del CICY.

La evaluación de toxicidad aguda en los ácaros *V. destructor* se realizó mediante el método de contacto residual en vial (Plapp y Vinson, 1977; Aliano *et al.*, 2006; Gashout y Guzmán-Novoa, 2009). Para realizar el bioensayo fueron utilizados viales de vidrio (Figura 3.2) de 20 mL con tapón de rosca (Sigma-Aldrich, número de catálogo Z190543), cuyo interior fue embebido con los tratamientos a evaluar. El disolvente utilizado como vehículo para los extractos fue acetona (J.T. Baker, Pensilvania, EUA). Fueron evaluados dos controles negativos, viales con el vehículo utilizado para los extractos (acetona) y viales sin ningún tratamiento, así como timol (Mieles del Mayab, Mérida, Yucatán) como control positivo, debido a que es uno de los tratamientos alternativos utilizados para el control de *V. destructor*.

Inicialmente se realizó un monitoreo con los extractos de las plantas seleccionadas, con el fin de identificar los extractos con actividad acaricida y proseguir con las evaluaciones únicamente con ellos. Se aplicaron 250 μ L de una solución a 1 mg/mL de cada extracto (evaluados individualmente) en los viales (250 μ g) y se realizaron cinco réplicas por cada extracto. Las evaluaciones posteriores constaron de diez replicas por cada dosis (200, 150, 100, 75, 50 y 25 μ g) de los extractos seleccionados mediante el monitoreo. De cada extracto se preparó una solución de 1 mg/mL y con ayuda de una micropipeta se colocó el volumen necesario (200, 150, 100, 75, 50 y/o 25 μ L) de la solución para conseguir la dosis deseada en los viales (200, 150, 100, 75, 50 y 25 μ g). Tras agregar el tratamiento los viales fueron mantenidos en rotación hasta la evaporación total del disolvente (3-5 minutos) e inmediatamente se les colocó la tapa. Después de preparar los viales con los tratamientos fueron introducidos cinco ácaros en cada uno de ellos, se les colocó la tapa y fueron mantenidos en oscuridad y a una temperatura de 28 ± 2 °C. Luego de cuatro horas de exposición a los tratamientos se revisó la supervivencia de los ácaros con ayuda de un pincel, considerando muerto al individuo si era incapaz de reaccionar al estímulo (Gashout y Guzmán-Novoa, 2009).



Figura 3.2 Evaluación de toxicidad aguda en los ácaros. Viales utilizados en la evaluación.

3.3 RESULTADOS

Evaluación de la actividad acaricida de los extractos de baja polaridad

Mediante el monitoreo de actividad acaricida (Tabla 3.1) se observó que a la dosis de 250 µg los extractos de hojas de *C. citratus* y de flores de *L. punctatus* carecían de actividad acaricida, mientras que los extractos de *C. aromatisans* y *P. amboinicus* generaron 100% de mortalidad, al igual que el control positivo (timol); por lo que se decidió eliminar los extractos de *C. citratus* y *L. punctatus* de las siguientes evaluaciones. En ninguna de las réplicas de los controles negativos (acetona y viales sin tratamiento) se presentó mortalidad en los ácaros.

Tabla 3.1 Resultados del monitoreo de actividad acaricida. Efecto de los tratamientos en la mortalidad de los ácaros, los datos representan el promedio del número de individuos muertos \pm la desviación estándar (DE) de 5 réplicas por cada tratamiento evaluado a 250 µg por vial.

Tratamientos (250 µg por vial)	% Mortalidad
Control positivo (timol)	100
<i>Lonchocarpus punctatus</i>	0
<i>Cymbopogon citratus</i>	0
<i>Plectranthus amboinicus</i>	100
<i>Critonia aromatisans</i>	100
Control negativo (acetona)	0
Control negativo (sin tratamiento)	0

En la evaluación posterior al monitoreo (Tabla 3.2), al igual que en ésta, no hubo mortalidad natural del ácaro, dado que en ambos grupos de control negativo no murió ninguno de los ácaros. Los extractos de *C. aromatisans* y *P. amboinicus* mantuvieron la actividad acaricida hasta la dosis de 50 µg por vial, la dosis más baja evaluada. Sin embargo, en el caso del extracto de *C. aromatisans* la actividad acaricida a esta concentración fue muy baja, provocando en promedio un 13% mortalidad, mientras que el promedio de mortalidad del grupo tratado con el extracto de *P. amboinicus* fue del 53%;

las dosis a las que ambos extractos mantuvieron la actividad acaricida en el total de la muestra (100%) de todas las réplicas realizadas fueron 250 y 150 μg , respectivamente.

Tabla 3.2 Resultados del bioensayo de toxicidad en ácaros hembra adultos *Varroa destructor*. Efecto de los tratamientos en la mortalidad de los ácaros, los datos representan el promedio del porcentaje de individuos muertos \pm DE de 10 réplicas por cada dosis evaluada.

Tratamientos ($\mu\text{g}/\text{vial}$)	<i>Critonia aromatisans</i>	<i>Plectranthus amboinicus</i>	Timol	Acetona	Sin tratamiento
250 μg	100	100	100		
200 μg	100	100	100		
150 μg	90 \pm 14.14	100	100		
100 μg	84 \pm 18.37	92 \pm 19.32	100	0	0
75 μg	82 \pm 23.94	80 \pm 23.25	100		
50 μg	60 \pm 23.09	60 \pm 18.85	100		
25 μg	54 \pm 46	42 \pm 22	98 \pm 6.32		

Con los datos obtenidos en esta evaluación se realizó un análisis Probit para obtener la concentración letal media (CL_{50}), resultando ser de 18.59 $\mu\text{g}/\text{vial}$ en *C. aromatisans* y de 36.50 $\mu\text{g}/\text{vial}$ para *P. amboinicus*, como se muestra en la Tabla 3.3; los resultados completos se encuentran en el Anexo 1.

Tabla 3.3 Resultados del análisis Probit de los datos obtenidos de la evaluación de actividad acaricida. Concentración letal media (CL_{50}) e límite de confianza (LC) superior de los extractos de *C. aromatisans* y *P. amboinicus*.

	CL_{50} ($\mu\text{g}/\text{vial}$)	LC fiducial de 95% (superior)
<i>Critonia aromatisans</i>	18.5972	36.7964
<i>Plectranthus amboinicus</i>	36.5071	45.7449

3.4 DISCUSIÓN

Las cuatro especies de plantas utilizadas en esta evaluación cuentan con reportes de componentes de los que se ha descrito que presentan actividad acaricida, por lo que debido a la composición fitoquímica de éstas, se esperaría que hubieran presentado actividad acaricida, sin embargo, solo dos extractos presentaron actividad contra *V. destructor*, el de *P. amboinicus* y el de *C. aromatisans*. En el caso de *C. aromatisans*, no existen reportes previos de actividad acaricida contra ninguna especie de ácaro. En cuanto a *P. amboinicus*, esta reportada la actividad acaricida y repelente contra *Raoiella indica* del extracto obtenido de sus hojas (Arumugam *et al.*, 2016; Castillo-Sánchez *et al.*, 2018), y que al cultivarla de forma intercalada con plantas de pepino ayuda en el control de *Tetranychus urticae* (Negm y Abu-hashim, 2019). Además, es posible que la actividad acaricida de éste se deba a la presencia de carvacrol, uno de los componentes característicos de esta especie (Hsu y Ho, 2019).

Recientemente se reportó que el aceite esencial de *C. citratus* tiene actividad acaricida contra el ácaro *V. destructor* con una CL_{50} de 237.065 $\mu\text{g/mL}$ (Sabahi *et al.*, 2018); al igual que de *C. citratus*, se esperaba que *L. punctatus*, evaluada anteriormente contra especies del género *Rhipicephalus* y con la cual se formuló un producto para su control debido a su actividad (Argáez *et al.*, 2011), tuvieran actividad contra el ácaro *V. destructor*, sin embargo, ninguno de estos extractos presentó actividad acaricida en nuestros experimentos. Es posible que la diferencia en los resultados se deba a una variación en la composición de los extractos, principalmente en el de *C. citratus*, el cual ya había sido evaluado en *V. destructor*; esta variación podría deberse a la diferencia en la forma de obtención del extracto o debido a las plantas *per se*, por las condiciones en las que se desarrolló.

En cuanto al timol (control positivo), Gashout y Guzmán-Novoa reportaron en 2009 una CL_{50} de 56.1 $\mu\text{g/vial}$ (Gashout y Guzmán-Novoa, 2009), sin embargo, en nuestra evaluación el grupo tratado con este compuesto presentó 100% de mortalidad a la concentración de 50 $\mu\text{g/vial}$ y del 98% a 25 $\mu\text{g/vial}$; resultados que sugieren el surgimiento de resistencia a este tratamiento en la población del parásito muestreada por Gashout y Guzmán-Novoa o una disminución de la actividad acaricida debido a la temperatura a la que se realizaron las evaluaciones .

La CL_{50} de *C. aromatisans* resultó menor que la de *P. amboinicus*, no obstante, la DE obtenida de los resultados de *C. aromatisans* fue mayor, lo que indica una gran variación en la efectividad acaricida, a diferencia de la de *L. Punctatus*, que fue menor. Una de las limitantes con los productos volátiles, la cual se presenta en los tratamientos que se utilizan actualmente para el control de *V. destructor*, es que su característica tan preciada (su volatilidad) se vuelve también una gran desventaja, ya que estos compuestos quedan a expensas de las condiciones climáticas, las cuales determinan los efectos que puedan tener dentro de la colmena, desde una eficacia terapéutica, hasta la muerte de la colonia en algunos casos; por lo que aunado al descubrimiento de nuevas moléculas deben también desarrollarse nuevas alternativas en la aplicación de los tratamientos.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE BAJA POLARIDAD DE *Lonchocarpus punctatus*, *Critonia aromatisans*, *Cymbopogon citratus* Y *Plectranthus amboinicus* SOBRE *Apis mellifera* Y EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE LAS LEVADURAS ASOCIADAS

4.1 INTRODUCCIÓN

Dada la amenaza que el ácaro *Varroa destructor* representa para la apicultura, se han buscado compuestos que sean capaces de controlarlo de manera eficaz. En el mercado existen productos tanto de origen sintético, como natural, sin embargo, la tendencia y demanda actual de alimentos seguros y de buena calidad, promueve el uso de extractos de plantas y sus componentes como alternativas naturales para el control de plagas, en este sentido, la NOM-001-ZOO-1994 en su modificación del 2005, permite el empleo de aceites esenciales y ácidos orgánicos como alternativas naturales para el control de *V. destructor*.

Los aceites esenciales son líquidos viscosos semivolátiles que son obtenidos mediante la destilación por arrastré de vapor de material vegetal (plantas) o sus partes (flores, hojas, semillas, tallo, corteza, etc...) y son mezclas complejas de diferentes compuestos, entre los que se encuentran principalmente monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos; estos componentes han sido señalados como los principales responsables de sus propiedades aromáticas, antioxidantes, antimicrobianas (Rios y Recio, 2005) y acaricidas. Si bien, estos productos pueden ser alternativas más seguras para los humanos, algunos pueden resultar tóxicos y generar efectos adversos en las abejas, como en el caso del timol, uno de los tratamientos acaricidas autorizados en la producción de miel orgánica (DOF, 2013; SAGARPA-SENASICA, 2018). Sin embargo, a pesar de su efectividad contra el ácaro *V. destructor*, resulta tóxico para las larvas de *A. mellifera* (Gashout y Guzmán-Novoa, 2009). Incluso, en un estudio de toxicidad realizado en 1997 con abejas obreras, el timol fue el compuesto más tóxico (Ellis y Baxendale, 1997). Actualmente se han realizado estudios cuyo resultados corroboran la toxicidad del timol para las abejas (Bergougoux *et al.*, 2012; Charpentier *et al.*, 2014; Aboushaara *et al.*, 2017; Rahimi y Moradpuor, 2017;

Tihelka, 2018; Toomemaa, 2018), sin embargo, este compuesto sigue siendo utilizado en la apicultura.

Un punto fundamental que ha sido pasado por alto al momento de encontrar extractos y/o compuestos con actividad acaricida contra *V. destructor*, es el efecto tóxico que tendrán éstos sobre las mismas abejas y sobre su microbiota. El papel que tiene la microbiota de las abejas no ha sido completamente elucidado, sin embargo, se conoce que algunos azúcares presentes en el néctar resultan tóxicos para las abejas y probablemente los microorganismos asociados a su sistema digestivo estén ayudando a que estos azúcares puedan ser metabolizados sin generar estragos en las abejas. Se sabe también, que las pectinas de la pared del polen son metabolizadas por la microbiota intestinal de las abejas (Engel *et al.*, 2012). Por lo que la microbiota de las abejas tiene un papel fundamental en la nutrición, salud y desarrollo de las abejas. Por lo que resulta necesario realizar las evaluaciones pertinentes para asegurar la inocuidad de los productos (extractos y/o compuestos) con actividad acaricida promisorio contra *V. destructor* sobre todos los organismos involucrados.

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) ha establecido directrices para el estudio de productos químicos, este compendio se divide en 5 secciones, en la sección 2 se describen métodos acordados internacionalmente para evaluar el efecto sobre los sistemas bióticos y es en esta sección donde se encuentra la evaluación de toxicidad aguda por contacto en abejas melíferas (OECD, 1998). El uso de estas metodologías ha sido establecido con la finalidad de estandarizar la forma de evaluación de productos químicos y pueden ser utilizadas a manera de escrutinio para seleccionar extractos o metabolitos que presenten los efectos deseados y carezcan de efectos negativos.

Por su parte, las estrategias para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los productos naturales, ya sean extractos puros, fracciones e incluso compuestos puros, han sido cuestionadas, debido a la gran cantidad de variables que se pueden presentar, entre ellas, las relacionadas al producto a evaluar *per se*, como su composición, su polaridad, volatilidad, entre otras; así como las relacionadas al microorganismo en cuestión y al modo en que será la interacción entre ambos; estas características pueden guiarnos para

seleccionar el método adecuado de evaluación (Ríos y Recio, 2005). Entre los métodos más utilizados para la evaluación antimicrobiana se encuentran el de difusión y el de dilución (Ríos y Recio, 2005; Reyes-Jurado *et al.*, 2014). Los métodos de difusión han sido ampliamente utilizadas en la evaluación de la actividad antimicrobiana de productos naturales, tanto el método de difusión en disco, como en pozo, permiten establecer en forma cualitativa el efecto de un conjunto de sustancias evaluadas de manera individual sobre un microorganismo. El principio de estos métodos es la difusión del tratamiento en cuestión hacia el agar, lo que genera la inhibición del crecimiento microbiano y esto puede apreciarse mediante la formación de zonas (o halos) de inhibición, dichas zonas deben aumentar al incrementar la concentración del tratamiento evaluado. Dentro de los métodos de dilución en caldo se encuentra la microdilución, esta consiste en realizar la evaluación en volúmenes finales de hasta 500 μL (Reyes-Jurado *et al.*, 2014), es útil para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), así como la concentración letal mínima (CLM, también llamada concentración mínima bactericida o fungicida, CMB y CMF, respectivamente) al subcultivar en un medio libre del producto evaluado. Además la ventaja principal de ésta sobre los métodos de difusión, radica en la sensibilidad aumentada de los microorganismos, lo que permite trabajar con cantidades de muestra pequeñas, algo valioso al evaluar productos naturales, por lo que es recomendado cuando se cuenta con poca cantidad de muestra (Ríos y Recio, 2005; Stella y Marín, 2009; Reyes-Jurado *et al.*, 2014).

Por lo anterior, en este trabajo se realizó una evaluación de la inocuidad de los extractos de baja polaridad de las plantas seleccionadas como candidatos para la evaluación acaricida contra *V. destructor* sobre *A. mellifera* y sobre levaduras asociadas a las abejas. Se utilizó la evaluación de toxicidad aguda por contacto para identificar los extractos que generen en menor grado efectos negativos en las abejas y seleccionar candidatos para evaluaciones posteriores, Así como el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) y el método de microdilución para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos sobre las levaduras.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Fármacos y Reactivos

Todos los disolventes fueron adquiridos de J. T. Baker (Pensilvania, EUA). El fluconazol (Flucoxan, PiSA Farmacéutica) se disolvió en agua destilada estéril antes de cada ensayo a la concentración correspondiente para cada cepa de levadura.

4.2.2 Extractos de baja polaridad

Fueron empleados los extractos descritos en el capítulo 2, de la primera colecta de *L. punctatus* (octubre 2017), *P. amboinicus* (noviembre 2017), *C. aromatisans* (enero 2018) y de la segunda colecta de *C. citratus* (abril 2018).

4.2.3 Alimento para las abejas

Para alimentar a las abejas durante el experimento se preparó jarabe en una proporción 1:1 de sacarosa:agua (Williams *et al.*, 2013) (Figura 4.1, A) y se les proporcionó en alimentadores cilíndricos con malla metálica en la parte superior para evitar que las abejas se introdujeran en él. Se disolvieron 50 gramos de sacarosa en 50 mL de agua y posteriormente fue esterilizado en autoclave.

4.2.4 Cajas experimentales

Se utilizaron cajas de plástico de 9.5 × 7 × 11 cm, con perforaciones para permitir la ventilación (OECD, 1998; Williams *et al.*, 2013) y con una superficie de cera estampada ubicada en el centro (Figura 4.1, B).

4.2.5 Abejas

Se colectaron cuadros con cría próxima a emerger en el Apiario de Abejas Africanizadas (ubicado en Xmatkuil) de la FMVZ de la UADY y se colocaron en una cámara ambiental (Figura 4.1, C) con condiciones controladas de oscuridad, temperatura y humedad relativa

(HR) (35 ± 1 °C y $65 \pm 5\%$, respectivamente). Transcurridas 24 horas tras colocar los cuadros en la cámara ambiental se colectaron las abejas emergidas (Figura 4.1, D) para realizar el bioensayo.



Figura 4.1 Fotografías de actividades. A) Alimento para las abejas, B) caja experimental para la evaluación de toxicidad aguda por contacto en abejas, C) cuadros de cría en incubación dentro de cámara ambiental y D) colecta de abejas recién emergidas.

4.2.6 Levaduras

Las levaduras que se emplearon en este bioensayo fueron *C. versatilis*, *C. apicola*, *K. cleridarum* y *Z. mellis*, las cuatro proceden de diferentes sitios de aislamiento en colonias de abejas de Yucatán (Tabla 1.4), del Meliponario y Apiario de Abejas Africanizadas de la FMVZ de UADY y fueron aisladas por el grupo de trabajo de la Dra. María Azucena Canto Aguilar, de la URN del CICY (Lizama, 2011), estas fueron seleccionadas debido a que fueron aisladas de las colmenas, por lo que podrían existir una relación simbiótica con las abejas. Para ser utilizadas se requirió de su reactivación en agar extracto de levadura, peptona, dextrosa (YPD, por sus siglas en inglés; Sigma-Aldrich) en los días previos a la realización de los bioensayos. Las cajas con las levaduras fueron incubadas dentro de hieleras de unicel en un cuarto a temperatura ambiente por los períodos de tiempo indicados en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Características para la evaluación con las levaduras.

Levadura	Tiempo de Crecimiento (horas)	Concentración del control positivo (fluconazol)
<i>Candida versatilis</i>	48	50 µg/mL
<i>Candida apicola</i>	48	300 µg/mL
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	96	2 mg/mL
<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	24	100 µg/mL

4.2.7 Toxicidad aguda por contacto

Este bioensayo se realizó en el Laboratorio de Sanidad Apícola del Departamento de Apicultura Tropical de la FMVZ de la UADY.

Abejas obreras recién emergidas fueron separadas en contenedores en grupos de 10 individuos (Figuras 4.2, A1 y A2) y colocadas dentro de un congelador horizontal para ser adormecidas mediante la exposición durante 3 minutos a baja temperatura (-5 ± 1 °C) (Human *et al.*, 2013); la temperatura fue monitoreada en todo momento con ayuda de un registrador de temperatura y humedad digital (HUATO, S320). Con una micropipeta se le

aplicó a cada abeja en el área dorsal del tórax 5 μ L del extracto a evaluar a una concentración de 40 mg/mL, es decir, 200 μ g de extracto, y a los individuos del grupo control se les aplicaron 5 μ L del disolvente utilizado como vehículo (acetona). Para cada tratamiento se realizaron tres réplicas con 30 individuos cada una, así como para el grupo control. Tras la aplicación del tratamiento, las abejas fueron colocadas nuevamente en la cámara ambiental (Figura 4.2, B) y mantenidas a una temperatura de 35 ± 1 °C y $65 \pm 5\%$ de HR. Todos los grupos fueron provistos de agua y alimento *ad libitum* durante el experimento. Transcurridas cuatro horas tras la aplicación de los tratamientos se observó su efecto sobre la mortalidad de los individuos, así como tras 24 horas (OECD, 1998).

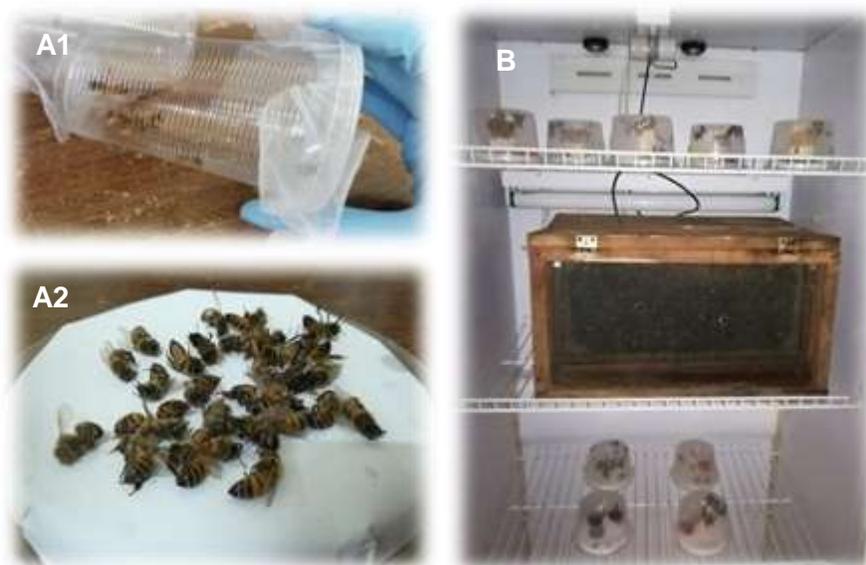


Figura 4.2 Evaluación de toxicidad aguda por contacto en *Apis mellifera*. A1) Grupo de abejas para adormecer, A2) abejas adormecidas y B) experimento en marcha.

4.2.8 Método de Kirby-Bauer

Se preparó un inóculo de cada levadura (1×10^6 ufc/mL) en caldo YPD y se dispersó homogéneamente con hisopos estériles en cajas Petri con agar YPD (Sigma-Aldrich). Se prepararon soluciones de los extractos de baja polaridad con Hx/diclorometano (1:1) a las concentraciones de 5, 10, 25 y 50 mg/mL y se aplicaron 10 μ L en discos de papel filtro (Whatman) con un diámetro de 5 mm y se colocaron en la placa previamente inoculada. Para la evaluación con timol, ácido oxálico y amitraz se utilizaron las concentraciones de 1.25, 2.5, 5, 10, 25 y 50 mg/mL, empleando agua destilada esterilizada como disolvente.

para estos tres tratamientos. A diferencia de los extractos, para el amitraz, ácido oxálico y timol fueron evaluadas dos concentraciones más bajas, debido a que se trata de compuestos puros, no mezclas de compuestos como en el caso de los extractos (Ríos y Recio, 2005). Se realizaron tres réplicas de cada concentración y la incubación se realizó a temperatura ambiente. Como control negativo se utilizó Hx/diclorometano 1:1 en las placas donde se evaluaron los extractos, y agua destilada esterilizada en las que se evaluaron los tratamientos para el control de *Varroa*. Los períodos de incubación y la concentración del control positivo (fluconazol) fueron las indicadas en la Tabla 4.1 y en la Figura 4.3 se muestra la distribución de los discos con los tratamientos en las cajas Petri. Fueron realizadas 3 evaluaciones en total con los tratamientos acaricidas (timol, ácido oxálico y amitraz), en la sección de resultados de este capítulo se muestra únicamente la fotografía de las placas de la primera evaluación realizada, mientras que en la sección de Anexos (Anexo 2) se encuentran en las de la segunda evaluación (Anexo 2.1) y de la tercera (Anexo 2.2-2.5).

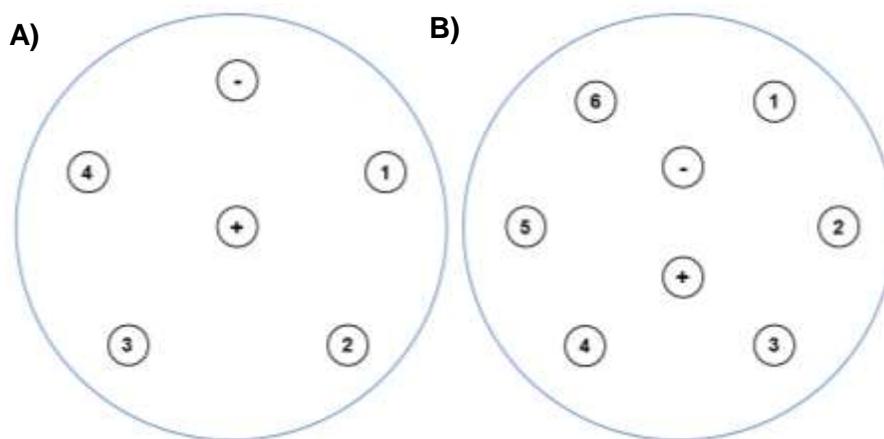


Figura 4.3 Distribución de los discos con los tratamientos a evaluar. Ubicación de los discos con control positivo (+), control negativo (-) y las concentraciones de 50 (1), 25 (2), 10 (3), 5 (4), 2.5 (5) y 1.25 (6) mg/mL de extractos de baja polaridad (A) y timol, ácido oxálico y amitraz (B)

4.2.9 Método de microdilución en caldo

Para realizar esta evaluación fue necesario establecer la concentración de inóculo adecuada, así como determinar la CMI del fluconazol (Control positivo). Fueron evaluadas dos concentraciones de inóculo, a 5×10^4 ufc/mL y a 5×10^6 ufc/mL, respectivamente (Cantón-Lacasa *et al.*, 2007), para seleccionar la más adecuada para los ensayos posteriores. Se utilizaron placas de 96 pocillos (organización de la placa en el nexo 3, 3.1) con capacidad para 300 μ L y como medio para la evaluación y para la preparación de los inóculos se utilizó caldo YPD. Las soluciones de fluconazol fueron preparadas con agua destilada estéril y las concentraciones evaluadas para cada levadura se muestran en la Tabla 4.2.

Para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos y del timol, amitraz y ácido oxálico se utilizaron placas de 96 pocillos con capacidad para 300 μ L y la concentración del inóculo de cada una de las levaduras en los pocillos fue de 5×10^6 ufc/mL. Se utilizó caldo YPD y los extractos de baja polaridad fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) para que fueran solubles en medio líquido. Con base en los resultados obtenidos en las evaluaciones previas mediante el método de Kirby-Bauer, las

concentraciones iniciales de extracto evaluadas fueron 5 mg/mL para los extractos de *L. punctatus*, *C. aromatisans* y *C. citratus*, 2.5 mg/mL para *P. amboinicus*, timol y ácido oxálico y de 31.25 mg/mL para el amitraz. En total se realizaron siete diluciones seriadas (NCCLS, 2012) en el caso de los extractos y ocho en el caso del timol, amitraz y ácido Oxálico, así como tres réplicas de cada concentración; en la Tabla 4.3 se muestran las concentraciones que fueron evaluadas para cada tratamiento y en la Figura 4.4 la metodología en general para la microdilución. Por cada levadura se utilizaron dos placas, como se muestra en la Figura 4.5. La incubación se realizó a temperatura ambiente y tras 24 horas de incubación se observó el crecimiento de las cuatro levaduras. Se utilizaron cuatro controles para cada levadura, como control positivo el fluconazol, control de viabilidad del inóculo, control del medio y control del disolvente. Se utilizó bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) como indicador de crecimiento (Mosmann, 1983), debido a que las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, tornando su coloración amarilla a rojiza-violeta en forma de precipitado, evidenciando así actividad metabólica (Stella y Marín, 2009), para ello, fueron colocados

100 µL de MTT al 1% en cada pocillo inicial e incubado nuevamente por 24 horas en agitación (agitador orbital). Los resultados se observaron a simple vista tras las 24 horas de incubación con el MTT, considerando positivo el crecimiento si se presentaba un precipitado de color rojo en cada pocillo. De manera adicional se realizó una resiembra en medio solido (Agar YPD), tomando alícuotas de todos los pocillos con ayuda de un cepillo replicador para verificar si la actividad de los tratamientos era de carácter fungistático y/o fungicida, esto se realizó tras las 24 horas iniciales de incubación, justo antes de aplicar la solución de MTT. En el nexa 3 se presentan las fotografías de las placas de 96 pocillos y del subcultivo realizado de las evaluaciones con fluconazol (nexo 3.2), con los extractos (Anexo 3.3) y con los tratamientos acaricidas (nexo 3.4).

Tabla 4.2 Concentraciones evaluadas de fluconazol para la determinación de la concentración mínima inhibitoria.¹

	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	<i>Candida versatilis</i>	<i>Candida apicola</i>
1	400	600	200	500
2	200	300	100	250
3	100	150	50	125
4	50	75	25	62.5
5	25	37.5	12.5	31.25
6	12.5	18.75	6.25	15.625
7	6.25	9.375	3.125	7.8125
8	3.125	4.6875	1.5625	3.9062
9	1.5625	2.3437	0.7812	1.9531
10	0.7812	1.1718	0.390625	0.9765
11	0.3906	0.5859	0.1955	0.4882
12	0.1955	0.2929	0.0976	0.2441

¹ Concentraciones en µg/mL.

Tabla 4.3 Concentraciones evaluadas de los extractos y tratamientos para la determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método microdilución en caldo.

	<i>Lonchocarpus punctatus</i> <i>Critonia aromatisans</i> <i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Plectranthus amboinicus</i> Timol Acido oxálico	Amitraz
1	5	2.5	32.25
2	2.5	1.25	15.625
3	1.25	0.625	7.8125
4	0.625	0.3125	3.90625
5	0.3125	0.15625	1.953125
6	0.15625	0.078125	0.9765625
7	0.078125	0.03906	0.48828125
8	NA	0.01953125 *	0.244140625

[†] Concentraciones en µg/mL. *Excepto para *P. amboinicus*.

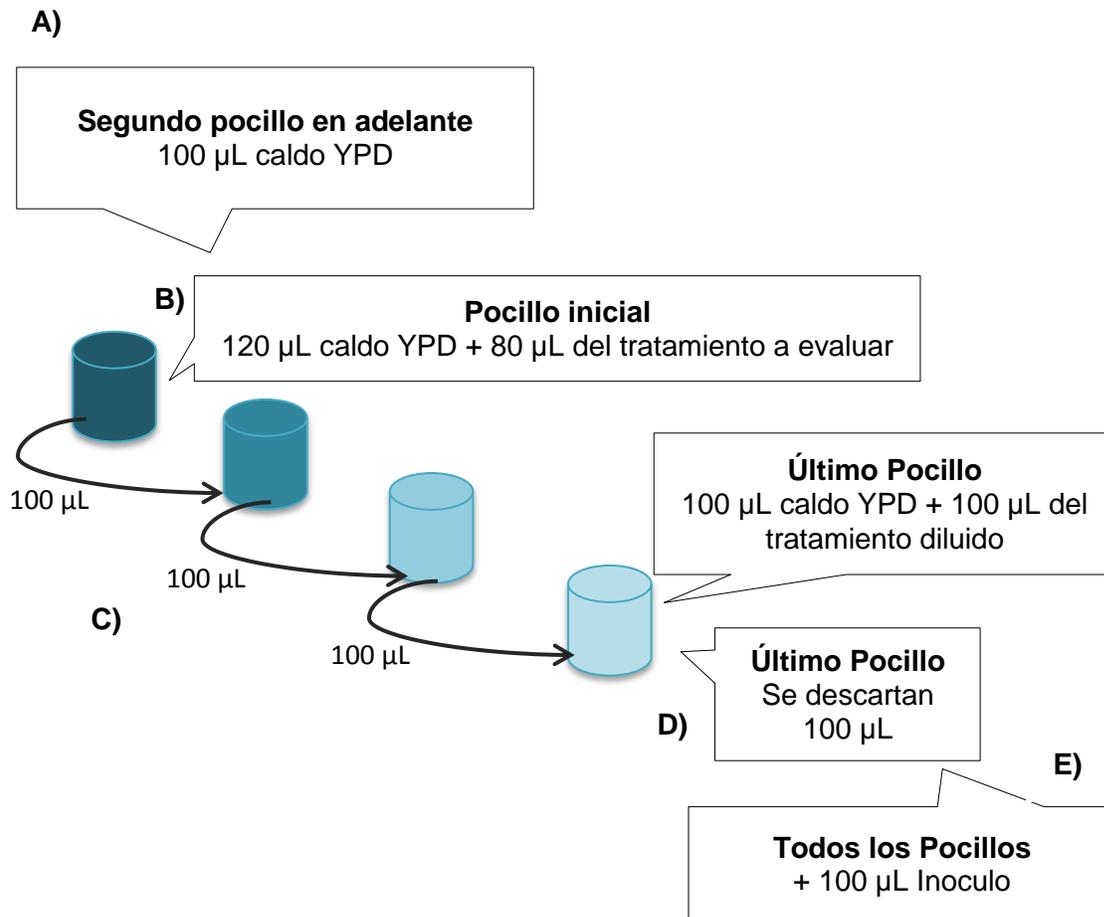


Figura 4.4 Metodología general para la microdilución y concentración de cada tratamiento por pocillo. A) Se colocan 100 μ L caldo YPD del segundo pocillo en adelante, B) en el pocillo inicial se agregan 120 μ L caldo YPD y 80 μ L del tratamiento a evaluar, el cual debe estar al doble de la concentración inicial deseada, C) se transfieren 100 μ L del pocillo inicial hacia el siguiente y así sucesivamente hasta el pocillo final, D) del pocillo final se descartan 100 μ L y E) se agregan 100 μ L del inoculo a cada uno de los pocillos.

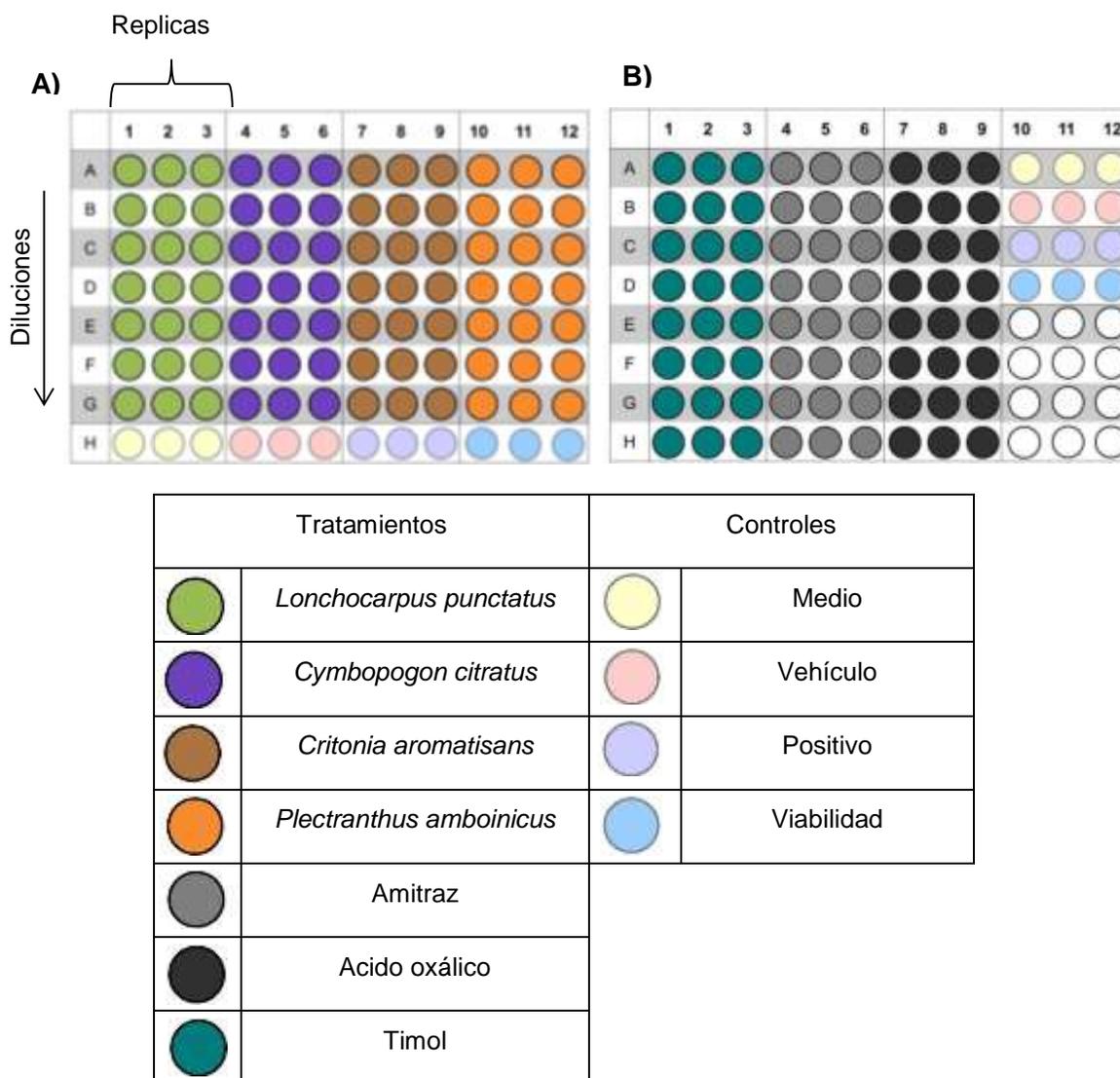


Figura 4.5 Organización de las placas de 96 pocillos para la evaluación mediante microdilución. Distribución y orientación de los tratamientos a evaluar; A) placas en las que se evaluaron los extractos y B) los tratamientos utilizados para el control de *V. destructor*.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Evaluación de inocuidad en *Apis mellifera*

La sobrevivencia de las abejas fue registrada a 4 y 24 horas tras la aplicación de los tratamientos, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.4. El extracto de baja polaridad de *C. citratus* no genero mortalidad en las abejas obreras durante el tiempo total de la evaluación, al igual que el grupo control. Por otro lado, los extractos de *C. aromatisans*, *L. punctatus* y *P. amboinicus* generaron mortalidad desde las 4 horas, donde *C. aromatisans* resultó ser el extracto más tóxico. Transcurridas 24 horas de la aplicación, en el grupo tratado con el extracto de *P. amboinicus* se presentó un aumento significativo en la mortalidad, mientras que en el caso del grupo tratado con *L. punctatus* solo se presentó la muerte de un individuo en una de las réplicas a las 4 horas y generó una mínima mortalidad a las 24 horas (de uno hasta tres individuos).

Tabla 4.4 Resultados del bioensayo de toxicidad aguda por contacto en abejas. Efecto de los tratamientos evaluados a la dosis de 200 µg en la sobrevivencia de las abejas, los datos representan el promedio del número de individuos (abejas obreras) vivos ± DE de 3 réplicas a cada intervalo de tiempo.

Tiempo (horas)	Tratamientos				
	acetona	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Critonia aromatisans</i>	<i>Lonchocarpus punctatus</i>	<i>Plectranthus amboinicus</i>
0	30 ± 0	30 ± 0	30 ± 0	30 ± 0	30 ± 0
4	30 ± 0	30 ± 0	16 ± 6.56	29.66 ± 0.58	28 ± 1
24	30 ± 0	30 ± 0	12 ± 6.93	28 ± 1	17 ± 4.58

4.3.2 Evaluación del efecto antimicrobiano en las levaduras

4.3.2.1 Método de Kirby-Bauer

El método de difusión en agar fue empleado para la determinación de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos en las levaduras. En la Tabla 4.5 y 4.6 se muestran los resultados de la evaluación de los extractos obtenidos de la primera y segunda colecta, respectivamente.

Tabla 4.5 Resultados de la evaluación actividad antimicrobiana de los extractos de baja polaridad de la primera colecta de material vegetal en las levaduras por el método de Kirby-Bauer. Se indican las concentraciones (mg/mL) mínimas de los extractos que presentaron actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las levaduras, así como los que no presentaron actividad (Sin actividad, SA) a las concentraciones evaluadas.

	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	<i>Candida versatilis</i>	<i>Candida apicola</i>
<i>Critonia aromatisans</i>	10	5	10	10
<i>Cymbopogon citratius</i>	SA	SA	SA	SA
<i>Lonchocarpus punctatus</i>	5	50	SA	SA
<i>Plectranthus amboinicus</i>	SA	SA	SA	SA

De los extractos obtenidos de la primera colecta, el de *C. aromatisans* presentó actividad a partir de 10 mg/mL de concentración sobre *Z. mellis*, *C. versatilis* y *C. apicola*, mientras que fue a partir de los 5 mg/mL con *K. cleridarum*. Únicamente los extractos de *P. amboinicus* y *C. citratius* no inhibieron el crecimiento de las cuatro levaduras en las cuatro concentraciones evaluadas. El extracto de *L. punctatus* solo fue activo contra *Z. mellis* y *K. cleridarum*, a partir de 5 y 50 mg/mL respectivamente, como se observa en la siguiente Figura (Figura 4.6).

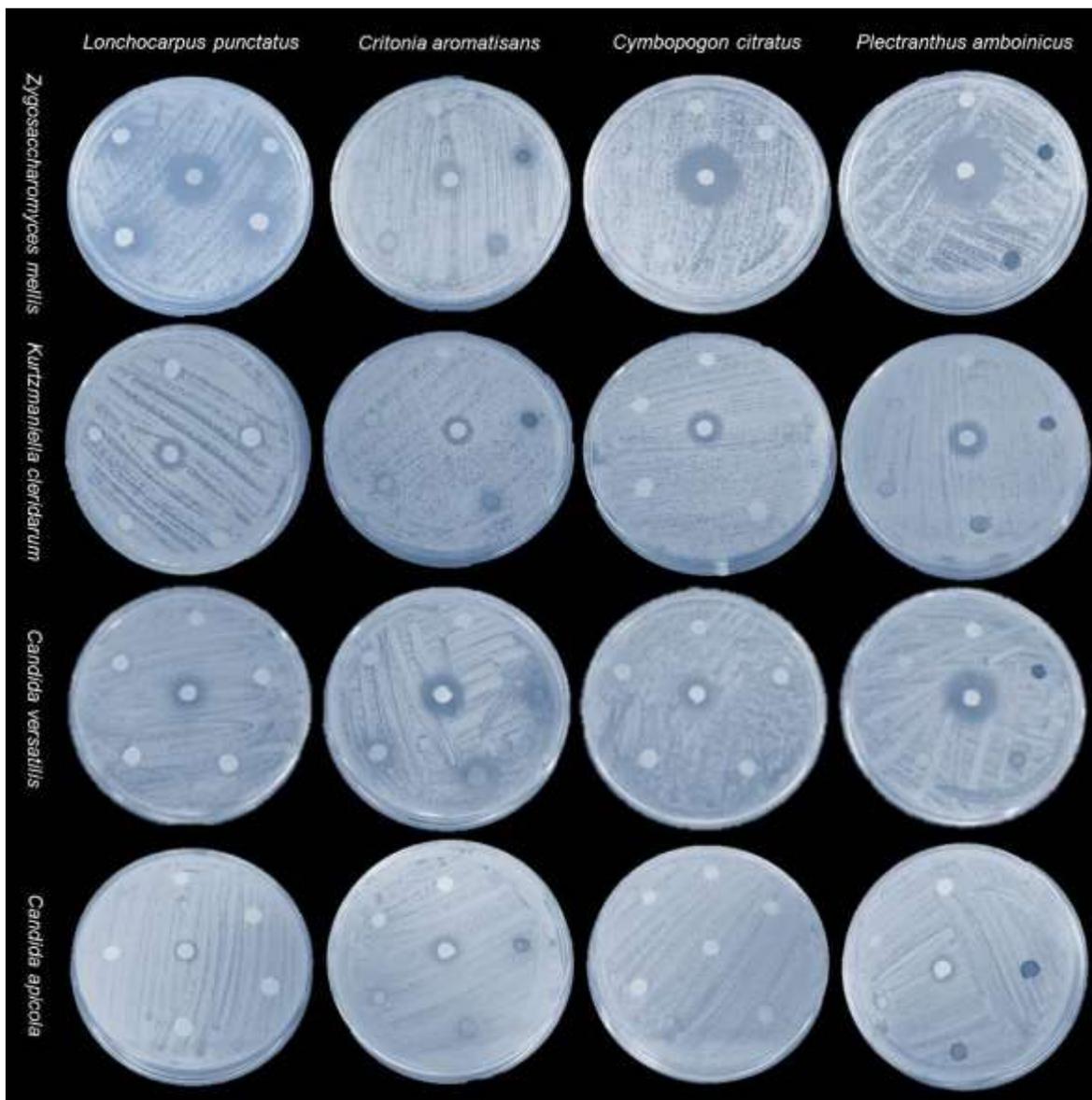


Figura 4.6 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de baja polaridad de la primera colecta mediante el método Kirby-Bauer. Se puede observar que en las placas correspondientes a *C. citratus* y *P. amboinicus* no se presentan halos de inhibición, a excepción del correspondiente al control positivo; solo en las de *L. punctatus* y *C. aromatisans* se generaron halos de inhibición; puede apreciarse también una diferencia en el diámetro de los halos de inhibición del control positivo en las placas correspondientes a una misma levadura.

Tabla 4.6 Resultados de la evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos de baja polaridad de la segunda colecta de material vegetal en las levaduras por el método de Kirby-Bauer. Se indican las concentraciones (mg/mL) mínimas de los extractos que presentaron actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las levaduras, así como los que no presentaron actividad (Sin actividad, SA) a las concentraciones evaluadas.

	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	<i>Candida versatilis</i>	<i>Candida apicola</i>
<i>Cymbopogon citratu s A</i>	50	10	SA	SA
<i>Cymbopogon citratu s B</i>	SA	SA	SA	SA
<i>Plectranthus amboinicus</i>	25	25	50	50

En la segunda colecta de material vegetal fueron colectados dos ejemplares de *C. citratu s* de dos sitios diferentes y varios ejemplares de *P. amboinicus*, también de un nuevo sitio. Como puede observarse en la Figura 35, el extracto de *C. citratu s* obtenido del material colectado en el sitio A (*C. citratu s A*) inhibió el crecimiento de *K. cleridarum* a partir de 10 mg/mL de concentración y a 50 mg/mL para *Z. mellis*. De igual manera, el extracto obtenido de la segunda colecta de *P. amboinicus*, inhibió el crecimiento de las cuatro levaduras utilizadas en la evaluación. El extracto de *C. citratu s* del material colectado en el sitio B (*C. citratu s B*) no presentó actividad inhibitoria en el crecimiento de las levaduras.

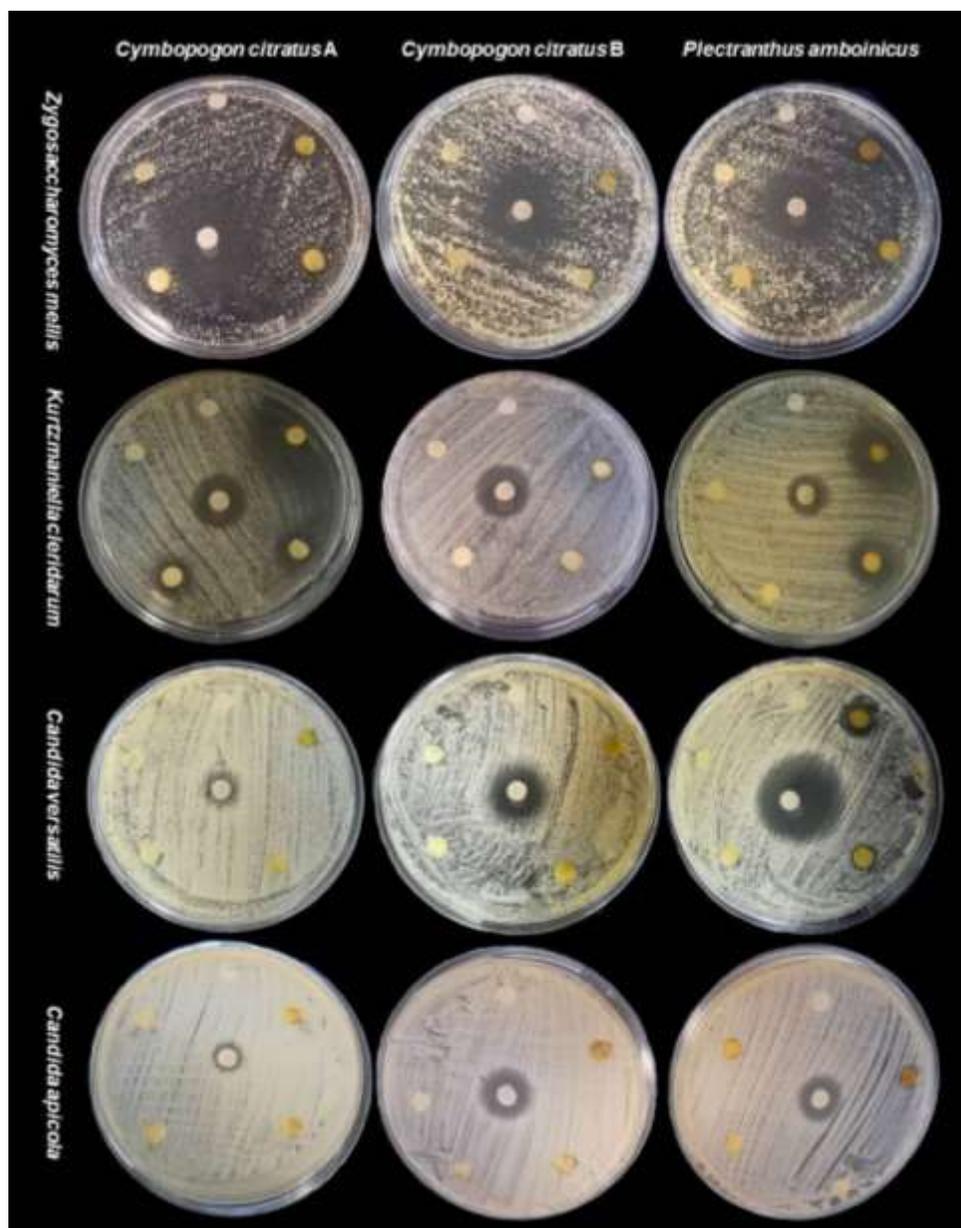


Figura 4.7 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de baja polaridad de la segunda colecta mediante el método Kirby-Bauer. Se puede observar que en las placas correspondientes a *C. citratus* B no hubo inhibición del crecimiento de ninguna de las levaduras, mientras que *C. Citratus* A generó inhibición en el crecimiento de *K. cleridarum* y *Z. mellis*, y *P. amboinicus* tuvo actividad inhibitoria sobre todas las levaduras. Al igual que en la Figura 4.6, puede apreciarse también una diferencia en el diámetro de los halos de inhibición del control positivo en las placas correspondientes a una misma levadura

Además de realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana con los extractos de baja polaridad de las plantas seleccionadas, también se realizó con el timol, amitraz y ácido oxálico, debido a que no existe información en la literatura sobre su actividad en las levaduras seleccionadas en este estudio. Se realizaron tres repeticiones de esta evaluación, en las primeras dos (A y B) se colocaron todas las concentraciones a evaluar de cada tratamiento en una sola placa y en la tercer evaluación (C) se colocaron los discos de manera individual, es decir, una placa por cada concentración a evaluar, debido a que se pudo observar un efecto sinérgico al evaluar todas las concentraciones de un mismo tratamiento en una sola placa. Los resultados se resumen en la Tabla 4.7. y se presentan en la Figura 4.8 y en el Anexo 2.

Tabla 4.7 Resultados de las evaluaciones de actividad antimicrobiana de los tratamientos acaricidas en las levaduras por el método de Kirby-Bauer. Se indican las concentraciones (mg/mL) mínimas de los tratamientos a las que presentaron actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las levaduras en la evaluación inicial (A), la segunda (B) y la realizada de manera individual (C).

Evaluación	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>			<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>			<i>Candida versatilis</i>			<i>Candida apicola</i>		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Timol	10	50	5	25	25	10	25	25	50	25	25	50
Amitraz	5	25	50	10	10	25	25	10	25	50	50	5
Ácido oxálico	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA

El ácido oxálico resultó inocuo para las cuatro levaduras utilizadas en las tres repeticiones de la evaluación (A, B y C). Tanto el timol como el amitraz presentaron actividad contra todas las levaduras en las tres repeticiones, con variaciones en la concentración mínima (desde 5 hasta 50 mg/mL) que afectó el crecimiento de las levaduras. Se observó también un efecto de los tratamientos evaluados (timol, amitraz y ácido oxálico) sobre la acción inhibitoria del fluconazol (control positivo) en las evaluaciones A (Figura 4.8) y B (nexo 2.1), presentándose disminuido el halo de inhibición del fluconazol en las placas donde se evaluó el ácido oxálico e incluso la ausencia de éste (Anexo 2.1, *C. apicola* y *C. versatilis*); mientras que en las placas en las que se evaluó el timol y el amitraz se observó un aumento en el diámetro en el halo de inhibición generado por el fluconazol. En los Anexos 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5 se puede observar el halo de inhibición normal que debería

generar el fluconazol, así como los generados por los tratamientos al evaluarse de manera individual.



Figura 4.8 Resultados de la primera evaluación (A) de la actividad antimicrobiana del timol, amitraz y ácido oxálico sobre las levaduras por el método Kirby-Bauer. Se presentan halos de inhibición en las placas donde se evaluó el timol y el amitraz, mientras que el ácido oxálico no inhibió el crecimiento de ninguna de las levaduras, también, se puede observar la variación en el diámetro de los halos de inhibición del control positivo.

4.3.2.2 Método de microdilución en caldo.

Para poder realizar la evaluación de los extractos mediante el método de microdilución se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del fluconazol para cada levadura. Además, dicha determinación se realizó utilizando dos concentraciones de inóculo diferentes, con el fin de seleccionar la concentración adecuada de inóculo para las evaluaciones posteriores (orientación y resultados en Anexos 3.1 y 3.2, respectivamente). La concentración idónea del inóculo para realizar este ensayo resultó ser la de 5×10^6 ufc/mL, debido a que en la concentración a 5×10^4 ufc/mL no hubo crecimiento de *C. versatilis* (Tabla 4.8).

Tabla 4.8 Resultados de concentración mínima Inhibitoria de fluconazol. Se muestra la CMI en $\mu\text{g/mL}$ del fluconazol para cada levadura a dos concentraciones de inóculo, la CMI del fluconazol para *C. versatilis* a la concentración de 5×10^4 ufc/mL no fue determinada (ND).

Levadura	CMI con Inóculo a 5×10^4 ufc/mL	CMI con Inóculo a 5×10^6 ufc/mL
454 <i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	0.78125	1.5625
443 <i>Zygosaccharomyces Mellis</i>	4.6875	9.375
386 <i>Candida versatilis</i>	ND	0.78125
413 <i>Candida apicola</i>	7.8125	15.625

La decisión de la concentración inicial y de las diluciones a evaluar mediante el método de microdilución fue realizada con base en los resultados obtenidos en la evaluación empleando el método de Kirby-Bauer. En la Tabla 4.7 se resumen los resultados obtenidos. En esta evaluación los tratamientos que presentaron la CMI más baja fueron el extracto de *P. amboinicus* y el timol, el primero presentó una CMI de 0.312 mg/mL para *Z. mellis*, *K. cleridarum* y *C. versatilis* y de 0.625 para *C. apicola*, mientras que la CMI del timol fue de 0.156 para *Z. mellis*, 0.078 para *K. cleridarum* y *C. versatilis* y 0.312 para *C. apicola*. El extracto de *L. punctatus* solo fue activo contra *C. versatilis* y presentó una CMI de 5 mg/mL, el ácido oxálico tuvo una CMI baja únicamente para *C. versatilis*, que fue de

0.625 mg/mL, así como el amitraz para *K. cleridarum* y *C. versatilis*, que fueron de 0.244 y 0.976 mg/mL, respectivamente. Por otro lado, *Z. mellis* y *C. apicola* fueron las levaduras que presentaron la mayor CMI de amitraz, que resultó de 31.25, la concentración más alta evaluada.

Tabla 4.9 Resultados de la evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos sobre las levaduras por el método de microdilución. Se indica la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) en mg/mL de cada uno de los tratamientos en las levaduras.

	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>		<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>		<i>Candida versatilis</i>		<i>Candida apicola</i>	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Lonchocarpus punctatus</i>	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND
<i>Critonia aromatisans</i>	2.5	ND	1.25	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5
<i>Cymbopogon citratus</i>	5	5	1.25	1.25	5	5	2.5	2.5
<i>Plectranthus amboinicus</i>	0.312	1.25	0.312	0.312	0.312	0.625	0.625	0.625
Timol	0.156	0.312	0.078	0.156	0.078	0.078	0.312	0.625
Amitraz	31.25	31.25	0.244	0.244	0.976	3.906	31.25	31.25
Ácido oxálico	1.25	ND	2.5	2.5	0.625	0.625	2.5	ND
Fluconazol	0.093	ND	0.0015	0.0015	0.0078	0.025	0.015	ND

ND: No Determinado

4.4 DISCUSIÓN

En la evaluación de toxicidad aguda por contacto de los extractos sobre *A. mellifera* únicamente el extracto de *C. citratus* resultó inocuo para las abejas durante el período evaluado, en contraste con los resultados obtenidos por Sabahi *et al.* (2018) al evaluar el aceite esencial de *C. citratus* mediante este mismo método, en donde reportó que éste presentó una DL_{50} de 274.22 y 266.54 μg a las 24 y 48 horas (Sabahi *et al.*, 2018), respectivamente.

Los extractos de *C. aromatisans*, *L. punctatus* y *P. amboinicus* generaron mortalidad en las abejas a la dosis evaluada (200 μg). Seguido de *C. citratus*, el extracto de *L. punctatus* fue el que menor mortalidad causó, por otro lado, los extractos de *C. aromatisans* y *P. amboinicus* fueron los más tóxicos para las abejas; inicialmente el extracto de *P. amboinicus* parecía no ser tan tóxico a las cuatro horas de administrado el tratamiento, sin embargo, su efecto fue notorio a las 24 horas, donde el promedio de abejas vivas resultó de 17 ± 4.58 , mientras que a las cuatro horas fue de 28 ± 1 .

Los resultados obtenidos en la primera evaluación de actividad antimicrobiana en las levaduras mediante el método de Kirby-Bauer mostraron que los extractos de baja polaridad de *C. aromatisans* y *L. punctatus* presentan actividad contra las levaduras utilizadas, lo cual podría generar un desequilibrio en la microbiota de las abejas en el caso de su ingestión. Por el contrario, los extractos de *P. amboinicus* y *C. citratus* fueron inocuos para todas las levaduras.

Tras realizar la primera evaluación de actividad antimicrobiana en las levaduras mediante el método de Kirby-Bauer, se seleccionó a *C. citratus* y *P. amboinicus*, y se realizó una nueva colecta de material vegetal de estas dos especies, debido a que ambos resultaron inocuos para las cuatro levaduras a todas las concentraciones evaluadas; en el caso de *C. citratus* éste fue un resultado inesperado, dado que existen reportes de que el extracto de esta especie posee actividad antimicrobiana (Ramírez-Ortega, 2013; Ekpenyong *et al.*, 2015; Veléz-Rodríguez, 2015; Pérez, 2017; Hsu y Ho, 2019) y generalmente los aceites esenciales poseen dicha actividad, además de acaricida e insecticida; estas dos últimas actividades se le atribuyen principalmente a los isoprenoides (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Ávalos y Pérez-Urria, 2009) y en la composición fitoquímica de las cuatro especies

de plantas utilizadas en este trabajo han sido descritos compuesto de este tipo; es por ello que podrían ser este tipo de compuestos los que estén generando el efecto tóxico en las abejas, ya que los extractos de *C. aromatisans* y *P. amboinicus*, fueron los que generaron un mayor porcentaje de mortalidad y en ambas especies han sido descritos como componentes mayoritarios algunos terpenoides. Si bien, en *C. citratus* se han reportado también este tipo de compuestos (Fonnegra y Jiménez, 2007; Méndez-González *et al.*, 2012), es posible que se deba a la concentración en la que se encuentran en el extracto, el que se presente o no actividad contra las abejas y con las levaduras. También, la actividad podría deberse a otros tipos de compuestos no tan volátiles, ya que se trata de extractos obtenidos mediante maceración y no de aceites esenciales, por lo que además de los compuestos volátiles, el extracto puede contener compuestos no volátiles y estos podrían estar generando la mortalidad presentada a partir de las 24 horas en las abejas.

El material vegetal de la segunda colecta provino de sitios diferentes, se colectaron ejemplares de *P. amboinicus* de un nuevo sitio, y en el caso de *C. citratus* se colectó un ejemplar del mismo sitio donde se realizó la primera colecta y un ejemplar en un sitio nuevo; además de realizarse en diferentes temporadas. Lo anterior fue evidente en los resultados obtenidos en la segunda evaluación, dado que uno de los extractos de *C. citratus* (A) presentó actividad contra *Z. mellis* y *K. cleridarum*, así como el extracto de *P. amboinicus* contra todas las levaduras, en cambio, el otro extracto de *C. citratus* (B) resultó inocuo, como el de la primera colecta. El aceite esencial de *P. amboinicus* es rico en compuestos aromáticos, entre los componentes mayoritarios que se reporta en su composición se encuentran el timol y el carvacrol, compuestos con actividad acaricida e insecticida reportada (Ayvaz *et al.*, 2010). El timol es un constituyente común de los aceites esenciales obtenidos de plantas pertenecientes a los géneros *Lippia*, *Thymus* y *Origanum*. De este compuesto se ha reportado que presenta actividad fungicida y bactericida (García-García y Palou-García, 2008; Rojas *et al.*, 2014; Salehi *et al.*, 2018), con nuestros resultados se confirma que también presenta actividad contra las levaduras asociadas a las abejas utilizadas en esta evaluación. Este compuesto puede encontrarse de manera natural en los productos de la colmena, por lo que podría ser un factor que este regulado la población de estas levaduras en las abejas y que al ser utilizado como tratamiento contra la varroosis ocasione una disminución aún mayor en la población de

estas levaduras, lo que dificulta su aislamiento, o por lo que es común que existan una población escasa o nula de levaduras en la microbiota de las abejas. Por su parte, el aceite esencial de *C. citratus* también presenta actividad acaricida reportada (Meza y Taborda, 2010), y entre los componentes mayoritarios que se reportan en su composición están los monoterpenos, principalmente el geranial y el neral y de manera minoritaria está constituido por compuestos aromáticos, terpenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, esterres, entre otros.

Al no existir reportes acerca de la actividad antimicrobiana de los tratamientos que se utilizan para el control de *V. destructor* sobre las levaduras seleccionadas, se decidió realizar dicha evaluación. Esta se llevó a cabo de la manera convencional, es decir, todos los discos con las concentraciones a evaluar de cada tratamiento en una placa y con base en los resultados se optó por evaluar cada concentración de manera individual.

El ácido oxálico resultó inocuo contra las cuatro levaduras, mientras que el timol y el amitraz fueron activos contra todas ellas en las tres repeticiones de la evaluación. Por lo que el empleo de estos tratamientos podría alterar la composición de la microbiota de las abejas y ponerlas en riesgo, debido al papel esencial que tienen estos microorganismos para las abejas, ya que se les atribuye tanto a levaduras como a bacterias la transformación de polen floral a pan de abeja, esencial para la alimentación, nutrición y por lo tanto, en la salud de las abejas (Araneda *et al.*, 2014; Portillo, 2016).; un ejemplo de ello es el impacto que ocasiona el glifosato al alterar la microbiota (Motta *et al.*, 2018). Además, se logró apreciar que existe un efecto sinérgico de estos tratamientos con el fármaco utilizado como control positivo en la evaluación, tanto el amitraz como el timol provocaron un aumento en el diámetro del halo de inhibición del fluconazol (control positivo), mientras que en las placas en las que se evaluó ácido oxálico ocurrió lo contrario, se presentó disminuido.

En la evaluación realizada mediante el método de microdilución los extractos de *L. punctatus* y *C. citratus* y el ácido oxálico (B) presentaron actividad, mientras que por el método de Kirby-Bauer no fueron activos; *L. punctatus* tuvo actividad contra *C. versatilis* y el ácido oxálico y *C. citratus* contra las cuatro levaduras. La CMI obtenida de *L. punctatus* para *C. versatilis* fue mayor que las concentraciones evaluadas mediante Kirby-Bauer, así

como las obtenidas de *C. citratus* para *Z. mellis* y *C. versatilis*, en cambio *K. cleridarum* y *C. apicola* presentaron una CMI que se encontraba entre las concentraciones evaluadas mediante el método de Kirby-Bauer, de igual manera con el ácido oxálico en las cuatro levaduras. La CMI de *P. amboinicus* y del timol obtenidas para las cuatro levaduras en esta evaluación fueron las más bajas, así como las del amitraz para *K. cleridarum* y *C. versatilis*, sin embargo, no resultaron menores que las del control positivo. A diferencia del timol y el amitraz, el ácido oxálico no inhibió el crecimiento de ninguna de las levaduras; este compuesto está presente de manera natural en algunas las plantas, sin embargo, a pesar de que el ácido oxálico resultó ser inocuo contra las levaduras por el método de Kirby-Bauer, es cuestionable su empleo, debido a los efectos adversos que se han demostrado en las abejas (Gregorc *et al.*, 2004; Johnson, 2015).

Estos resultados, tanto los obtenidos en la evaluación con las abejas, como con las levaduras, nos ayudan a identificar las dosis que representan un riesgo para *A. mellifera* y la forma más amigable o adecuada de proporcionar un tratamiento contra *V. destructor*, afectando en la menor medida posible a las abejas y a las levaduras, así como a cualquier microorganismo simbiote. El usar alternativas naturales para el control de plagas, como *V. destructor*, hacen más segura la práctica de la apicultura y el consumo de los productos que esta genera. Sin embargo, no debemos suponer que, aunque estas sustancias sean de origen natural serán inocuas para todos los organismos. Un gran ejemplo de esto es el timol, que ha sido usado como alternativa natural para el tratamiento de la varroosis y puede encontrarse en la miel de manera natural, pero a muy bajas concentraciones. Sin embargo, ha sido demostrado que su uso como tratamiento para el control de *V. destructor* genera efectos adversos en las abejas (Allis y Baxendale, 1997; Gashout y Guzmán-Novoa, 2009; Bergougnoux *et al.*, 2012; Grandtne y Chevrette, 2013; Charpentier *et al.*, 2014; Aboushaara *et al.*, 2017; Toomemaa, 2018). Sin embargo pese a que se ha reportado que este producto presenta actividad fungicida y bactericida (García-García y Palou-García, 2008; Rojas *et al.*, 2014; Salehi *et al.*, 2018), no se han realizado estudios para conocer el impacto sobre su microbiota, lo cual debería abordarse en los próximos años ya que algunos estudios empiezan a sugerir la adición de aceites esenciales, entre ellos timol, para el control de *V. destructor* (Sammataro *et al.*, 2009). Debido a que como el timol, cualquier otro producto natural podría ser activo contra la

microbiota de las abejas, resulta importante verificar que las alternativas con potencial para el control de *V. destructor* no sean dañinas tanto para las abejas, como para su microbiota, que si bien no está totalmente claro el papel específico de cada uno de los microorganismos que la conforman, se sabe que contribuyen a la salud de las abejas (Barker, 1977; Crane, 1978; Vega y Dowd, 2005; Engel *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2016; Raymann y Moran, 2018).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

En este estudio se demostró que los extractos de baja polaridad de *C. aromatisans* y *L. punctatus* poseen actividad acaricida sobre *V. destructor*, sin embargo, ambos extractos también presentaron actividad contra *A. mellifera* y contra las levaduras en las evaluaciones de toxicidad y de actividad antimicrobiana (Tabla 5.1). A pesar de los resultados obtenidos, ya que se ha visto que los efectos negativos de los tratamientos acaricidas sobre las abejas varían de acuerdo a su forma farmacéutica y/o forma de aplicación (Tihelka, 2018), la forma de administrarlos podría constituir una ventaja, que podría disminuir los efectos negativos en la colmena, y potenciar el efecto deseado. Además, ambos extractos representan alternativas promisorias, dado que la CL₅₀ no excedió los 50 µg/ vial, mientras que para el tau-fluvalinato se ha reportado 40.2 µg/vial (Sabahi *et al.*, 2018) y 56.1 µg/vial para el timol (Gashout y Guzmán-Novoa, 2009).

Tabla 5.1 Resumen de resultados de todas las evaluaciones. Los resultados de la evaluación de la actividad acaricida contra *Varroa destructor* se muestran en µg por vial, los datos del bioensayo de toxicidad aguda por contacto en *Apis mellifera* representan el promedio del número de individuos (abejas obreras) vivos ± DE de 3 réplicas a las 24 horas de recibir el tratamiento (200 µg de extracto), y se muestran las concentraciones (mg/mL) a las que los extractos presentaron actividad inhibitoria sobre las levaduras mediante el método de Kirby-Bauer (K-B) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/mL obtenida mediante microdilución.

Tratamiento evaluado	<i>Varroa destructor</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>		<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>		<i>Candida versatilis</i>		<i>Candida apicola</i>	
	CL50	Sobrevivencia	K-B	CMI	K-B	CMI	K-B	CMI	K-B	CMI
<i>Cymbopogon citratus</i>	ND	SA	SA	5	SA	1.25	SA	5	SA	2.5
<i>Critonia aromatisans</i>	18.5972	12 ± 6.93	10	2.5	25	1.25	10	1.25	50	2.5
<i>Lonchocarpus punctatus</i>	ND	28 ± 1	5	ND	50	ND	SA	5	SA	ND
<i>Plectranthus amboinicus</i>	36.5071	17 ± 4.58	25	0.312	25	0.312	50	0.31	50	0.625
Timol	ND	ND	5	0.156	10	0.078	50	0.08	25	0.312
Amitraz	ND	ND	50	31.25	25	0.244	25	0.98	50	31.25
Ácido oxálico	ND	ND	SA	1.25	SA	2.5	SA	0.63	SA	2.5

SA: Sin actividad; ND: No determinado

El análisis de los extractos de *C. aromatisans* y *P. amboinicus* (de la segunda colecta) mediante CG-EM reveló que entre los componentes mayoritarios se encontraban cumarina y ciclocoloronona, y carvacrol, respectivamente; estos fueron los únicos extractos que presentaron actividad acaricida contra *V. destructor*. El carvacrol conformaba más del 50% de la composición del extracto de *P. amboinicus*, por lo que resulta evidente el porqué este extracto presentó actividad contra *V. destructor*. Además, este componente podría ser el responsable de la actividad que presentó este extracto en la evaluación actividad antimicrobiana en las levaduras, ya que el primera extracto evaluado de esta especie (de la primera colecta) fue inocuo para las levaduras, y el análisis por CG-EM reveló que carecía de este componente y en su lugar los componentes mayoritarios fueron B-sitosterol y α -amirina; se ha reportado que el β -sitosterol posee actividad acaricida (Moawad *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018) y antimicrobiana (Sen *et al.*, 2012; Odiba *et al.*, 2014; Ododo *et al.*, 2016), sin embargo, el extracto que la contenía no presentó actividad contra las levaduras. Además de carvacrol, en el extracto de *P. amboinicus* también se detectó escualeno, de este último existe una patente registrada de un producto acaricida (Chunya *et al.*, 2010) y ha sido identificado entre los componentes mayoritarios de extractos con actividad ixodicida (Souza *et al.*, 2017) y ambos compuestos poseen también actividad antimicrobiana reportada (García-García y Palou-García, 2008; Martínez *et al.*, 2015; Hsu y Ho, 2019); por lo anterior, es posible que la actividad observada en todas las evaluaciones se deba a estos compuestos. Este extracto (*P. amboinicus*) fue el segundo más tóxico para las abejas, así como el que menor CMI presentó en la evaluación de actividad antimicrobiana en las levaduras mediante microdilución.

El extracto de *C. aromatisans* fue activo contra las cuatro levaduras evaluadas, al igual que contra *A. mellifera*, donde resultó ser el extracto que mayor mortalidad ocasionó en la abeja, de los cuatro extractos evaluados. De sus principales componentes como la cumarina y la ciclocoloronona se ha reportado que presentan actividad acaricida; la ciclocoloronona no ha sido evaluada de forma aislada, sin embargo, se le atribuye a su presencia la actividad ixodicida reportada de algunos aceites esenciales (Ribeiro *et al.*, 2007; Lebouvier *et al.*, 2013) y la cumarina presenta actividad acaricida contra *Dermatophagoides pteronyssinus* (Gleye *et al.*, 2003); y a otras cumarina y derivados se

les ha atribuido también actividad acaricida (Owino y Matasyoh, 2015), insecticida (Hussain *et al.*, 2018) y antimicrobiana (Ferrer, 2007; Naik *et al.*, 2017; López-Rojas *et al.*, 2018). Es posible que estos compuestos sean los responsables de la actividad de este extracto contra *V. destructor*, *A. mellifera* y en las levaduras, sin embargo, se requieren de estudios de aislamiento biodirigido que confirmen estos hallazgos.

Los extractos de *C. citratus* presentaron grandes diferencias en su composición, el que se obtuvo de la primera colecta presentó como componentes mayoritarios β -sitosterol y β -sitostenona, además de otro componente que no pudieron ser identificados que presentó similitud con la 4,4'-Difluorobenzofenona, este primer extracto fue inocuo para las levaduras; el extracto *C. citratus* A sí presentó actividad contra las levaduras y estaba compuesto en su mayoría por geranial y cimnopogona; el extracto *C. citratus* B al igual que el anterior, presentó geranial en un porcentaje de abundancia relativa similar y a diferencia de este carecía de cimnopogona y en su lugar contenía geraniol, componente que no se encontró en los extractos anteriores. El extracto de *C. citratus* B fue empleado en la evaluación de la actividad acaricida y en la de inocuidad en *A. mellifera*, en los cuales no presentó actividad. El único extracto de *C. citratus* que presentó actividad contra las levaduras fue el B, por lo que podría deberse a la cimnopogona, ya que este componente no se encontró en los otros dos extractos de esta especie.

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

- Solo los extractos de *P. amboinicus* y *C. aromatisans* presentaron actividad acaricida sobre *V. destructor*, sin embargo, su actividad biológica no fue selectiva, ya que ambos extractos generaron mortalidad en las abejas, así como actividad antimicrobiana sobre las levaduras. Estos efectos podrían deberse a la acción sinérgica de los diferentes componentes de los extractos, por lo que mediante un estudio de aislamiento biodirigido se podría determinar si los metabolitos responsables de la actividad acaricida actúan de manera selectiva sobre *V. destructor* sin afectar a las abejas y a las levaduras asociadas.
- La diferencia entre los resultados obtenidos con los extractos de la primera y segunda colecta en la evaluación de actividad antimicrobiana sobre las levaduras se debe a la

variación en su composición, debido a que en los que presentaron actividad antimicrobiana se detectaron compuestos con actividad antimicrobiana reportada, los cuales no fueron detectados en los extractos sin actividad inhibitoria.

- A pesar de que los extractos de *C. aromatisans* y *P. amboinicus* presentaron actividad inhibitoria sobre las levaduras, esta fue a una elevada concentración, a la que no podrían ser expuestas en condiciones de campo.
- Los extractos de *C. aromatisans* y de *P. amboinicus*, no deberían emplearse en presentaciones que requieran que las abejas lo consuman, ni que sean directamente aplicados sobre las abejas, debido a que generan un alto porcentaje de mortalidad en las abejas.
- A pesar de los efectos negativos de los extractos de *C. aromatisans* y *P. amboinicus* en las evaluaciones de toxicidad sobre *A. mellifera* y de actividad antimicrobiana sobre las levaduras *C. versatilis*, *C. apicola*, *K. cleridarum* y *Z. mellis* ambos tienen potencial como alternativas para el control del ácaro *Varroa destructor*, debido a que presentaron una baja CL₅₀ sobre *V. destructor* y los efectos negativos en las abejas y en las levaduras podrían reducirse al seleccionar una forma farmacéutica adecuada.

5.3 PERSPECTIVAS

- Aislamiento biodirigido y caracterización de los compuestos acaricidas de *Critonia aromatisans* y *Plectranthus amboinicus*.
- Evaluar la actividad de los extractos de *Critonia aromatisans* y *Plectranthus amboinicus* en campo.
- Desarrollo de una forma farmacéutica para la administración de tratamientos con los extractos o sus combinaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboushaara, H., Staron, M., Čermáková, T. (2017). Impacts of oxalic acid, thymol, and potassium citrate as *Varroa* control materials on some parameters of honey bees. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41, 238-247.
- Aliano, N.P., Ellis, M.D., Siegfried, B.D., 2006. Acute contact toxicity of oxalic acid to *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and their *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) hosts in laboratory bioassays. *Journal of Economic Entomology*, 99, 1579-1582.
- Anderson, D.L., Trueman, J.W.H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 165-189.
- Araneda, X., Velásquez, C., Morales, D., Martínez, I. (2014). Producción de pan de abejas (*Apis mellifera* L.) bajo condiciones de laboratorio. *IDESIA*, 32, 63-69.
- Arellano-Rodríguez, J.A., 2003. Etnoflora Yucatanense: Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán. UADY.
- Ariana, A., Ebadi, R., Tahmasebi, G. (2002). Laboratory evaluation of some plant essences to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental and Applied Acarology*, 27, 319-327
- Aronstein, K., Saldivar, E., Vega, R., Westmiller, S., Douglas, A. (2012). How *Varroa* parasitism affects the immunological and nutritional status of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 3, 601-615.
- Arumugam, G., Swamy, M.K., Sinniah, U.R. (2016). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. *Molecules*, 21, 1-26.
- Ávalos, A., Pérez-Urria C.E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología. Serie Fisiología Vegetal*, 2, 119-145.
- Avilés-Peraza, G.C. (2015). Balché (*Lonchocarpus longistylus*) árbol mágico, usos

ceremoniales y medicinales. Desde el Herbario CICY. 7, 46-48.

Ayvaz, A., Sagdic, O., Karaborklu, S., Ozturk, I. (2010). Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. *Journal of Insect Science*, 10, 1-13.

Barker, R.J. (1977). Some carbohydrates found in pollen and pollen substitutes are toxic to honey bees. *Journal of Nutrition*, 107, 1859-1862.

Baskin, J.M., 2004. Tropical tree seed manual: Part II, species descriptions. *Native Plants Journal*. Pp. 99-100.

Bergougnot, M., Treilhou, M., Armengaud, C. (2012). Exposure to thymol decreased phototactic behaviour in the honeybee (*Apis mellifera*) in laboratory conditions. *Apidologie*, 44, 82-89.

Boncristiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J.D., Pettis, J., 2012. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*. 58, 613-620.

Bonilla-Rosso, G., Engel, P. (2018). Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 69-76.

Borges-Argáez, R., Cáceres-Farfán, M., Nuria, P., Pérez, B., Genilloud, F., Melguizo, O., Díaz, A., Reyes, C., El Aouad, F. Y Sansores-Peraza, P. (2017). Cytotoxic studies and in vitro effects of trans-3,4,4',5-tetramethoxystilbene, a bioactive compound isolated from *Lonchocarpus punctatus* Kunth. *Polibotánica*, 43, 165-175.

Borges-Argáez, R., González, M., Cáceres-Farfán, M., 2011. Composición farmacéutica que comprende un extracto estandarizado de *Lonchocarpus longistylus* como control natural larvicida e inhibidor de la eclosión de larvas de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* susceptibles y resistentes a organofosforados.

Burley, L.M. (2007). The effects of miticides on the reproductive physiology of Honey Bee

- (*Apis mellifera* L.) queens and drones. Tesis de Maestría. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia. pp. 91.
- Burley, L.M., Fell, R.D., Saacke, R.G. (2008) Survival of Honey Bee (Hymenoptera:Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides, 101, 1081-1087.
- Calderone, N.W., Wilson, W.T., Spivak, M. (1997). Plant extracts used for control of the parasitic mites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Journal of Economic Entomology, 90, 1080-1086.
- Calvo-Irabién, L.M. (2013). Plantas vemos, aromas....no sabemos. Desde el Herbario CICY. 5, 6-7.
- Canto, A., Herrera, Carlos M, Rodríguez, R. (2017). Nectar-living yeasts of a tropical host plant community: diversity and effects on community-wide floral nectar traits. PeerJ, 3517, 1-22.
- Cantón-Lacasa E., Martín-Mazuelos E. y Espiguel-Ingroff A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Asociación Española de Micología. Pp. 24.
- Carayon, J.L., Téné, N., Bonnafé, E., Alayrangues, J., Hotier, L., Armengaud, C., Treilhou, M. (2014). Thymol as an alternative to pesticides: Persistence and effects of Apilife Var on the phototactic behavior of the honeybee *Apis mellifera*. Environmental Science and Pollution Research, 21, 4934-4939.
- Castillo-Sánchez LE, Ruz-Febles NM, Alvarado-Canché AR, C.-S., JR, L.-C.E. and C.-N.M. (2018). Ethanolic extracts of *Brosimum alicastrum* and *Plectranthus amboinicus* for the control of *Raoiella indica*. Journal of Entomology and Zoology Studies, 6, 625-628.
- Chaimanee, V., Evans, J.D., Chen, Y., Jackson, C., Pettis, J.S. (2016). Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the

neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology*, 89, 1-8.

Charpentier, G., Vidau, C., Ferdy, J.B., Tabart, J., Vetillard, A. (2014). Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared in vitro. *Pest Management Science*, 70, 140-147.

Chihu-Amparán, D., Rojas-Avalos, L.M., Rodríguez-Dehaibes, S.R. (1992) Presencia en Veracruz, México del ácaro *Varroa jacobsoni*, causante de la Varroasis de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.). *Técnica Pecuaria en México*, 30, 133-135.

Chunya B., Guanglu S., Haiming Z., Cheng J., Wei L., Dandan D., Younian W., Jicheng G., Yongsheng J. y Lanqing M. (2010). Plant miticide of squalene and applications thereof, Beijing Agricultural College [Online]
Disponible en : <https://patents.google.com/patent/CN101869103A/en>
[Acceso 12 de junio 2019]

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. MIC testing. [online]
Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>
[Acceso 2 de junio 2018]

CONABIO, 2006: Capital Natural y Bienestar Social. [Online]
Disponible en:
http://www.conabio.gob.mx/2ep/images/3/37/capital_natural_2EP.pdf
[Acceso 12 de septiembre 2017]

Coronado, A., Barrios, C., Mujica, F. (1997). *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904 (Acari:varroidae) en apiarios del centroccidente de Venezuela. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 7, 161-163.

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, 141-150.

Crane T., E. (1978). Sugars poisonous to bees. *Bee World*, 59, 37-38.

Dai, P., Jack, C.J., Mortensen, A.N., Bustamante, T.A., Ellis, J.D. (2018). Chronic toxicity of amitraz, coumaphos and fluvalinate to *Apis mellifera* L. larvae reared in vitro. *Scientific Reports*, 8, 1-9.

De Guzman, L.I., Rinderer, T.E., Beaman, L.D. (1993). Survival of *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari: Varroidae) away from its living host *Apis mellifera* L. *Experimental and Applied Acarology*, 17, 283-290.

De Guzman, L.I., Rinderer, T.E., Stelzer, J.A. (1997). DNA evidence of the origin of *Varroa jacobsoni* Oudemans in the Americas. *Biochemical Genetics*, 35, 327-335.

De Jong, D., Gonçalves, L.S. (1982). Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa Jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21, 165-167.

De Jong, D., Roma, D.D.A., Goncalves, L.S. (1982). A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honeybees. *Apidologie*, 13, 297-306.

De, L., Rodríguez, M. (2015). Etnobotánica maya : Algunas plantas de uso medicinal en estomatología . *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, 72, 21-25.

Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F., Pennacchio, F. (2016). A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 113, 3203-3208.

Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H.F., Evans, J.D., Chen, Y. (2011). *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Genetic Virology*, 92, 151-155.

Diario Oficial de la Federación, 2005. Modificación a la Norma Oficial Mexicana PROY-

NOM-001-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la varroasis de las abejas.
[Online]

Disponible en línea:

[http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/APC/SAGARPA/Modificaciones/28122005\(1\).pdf](http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/APC/SAGARPA/Modificaciones/28122005(1).pdf)

[Acceso 13 de octubre 2017]

Diario Oficial de la Federación, 2013. ACUERDO por el que se dan a conocer los Lineamientos para la Operación Orgánica de las actividades agropecuarias.
[Online]

Disponible en:

https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5319831&fecha=29/10/2013

[Acceso 10 de mayo 2019]

Diario Oficial de la Union Europea, 2017. Reglamento (UE) 2017-623 de la commission de 30 de marzo de 2017 que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) no° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos del acequinocilo, el amitraz, el cumafós, el diflufenicán, la flumequina, la metribuzina, la permetrina, la piraclostrobina y la estreptomicina en determinados productos. [Online]

Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2017/093/L00001-00029.pdf>

[Acceso 12 de mayo 2019]

Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D.L., Locke, B., Delaplane, K.S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., Ellis, J.D. (2013). Standard methods for *Varroa* research. *Journal of Apicultural Research*. 52, 1-54

Duan, D.D., Bu, C.Y., Cheng, J., Wang, Y.N., Shi, G.L. (2011). Isolation and identification of acaricidal compounds in *Inula japonica* (Asteraceae). *Journal of Economic Entomology*, 104, 375-378.

Duan, D.D., Bu, C.Y., Ma, L.Q., Liu, Y.B., Wang, Y.N., Shi, G.L., 2012. Identification of acaricidal compounds in *Inula japonica* extracts against *Tetranychus cinnabarinus*. *Information Technology and Agricultural Engineering*. Springer. Pp. 739-746.

- Duke, S.O., Cantrell, C.L., Meepagala, K.M., Wedge, D.E., Tabanca, N., Schrader, K.K. (2010). Natural toxins for use in pest management. *Toxins (Basel)*, 2, 1943-1962.
- Ekpenyong, C.E., Akpan, E., Nyoh, A. (2015). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13, 321-337.
- El Zalabani, S.M., El-Askary, H.I., Mousa, O.M., Issa, M.Y., Zaitoun, A.A., Abdel-Sattar, E. (2012). Acaricidal activity of *Swietenia mahogany* and *Swietenia macrophylla* ethanolic extracts against *Varroa destructor* in honeybee colonies. *Experimental Parasitology*, 130, 166-170.
- Ellis, J.J.D., Delaplane, K.S., Hood, W.M. (2001). Efficacy of a bottom screen device, apistan, and apilife var, in controlling *Varroa destructor*. *American Bee Journal*, 141, 813-816.
- Ellis, M.D., Baxendale, A.P. (1997) Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. *Journal of Economic Entomology*, 90, 1087-1091.
- Engel, P., Kwong, W.K., McFrederick, Q., Anderson, K.E., Barribeau, S.M., Chandler, J.A., R. Scott Cornman, J.D., Miranda, J.R. de, Doublet, V., Emery, O., Evans, J.D., Farinelli, L., Flenniken, M.L., Granberg, F., Grasis, J.A., Gauthier, L., Hayer, J., Koch, H., Kocher, S., Martinson, V.G., Moran, N., Monica Munoz-Torres, I.N., Paxton, R.J., Powell, E., Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R., Song, S.J., Schwarz, R.S., VanEngelsdorp, D., Dainat, B. (2016). The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *Mbio*. 7, 2164-2173
- Engel, P., Martinson, V.G., Moran, N.A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 109, 11002-11007.
- Ferrer, J.I. (2007). Principales referencias etnomédicas sobre el anamú (*Petiveria alliacea* Linn) y principios activos encontrados en la planta. Un acercamiento al tema.

Revista CENIC Ciencias Biológicas, 38, 27-30.

Floris, I., Satta, A., Cabras, P., Garau, V.L., Angioni, A. (2004). Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor* effectiveness, persistence, and residues. *Journal of Economic Entomology*, 97, 187-191.

Fonnegra G., R., Jimenez R., S.L., 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín. pp. 368.

García-García, R.M., Palou-García, E. (2008). Mecanismo de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, 2, 41-51.

Gashout, H.A., Gúzman-Novoa, E. (2009). Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*, 48, 263-269.

Genersch, E. (2010). Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 87-97.

Germosén-Robineau, L., 2014. Farmacopea Vegetal Caribeña. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. pp. 400.

Gleye, C., Lewin, G., Laurens, A., Jullian, J.C., Loiseau, P., Bories, C., Hocquemiller, R. (2003). Acaricidal activity of tonka bean extracts. Synthesis and structure-activity relationships of bioactive derivatives. *Journal of Natural Products*, 66, 690-692

Goswami, V., Srivastava, P., Khan, M.S. (2014). Efficacy of essential oils against *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera* Linn. Colonies and their impact on brood development, 6, 2012-2015.

Grandtne, M.M., Chevrette, J., 2013. Dictionary of trees, Volumen 2: South America: Nomenclature, taxonomy and ecology. Academic Press. pp 1172.

Gregorc, A., Pogacnik, A., Bowen, I.D. (2004). Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie*, 35, 453-460.

- Hsu, K.-P., Ho, C.-L. (2019). Antimildew Effects of *Plectranthus amboinicus* Leaf Essential Oil on Paper. *Natural Product Communications*, 14, 1-6.
- Huang, Z. 2012. *Varroa* Mite Reproductive Biology. *American Bee Journal*. [Online]
Disponible en:<https://bee-health.extension.org/varroa-mite-reproductive-biology/>
[Acceso 15 de septiembre 2017]
- Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J.D., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F.-L., Jaffé, R., Jensen, A.B., Köhler, A., Magyar, J.P., Özkýrým, A., Pirk, C.W.W., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpy, D.R., van der Steen, J.J.M., Vaudo, A., Vejsnæs, F., Wilde, J., Williams, G.R., Zheng, H.-Q. (2013). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 54, 1-57.
- Hussain, M.I., Qamar A.S., Reigosa, M.J. (2018). Activities and novel applications of secondary metabolite coumarins. *Planta Daninha*, 36, 1-13.
- Imdorf A., Kilchenmann V., Bogdanov S., Bachofen B., Beretta C. (1995) Toxic effects of thymol, camphor, menthol and eucalyptol on *Varroa jacobsoni* Oud. And *Apis mellifera* L. in a laboratory test. *Apidologie*, 26, 27-31.
- Imdorf, A., Bogdanov, S., Ibañez, O.R., Calderone, N.W. (1999). Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. In honey bee colonies. *Apidologie*, 30, 209-228.
- INEGI, 2015. Anuario estadístico y geográfico por entidad federativa. [Online]
Disponible en:
<https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825107017>
[Acceso 10 de septiembre 2017]
- Johnson, R.M., 2015. Honey bee toxicology. *Annual Review of Entomology* 60, 415-434.
- Knolhoff, L.M., Onstad, D.W., 2013. Resistance by ectoparasites. *Insect Resistance Management*. Pp. 185-231
- Kwong, K.W., Moran, N.A. (2016). Gut Microbial Communities of Social Bees. *Nature*

Reviews Microbiology, 14, 374-384.

Le Conte, Y., Ellis, M., Ritter, W. (2010). *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41, 353-363.

Lebouvier, N., Hue, T., Hnawia, E., Lesaffre, L., Menut, C., Nour, M. (2013). Acaricidal activity of essential oils from five endemic conifers of New Caledonia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitology Research*, 112, 1-6.

Levy-Tacher, S.I., Aguirre-Rivera, J.R., García-Perez, J.D., Martínez-Romero, M.M. (2006). Aspectos florísticos de Lacanhá Chansayab, Selva Lacandona, Chiapas. *Acta Botánica Mexicana*, 77, 69-98.

Li, M., Zhang, Y., Ding, W., Luo, J., Li, S., Zhang, Q. (2018). Effect of acaricidal components isolated from lettuce (*Lactuca sativa*) on carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.). *Bulletin of Entomological Research*, 108, 314-320.

Lizama B. (2011). Levaduras asociadas a dos especies de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) y a tres especies de la flora nectarífera de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. pp. 77.

López-Rojas, P., Janeczko, M., Kubiński, K., Amesty, Á., Maslyk, M., Estévez-Braun, A. (2018). Synthesis and antimicrobial activity of 4-substituted 1, 2, 3-triazole-coumarin derivatives. *Molecules*, 23, 1-18.

Magaña-Magaña, M.A., Tavera-Cortés, M.E., Salazar-Barrientos, L.L., Sanginés-García, J.R. (2016). Productividad de la apicultura en México y su impacto sobre la rentabilidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7, 1103-1115.

Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Negri, P., Eguaras, M.J. (2010). Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitology Research*, 107, 1189-1192.

Marcangeli, J.A., García, M. del C. (2003) Control del Ácaro *Varroa destructor*

- (Mesostigmata: Varroidae) en colmenas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) mediante la aplicación de distintos principios activos. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 62, 69-74.
- Martínez, P.J.F., Alcalá, E.K.I., Leal, H.M., Vivas, R.J.A., Martínez, A.E. (2011). Prevención de varroosis y suplementación, Manual de capacitación. INIFAP-CENID, Mexico. pp. 59.
- Martínez, R.M., Cerrilla, M.E.O., Haro, J.G.H., Garza, J.R.K., Ramos, J.J.Z., Robles, R.S. (2015). Uso de aceites esenciales en animales de granja. Interciencia, 40, 744-750.
- Martini, N.D., Katerere, D.R.P., Eloff, J.N. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). Journal of Ethnopharmacology, 93, 207-212.
- Medina-Flores, C.A., Guzmán-Novoab, E., Aréchiga-Flores, C.F., Aguilera-Soto, J.I., Gutiérrez-Piña, F.J. (2011). Efecto del nivel de infestación de *Varroa destructor* sobre la producción de miel de colonias de *Apis mellifera* en el altiplano semiárido de México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 2, 313-317.
- Méndez-González M., Durán-García R., Borges-Argáez R., Peraza-Sánchez S., Dorantes-Euan A., Tapia-Muñoz J. L., Torres-Avilez W., Ferrer-Cervantes M. (2012). Flora medicinal de los Mayas peninsulares. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., Fordecyt-Conacyt, Fomix, Pronatura Península de Yucatán, Merida, Yucatán, México. pp. 238.
- Menéndez Castillo, R.A., Pavón González, V. (1999). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 4, 110-115.
- Meza, D.L.M., Taborda, M. (2010). Chemical composition and acaricidal activity of essential oil *Cymbopogon citratus* Stapf against house dust mite *Dermatophagoides arina* (acari: Pyroglyphidae). Biosalud. 9, 20-31.
- Milani, N. (1999). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. Apidologie, 30, 229-234.

- Miller, A.L.E., Tindall, K., Leonard, B.R., (2010). Bioassays for monitoring insecticide resistance. *Journal of Visualized Experiments*.46, 3-7
- Moawad, A., Mohammed, R., Arafa, W. (2017). Biologically-guided isolation of acaricidal phytosterols: an in vitro study against *Rhipicephalus (B.) annulatus* ticks infesting cattle in Egypt. *European Journal of Medicinal Plants*, 18, 1-9.
- Mors, A., Nowogrodzki, R. (1997). Mites: *Varroa* and other parasites of brood, In: Honey bees pest, predator and disease. The A.I. Root Company Medina. Ohio. Pp. 200-218.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Motta, E.V.S., Raymann, K., Moran, N.A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 115, 10305-10310.
- Naik, R.J., Revankar, H.M., Kulkarni, M.V., Pai, K.S.R., Nayak, P.G., (2017). 4-((bis (2-chloroethyl) amino) methyl)-2h-chromen-2-ones as antifungal, cytotoxic, anti-tubercular and antimicrobial agents. *Modern Approaches in Drug Designing*. 3, 1-10.
- Negm, A.M., Abu-hashim, M., (2019). *The Handbook of Environmental Chemistry Sustainability of agricultural environment in Egypt: Part II Soil-Water-Plant Nexus*. Springer. pp. 422.
- North Carolina State Extension Publications, 2016. Managing *Varroa* mites in honey bee colonies. [Online]
(Actualizado 23 febrero 2016).
Disponible en: <https://content.ces.ncsu.edu/managing-varroa-mites-in-honey-bee-colonies#>
[Acceso 10 abril 2010].
- Núñez Figueredo, Y., Tillán Capó, J., Carrillo Domínguez, C., Menéndez Castillo, R., León, D.R. (2006). Efecto de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Tabletas

- sobre la anafilaxia pasiva cutánea, transmisión histaminérgica y adrenérgica. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11, 1-12
- Odiba, J.O., Musa, A.M., Hassan, H.S., Yahaya, S.M., Okolo, E.I. (2014). Antimicrobial activity of isolated stigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) from Honeybee propolis from North-Western, Nigeria. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5, 908-918.
- Ododo, M.M., Choudhury, M.K., Dekebo, A.H. (2016). Structure elucidation of β -sitosterol with antibacterial activity from the root bark of *Malva parviflora*. *Springerplus*, 29, 1-11.
- OECD, 1998: Test 214: Honeybees, acute contact toxicity test. [Online]
Disponible en: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070189-en.pdf?expires=1576644550&id=id&accname=quest&checksum=B1CBB8811726BA627C48B8E2ABC843B9>
[Acceso 10 de agosto 2017]
- OIE, 2004. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Pp. 1060–1064. Comisión de Estándares Biológicos de la Organización Mundial de Sanidad Animal [Online]
Disponible en: <https://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
[Acceso 8 de septiembre 2017]
- Oudemans A. C. (1904). On a new genus and species of parasitic Acari. *Notes from the Leyden Museum*, 24, 216-222.
- Owino, J.O., Matasyoh, J.C. (2015). Acaricidal Coumarins from the Medicinal Plant *Acokanthera schimperi*. *Journal of Organic & Inorganic Chemistry*. 1, 1-6.
- Palacios, P., Gutkind, G. O., Rondina, R.V.D., de Torres, R. A., Coussio, J. D., (1983). Actividad antimicrobiana de *Baccharis crispa* Sprengel (Carqueja, F.A.) y *Baccharis notoserghila* Gris. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 2, 5-10.
- Patel, R., Alam, G., M, N., PS, M., S, A., S, S. (2010). *Plectranthus Amboinicus* (Lour) Spreng : an Overview. *Pharmaceutical Research*, 4, 1-15.

- Pérez Cordero, A.F., Chamorro Anaya, L.M., Vitola Romero, D.C., Hernández Gómez, J.M. (2017). Actividad antifúngica de *Cymbopogon citratus* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. *Agronomía Mesoamericana*. 28, 265-475.
- Plapp, F.W., Vinson, S.B. (1977). Comparative toxicities of some insecticides to the tobacco budworm and its ichneumonid parasite, *Campoletis sonorensis*. *Environmental Entomology*, 6, 381-384.
- Portillo Carrascal, C.Y. (2016). Identificación de levaduras presentes en el proceso de transformación de polen corbicular a pan de abejas por métodos tradicionales y moleculares. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 93.
- Ptaszynska, A.A., Borsuk, G., Mulencko, W., Wilk, J. (2016) Impact of vertebrate probiotics on honeybee yeast microbiota and on the course of nosemosis. *Medycyna Weterynaryjna*. 72, 430-434.
- Qamar M. (2000). Evaluation of some natural products for controlling mites of *Varroa* sp. parasitizing honeybees in Sokoto. *Shashpa* 7:49-52
- Radakovic, M., Stevanovic, J., Djelic, N., Lakic, N., Knezevic-Vukcevic, J., Vukovic-Gacic, B., Stanimirovic, Z. (2013). Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the Comet assay. *Journal of Biosciences*, 38, 53-62
- Rahimi, A., Del, Y.K., Moradpour, F. (2017). The effect of thyme (*Thymus caucasicus*) ethanol extract on *Varroa* mite (*Varroa destructor*), an ectoparasite mite of *Apis mellifera* meda (Hym : Apidae). *BIOLOGIJA*, 63, 177-184.
- Stella, R. L., Marín C.D. (2009). Methodologies for evaluating the *in vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, 42, 263-268.
- Ramírez-Ortega, L.A. (2013). Sinergismo antibacteriano entre compuestos terpénicos de *Cymbopogon citratus* y azufrados de *Allium cepa*, Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. pp. 58.
- Ramsey, S.D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D.,

- Joklik, J., Cicero, J.M., Ellis, J.D., Hawthorne, D., VanEngelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 116, 1792-1801.
- Rangel, J., Tapy, D.R. (2015). The combined effects of miticides on the mating health of honey bee (*Apis mellifera* L.) queens. *Journal of Apicultural Research*, 54, 275-283.
- Raymann, K., Moran, N.A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insects Science*, 26, 97-104.
- Reyes-Jurado, F., Palou, E., López-Malo, A. (2014). Metodologías de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8, 68-78.
- Ribeiro, V. L. S., Rolim, V., Bordignon, S., Henriques, A. T., Dorneles, G. G., Limberger, R.P., & von Poser, G. (2007). Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasitology Research*, 103, 531–535.
- Rinderer, T.E., De Guzman, L.I., Lancaster, V.A., Delatte, G., Stelzer, J.A. (1999). *Varroa* in the mating yard the effects of *Varroa jacobsoni* and Apistan on drone honey bees. *American Bee Journal*, 139, 134-139.
- Ríos, J.L., Recio M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84.
- Rodríguez, S.A, Rodríguez, M.C., Cruz, C.A. (2010). Efecto ixodicida de los extractos etanólicos de algunas plantas sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista MVZ Cordoba*, 15, 2175-2184.
- Rojas Fernández, M.M., Corzo López, M., Sánchez Pérez, Y., Brito, D., Montes de Oca, R., Martínez, Y., Pino Pérez, O. (2014). Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Revista de Protección Vegetal*, 29, 197-203.

Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argáez, R., García-Vázquez, Z., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., Dorantes-Euán, A. (2008). Actividad ixodícida de extractos crudos de *Diospyros anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8, 297-301.

Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Aguilar-Caballero, A., Borges-Argáez, R., García-Vázquez, Z., Méndez-González, M. y Cáceres-Farfán, M. (2008). Extractos de plantas como alternativa de control de la garrapata *Boophilus microplus*. [Online]

Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/294088341_Extractos_de_plantas_como_alternativa_de_control_de_la_garrapata_Boophilus_microplus

[Acceso 6 de octubre 2017]

Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (1904). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 96-119.

Ruffinengo, S.R., Maggi, M.D., Marcangeli, J.A., Eguaras, M.J., Principal, J., Barrios, C., De Piano, F., Giullia, M. (2014). Integrated pest management to control *Varroa destructor* and its implications to *Apis mellifera* colonies. *Zootecnia Tropical*, 32, 149-168.

Sabahi, Q., Hamiduzzaman, M.M., Barajas-Pérez, J.S., Tapia-Gonzalez, J.M. y Guzman-Novoa, E. (2018). Toxicity of anethole and the essential oils of lemongrass and sweet marigold to the parasitic mite *Varroa destructor* and their selectivity for honey bee (*Apis mellifera*) workers and larvae. *Psyche*, 8, 1-9.

SAGARPA, 2015: Manual de producción de miel orgánica. [Online]

Disponible en: <https://coba.com.gt/wp-content/uploads/2015/07/MANUAL-DE-PRODUCCION-DE-MIEL-ORGANICA.pdf>

[Acceso 17 de octubre 2017]

SAGARPA, 2017. Miel “Hecho en México”, símbolo de calidad y sabor en el marco del Día

Mundial de las Abejas. Comunidado prensa, Baja California, México. BCS,179,1-2.

SAGARPA, SENASICA, 2018. Buenas Prácticas Pecuarias en la Producción Primaria de Miel [Online]

Disponible en:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/395732/Manual_BPP_en_la_Produccion_primaria_de_Miel_octubre_2018.pdf

[Acceso 10 de septiembre 2017]

Salehi, B., Mishra, A.P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. del M., Segura-Carretero, A., Fathi, H., Nasrabadi, N.N., Kobarfard, F., Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*, 32, 1688-1706.

Sammataro D., Finley J., LeBlanc B., Wardell G., Ahumada-Segura F. y Carroll M.J. (2009). Feeding essential oils and 2-heptanone in sugar syrup and liquid protein diets to honey bees (*Apis mellifera* L.) as potential *Varroa* mite (*Varroa destructor*) controls. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 48, 256-262.

Sen, A., Dhavan, P., Shukla, K.K., Singh, S. y Tejavathi, G. (2012). Analysis of IR, NMR and antimicrobial activity of β -sitosterol isolated from *Momordica charantia*. *Science Secure Journal of Biotechnology*, 1, 9-13.

Sepúlveda, L.C., Rodríguez, O.S.J., Carrillo, A.C., Molano, C.E.R. (2013). Preliminary report of the ixodicidal effect of some plant extracts on ticks *Boophilus microplus*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18, 118-130.

Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., Rocha-Sosa, M. (2003). La Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355-363.

Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., Mann, A.S. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced pharmaceutical technology & Research*, 2, 3-8.

- Sharma, S., Anand, N. (1997). Natural products. Approaches to desing and synthesis of antiparasitic drugs. Pharmacochemistry Library. Pp. 71-123.
- Singh, D. (2014). 13: Management of mite pests in honeybee colonies through botanicals. Advances in Plant Biopesticides. Springer India, 271-277
- Snodgrass, G.L. (1996). Glass-vial bioassay to estimate insecticide resistance in adult tarnished plant bugs (Heteroptera: Miridae). Journal of Economic Entomology, 89, 1053-1059.
- Soto Ortiz, R., Vega Marrero, G., Tamajón Navarro, A.L. (2002) Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 7, 1-10.
- Souza Conceição, R., Monique Marylin, M.M.A., Alves Reis, I.M., Branco, A., Curcino Vieira, I.J., Braz-Filho, R., Borges Botura, M. (2017). *In vitro* acaricide activity of *Ocote aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. Ticks and Tick-borne Diseases, 8, 275-282.
- Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Jovanovic, S., Andjelkovic, M. (2005). Evaluation of genotoxic effects of Apitol® (cymiazole hydrochloride) in vitro by measurement of sister chromatid exchange. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental. Mutagenesis, 588, 152-157.
- Tihelka, E. (2018). Effects of synthetic and organic acaricides on honey bee health: A review. Slovenian Veterinary Research, 55, 119-140
- Toomemaa, K. (2018) The synergistic effect of weak oxalic acid and thymol aqueous solutions on *Varroa* mites and honey bees. Journal of Apicultural Research, 58, 37-52.
- Vázquez-Briones, M. del C., Guerrero-Beltrán, J.Á. (2017). Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre propiedades fisicoquímicas en películas de quitosano. Scientia Agropecuaria, 8, 401-409.

- Vega, F.E., Dowd, P.F., (2005). The role of the yeast as insect endosymbionts. Insect Fungal Associations: Ecology and Evolution. Oxford University Press. Pp. 211-243.
- Veléz-Rodríguez, R.E. (2015). Evaluacion comparative de meabolitos secundario, actividad antimicrobiana y letalidad de extractos orgánicos de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) y *Meliss officinalis* (Toronjil). Tesis de Licenciatura. Universidad Técnica de Machala. Ecuador. pp. 95.
- Vieira, G.H. da C., Andrade, W. da P., do Nascimento, D.M. (2012). Use of essential oils for controlling the *Varroa destructor* acarus in *Apis mellifera*. Pesquisa Agropecuária Tropical, 42, 317-322.
- Villa de la Torre, F.E. (2014). Actividad antiinflamatoria de *Critonia aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 125.
- Villa-De La Torre, F., Puebla-Pérez, A.M., Arana-Argaez, V.E., Ortiz-Andrade, R. Carballo-Uicab, M., Cáceres-Farfán, M., Borges-Argáez, R. (2017). Anti-inflammatory activity of *Critonia aromatisans* and *Montanoa grandiflora* leaves extracts, plants used in Mayan traditional medicine to treat inflammation. Polibotánica, 43, 285-319.
- Villanueva, G.R, Colli-Ucan W. (1996). Folia Entomológica Mexicana, 97, 55-70.
- Wahida, L., Aribi, N. y Soltani, N. (2008). Evaluation of Secondary Effects of some Acaricides on *Apis Mellifera* Intermissa (Hymenoptera, Apidae): Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferase Activities. European Journal of Scientific Research. 21, 642-649.
- Wantuch, H.A., y D.R. Tarpy, (2009). Removal of drone brood from *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and retain adult drones. Apiculture and Social Insects, 102, 2033-2040.
- Williams, G.R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D.P., Medrzycki, P., Murray, T.E., Natsopoulou, M.E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R.J., Pernal, S.F., Shutler, D., Tanner, G., van der Steen, J.J.M., Brodschneider, R. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in

cages under *in vitro* laboratory conditions. Journal of Apicultural Research, 52, 1-36.

Yan-Wang, Shi, G.L., Ma, L.Q., Liu, Y.B. y Wang, Y.N. (2012) Studies on action mechanism of acaricidal activity of extracts of *Pharbitis purpurea* seeds against *Tetranychus cinnabarinus*. Advances in Intelligent and Soft Computing. Pp. 629-641.

Zheng, H., Nishida, A., Kwong, W.K., Koch, H., Engel, P., Steele, M.I., Moran, N.A. (2016). Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. Mbio. 7, 1326-1335.

Zheng, H., Powell, J.E., Steele, M.I., Dietrich, C., Moran, N.A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. Proceedings of the National Academy Sciences, 114, 4775-4780.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados del análisis Probit de los datos obtenidos mediante la evaluación de la actividad acaricida de *P. amboinicus* y *C. aromatisans*.

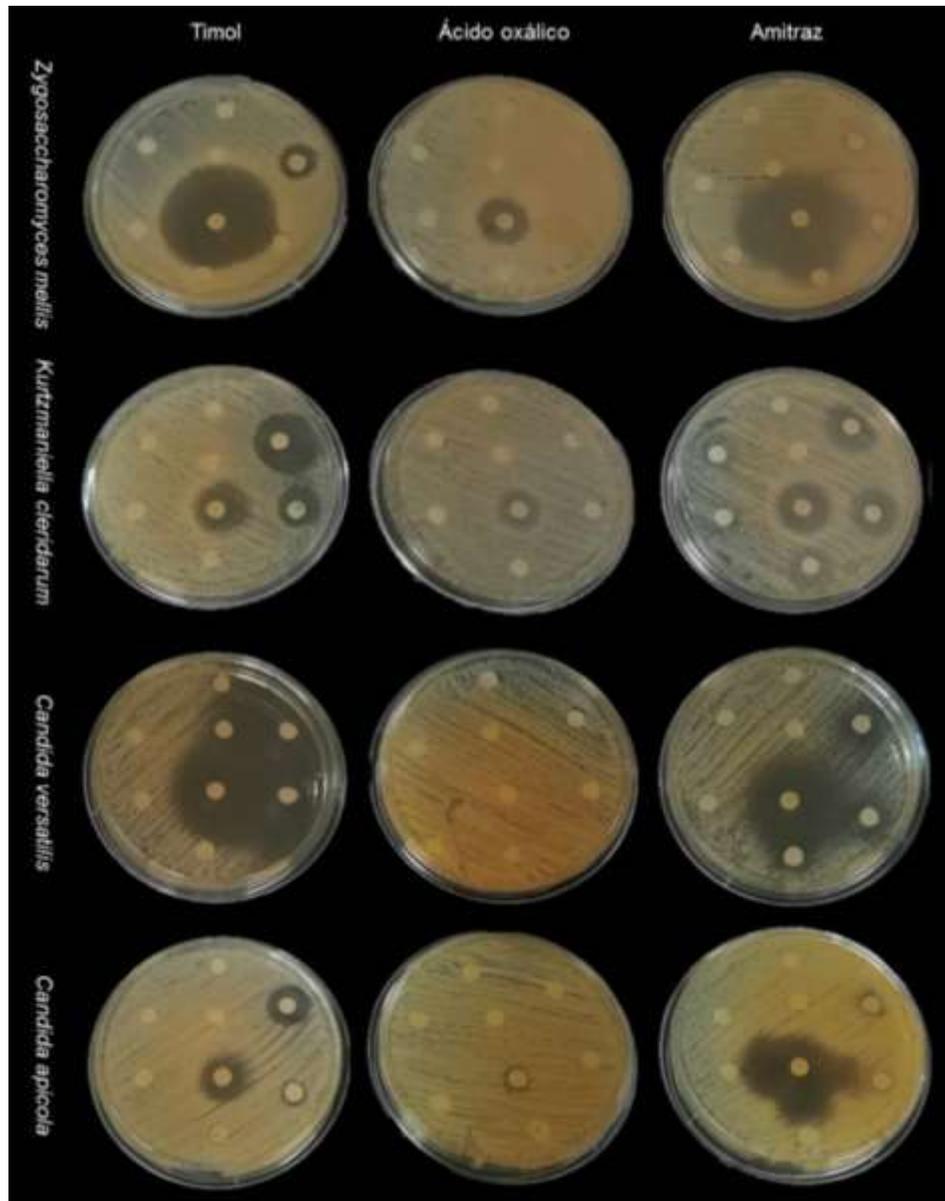
Anexo 1.1 Resultados del análisis Probit de la actividad acaricida del extracto de *P. amboinicus*.

Porcentaje	Percentil	Error Estándar	IC fiducial de 95.0%	
			Inferior	Superior
1	-66.7323	19.1762	-119.605	-137.4752
2	-54.6349	17.4104	-102.558	-28.0270
3	-46.9594	16.2960	-91.7540	-22.0206
4	-41.1854	15.4616	-83.6342	-17.4946
5	-36.4888	14.7857	-77.0350	-13.8074
6	-32.4912	14.2127	-71.4227	-10.6644
7	-28.9860	13.7122	-66.5057	-7.90477
8	-25.8476	13.2659	-62.1065	-5.43036
9	-22.9934	12.8616	-58.1088	-3.17684
10	-20.3660	12.4908	-54.4318	-1.09957
20	-0.842631	9.79542	-27.2275	14.4552
30	13.2351	7.95775	-7.82458	25.8844
40	25.2640	6.52278	8.47825	35.9266
50	36.5071	5.38870	23.2839	45.7449
60	47.7503	4.60903	37.3282	56.3247
70	59.7792	4.38521	51.0021	68.9958
80	73.8569	5.01798	65.0058	85.8243
90	93.3803	6.94676	82.1432	111.446
91	96.0076	7.25799	84.3411	115.002
92	98.8619	7.60492	86.7107	118.84
93	102.000	7.99559	89.2973	123.171
94	105.505	8.44171	92.1661	127.979
95	109.974	8.96124	95.4163	133.484
96	114.200	9.58379	99.2102	139.976
97	119.974	10.3638	103.845	147.988
99	127.649	11.4204	109.966	158.677
99	139.747	13.1190	119.548	175.590

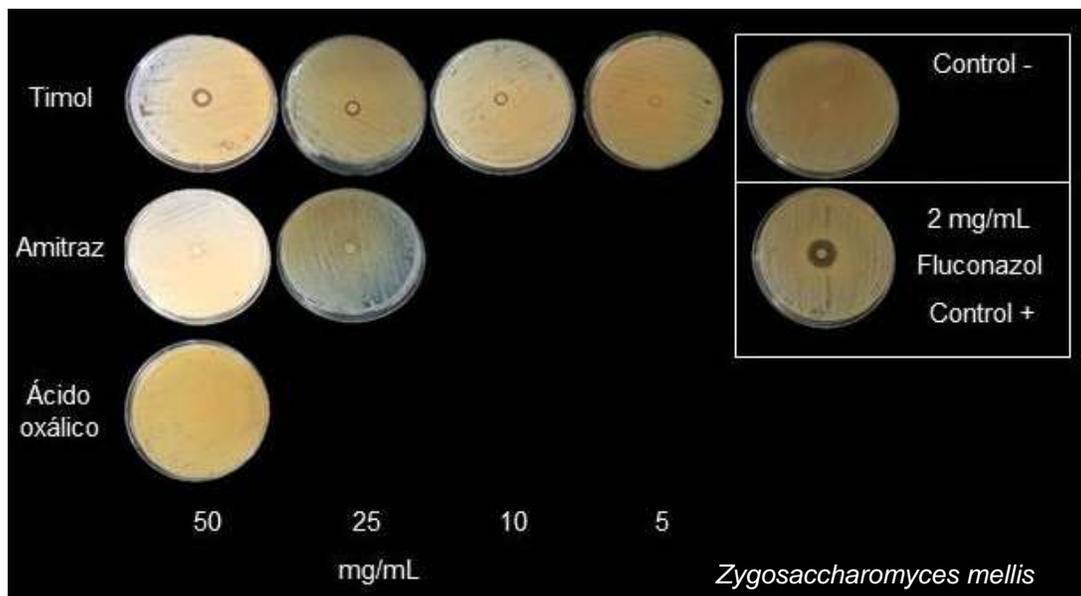
Anexo 1.2 Resultados del análisis Probit de la actividad acaricida del extracto de *C. aromatisans*

Porcentaje	Percentil	Error Estándar	IC fiducial de 95.0%	
			Inferior	Superior
1	-173.073	38.9321	-281.993	-114.206
2	-150.613	35.525	-249.8944	-96.8400
3	-136.363	33.3705	-229.542	-85.8075
4	-125.644	31.7542	-214.241	-77.4994
5	-116.924	30.4428	-201.802	-70.7349
6	-109.502	29.3292	-191.219	-64.9719
7	-102.995	28.3551	-181.944	-59.9144
8	-97.1682	27.4849	-173.644	-55.3822
9	-91.8691	26.6953	-166.098	-51.2567
10	-86.9912	25.9701	-159.156	-47.4560
20	-50.7449	20.6469	-107.700	-19.0827
30	-24.6087	16.9223	-70.8236	1.60348
40	-2.27633	13.8816	-39.5994	19.5644
50	18.5972	11.2573	-10.8593	36.7964
60	39.4708	9.03343	17.0453	54.8639
70	61.8032	7.51061	45.0487	76.0456
80	87.9393	7.56514	73.7069	104.950
90	124.186	10.6051	106.852	151.634
91	129.064	11.1669	110.986	158.243
92	134.363	11.8016	115.425	165.475
93	140.189	12.5244	120.255	173.477
94	146.697	13.3573	125.597	182.467
95	154.119	14.3344	131.634	192.777
96	162.838	15.5123	138.666	204.949
97	173.558	16.9952	147.240	219.984
99	187.808	19.0114	158.547	240.061
99	210.268	22.2615	176.225	271.849

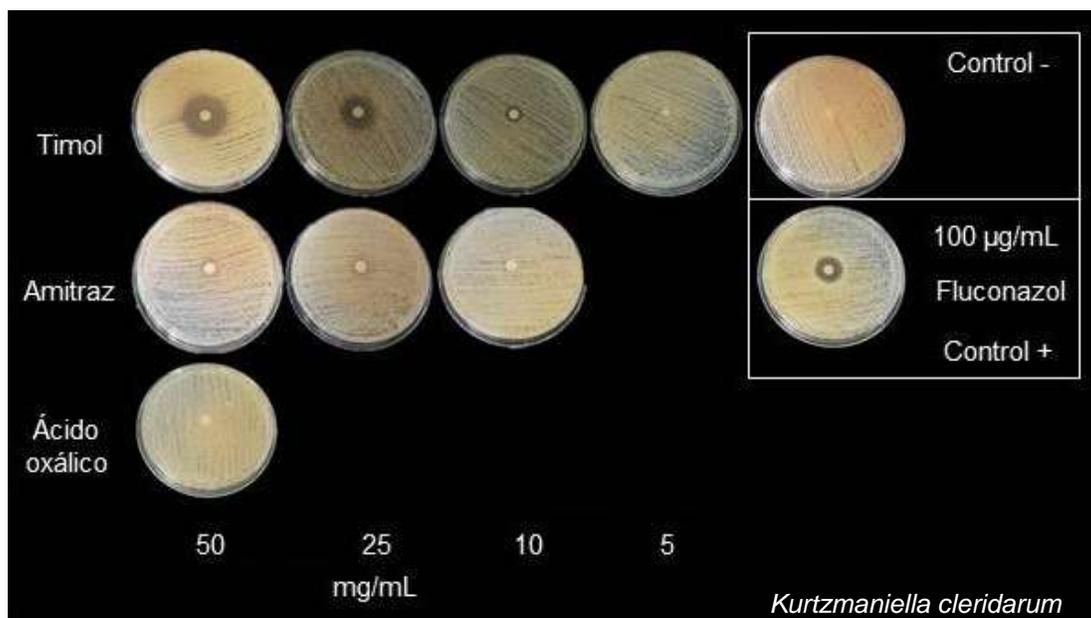
Anexo 2. Resultados de las evaluaciones complementarias de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz.



Anexo 2.1 Resultados de la segunda evaluación de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz por el método Kirby-Bauer.



Anexo 2.2 Resultados de la evaluación individual de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz sobre *Zygosaccharomyces mellis* por el método Kirby-Bauer (tercer ocasión).



Anexo 2.3 Resultados de la evaluación individual de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz sobre *Kurtzmaniella cleridarum* por el método Kirby-Bauer (tercer ocasión).

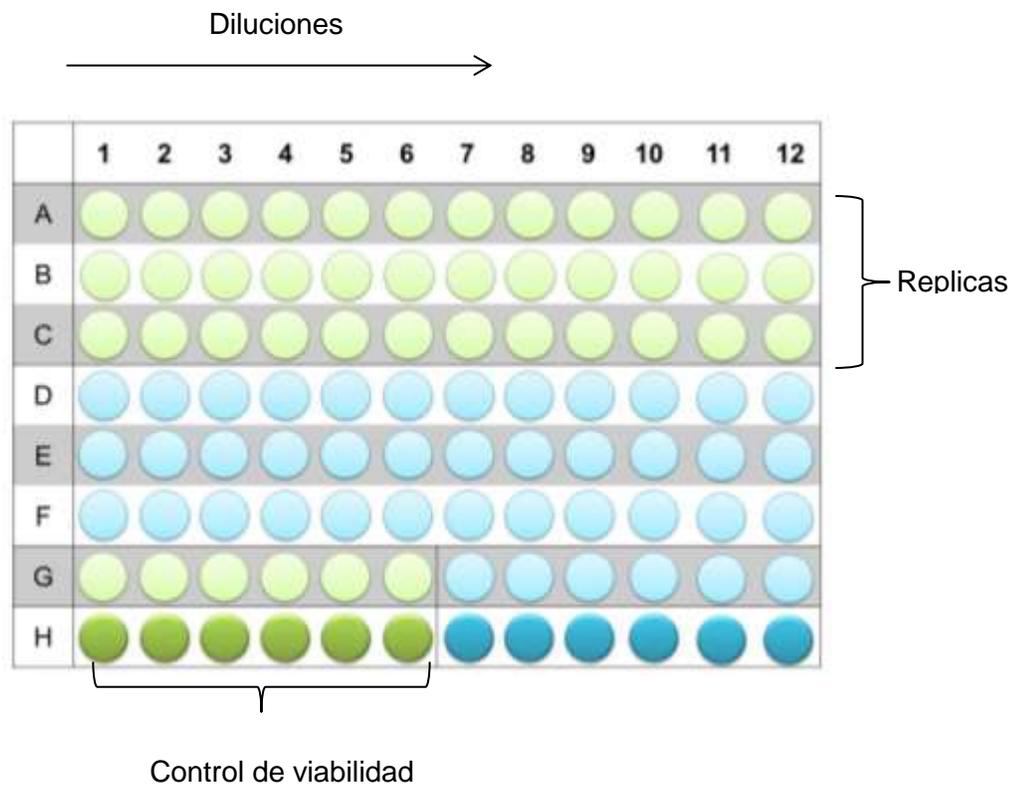


Anexo 2.4 Resultados de la evaluación individual de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz sobre *Candida versatilis* por el método Kirby-Bauer (tercer ocasión).



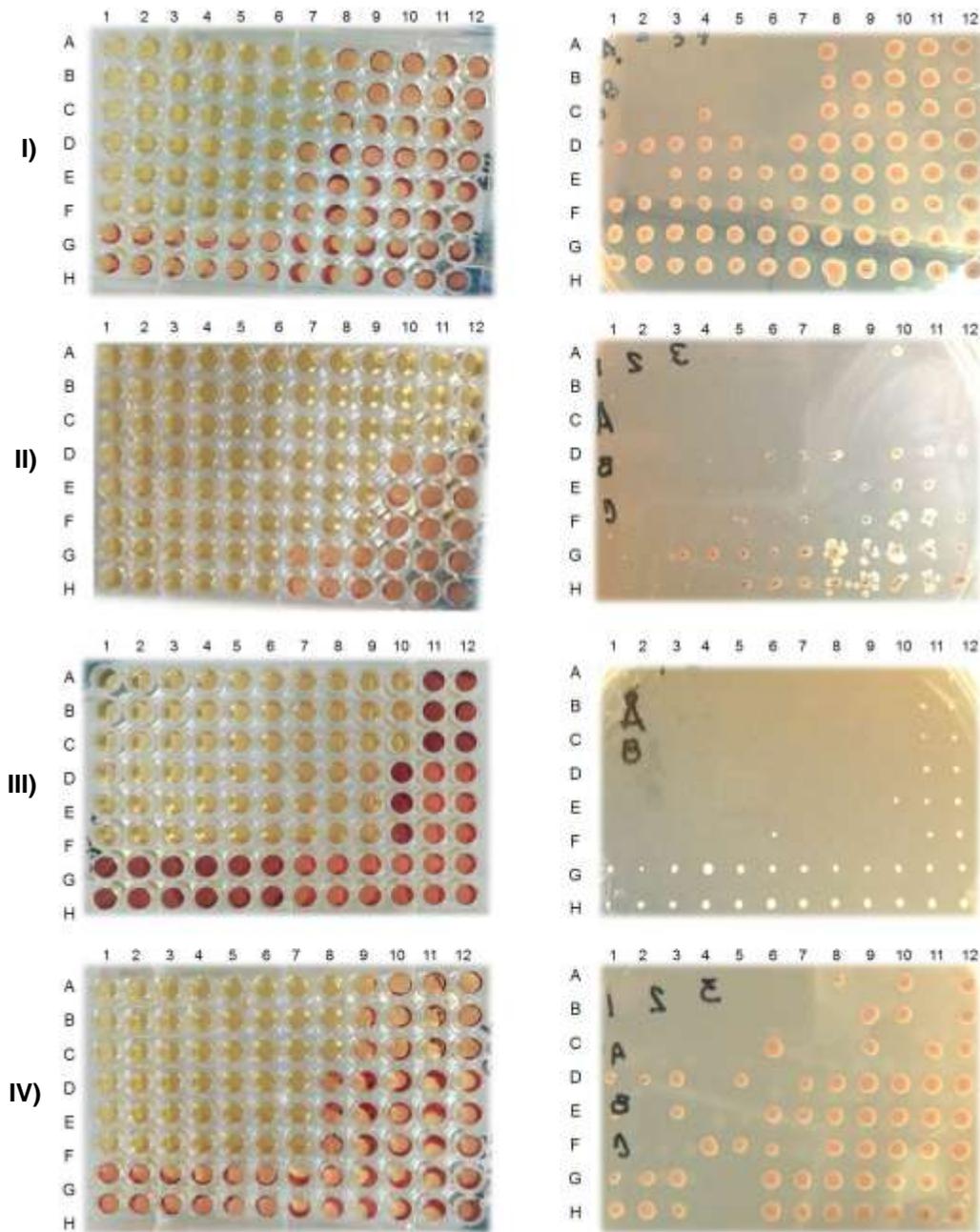
Anexo 2.5 Resultados de la evaluación individual de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz sobre *Candida apicola* por el método Kirby-Bauer (tercer ocasión).

Anexo 3. Complementos de la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución.

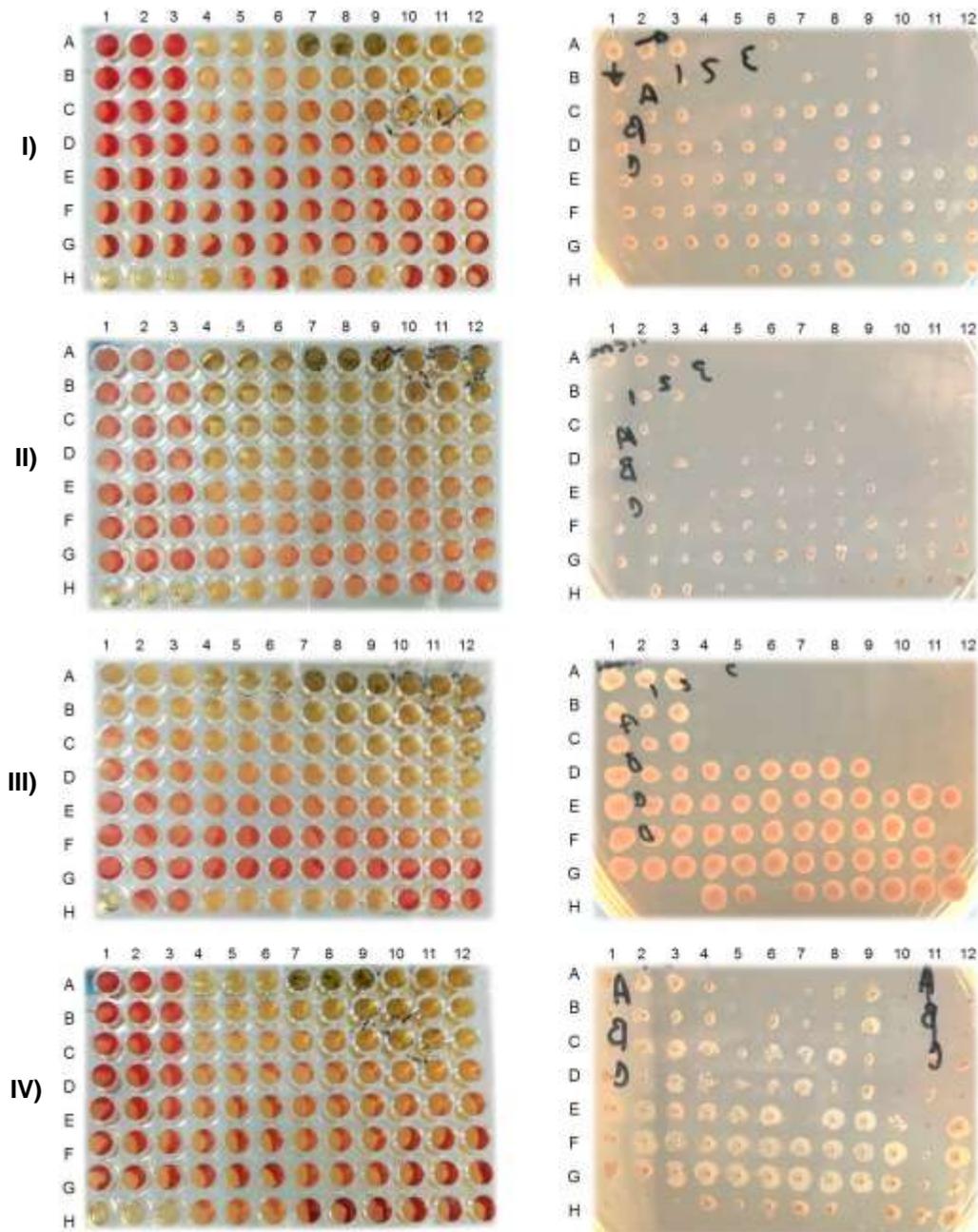


Diluciones		Inóculo a 5×10^4 ufc/mL		Inóculo a 5×10^6 ufc/mL
Control de viabilidad		Inóculo a 5×10^4 ufc/mL		Inóculo a 5×10^6 ufc/mL

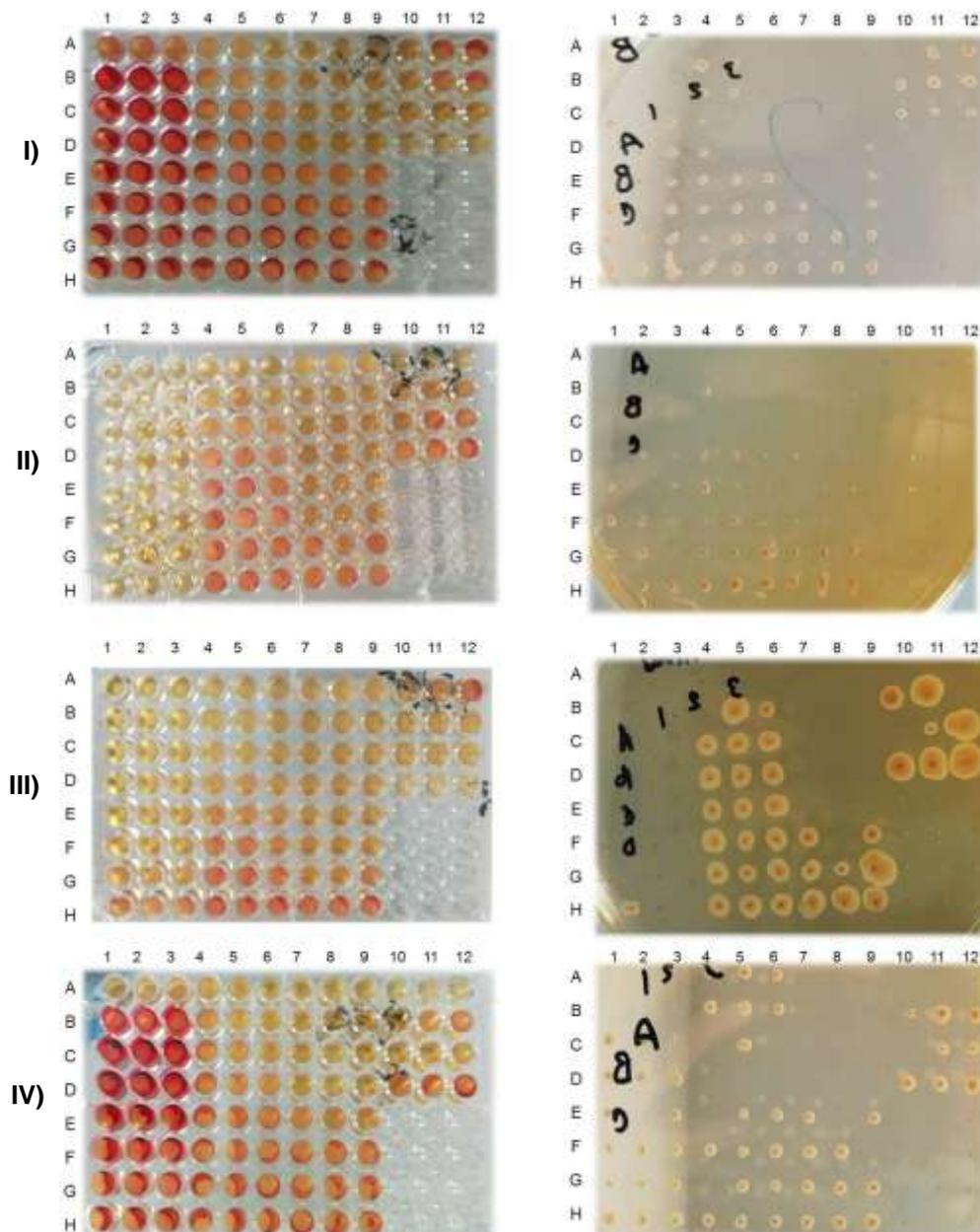
Anexo 3.1 Organización de las placas de 96 pocillos para la evaluación del fluconazol mediante microdilución. Distribución y orientación de las diluciones e inóculos y evaluados para la obtención de la concentración mínima inhibitoria del fluconazol y selección del inóculo adecuado para las evaluaciones de actividad antimicrobiana de los tratamientos.



Anexo 3.2 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana del fluconazol. A la izquierda se presentan las placas de 96 pocillos tras 24 horas de incubación con MTT de I) *C. apicola*, II) *C. versatilis*, III) *K. cleridarum*, IV) *Z. mellis*, y a su derecha se encuentran las placas (24 horas de incubación) donde se realizó el subcultivo para la determinación de la concentración mínima letal (CML), en este caso concentración mínima fungicida (CMF).



Anexo 3.3 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos. A la izquierda se presentan las placas de 96 pocillos tras 24 horas de incubación con MTT de I) *C. apicola*, II) *C. versatilis*, III) *K. cleridarum*, IV) *Z. mellis*, y a su derecha se encuentran las placas (24 horas de incubación) donde se realizó el subcultivo para la determinación de la concentración mínima letal (CML), en este caso concentración mínima fungicida (CMF).



Anexo 3.4 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana del timol, ácido oxálico y amitraz. A la izquierda se presentan las placas de 96 pocillos tras 24 horas de incubación con MTT de I) *C. apicola*, II) *C. versatilis*, III) *K. clerdarum*, IV) *Z. mellis*, y a su derecha se encuentran las placas (24 horas de incubación) donde se realizó el subcultivo para la determinación de la concentración mínima letal (CML), en este caso concentración mínima fungicida (CMF).