

Efecto Acaricida del Aceite Esencial de Aguaribay (*Schinus molle* L.) y sus Fracciones en Colmenares de Abejas (*Apis mellifera*) en Relación con la Composición Química

María S. Guala⁽¹⁾, Matías O. Lapissonde⁽²⁾, Heriberto V. Elder⁽³⁾ y Gustavo A. Pérez⁽¹⁾

(1) Univ. Nacional del Litoral, Fac. de Ingeniería Química, Santiago del Estero 2654, 3000 Santa Fe-Argentina (e-mail: mguala@fiq.unl.edu.ar)

(2) Ministerio de la Producción, Bv. Pellegrini 3100, 3000 Santa Fe-Argentina

(3) PPAM, CONICET, UNL, Ministerio de la Producción, Fac. de Ingeniería Química, Santiago del Estero 2654, 3000 Santa Fe-Argentina

Recibido Ago. 26, 2013; Aceptado Oct. 18, 2013; Versión final recibida Dic. 17, 2013

Resumen

Se ha determinado el poder acaricida del aceite esencial crudo de aguaribay (*Schinus molle* L.) y sus fracciones, en el control de la varroa (*Varroa destructor*), considerando su composición química. Se determinó la eficacia de los productos ensayados, para lo cual se realizaron experiencias en colmenares de abejas (*Apis mellifera*), midiéndose la cantidad de ácaros totales y los eliminados por el producto. Los valores de eficacia fueron: 30 ± 6 para la fracción 2 que posee mayor concentración de pinenos y 38 ± 6 para la fracción 5 de mayor concentración en terpinen-4-ol, que el aceite esencial crudo cuya eficacia es 9.2. El uso de un producto natural, cuando no se pueden aplicar productos sintéticos, mantiene baja la cantidad de varroas. El incremento en el volteo del ácaro se puede atribuir al aumento de la concentración de pinenos y a la alta concentración del terpinen-4-ol en las fracciones ensayadas.

Palabras clave: *varroa destructor*, *Schinus molle* L., aceite esencial, acaricida, *Apis mellifera*

Acaricide Effect of Raw Essential Oil from Aguaribay (*Schinus Molle* L.) and their Fractions in Beehives (*Apis Mellifera*), Regarding the Chemical Composition

Abstract

The acaricides power of aguaribay (*Schinus molle* L.) raw essential oil and its fractions were determined. For the sanitary control of varroa (*Varroa destructor*), considering their chemical composition. Test in different hives of bees (*Apis mellifera*) were carry and the total amount of acarus and those eliminated in the product were determined. Efficiency values were 30 ± 6 for the fraction 2 having more pinene concentration and 38 ± 6 for fraction 5 with highest concentration in terpine-4-ol, compared with the raw essential oil whose effectiveness is 9.2. The use of this natural product, when the synthetic ones cannot be applied, maintain lower amounts of varroa. The enhancement in the acarus death can be attributed to the increased concentration of pinene and to the high concentration of terpinen-4-ol in the fractions tested.

Keywords: *varroa destructor*, *Schinus molle* L., essential oil, acaricide, *Apis mellifera*

INTRODUCCIÓN

La varroa (*Varroa destructor*) es un ácaro que parasita las abejas (*Apis mellifera*) y origina pérdidas económicas muy importantes en la apicultura mundial. Cuando el grado de infestación es alto produce un debilitamiento de la colmena llegando a veces a originar la muerte de la colonia. Actualmente, la varroosis se controla utilizando productos sintéticos tales como piretroides, formidinas y fosforados, por citar algunos, que se deben aplicar en la época que la colmena no se encuentra produciendo miel. El uso reiterado de los parasiticidas sintéticos ha generado poblaciones de parásitos resistentes (Maggi et al., 2009, 2011), provocando la necesidad de utilizar dosis mayores que las recomendadas, lo cual conlleva a la contaminación de los productos de la colmena (cera y miel). Los productos naturales se han comenzado a estudiar como posibles acaricidas, debido a que no dejan residuos contaminantes y se pueden aplicar durante la etapa que las abejas elaboran la miel (mielada) (Kaštelan y Šekulja, 2012).

El efecto acaricida sobre el ácaro varroa de algunos aceites esenciales fue reportados por diferentes autores (Ruffinengo et al., 2005; Damiani et al., 2009; Ghasemi et al., 2011). En particular, el aceite esencial de aguariabay (*Schinus molle* L.) ha sido estudiado para determinar su actividad acaricida contra la garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) dando buenos resultados (Torres et al., 2012). Por lo que el aceite esencial crudo de aguariabay, y también, las fracciones obtenidas del mismo, surgen como una alternativa a ensayar en el control de la proliferación de la varroa. Las experiencias se llevaron a cabo en los colmenares utilizando el AEC de aguariabay y dos fracciones obtenidas por destilación al vacío. La finalidad de este trabajo es encontrar los componentes más activos en lo que hace a la eficacia en el poder de volteo del ácaro, teniendo en cuenta las diferencias en la composición química del AEC y las distintas fracciones. Esto permitiría planificar la obtención de aquellos cortes que contienen mayor concentración de los componentes de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se detalla a continuación los materiales y la metodología utilizada para la obtención del AEC y sus fracciones, la técnica analítica para analizar la composición de los diferentes productos ensayados, la metodología empleada para realizar las experiencias, y el análisis estadístico realizado a los valores experimentales.

Materia Prima

El material vegetal de aguariabay (*Schinus molle* L.) utilizado para la extracción del AEC fue recogido de cultivos provenientes del Centro Operativo Experimental "Ángel Gallardo" (C.O.E.A.G.) en la localidad de Ángel Gallardo, ubicado a 11 km al nordeste de la ciudad de Santa Fe; a 31° 40' S y 60° 43' O, perteneciente al distrito de Monte Vera, Santa Fe, Argentina.

Metodología para la obtención del AEC y sus fracciones

El AEC de aguariabay se extrajo mediante destilación por arrastre con vapor, a partir de algunas partes de la planta que se sometieron a un proceso de oreado, utilizando la siguiente proporción: frutos molidos 25% p/p, hojas 65% p/p y tallos pequeños 10% p/p. Las fracciones se obtuvieron mediante un sistema de destilación a vacío, el cual consta de un balón de tres conexiones herméticas donde se colocan: la columna de fraccionamiento, un termómetro y un vástago para el ingreso de aire al seno del balón, que actúa como núcleo de burbujeo; condensador y recolector de fracciones.

Determinación Analítica

Los aceites esenciales se analizaron mediante un sistema de CG-FID-MS, Perkin Elmer Clarus 500 con automuestreador automático y con un inyector (rango de split 1:100) conectado por un divisor de flujo a dos columnas capilares: a) polietilenglicol PM ca 20000 y b) 5 % fenil-metil 95% de silicona, de 60 m X 0,25 mm con 0,25 micrones de fase fija. La columna polar está conectada a un FID, mientras que la columna no polar está conectada a un FID y a un detector de masas cuadrupolar (70 eV). Se utilizó helio como fase móvil.

El volumen de inyección fue 0,2 µl de una solución al 10% de aceite esencial en etanol. La temperatura de la línea de transferencia y la fuente de iones fueron 180°C y 150°C, respectivamente; el intervalo de masas usado fue de 40-300 Da. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los índices de retención (en relación con los de una serie de los n-alcanos C8-C20) obtenidos en las dos columnas, con

los de compuestos de referencia. Además, cada uno de los espectros de masa obtenidos se comparó con los de las bibliotecas habituales (Adams, 2007; NIST/Wiley, 2008) y con una biblioteca de espectros de masas desarrollada en nuestro laboratorio a partir de muestras de referencia o componentes de aceites esenciales conocidos. La composición porcentual se logró utilizando el método de porcentaje de áreas, sin tener en cuenta las correcciones por factores de respuesta. Se consideró para cada componente la respuesta más baja obtenida entre ambas columnas.

Metodología empleada para realizar las experiencias

Antes de aplicar los productos a ensayar se determinó la mortalidad natural de los ácaros, para lo cual se contaron las varroas muertas en el transcurso de una semana. Se seleccionaron las fracciones ricas en pinenos y terpinen-4-ol, y con un volumen adecuado para realizar los ensayos. Luego de esto, se aplicaron en las colmenas el AEC y dos fracciones elegidas (Fracción 2 y 5). Cada 15 días, se contaron el número de varroas muertas, y se calculó la eficacia en el volteo de la varroa de los productos ensayados. Se utilizaron colonias de *Apis mellifera*, desarrolladas en colmenas tipo Langstroth. Las colmenas se dividieron en tres grupos y en cada uno de ellos se colocó el material a ensayar.

Los productos a aplicar se disolvieron en aceite comestible y se colocaron en cubetas de metal, con una red metálica en su interior, las que se dispusieron dentro de las colmenas. Se realizó un recuento periódico de los ácaros muertos, utilizando para ello pisos trampas colocados en el fondo de las colmenas. Las cubetas de metal y los pisos trampas se pueden visualizar en las Figuras 1 y 2.



Fig. 1: Colmena con la cubeta

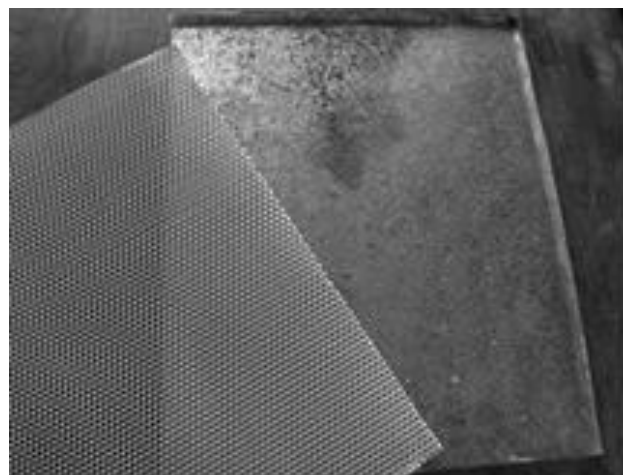


Fig. 2: Piso Trampa

Finalmente, se aplicó un producto comercial, tiras impregnadas con el compuesto sintético Amitraz., que posee una elevada eficacia, entre 95-99 %, en el volteo de varroas. Esto se realizó para tener una idea del total de la población de ácaros presentes en las colmenas (Gregorc y Poklukar, 2002). La eficacia de los productos ensayados se calculó utilizando la expresión (1).

$$Eficacia = \frac{n^{\circ} \text{ ácaros muertos debido al producto ensayado}}{n^{\circ} \text{ total de ácaros muertos}} \times 100\% \quad (1)$$

En la ecn. (1), n° total de ácaros muertos = (n° ácaros muertos debido al producto ensayado + n° ácaros muertos debido al compuesto sintético Amitraz)

Se utilizó el factor de corrección de Abbot (European working group CA3686, 2001) para obtener valores de eficacia que contemplen la muerte natural de los ácaros.

Análisis estadístico

Los valores experimentales se informan como valores medios \pm la Desviación Standard (DS) de tres muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la determinación analítica del AEC y de los distintos cortes obtenidos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición por ciento de los principales compuestos del Aceite Esencial Crudo y de las Fracciones. Los porcentajes se basan en las áreas de los picos de la GC. En la Tabla, TR es tiempo de retención y Fr es fracción

<i>Compuesto</i>	<i>TR</i>	<i>AEC</i>	<i>Fr. 1</i>	<i>Fr. 2</i>	<i>Fr. 3</i>	<i>Fr. 4</i>	<i>Fr. 5</i>
alfa-Tuyeno	8.125	1.1	2.1	1.1	0.5	tr	--
alfa-Pineno	8.376	9.5	19.1	11.4	5.3	1.1	--
Canfeno	8.784	0.2	0.4	0.3	0.2	tr	--
Sabineno	9.219	51.0	59.8	64.3	66.2	58.3	3.3
Mirceno	9.336	1.9	0.6	0.5	2.5	3.7	0.5
beta-Pineno	9.424	11.2	12.2	12.7	14.8	12.6	0.5
alfa-Felandreno	9.900	tr	--	--	tr	tr	--
alfa-Terpineno	10.224	1.4	--	--	1.4	2.2	0.3
para-Cimeno	10.440	1.8	1.4	2.4	1.6	4.5	8.1
Limoneno	10.576	4.0	1.5	2.4	4.1	9.1	6.6
beta-Felandreno	10.683	1.0	--	--	1.0	1.9	1.3
gama-Terpineno	11.336	2.8	--	--	1.6	3.7	3.1
Terpinoleno	12.192	0.6	--	--	0.2	0.6	1.1
Oxido de alfa-Pineno	12.850	--	0.4	0.4	--	--	--
Verbenol	13.190	--	0.3	0.3	--	--	--
cis p-Ment-2-en-1-ol	13.570	tr	--	--	--	tr	0.8
trans p-Ment-2-en-1-ol	14.200	tr	--	--	--	--	1.0
Pinocarveol	14.310	--	0.6	0.9	--	--	--
Sabina cetona	14.800	--	0.2	0.5	--	--	--
Terpinen-4-ol	15.592	5.4	tr	0.1	0.3	0.8	23.3
p-Cimen-8-ol	15.717	0.2	--	--	--	--	0.7
alfa-Terpineol	16.080	tr	--	--	--	--	0.7
Mirtenal	16.200	--	0.5	0.9	--	--	--
epi-Cariofileno	24.803	1.3	--	--	--	--	5.2
alfa-Humuleno	26.619	tr	--	--	--	--	0.8
Alloaromadendreno	26.363	0.8	--	--	--	--	4.2
gama-Muroleno	26.770	--	--	--	--	--	0.4
Germacreono D	27.123	0.7	--	--	--	--	1.1
Biciclogermacreono + alfa Muroleno	27.672	0.8	--	--	--	--	1.7
gama-Cadineno	28.275	1.0	--	--	--	--	5.1
delta-Cadineno	28.371	0.7	--	--	--	--	3.0
Espatuleno	30.832	0.7	--	--	--	--	6.5
epi-Cubenol	32.163	0.2	--	--	--	--	1.5
alfa-Murolol	33.107	1.0	--	--	--	--	8.2

Las fracciones que se ensayaron en las colmenas fueron la fracción 2 y la 5, y también se ensayó el AEC. Del análisis de la Tabla 1, se puede observar que la fracción 2 tiene mayor concentración en pinenos y sabineno que el AEC, y la fracción 5 cuenta con un significativo aumento de la cantidad de terpinen-4-ol y de otros compuestos pesados, con respecto al AEC. La cantidad de ácaros muertos naturalmente, determinados previamente varió por día de 0.1 a 0.6. Para esta mortandad el valor del factor de corrección de la fórmula de Abbot es de -2.1.

Una vez finalizados los ensayos de las distintas muestras en las colmenas y realizado el recuento de las varroas muertas, se calculó la eficacia y se utilizó el factor de corrección de Abbot. En la Tabla 2 se muestran el número de ácaros caídos para cada grupo, según el producto ensayado. En la Tabla 3 y Figura 3 las eficacias calculadas con y sin el factor de corrección de Abbot.

Tabla 2: Número de ácaros caídos según el tratamiento.

Producto ensayado	Número de ácaros muertos		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
AEC	22	-	-
Fr. 2	-	63 ± 17	-
Fr. 5	-	-	63 ± 17
Amitraz	173	135 ± 1	60±29
Total	195	199 ± 18	98 ± 39

Tabla 3: Eficacia de los distintos tratamientos

Grupo	Eficacia	Eficacia con Factor de Abbot
I (AEC)	11.3	9.2
II (Fr 2)	32 ± 6	30 ± 6
III (Fr 5)	40 ± 6	38 ± 6

Una vez finalizados los ensayos de las distintas muestras en las colmenas y realizado el recuento de las varroas muertas, se calculó la eficacia y se utilizó el factor de corrección de Abbot. Los resultados obtenidos se muestran graficados en la Figura 3, con y sin la corrección de Abbot. Como muestra la figura 3, la fracción más eficaz para el control del acaro fue la 5 y resulto 25% superior a la 2 y un 400% respecto del AEC.

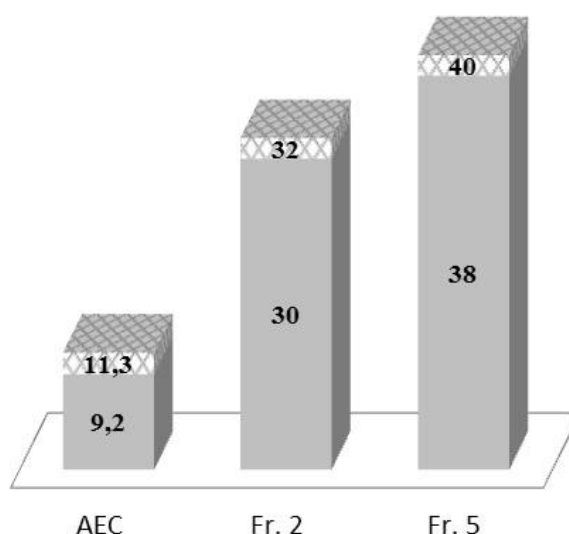


Fig. 3: Eficacia de los Productos ensayados
 ■ Eficacia (Abott`s) ✕ Eficacia

CONCLUSIONES

Tanto los pinenos como el terpinen-4-ol han sido informados en la bibliografía como efectivos en la mortalidad de la varroa, el primero con un suave efecto y el segundo con un alto efecto (Imdorf et al., 1999). Los resultados obtenidos muestran que el incremento en el poder de volteo de la varroa puede ser atribuido, por un lado al aumento en la concentración de pinenos en la fracción 2, y por el otro a la alta concentración de terpinen-4-ol en la fracción 5, lo cual es consistente con los datos bibliográficos.

La eficacia de los productos ensayados no es tan alta como la de los productos sintéticos, y probablemente se debe a la necesidad de mejorar el sistema de aplicación de los productos en las colmenas. Sin embargo, si los sistemas de aplicación se mejoraran es posible su uso como un complemento sanitario durante la época de producción de miel, cuando los sintéticos no se pueden usar, a fin de mantener baja la cantidad de varroas, y las colmenas más fuertes cuando comienza el período de invernada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de la Universidad Nacional del Litoral a través del proyecto CAI+D 2009 PE 373, UNL.

REFERENCIAS

- Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured, Illinois, USA (2007).
- Damiani N, Gende L, Bailac P, Marcangeli J and Eguaras M. *Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on Varroa destructor (Acari:Varroidae) and Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae)*. Parasitol Res 106:145–152. DOI 10.1007/s00436-009-1639-y (2009).
- Eguaras, MJ; Palacio, MA; Faverin, C). Efficacy of formic acid in gel for Varroa control in Apis mellifera L.: importance of the dispenser position inside the hive. *Veterinary Parasitology* 111, 241 – 245 (2002).
- European working group CA3686 . Evaluation of treatment for control of Varroa mites in honeybee colonies. Part I Standards for experimental protocols (2001). <http://www.apis.admin.ch>. Acceso: 12 diciembre (2013).
- Ghasemi V, Moharrampour S, Tahmasbi G. Biological activity of some plant essential oils against Varroa destructor (Acari: Varroidae), an ectoparasitic mite of Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae). *Exp. Appl. Acarol.* 55:147–154. DOI 10.1007/s10493-011-9457-1 (2011).
- Gregorc A, Poklukar J. Rotenone and oxalic acid as alternative acaricidal treatments for Varroa destructor in honeybee colonies. *Veterinary Parasitology*, 111, 351-360 (2002).
- Imdorf A, Bogdano S, Ibañez Ochoa R, Calderone N. Use of essential oils for the control of Varroa jacobsoni Oud. in honey bee colonies. *Apidologie*, 30, 209-228 (1999).
- Kaštelan M, Šekulja D. Efficacy of the varroa treatment with half of the recommended doses of rotenone in stripes in Rijeka, Croatia. *Apidologie*. 43 (2012).
- Maggi M, Ruffinengo S, Damiani N, Sardella N, Eguaras M. First detection of Varroa destructor resistance to coumaphos in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*, 47 (4), 317-320 (2009).
- Maggi M, Ruffinengo S, Mendoza Y, Ojeda P, Ramallo G, Floris I, Eguaras M. Susceptibility of Varroa destructor (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: Varroa mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitology Research*, 108 (4), 815 – 821 (2011).
- McLafferty F. Wiley Registry. 9th Edition/ NIST 2008 - Mass Spectral Library. Wiley, Hoboken, NJ, Estados Unidos (2008).
- Ruffinengo S, Eguaras M, Floris I, Faverin C, Bailac P, Ponzi M. LD50 and Repellent Effects of Essential Oils from Argentinian Wild Plant Species on *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 651- 655 (2005).
- Torres FC, Machado Lucas A, Sardá Ribeiro VL , Martins JR, von Poser G, Guala MS, Elder HV, Cassel E. Influence of Essential Oil Fractionation by Vacuum Distillation on Acaricidal Activity Against the Cattle Tick. *Braz. Arch. Biol. Technol.*; 55: 613-621 (2012).