

Eficacia “in vitro” de una solución alcohólica de timol frente al ácaro Varroa destructor.

Vega, A.; Vázquez, M.; Morales, A; Oliva, M; Luaces, B.

Centro de Investigaciones Apícolas. La Habana, Cuba.

E-mail: alain@eeapi.cu

Abstract.

This investigation was carried out in the laboratories of Cuba Bee Research Centre in the period of March to June of the 2007 and had as objective to evaluate the effectiveness “in vitro” of an alcoholic solution of thymol on the Varroa destructor mite in rehearsals with alone mite and in rehearsals with bees with mite. You use one experimental design of complete blocks at random, with several groups’ treatment and two controls (alcohol to 70% and negative control). The period of evaluation extended for 24 hours, with intervals of 1, 2, 4, 6 and 24 hours. All the used doses produced 100% of mortality in the mite at the two hours of having applied, so much in rehearsals with mite as in bees with mite.

Key words: Bee, dose, effectiveness, mite, thymol

Resumen.

Esta investigación se realizó en los laboratorios del Centro de Investigaciones Apícola de Cuba en el período de marzo a junio del 2007 y tuvo como objetivo evaluar la eficacia “in vitro” de una solución alcohólica de timol sobre el ácaro Varroa destructor en ensayos con ácaros solos y en ensayos con abejas parasitadas. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar, con varios grupos tratamiento y dos controles (alcohol al 70% y control negativo). El período de evaluación se extendió por 24 horas, con intervalos de 1, 2, 4, 6 y 24 horas. Todas las dosis empleadas produjeron el 100% de mortalidad en los ácaros a las dos horas de aplicadas, tanto en ensayos con ácaros como en abejas parasitadas.

Palabras claves: abejas, ácaros, dosis, eficacia, timol

Introducción.

La patología conocida como Varroosis es causada por el ácaro Varroa destructor (Anderson y Trueman, 2000). Varroa destructor presenta distribución mundial, con excepción de algunas islas (7 de las 9 de las Azores) en las que se practican estrictas medidas de control de introducción de abejas (Crespo et al, 2006). Este ácaro afecta tanto a las abejas adultas como a las crías, provocando grandes daños en las colonias. Diversas enfermedades secundarias transmitidas por varroa han sido relacionadas con la mortalidad a veces explosiva de las colonias; tales son los casos de la Ascoferosis (Medina y Vicario, 1998), enfermedades virales como el virus de las alas deformes (DWV – siglas en Inglés) y bacterianas como: Loque Americana y Loque Europea (Aguerregeray y Poblet, 2004; Xialong, 2004).

En Cuba se reportó por primera vez en tres apiarios del municipio Limonar, provincia Matanzas en abril de 1996, a través de un Informe Técnico del Instituto de Medicina Veterinaria, pero el pesquiseo posterior permitió comprobar que ya estaba extendido además en las provincias de La Habana y Ciudad de La Habana (Puentes, Verde y Fregel, 1998 y 2000).

El timol, 5- metil- 2 (1- metil etil) fenol, (Carmona et al, 2002) es una sustancia de origen natural que se encuentra presente en gran número de plantas, sobre todo en especies de la familia de las labiadas: romero, albahaca, melisa, menta, salvia, tomillo, ajedrea, tilo y orégano. El timol se ha usado en medicina humana para el tratamiento tópico de enfermedades dermatológicas, para realizar inhalaciones en problemas respiratorios y para el cuidado de los dientes. Se ha demostrado “in vitro” que inhibe la oxidación de las proteínas humanas LDL, responsables del transporte de colesterol por el torrente sanguíneo (Teissedre y Waterhouse, 2000).

De varios formulados comerciales a base de timol en 1999 y 2000, el Apilife VAR alcanzó una eficacia del 95.5% (86.7-99.9) y 74.0% (63.5-96.3); Thymovar 97.1% (75.8-100.0) y 93.5% (80.0-100.0) y Apiguard 94.2% (82.6-99.5) y 96.5% (90.4-99.8), por lo que concluyen que los preparados a base de timol han mostrado una elevada eficacia, siempre por encima del 90% y un bajo impacto ambiental (Marinelli et al., 2002).

Esta investigación tiene como objetivo evaluar la eficacia “in vitro” de una solución alcohólica de timol sobre el ácaro Varroa destructor en ensayos con ácaros solos y en ensayos con abejas parasitadas.

Materiales y Métodos.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Genética y Salud Apícola del Centro de Investigaciones Apícolas, La Habana, Cuba; en el período de marzo a junio del 2007, con ácaros Varroa destructor y abejas obreras, provenientes de colonias de *A. mellifera* L, que no habían recibido tratamiento previo contra el parásito. Se utilizaron para la obtención de abejas y ácaros colmenas del tipo Langstroth de un alza con 10 panales ubicados de afuera hacia dentro: (2) de miel, (2) de polen, (4) crías selladas y (2) crías abiertas.

En el laboratorio se utilizaron dos incubadoras (Kowell, modelo C2-1), un termohigrómetro, un estereoscopio, 16 jaulas fabricadas con madera (8cm de diámetro x 8cm de altura), rejilla de aluminio de 0,3cm de diámetro y placas Petri (9cm de diámetro x 1cm de altura).

Solución alcohólica de Timol:

Se evaluaron diferentes dosis de una solución a base de cristales de timol disueltos en alcohol etílico al 70% (5g de cristal de timol en 5ml de alcohol etílico), aplicadas sobre papel de filtro.

Ensayos con ácaros:

Los ácaros se recolectaron de panales de zánganos, destapando cada una de las celdas con un bisturí y extrayendo la larva infestada por varroa con una pinza de disección; se colocaron 10 varroas con 4 larvas para su alimentación sobre papel de filtro húmedo para mantener las larvas hidratadas y este se introdujo en una placa Petri; formándose siete grupos homogéneos. Posteriormente se les aplicó diferentes dosis (0,1; 0,2; 0,3; 0,4, 0,5ml) de la solución a los grupos bajo tratamiento y se utilizaron dos grupos control: uno con 1ml de alcohol etílico al 70% y el otro solo.

Bioensayos con abejas parasitadas:

Las abejas parasitadas utilizadas en cada unidad experimental, se recolectaron del centro de la cámara de cría de colonias con altas tasas de infestación por varroa. Posteriormente se colocaron en las jaulas con el alimento (miel) y se llevaron al laboratorio.

Para verificar la presencia de varroa, las abejas se revisaron individualmente bajo lupa, tomándolas por la región torácica con una pinza, formando grupos homogéneos de 30 abejas parasitadas por 10 ácaros. Posteriormente se les aplicó diferentes dosis (0,5; 0,8; 1 y 1,2ml) de la solución a los grupos bajo tratamiento y se utilizaron dos grupos control: uno con 1, 2ml de alcohol etílico al 70% y el otro solo (-).

Los tratamientos se aplicaron con una jeringa sobre el papel de filtro puesto en una placa petri pequeña (4,7cm de diámetro por 0,8cm de altura) la cual se introdujo en la jaula y cada jaula se puso sobre una placa Petri grande con el borde untado con vaselina para evitar que los ácaros que se desprendieran de su hospedero se alejaran. Luego de la aplicación, cada unidad experimental se llevó a la incubadora para la volatilización de la solución.

Se utilizaron dos incubadoras (una para los controles y la otra para los tratamientos) para evitar que los controles recibieran la acción de los vapores de la solución.

Debido a que se trabajó con organismos vivos en condiciones de laboratorio, se tuvo cuidado de no afectar durante los ensayos la relación parásito-huésped que existe naturalmente. Por ello, el ensayo en el laboratorio otorgó, tanto a las abejas como a los ácaros, condiciones similares a las que se encuentran en forma natural. La temperatura, humedad y oscuridad en la incubadora se regularon para simular las condiciones de la colmena. La temperatura se mantuvo regulada mediante un termostato, en un rango de

34°C \pm 1°C. La humedad relativa se mantuvo entre 70 - 80% mediante pocillos con agua puestos en la incubadora. Ambas variables se midieron mediante un termohigrómetro colocado en el interior de la misma; la puerta se cubrió con papel oscuro, para evitar que entrara luz al abrirla. Además las observaciones se realizaron bajo luz tenue, para no alterar la conducta de las abejas y los parásitos.

Después de la aplicación de cada tratamiento, se dejó pasar un día para ventilar la cámara.

Cada unidad experimental fue identificada con una etiqueta la cual contenía: grupo, dosis aplicada, cantidad de animales en estudio y fecha de inicio del experimento.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se realizó análisis de varianza simple, utilizando el test de contraste múltiple de rango LSD para comparar las medias de caídos y muertos entre grupos y entre observaciones, utilizándose para el procesamiento de los datos el paquete estadístico Statgraphics plus 5.1, versión en Español.

El período de evaluación de los tratamientos se extendió por 24 horas, considerando intervalos de tiempo de 1,2, 4, 6 y 24 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos. Los ensayos comenzaron siempre en el mismo horario (10:00 AM), lo que permitió realizar evaluaciones cronológicas a las 11:00, 12:00; 14:00, 18:00 y 10:00 del día siguiente, para hacer comparables los resultados obtenidos. Con estas evaluaciones se llevaron registros de temperatura y humedad, verificando que las condiciones se mantuvieran constantes y no influyeran en la conducta normal de las abejas y ácaros. La eficacia de la solución aplicada se midió en ácaros contabilizando los muertos, y en abejas parasitadas se midió evaluando los ácaros caídos y muertos. Utilizando la formula:

$$\text{Eficacia} = \text{ácaros muertos} / \text{total de ácaros} * 100$$

Los ácaros se observaron bajo el estereoscopio, por un período de 30 minutos a intervalos de 5 minutos. Al momento de las observaciones los ácaros se sometieron a estimulación táctil con una aguja entomológica en la zona ventral, para verificar si realmente estaban muertos. Se consideraron ácaros muertos los que no presentaron movimiento luego de los 30 minutos de observación.

Resultados.

Eficacia “in vitro” de una solución alcohólica de timol en ensayos con ácaros. La eficacia acaricida de la solución alcohólica de timol en la primera observación fue aumentando a medida que las dosis fueron mayores, alcanzándose una eficacia del 100% en la dosis de 0,5ml; ya a las dos horas de aplicada la solución la eficacia fue del 100% para todas las dosis (Tabla #1).

Tabla #1. Eficacia Varroicida de la solución alcohólica de timol durante las observaciones.

Ttos	Observación 1 (1 hora)			Observación 2 (2 hora)		
	Varroas muertas	Varroas totales	Eficacia	Varroas muertas	Varroas totales	Eficacia
1 (0,1ml)	29	40	72,5%	40	40	100%
2 (0,2ml)	31	40	77,5%	40	40	100%
3 (0,3ml)	33	40	82,5%	40	40	100%
4 (0,4ml)	39	40	97,5%	40	40	100%
5(0,5ml)	40	40	100%	40	40	100%
Control (alcohol 70%)	1	40	2,5%	2	40	5%
Control (-)	1	40	2,5%	1	40	2,5%

Al comparar las medias de ácaros muertos al final del ensayo no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratamientos para $p = 0,05$, pero si entre los tratamientos y los controles (alcohol al 70% y placebo) (Tabla #2), por lo que podemos decir que la solución de timol presenta elevada eficacia frente a Varroa y que el alcohol al 70% no influyo en la mortalidad de los ácaros.

Tabla # 2: Promedio de ácaros muertos entre los grupos.

Grupos	Muertos Media \pm D S
T ₁ (0,1ml)	10 \pm 0a
T ₂ (0,2ml)	10 \pm 0a
T ₃ (0,3ml)	10 \pm 0a
T ₄ (0,4ml)	10 \pm 0a
T ₅ (0,5ml)	10 \pm 0a
Control (alcohol 70%)	0,75 \pm 0,957b
Control (-)	0,5 \pm 0,577b

Letras diferentes indican diferencia significativa para $p = 0,05$. Eficacia varroicida “in vitro” de una solución alcohólica de timol en ensayos con abejas parasitadas con ácaros Varroa destructor.

En ensayos con abejas parasitadas por ácaros Varroa destructor se obtuvo la caída y muerte del 100% de los ácaros a las dos horas después de aplicadas las dosis (Tabla #3); parámetros tomados para medir la eficacia de la solución alcohólica de timol. En los

grupos bajo tratamiento todas la Varroas que se cayeron estaban muertas, no siendo así para los controles (control con alcohol al 70% y control solo), donde solamente se cayeron 3 y 2 Varroas y las 5 se encontraban vivas.

Tabla # 3: Eficacia de la solución alcohólica de timol al final del ensayo.

Grupos	Varroas Caídas	Varroas Muertas	Varroas Totales	Eficacia
T ₁ (0,5ml)	40	40	40	100%
T ₂ (0,8ml)	40	40	40	100%
T ₃ (1ml)	40	40	40	100%
T ₄ (1,2ml)	40	40	40	100%
Control (alcohol 70%)	3	0	40	0
Control (-)	2	0	40	0

Al comparar las medias de ácaros caídos y muertos entre los grupos durante las observaciones (Tabla # 4), obtuvimos que a medida que aumentaban las dosis de la solución alcohólica de timol, las medias de ácaros caídos y muertos eran mayores, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos y los controles para $p = 0,05$. No se encontraron diferencias significativas entre el control con alcohol al 70% y el placebo. El mejor tratamiento fue el cuarto, ya que a la hora después de aplicado obtuvimos una media de 10 ácaros caídos y muertos de un total de 10 varroas analizadas por tratamiento.

Tabla # 4: Promedio de ácaros caídos y muertos entre los grupos durante las observaciones.

Grupos	Observación 1(1hora)		Observación 2 (2horas)	
	Caídos Media \pm D S	Muertos Media \pm D S	Caídos Media \pm D S	Muertos Media \pm D S
T ₁ (0,5ml)	8,75 \pm 0,957b	8,75 \pm 0,957c	1,25 \pm 0,917	1,25 \pm 0,917
T ₂ (0,8ml)	9 \pm 0,817ab	9 \pm 0,817bc	1 \pm 0,667	1 \pm 0,667
T ₃ (1ml)	9,75 \pm 0,5ab	9,75 \pm 0,5ab	0,25 \pm 0,25	0,25 \pm 0,25
T ₄ (1,2ml)	10 \pm 0a	10 \pm 0a	0	0
Control (alcohol 70%)	0,75 \pm 0,957c	0d	0	0
Control (-)	0,5 \pm 0,577c	0d	0	0

Discusión.

Los resultados obtenidos en los experimentos confirman la elevada eficacia del timol contra Varroa destructor. Resultados similares fueron obtenidos por Imdorf et al., (1995), donde durante un experimento en Suiza sometieron grupos de 100 abejas con 20 varroas a una corriente de aire y sustancias volátiles, durante 72 horas y observaron que el 100% de los ácaros murieron con 5-15µg de timol por litro de aire, sin mortalidad de las abejas.

Desde el punto de vista del uso del timol como biocida, ha demostrado su eficacia no solo para combatir la varroosis en las abejas. Posee capacidad insecticida y antialimentaria frente a Spodoptera lituria (Hummel-brunner y Isman, 2001), una plaga de considerable importancia en el sureste español. Incluso frente a algunos nemátodos, posee una actividad nematocida comparable al compuesto de síntesis Oxamilo (Tsao y Yu, 2000). En el Centro Andaluz de Apicultura Ecológica se evaluaron diferentes tratamientos orgánicos (Ruiz et al., 1998), resultando el timol en tres formas de aplicación (polvo, 1g/cabezal con abejas, 10g en placa de Petri y tablillas embebidas en solución alcohólica de 15g/20ml, con temperaturas de 11-28°C, con efectividades de 94%, 96% y 95%, respectivamente, superior al ácido fórmico (42-61%) y a la Rotenona (30-64%).

En las condiciones de Cuba (Miranda, 2001), con colmenas Langstroth y temperatura ambiente diurna superior a los 26°C, el Apilife VAR (timol, mentol, alcanfor y eucaliptol) redujo los índices de infestación en un 75.88% y el Apiguard (timol en gel) solo alcanzó 56.33%, considerado insatisfactorio, con una alta variabilidad entre colmenas. (Demedio, 2001) al aplicar el Apilife VAR, tuvo una eficacia media de 87.35%, con variabilidad significativa entre colmenas a uno y dos cuerpos (78.90%-95.78%) y entre apiarios (70%-95%), con fuerte influencia del estado de los elementos de colmena y una moderada reducción del área de cría, que se hizo más evidente a medida que se incrementaba la eficacia.

Latorre (2004) resume los resultados de varios ensayos con diferentes productos varroicidas: Apivar (amitraz), dos tiras cada 28 días, eficacia del 87.5% en abejas y 76.1% en cría; Apilife VAR, 99.87% en abejas y 94.23% en cría; timol en alcohol, dos tabletas cada 14 días, 73.74% en abejas y 93.02% en cría, y timol en aceite de oliva, con similar esquema, 77.8% en abejas y 93.6% en cría. Concluyendo que el Apilife VAR resultó el mejor de los tratamientos evaluados.

Los principales inconvenientes atribuidos al timol son la reducción de la cría, la producción de miel, un incremento de la tendencia a enjambrar y casos de evasión de colonias completas (Guzmán, 2005).

Conclusiones:

? La solución alcohólica de timol utilizada presenta eficacia del 100% frente al ácaro Varroa destructor, tanto en ensayos con ácaros, como en abejas parasitadas.
? El alcohol al 70% utilizado como solvente en la solución, no influye en la caída y muerte de los ácaros.

Recomendaciones

? Continuar el estudio de la eficacia de diferentes preparados realizados a base de timol en el control de Varroa.

Bibliografías:

1. Aguerregaray, D., H. Poblet. 2004. La varroasis está diseminada por todo el país y es el principal problema sanitario de la apicultura. Suplemento Campo, Los Andes – Mendoza, Argentina. 20 de abril de 2004. Disponible en: www.e-campo.com 11/08/2004, 7:45 PM.
2. Anderson D L, Trueman J W H. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*; 24: 165- 189.
3. Carmona, M. Valero, A. Zalacaín, I. Zalacaín, A. Salinas, M R. 2002. Influencia del Timol en la puesta de cría de la abeja melífera. *Vida Apícola*. España, 113: 35-43. mayo-junio.
4. Crespo, J. M; Alfonso, J; Quesada, P. D; Gómez, A. 2006. Primeras aportaciones en la etiología de las principales enfermedades de las abejas. *Rev. Vida Apícola*. España, 138: 25. julio y agosto.
5. Demedio, J. 2001. La varroasis de las abejas en una zona de la provincia de La Habana. Agente etiológico, índices de infestación y control biotécnico y químico. Tesis en opción al grado Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana, Cuba.
6. Guzmán, E. 2005. El control de la varroasis en el futuro. 12º Congreso Internacional de Actualización Apícola. Tepic, Nayarit, México.
7. Hummel Brunner, L A; Isman, M B. 2001. Acute, sublethal, antifeedant and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noptuidae). *Jornal of Agricultural and FoodChemistry*. 49(2):715-720.
8. Imdorf, A., S. Bogdanov, V. Kilchenmann and C. Maquelin. 1995. Apilife VAR: A new varroicide with thymol as the main ingredient. *Bee World* 76(2): 77-83.
9. Latorre, E. 2004. Varroasis. Situación actual y tratamientos. IV. Químio-resistencia y alternativas. Resúmenes de las conferencias de la XIX Feria Apícola de Castilla-La Mancha. Disponible en: www.culturaapicola.com.ar/apuntes/sanidad 28/08/2004, 11:00 AM.
10. Marinelli, E., F.M.de Pace, L. Ricci, L. Persano Oddo. 2002. Lotta contro la Varroa: Strategie di intervento con prodotti a basso impatto nel Lazio. *Atti del Convegno finale “Il ruolo della ricerca in apicoltura”*. Progetto finalizzato AMA. Bologna 14-16 marzo. pp. 123-129.

11. Medina, L. y E. Vicario. 1998 Número de ácaros de *Varroa jacobsoni* Oud. en colonias de abejas *Apis mellifera* L. con desarrollo normal y crítico en Yucatán, México. VI Congreso Ibero-Latinoamericano de Apicultura. Mérida, México.
12. Miranda, E. 2001. Apilife VAR y Apiguard: Evaluación de dos tratamientos contra la varroasis y la acariosis de las abejas. Trabajo de Diploma. Universidad Agraria de La Habana, Cuba.
13. Puentes, T., E. Pérez y N. Fregel. 2000. Estudio del impacto ocasionado por el huracán "Lili" en la dispersión del ácaro *Varroa jacobsoni* Oud en los territorios occidentales y centrales del país. V Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. La Habana, Cuba: 284. Puentes, T., Maida Verde y N. Fregel. 1998. Análisis de los factores de riesgo asociados a la varroasis en la República de Cuba. VI Congreso Ibero-Latinoamericano de Apicultura. Memorias. México.
14. Ruiz, J.A., J.M. Flores, J.M. Ruz, F. Puerta, F. Campano. 1998. El timol como tratamiento natural de elección contra *Varroa jacobsoni* Oud. Actas del III Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE). pp. 505-512.
15. Teissedre, P L; Waterhouse, A L. 2000. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(9): 3801-3805.
16. Tsao, R; Yu, Q. 2000. Nematicidal activity of monoterpenoids against important nematodes in agriculture. *Jornal of Essential Oil Research*. 12(3): 350-354.
17. Xiaolong, X. Y. 2004. Effects of varroa mites on the immune system of honey bees. 7th annual environmental chemistry student symposium program & abstracts. Pennsylvania State University. March 19-20, Online: http://www.geosc.psu.edu/~jmoore/ecs/abstract_vol/abstracts/abstracts3.html#yang . Citado el 28 junio 2007.