Eficacia *in vitro* de aceite esencial de Albahaca morada (*Ocimum tenuiflorum L*.) en abejas *Apis mellifera* infestadas con ácaros *Varroa destructor*.

Effectiveness in vitro of essential oil of *Ocimum tenuiflorum L*. in bees *Apis mellifera* infested with mites *Varroa destructor*.

Dr. Alain Veja Cárdenas MVZ [1]; Lic. Jorge Pino Alea PhD [2] , Dra. Martha Vázquez Luaces [1]; Téc. Alberto Morales [1]; Téc. Beatriz Luaces [1].

[1] Centro de Investigaciones Apícolas. La Habana, Cuba.
Cuba Bee Research Center.
E-mail: alain@eeapi.cu
[2] Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia.
Institute of Investigations for the Nutritious Industry

Abstract:
This investigation had as objective to evaluate the effectiveness of essential oil of *Ocimum tenuiflorum L* in bees *Apis mellifera* infested with mites *Varroa destructor*. You uses an experimental design of complete blocks at random, with 5 treatments, a positive control (it essential oils of *Thymus vulgaris*) and an alone control. The period of evaluation extended for 24 h, with intervals of 1, 2, 4, 6 and 24 h. The used doses produced the fall of 100% of the mite and between a 63 and 87 % of mortality of these at the end of the rehearsal. For what you conclude that the oil of lived basil presents effectiveness about the fall and mortality of the mites *Varroa destructor* and that significant association exists between dead mites and the used doses.

Key words: Bees, doses, effectiveness, essential oil, mites, *Ocimum tenuiflorum L*

Resumen:
Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la eficacia de aceite esencial de *Ocimum tenuiflorum L* en abejas *Apis mellifera* infestadas con ácaros *Varroa destructor*. Se utilizo un diseño experimental de bloques completos al azar, con 5 tratamientos, un control positivo (aceite esencial de *Thymus vulgaris*) y un control solo. El periodo de evaluación se extendió por 24 h, con intervalos de 1, 2, 4, 6 y 24 h. Las dosis utilizadas produjeron la caída del 100 % de los ácaros y entre un 63 y 77 % de mortalidad de estos al final del ensayo. Por lo que se concluye que el aceite de albahaca morada presenta eficacia sobre la caída y mortalidad de los ácaros *Varroa destructor* y que existe asociación significativa entre ácaros muertos y las dosis utilizadas.

Palabras claves: abejas, ácaros, aceite esencial, dosis, eficacia, *Ocimum tenuiflorum L*

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 como: la Ascoferosis (**Medina y Vicario, 1998**), enfermedades virales como el virus de las alas deforme **(DWV – siglas en Inglés)** y bacterianas como: Loque Americana y Loque Europea (**Aguerregaray y Poblet, 2004; Xialong, 2004**).

En Cuba esta parasitosis se reporto 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 pesquisaje posterior permitió comprobar que ya estaba extendido además en las provincias de La Habana y Ciudad de La Habana (**Puentes, Verde y Fregel, 2000**).

Los métodos utilizados con mayor frecuencia para el control de dicha enfermedad se han basado en el uso de productos químicos los cuales permiten cierto grado de control, pero incrementan los costos de producción al apicultor y pueden traer inconvenientes como el desarrollo de ácaros resistentes a las sustancias activas de estos productos; por ejemplo, en el caso de los piretroides: fluvalinato y flumetrina ya es una realidad (**Rodríguez, 2000**). Además de la presencia de residuales en los productos de la colmena, afectando su aceptación en el mercado internacional (**Medina y Medina, 2005**). Esta problemática ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos para lograr el control de la parasitosis, ejemplo de esto es la utilización de aceites esenciales de plantas aromáticas.

La Albahaca morada (*Ocimum tenuiflorum L*) en su follaje contiene aceite esencial, aproximadamente 1,5 %, donde predomina el eugenol (40 a 60 %), además en el tamizaje fitoquímico se evidenció la presencia de aminas, flavonoides, leucoantocianinas, esteroides y triterpenos, fenoles, azucares reductores y saponinas (**Acosta y Rodríguez, 2006**). Farmacológicamente se ha demostrado su acción antimicrobiana en el extracto acuoso de la planta y el eugenol obtenido de su aceite esencial tiene gran empleo en cirugía dental y como desinfectante por su gran acción antimicrobiana.

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la eficacia de aceite esencial de albahaca morada en abejas *Apis mellifera* infestadas por ácaros *Varroa destructor,* así como determinar el grado de asociación entre las dosis y mortalidad de los ácaros.

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 julio a octubre del 2007, con ácaros *Varroa destructor* y abejas obreras, provenientes de colonias de *A. mellifera*, 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 termohidrómetro, un estereoscopio, 16 jaulas fabricadas con madera (8 cm de diámetro x 8 cm de altura), rejilla de aluminio de 0,3 cm de diámetro y placas Petri pequeñas (4,7 cm de diámetro por 0,8 cm de altura).

Aceite esencial de Albahaca morada (*Ocimum tenuiflorum L*):

Se utilizaron diferentes dosis del aceite esencial, el cual se obtuvo previamente por hidrodestilación y se le determino la composición química mediante cromatografía gaseosa acoplada a masa, realizada en el Laboratorio de aromas del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia arrojando los resultados siguientes:

Bioensayos con abejas parasitadas:

Las abejas utilizadas en cada unidad experimenta se recolectaron del centro de la

Familia	**Especie**	**Nombre vulgar**	**Procedencia**	**Rendimiento (%)**	**Compuestos Mayoritarios (%)**
Lamiaceae	*Ocimum tenuiflorum* L.	Albahaca morada	San Antonio de los Baños, Habana	**1,6**	**eugenol**, 34,3 β-elemeno, 18,0 β-cariofileno, 23,1

cámara de cría de colonias que no recibieron tratamiento contra esta parasitosis, se colocaron en las jaulas con el alimento (miel) y se llevaron al laboratorio.

Se utilizaron abejas sanas, las cuales se parasitaron intencionalmente con ácaros maduros obtenidos de panales con zánganos a punto de nacer, formándose siete grupos homogéneos de 30 abejas parasitadas por 10 ácaros. Posteriormente se les aplico diferentes dosis (0,1; 0,3; 0,5; 0,7 y 0,9 ml) del aceite a los grupos tratamientos y se utilizaron dos grupos control: uno (+) con 0,9 ml de aceite esencial de *Thymus vulgaris* y el otro solo.

Los tratamientos se aplicaron con una jeringa sobre una placa Petri pequeña (4,7 cm de diámetro por 0,8 cm 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 sus hospederos se alejaran. Luego de la aplicación, cada unidad experimental se llevó a la incubadora para la volatilización del aceite.

Debido a que se trabajo 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 a 35 °C. La humedad relativa se mantuvo entre 70 y 80 %, mediante pocillos con agua puestos en la incubadora. Ambas variables se midieron mediante un termohidrómetro 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 incubadora.

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

Análisis estadístico:

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar. Cada tratamiento tuvo tres 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, también se realizó análisis de regresión para determinar el grado

de asociación existente entre las dosis y mortalidad de los ácaros, 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 h, considerando intervalos de tiempo de 90 min entre las observaciones. Los ensayos comenzaron siempre en el mismo horario (12:00 m), lo que permitió realizar evaluaciones cronológicas a las 01:30 pm, 03:00 pm; 04:30 pm, 06:00 pm, 07:30 pm y 08:30 am 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 del aceite aplicado se evaluó contabilizando los ácaros caídos y muertos.

Los ácaros se observaron bajo el estereoscopio, por un periodo de 5 min. 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 5 min de observación.

Análisis económico:

Para realizar el análisis económico se tuvo en cuenta que el costo por kg de material vegetal de Albahaca morada es de $1 MN, cuyo rendimiento en aceite esencial es de 0,2 %, por lo que se necesitan 10 kg de materia vegetal para obtener 20 g de aceite esencial, que es la cantidad que vamos a utilizar para tratar una colmena, ya que es la misma cantidad de la mezcla de aceites que contiene el Apilife Var.

También se realizó una comparación de los costos por tratamiento del aceite esencial de Albahaca con el Bayvarol y Apilife Var.

Resultados:

En los ensayos con abejas parasitadas por ácaros *Varroa destructor* se obtuvo la caída del 100 % de los ácaros al final del experimento (Tabla #1); no comportándose de igual forma la mortalidad de los mismos, encontrándose entre un 63 y 77 %; como podemos observar el porciento de ácaros muertos varía según las dosis aplicadas, aumentando paulatinamente mientras las dosis eran mayores.

Tabla # 1: Porciento de ácaros caídos y muertos al final del ensayo (n = 30).

Tratamientos	% ácaros caídos	% ácaros muertos
T_1 (0,1ml)	100	66,7
T_2 (0,3ml)	100	63,3
T_3 (0,5ml)	100	66,7
T_4 (0,7ml)	100	70
T_5 (0,9ml)	100	76,7
Control (+)	100	86,7

Control	20	0

Al comparar las medias de ácaros caídos entre los grupos durante las observaciones (Tabla # 2), obtuvimos que a medida que aumentaban las dosis del aceite esencial, las medias de ácaros caídos eran mayores, encontrándose en la primera observación que no habían diferencias significativas entre los tratamientos del dos al cinco y el control positivo y si con el tratamiento uno y el control para p ≤ 0,05. El mejor tratamiento fue el quinto, ya que en la primera observación el 50 % de los ácaros se habían caído. También se puede observar que la mayor cantidad de ácaros se cayeron en la primera observación y ya en la cuarta observación las dosis de la tres a la cinco y el control positivo presentaban una caída del 100 % de los ácaros.

Tabla # 2: Promedio de ácaros caídos durante las observaciones.

Tratamientos	Observaciones					
	1	2	3	4	5	6
T_5 (0,9ml)	4,67a	3,33	1,33	0,67	0	0
Control (+)	4,00a	3,33	1,33	1,33	0	0
T_4 (0,7ml)	4,00a	3,00	0,33	2,67	0	0
T_3 (0,5ml)	4,00a	2,00	1,00	3,00	0	0
T_2 (0,3ml)	3,33ab	2,67	0,67	0,67	1	3
T_1 (0,1ml)	2,33bc	2,00	2,00	2,33	1	1
Control	1,67c	0,33	0,00	0,00	0	0

Letras diferentes indican diferencia significativa para p ≤ 0,05.

Al comparar las medias de ácaros muertos entre los tratamientos al final del ensayo (Tabla # 3), encontramos que todos los tratamientos difieren del control, el control positivo y el tratamiento cinco no presentaron diferencias entre si para p ≤ 0.05. La muerte de los ácaros fue aumentando a medida que aumentaron las dosis. Se encontró asociación significativa entre ácaros muertos y las dosis utilizadas para p ≤ 0.05. El coeficiente de correlación igual a 0,525226 indica que existe una relación moderadamente fuerte entre las variables. La ecuación de regresión del modelo ajustado obtenida fue ácaros muertos = 6,2 + 1,3333 * dosis.

Tabla # 3: Promedio de ácaros muertos al final del ensayo.

Tratamientos	Muerte Media ± E S
Control (+)	8,67 ± 0,58a
T_5 (0,9ml)	7,67 ±1,15ab
T_4 (0,7ml)	7,00 ± 0bc

T_3 (0,5ml)	6,67 ± 0,58bc
T_1 (0,1ml)	6,67 ± 0,58bc
T_2 (0,3ml)	6,33 ± 0,58c
Control	0,00d

Letras diferentes indican diferencia significativa para p ≤ 0.05.

Análisis económico:

El costo del tratamiento (dos aplicaciones) con aceite de Albahaca morada por colmenas es $ 20,00 MN (0,80 CUC).

Al comparar el costo del tratamiento con aceite de Albahaca con el del Apilife Var que es 2,00 CUC por colmenas y con el del Bayvarol que es de 4,00 CUC, tenemos que el Apilife Var cuesta 1,20 CUC más y el Bayvarol 3,20 CUC, por lo que podemos ahorrar 168 000 CUC de las importaciones de Apilife Var ó 448 000 CUC de Bayvarol, teniendo en cuenta que en el país hay un total de 140 000 colmenas.

Discusión:

Los efectos de los aceites esenciales en la conducta de varroa han sido definidos como de atracción, repelencia o toxicidad (**Rickli *et al.*, 1991**). El desprendimiento de todos los ácaros desde su hospedero podría deberse a un efecto desorientador producido por el aceites utilizado, el cual actuaría sobre el sentido del olfato del ácaro. **Kraus *et al.* (1994)** señalaron que el estímulo olfativo juega un rol importante en la conducta del ácaro. Además, el principal factor en el reconocimiento de abejas adultas por varroa, así como también en el cambio de hospedero, es el olfato. Varroa es capaz de distinguir entre abejas nodrizas y recolectoras exclusivamente por el olor. Por ello es posible que alteraciones en la orientación olfatoria de varroa por olores naturales, como es el caso de los aceites esenciales, puedan causar modificaciones en la conducta del ácaro y llevar a una forma de control efectivo. Esto corrobora los resultados de este ensayo, en el cual, el aceite de albahaca morada logró desprender el 100 % de los ácaros, debido probablemente a este efecto.

Se identifico al eugenol como compuesto principal del aceite de albahaca morada encontrándose también en el aceite del clavo de olor (*Cariophyllos aromaticus*), el cual es usado en Europa para el control de varroa, y se ha comprobado que su efecto se debe a la presencia de este compuesto **(Liu, 1991). Kraus *et al.* (1994)** determinaron que el aceite de clavo de olor presentaba el mayor efecto repelente para varroa, entre 32 aceites ensayados. Así probablemente el alto desprendimiento de varroa, producido por el aceite esencial de albahaca se deba a su acción repelente hacia este.

Ruffinengo, et al, 2005 y 2006 utilizando dosis de 0.25, 0,5 y 1 g de aceite esencial de *Acantholippia seriphioidea* administraba por evaporación en bioensayos de laboratorio, obtuvo una mortalidad de ácaros del 88 % a las 72 h en las dosis de 0,25 y 0,5 g; la mortalidad alcanzo valores de 90 % para todos los casos que se le aplico la dosis de 1gr, la toxicidad en abejas no difirió significativamente del control para ninguna de las dosis; siendo ligeramente superiores a los obtenidos en este ensayo ya que la mortalidad se comporto entre un 63 y 77 %, aunque hay que tener en cuenta que estos resultados fueron a las 24 h y no hubo mortalidad de abejas ni síntomas de intoxicación.

Imdorf et al., (**1995**), 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 a 15 mg de timol por litro de aire, sin mortalidad de las abejas.

Conclusiones:

- El aceite de albahaca morada presenta eficacia sobre la caída y mortalidad de los ácaros.
- Se encontró asociación significativa entre ácaros muertos y las dosis utilizadas.

Recomendaciones:

- Continuar los estudios de eficacia con aceite de albahaca morada en colmenas experimentales, para su posterior aplicación en colmenas de producción.
- Evaluar la residualidad de este aceite en miel y cera de colmenas tratadas con él.

Bibliografías:

1. **Acosta de la luz, L. L; Rodríguez Ferrada, C. A. 2006**. Plantas Medicinales. Bases para su producción sostenible. La Habana. Ediciones Agroinfor. 116 p.
2. **Aguerregaray, D, Poblet, H. 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.
3. **Anderson D L, Trueman J W H. 2000**. Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) is more than one species. Experimental and Applied Acarology; 24: 165- 189.
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. **Imdorf, A.; Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Maquelin, C. 1995.** Apilife VAR: A new varroicide with thymol as the main ingredient. Bee World 76(2): 77-83.
6. **Kraus, B., N. Koeniger, and S. Fuchs. 1994**. Screening of substances for their effect on *Varroa jacobsoni*: attractiveness, repellency, toxicity and masking effects of etheral oils. J. Apic. Res. 33:34-43.
7. **Liu, T. 1991**. Vegetable oil and tracheal mites. Is there any pheromone connection, or is a mith? Am. Bee J. 131:303.
8. **Medina, C. A.; Medina, L. 2005**. Comportamiento Higiénico en *apis mellifera* y su relación con la varroosis (*Varroa destructor*) en Yucatán, México. XIX Seminario Americano de Apicultura: Campeche, México: 129- 135.
9. **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.
10. **Puentes, T.; Pérez, E.; Fregel, N. 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.
11. **Rickli, M., A. Imdorf, and V. Kilchemann. 1991**. Varroa- Bekámpfung mit Komponenten von ätherischen. Ölen. Apidologie 22:417- 421.
12. **Ruffinengo, S.; Eguaras, M.; Floris, I.; Faverin, C.; Bailac, P.; Ponzi, M. 2005**. LD50 and repellent effect to *Varroa destructor* mite of different essential oils from Argentina wild plants. Journal of Economic Entomology, 98 (3), in press.
13. **Ruffinengo, S; Maggi, M; Floris, I, Faverin, C; Pelayes, A; Gascón, A; Eguaras, M. 2006**. Eficacia del aceite esencial microencapsulado de *Acantholippia seriphioides* sobre el acaro varroa destructor, en condiciones de laboratorio**.** Argentina, in press
14. **Ruiz, J.A.; Flores, J.M.; Ruz, J.M.; Puerta, F. Campano, F. 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. **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.