

**Original****Evaluación "in vitro" del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* frente a Varroosis en *Apis mellifera*****Evaluation "in vitro" of *Rosmarinus's officinalis* essential oil in front of Varroosis in *Apis mellifera***

Dr. C. Osmaida Estrada Cutiño, Profesora Titular, Vicedecana de Investigación y postgrado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba, [oestradac@udg.co.cu](mailto:oestradac@udg.co.cu)

Jorlis Benitez Cayamo, DrMV, Ministerio de la Agricultura, Granma.

DrC. José Alfredo Guevara Franco, Profesor investigador, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Baja California Sur, México, [jguevara@uabcs.mx](mailto:jguevara@uabcs.mx)

Harold Font Puente, Profesor Auxiliar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba, [haroldf@udg.co.cu](mailto:haroldf@udg.co.cu)

Recibido: 6 de febrero – Aceptado: 4 de julio

**Resumen**

Con el objetivo de evaluar "*in vitro*" el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* frente a la varroosis en *Apis mellifera*, se recolectaron hojas frescas al azar de la planta. Se realizó la extracción mediante el método de hidrodestilación (con agua y vapor) en el Centro de Estudio de Química Aplicada, de la Universidad de Granma. Los parásitos fueron colectados, en un apiario ubicado en la comunidad de Santa Isabel del municipio Bayamo a partir de panales zanganeros. Para la evaluación del efecto acaricida se emplearon concentraciones de 25, 50, 75 y 100% respectivamente. Se utilizó como control el agua destilada. Se colocaron en un placa de Petri con papel de filtro impregnado con el producto, menos en el control, 20 ácaros en cada una de ellas. Las lecturas se realizaron a las 4, 8 y 24 horas. Se determinó el porcentaje de mortalidad de los ácaros. Se realizó el análisis de varianza para la comparación de proporciones. Mediante el uso del Programa COMPARPRO 1.0 (Font et al., 2007). Los resultados evidencian mayor actividad antiparasitaria al emplear las concentraciones 75 y 100%. Se concluye que el biopreparado tiene efecto antiparasitario contra el ácaro *Varroa destructor* de *Apis mellifera*.

**Palabras clave:** aceite; apis; esencial; mellifera; rosmarinus; varroosis

## Abstract

For the sake of evaluating "*in vitro*" the essential oil of *Rosmarinus officinalis* in front of varroosis in *Apis mellifera*, they recollected to the chance of the plant fresh leaves. The method of hidrodestilation (with water and vapor) in Estudio's Center of Química Aplicated of Granma's University accomplished the intervening extraction itself. Parasites were collected, in an apiary located in Santa Isabel's community of the municipality Bayamo as from honey combs zanganeros. For the evaluation of the acaricide effect they used 25, 50, 75 and 100 %'s concentrations respectively. The distilled water was utilized like control. They took a job in one Petri's plate with filter paper impregnated with the product, less in control, 20 acaruses in each their were ubicated. The readings came true to 4 8 and 24 hours. After of after of once the biopreparado was applied. The percentage of mortality of acaruses was determined. The analysis of variance for the comparison of proportions came true. By means of the use of the Program COMPARPRO 1,0 (Font et al., 2007). The results evidence bigger anthelmintic activity when 75 and 100 % use the concentrations. It is concluded that the biopreparado has antiparasitary effect against the acarus *destructive Varroa* of *Apis mellifera*.

**Key words:** oil; apis; essential; mellifera; rosmarinus; varroosis

## Introducción

El ser humano recibe gratificación doble de la abeja melífera, los beneficios de la polinización y los productos de la colonia. El beneficio a la agricultura, economía y ecología de un área, como resultado directo e indirecto de la difusión de las abejas es altamente significativo. Por otro lado las ventas de los productos y sub-productos del colmenar (miel, cera, polen, propóleos) así como el pasatiempo que se produce y mercadea para el manejo racional de éste insecto Calatayud (2007).

La producción mundial de miel estuvo en torno a 1.825.752 t, por países en el período del 2014 -2016 se comportó de la siguiente forma: China 27,7%, Turquía 6,1%, Estados Unidos 4,6%, Ucrania 3,7%, Argentina 3,2% y el resto del mundo 37,2%. Los mayores exportadores de miel en el 2017 fueron: China 19%, Argentina 10%, India 5%, México 4%, Brasil 4%, Alemania 4%, Hungría 3%, Canadá 3%, España 3% y el resto del mundo 45% FAO (2018).

Este proceso productivo se ve menguado debido a muchas enfermedades entre las que se destaca la varroosis, presente en la mayoría de los países en los que se practica la apicultura, tanto en poblaciones de colmenas rústicas o no. Patología que se convirtió en una preocupación desde el punto de vista económico en Japón y China en los años 1950 y 1960, en

Europa a finales de 1960 y 1970 y en Israel y Norte América en 1980. Eguaras y Ruffinengo (2008).

En nuestro país, esta noxa fue diagnosticada en 1996 y es uno de los peores problemas que afectan a la apicultura cubana. Actualmente se ha extendido a todo el territorio nacional, ocasionando pérdidas millonarias en nuestro segundo renglón exportable. Entre 1996 y 1997 en sólo dos provincias se perdieron más de 10 000 colmenas, mortandad que fue detenida y hoy se estima como promedio anual el 4% del parque apícola nacional, atribuibles a estas muertes no sólo directamente al cuadro morbosos causado por el ácaro, sino, a las enfermedades sobreañadidas como consecuencia de la acción expoliadora del parásito Pino, Sánchez, Rodríguez, Correa, Demedio., y Sanabrai (2011).

El control del ácaro en nuestro país se inicia en el año 2000, con el uso de productos químicos como la flumetrina (Bayvarol 4%) que genera resistencia y residualidad en los productos de las colmenas, esto ha conducido a problemas de riesgo toxicológico para los apicultores, abejas y por lo tanto también para los consumidores, por lo que se ha indicado su aplicación solo en época de no cosecha de miel, generalmente su costo es de millones de dólares Gómez, Verde, Álvarez., y Toraño (2004)..

El empleo de extractos vegetales como acaricidas, constituye una opción de bajo costo que ayuda en gran medida a la economía de muchos países, ya que su uso aporta beneficios capaces de reducir los gastos financieros que provoca la importación de grandes volúmenes de productos químicos, además de constituir una alternativa ecológica debido a que no ocasionan daños al medio ambiente Ávila, Navarro, Vera, Dávila, Melgoza., y Meza (2011). Por lo que los aceites esenciales de plantas como el orégano, romero, eucalypto, etc, pueden ser candidatos para el desarrollo de un nuevo producto en el control de varroosis en *Apis mellifera*.

El objetivo del trabajo es evaluar in vitro la efectividad del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* frente a varroosis en *Apis mellifera*.

### **Población y muestra**

Las investigaciones se realizaron en el período comprendido entre octubre del 2018 hasta marzo del 2019, en el Departamento de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, el Centro de Estudio de Química Aplicada, el Laboratorio de Agentes Biológicos de la Universidad de Granma, y el Laboratorio del Departamento de Sanidad Animal del MINAGRI en Granma.

### **Materiales y métodos**

Selección del material vegetal para la obtención del aceite esencial

La selección de la especie vegetal se realizó tomando como criterio la revisión bibliográfica y otros trabajos realizados y la factibilidad de su uso como una alternativa en la regulación poblacional de *Varroa destructor* de *Apis mellifera*. La recolección se realizó en un Organopónico ubicado en el municipio Bartolomé Masó, provincia Granma entre las siete y las ocho horas. La temperatura ambiente durante el proceso de recolección se mantuvo alrededor de los 25°C -30°C y la humedad relativa fue del 85% (Norma Ramal. NRSP 309, 1992).

El follaje recolectado se almacenó en el Laboratorio de Productos Naturales (LPN) del Centro de Estudios de Química Aplicada, en un lugar fresco, ventilado y de poca iluminación.

#### Obtención del aceite esencial

La extracción del aceite esencial de la planta de estudio se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Centro de Estudio de Química Aplicada (CEQA) utilizando el método de hidrodestilación (con agua y vapor) a partir del material vegetal molinado. La destilación se realizó en un equipo tipo Clavenger, constituido por un hidrodestilador y un condensador simple. Se utilizó agua como líquido refrigerante haciendo uso de un recirculador modelo MLW fabricado en Alemania.

Se realizaron cuatro extracciones de tres horas de duración cada una a partir de 250g de material vegetal respectivamente, pesados en una balanza Técnica BS 2202S SARTORIUS fabricada en Alemania.

El aceite esencial obtenido en cada extracción fue secado con sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhidro de calidad analítica para eliminar el agua remanente del proceso de destilación y posteriormente fue pesado para calcular el rendimiento porcentual (masa/masa) de la extracción.

#### Formulación del biopreparado

Los biopreparados con aceite esencial, se prepararon en concentraciones al 25, 50, 75 y 100% respectivamente, con agua destilada como excipiente de base, hasta obtener la mezcla con la homogeneidad deseada, se empleó como control el agua destilada. Las emulsiones a diferentes concentraciones se prepararon mediante una técnica de ultrasonido con un equipo de tipo ultrasonic cleaner SB-120DT posteriormente se envasaron en frascos de color ámbar (50 mL), para evitar la aceleración de la cinética de degradación por fotólisis. Todas las muestras fueron etiquetadas e identificadas.

Ubicación experimental del desarrollo del estudio.

Los ácaros fueron colectados, de un apiario localizado en el Consejo Popular de Santa Isabel de Bayamo, a partir de panales zanganeros de la especie *Apis mellifera* sometida a sistema de crianza intensiva en cajas Langstroth cuya infestación ocurrió de forma natural.

Se emplearon cuatro concentraciones del biopreparado (25%, 50%, 75% y 100%) más un control.

Formulación de las dosis

Concentración 1-----25% (0,25mL del extracto y 75mL de agua destilada).

Concentración 2-----50% (0,50mL del extracto y 50mL del agua destilada)

Concentración 3-----75% (0,75mL del extracto y 25mL de agua destilada)

Concentración 4-----100% (con1mL del extracto, sin añadirle nada más)

Control 5 ----- (solo se añadió agua destilada)

Cada concentración constituyó un tratamiento y se realizaron tres réplicas, en una placa de Petri con papel de filtro impregnado del biopreparado con el aceite esencial por el método de exposición completa en placa Petri, menos en el control. Se colocaron 20 ácaros en cada disco. Las lecturas se realizaron a las 4, 8 y 24 horas, después de aplicado el biopreparado. Se determinó el porcentaje de ácaros muertos, se empleó para la observación de los ácaros muertos el microscopio-estereoscopio.

Procedimiento estadístico para el estudio “*in vitro*”.

Para el análisis estadístico de los resultados se comparó el número de ácaros muertos, según el tiempo de observación para cada concentración y entre tratamiento en cada momento de observación a través de análisis de comparación múltiple de proporciones. Se utilizó la prueba de Duncan (1955) para la comparación múltiple de las medias. El procesamiento se realizó mediante COMPARPRO 1.0. Font, Noda, Herrera, Lizazo, Sarduy., y Rodríguez (2007).

### **Análisis y resultados**

En el cuadro uno, se encontró diferencia altamente significativa en todas las concentraciones, siendo superior a las 24 horas y se incrementa proporcionalmente con la concentración del aceite esencial., se considera favorable a partir de 50% a las 24 horas y al 100 a partir de las ocho horas.

**Cuadro 1. Ácaros muertos con el uso de diferentes concentraciones del biopreparado.**

Período de observación(horas)	25%	50%	75%	100%	Control
4	5 <sup>c</sup>	10 <sup>c</sup>	15 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>
8	10 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	35 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>
24	20 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	45 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
EE	2,22	3,83	2,90	3,64	0.01
Sig	***	***	***	***	ns

Valores con letras distintas presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según prueba de Duncan.

Según Alfonso (2012), en investigación realizada en la provincia Granma con extracto alcohólico de la planta *Trichilia hirta* en concentraciones iguales que las aplicadas en nuestro experimento obtuvo resultados similares a los nuestros al obtener una diferencia altamente significativa en las concentraciones de 75 y 100% respectivamente con un período de observación de 36 horas.

Por otra parte Sabahi, Gashout, y Kelly (2017). al utilizar el aceite esencial de orégano frente a la varroosis observó resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo. De igual manera reportan otros investigadores la eficacia de dos acaricidas naturales, el ácido fórmico y el timol, para el control del ácaro *Varroa destructor* en colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*.). La mayor eficacia se obtuvo con dos aplicaciones de 12,5 g de timol (92,1%), mientras que con el ácido fórmico, la eficacia fue de 66,4%. Ambos acaricidas obtuvieron una mortalidad significativa de ectoparásitos ( $P < 0.0001$ ), pero la misma disminuyó después de la primera réplica, con resultados diferentes a los expuestos en nuestra investigación.

Por su parte en investigaciones realizadas, investigadores evidenciaron que la utilización del tomillo, a las 24 horas, alcanzó el 100% de muertes en los ácaros. A las 36 horas se observaron valores entre un 22% y un 36% de mortalidad. Los resultados obtenidos muestran que el

extracto de la planta no tiene un efecto tóxico sobreagudo sobre la población total de estos ectoparásitos, y agudo sobre la totalidad de la población, lo que lo avala para su posible uso como acaricida.

Según Pomagualli (2017) reporta que el ácido oxálico seguía manteniendo su acción acaricida en pequeña proporción sin embargo para la diatomita se registra un incremento de 0,94%, en consecuencia si se utilizara a intervalos de tiempo más cortos la reducción del paracito sería en forma ascendente, para obtener buenos resultados al utilizar ácido oxálico se necesita dar cuatro aplicaciones a intervalos de cuatro días.

Por otra parte refieren investigadores la eficacia del empleo del aceite esencial de albahaca morada frente a ácaros de *Varroa destructor*, provenientes de colonias de *A. mellifera*, que no habían recibido tratamiento. Las dosis utilizadas produjeron la muerte del 100% de los parásitos y entre 63 y 77% de mortalidad de estos al final del ensayo, lo cual evidencia resultados inferiores a los obtenidos en nuestra investigación.

Como puede observarse en el cuadro dos, las concentraciones 75 y 100% muestran resultados más altos a las 24 horas, en cuanto al porcentaje de mortalidad en ácaros los cuales difieren significativamente del resto de las concentraciones y el control, lo que evidencia la efectividad del producto para el tratamiento contra la varroasis en *Apis mellifera*. Resultado que puede estar asociado a los componentes químicos como el carvacrol, monoterpeno sintetizado a partir de  $\alpha$ -pineno según el cual le confiere una amplia acción como antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatorias y antioxidante Yesil, Sevimli, Bedir, y Vardar (2010). ya probadas tal como refieren Han, Choi, Lee, Kim., y Ahn, (2015).

Por otro lado varios estudios realizados con el aceite esencial del romero han comprobado su efecto contra microorganismos Gram-negativos, Gram-positivos y microorganismos resistentes Bonilla, Mendoza, Moncada, Murcia, Rojas, Calle., y Pinzón (2016).demostraron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *R. officinalis* L. sobre tres bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; Gram-negativas: *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* y hongos: *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, también demostraron la actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguinis* y *Enterococcus faecalis*, microorganismos presentes en la cavidad bucal.

Además refieren autores que el romero contiene otros componentes químicos como: taninos, azúcares y elementos minerales: 1,14% de sodio, 1,06% de potasio, 0,63% de calcio, 0,23% de

magnesio 17 partes por millón (ppm) de hierro, 10 ppm de cobre, 26 ppm de zinc, 15 ppm de manganeso y de AE 1,2-2%, por lo que su aceite esencial es considerado un potente estimulante con propiedades analgésicas, antisépticas, antidiarreicas, antirreumáticas, antiespasmódicas, astringentes, estimulante circulatorio, sudorífico, cicatrizante, hepático y tonificante.

**Cuadro 2. Porcentaje de ácaros muertos con el empleo de diferentes concentraciones del biopreparado a las 24 horas**

Tratamientos	% ácaros muertos	N	EE
25	35 <sup>d</sup>	20	
50	60 <sup>c</sup>	20	
75	75 <sup>b</sup>	20	4.57333
100	100 <sup>a</sup>	20	
Control	0,0 <sup>e</sup>	20	

Valores con letras distintas presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según prueba de Duncan.

El efecto acaricida de los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Heterotheca latifolia* y *Eucalyptus* sp, contra *Varroa destructor* y su toxicidad sobre *Apis mellifera* L. fue evaluado por diferentes investigadores en condiciones de laboratorio en dos ensayos diferentes y su efectividad varió entre 63 y 84% y en nuestro trabajo se alcanzó una efectividad de 75% a 100%, en condiciones similares.

Se coincide con Pomagualli (2017), que atribuye esta acción antiparasitaria del romero al contenido mayoritario de alcaloides, otros investigadores han obtenido buenos resultados con la utilización del Nim, los cuales encontraron concentraciones de cinco a 15  $\mu\text{g}$  de timol, 50 a 150  $\mu\text{g}$  de alcanfor y 20 a 60  $\mu\text{g}$  de mentol por litro produjeron la muerte del 100% de ácaros. En cambio, eucaliptol en 240  $\mu\text{g}$  por litro causó 100% de ácaros muertos. Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por estos investigadores.

Según Franco (2009), al evaluar el control alternativo del ácaro *Varroa destructor*, utilizando aceites esenciales de Eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh), Clavo (*Eugenia caryophyllata* Thunb), y extracto comercial de Nim (*Azadirachta indica* y *A. Juss*) aplicados a través de un sustrato de gel directamente en las colmenas de abejas melíferas, evidenciaron



que el aceite esencial de Eucalipto y el extracto de Nim ejercen un efecto tóxico directo sobre *Varroa* ya que el primero causó la mortalidad del 100% de *Varroa* y el segundo causó la muerte del 70%, en relación a los tratamientos tradicionales Bayvarol (100% de eficiencia) y ácido oxálico 89.28%.

Sin embargo diferentes autores, evaluaron en condiciones de laboratorio en dos ensayos diferentes el poder acaricida sobre *Apis mellifera* de los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Heterotheca latifolia* y *Eucaliptus sp* y la efectividad varió entre 63 y 84%, resultados inferiores a los obtenidos en nuestra investigación. Y otro grupo, reportaron valores de igual magnitud que los que se muestran en nuestro estudio, al evaluar el efecto varroocida del timol administrado en dos formas; una aplicación única de 25 g y otra de dos aplicaciones de 12,5g cada una, separadas por 12 días, obteniendo una mortalidad del 94% y 91% respectivamente.

## Conclusiones

1. Se observó mayor efectividad del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en las concentraciones de 75 y 100%, durante 24 horas "in vitro".
2. Se reportaron valores de igual magnitud que los que se muestran en nuestro estudio, al evaluar el efecto varroocida del timol administrado en diferentes formas.

## Referencias bibliográficas

- Alfonso, La O. (2012). *Efecto de Trichilia hirta L. en el control de Varroa destructor en colmenas de Apis mellifera*. (Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Medicina Preventiva Veterinaria). Universidad de Granma.
- Ávila, R., Navarro, A., Vera, O., Dávila, R., Melgoza, N. y Meza, R. (2011). *Romero (Rosmarinus officinalis L.): una revisión de sus usos no culinarios*. Ciencia y Mar. Facultad de ciencias químicas, Benemerita Universidad Autónoma de Puebla. XV (43): 23-36 p
- Bonilla, Y., Mendoza, C.E., Moncada, O., Murcia, Á.P., Rojas, J., Calle R. y Pinzón, L. (2016). *Efecto del aceite esencial de Rosmarinus officinalis sobre Porphyromonas gingivalis cultivada in vitro*, Rev. Colombia. Cienc. Quím. Farm., 45(2), 275-287.
- Calatayud F. (2007). Historia de la apicultura: Evolución y conceptos básicos. Rev. Apic. 3(5): 24. <http://biblioteca.upr.edu.cu/bidi/almacen/historia.pdf.31>
- Eguaras, M.J. y Ruffinengo, S.R. (2008). *Estrategias para el control de Varroa*. 2<sup>da</sup> ed. Mar del Plata: Argentina. 89-97.

- FAO. (2018). *Reporte comparativo del comercio exterior de productos, subproductos y derivados de origen animal en el primer cuatrimestre de los años 2017- 2018*.
- Franco, A. (2009). *Evaluación de tres productos naturales para el control alternativo del ácaro Varroa (Varroa destructor Anderson & Truman) en colmenas de abejas (Apis mellifera L.) usando gel como sustrato portador*. (Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo). Universidad de San Carlos De Guatemala. Guatemala.
- Font, H.A., Noda, T.M., Herrera, D., Lizazo, L., Sarduy, L. y Rodríguez. (2007). *COMPARPRO 1.0. Instituto de Ciencia Animal*. Departamento Biomatemática.
- Gómez, J., Verde, M. Álvarez, E. y Toraño, M. (2004). *Organización de sistema de control sanitario para la especie apícola en Cuba. Estrategia y acciones*. En I Congreso Latinoamericano de Apicultura. Habana.
- Han, J., Choi, B.R., Lee, S.G., Kim, S.I. and Ahn, Y.J. (2015). Toxicidad de aceites esenciales de plantas a acaricida susceptibles y resistentes .Tetranychusurticae (Acari: Tetranychidae) y Neoseiulus californicus(Acari: Phytoseiidae). J. Econ. Entomol. 103 (4) ,1293-1298.
- Norma Ramal. NRSP 309 (1992). *Medicamentos de origen vegetal.Droga cruda*. Métodos de Ensayos.
- Pino, O., Sánchez, Y., Rodríguez, H., Correa, T. M., Demedio, J. y Sanabrai, J. (2011). *Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de Piperaduncum sub sp. Frente a Varroa*. Revista de Protección Vegetal. 26(1), 52-61 pp.
- Pomagualli, C. (2017). *Acaricidas sintéticos y naturales para el control de Varroa destructor en colmenas Apis mellifera*. Riobamba-Ecuador.
- Sabahi, Q., Gashout, H. y Kelly, P. (2017). *La liberación continua de aceite de orégano controla de manera efectiva y segura las infestaciones por Varroa destructor en las colonias de abejas melíferas en un clima del norte*. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0157-3>
- Yesil, C.O., Sevimli, C., Bedir, E. y Vardar, S. (2010). *Inhibitor effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarínico acid in the growth of various human cancercellines*. Plant Foods Human Nutrition 65 158-63.