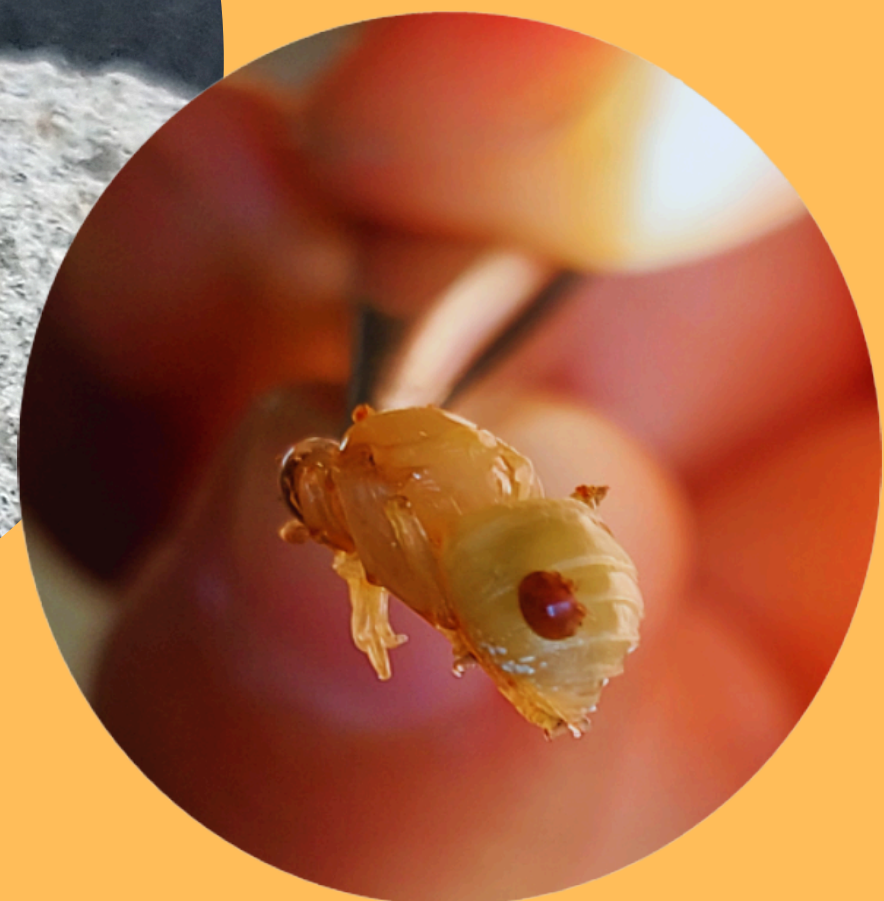




Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco  
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud

Tesis para optar por la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Control de *Varroa destructor* mediante la aplicación  
de aceites esenciales de *Juniperus communis* L. y  
*Azorella prolifera* (Cav.) G.M. Plunket & A.N.  
Nicolas en el noroeste de la Patagonia, Argentina:  
ensayos en laboratorio.



Brenda Denise Freeman



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD  
SEDE ESQUEL



TESIS PARA OPTAR POR LA  
LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Control de *Varroa destructor* mediante la aplicación de aceites esenciales de *Juniperus communis* L. y *Azorella prolifera* (Cav.) G.M. Plunket & A.N. Nicolas en el noroeste de la Patagonia, Argentina: ensayos en laboratorio.**

Alumna: Freeman, Brenda Denise.

Directora del seminario: Dra. Manzo, Rosa María.

Co- directora del seminario: Ing. López de Armentia, Juliana.

Profesora Asesora: Lic. Papazian, Gabriela.



## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
Regiones Apícolas Argentinas .....	4
Biología de <i>Apis mellifera</i> .....	5
<i>Ciclo de vida Apis mellifera</i> .....	6
<i>Sanidad de Apis mellifera</i> .....	7
Biología de <i>Varroa destructor</i> .....	8
<i>Adaptaciones al parasitismo: morfología y comportamiento</i> .....	9
<i>Ciclo de vida de Varroa destructor</i> .....	10
<i>Daños causados por Varroa destructor en A. mellifera</i> .....	12
<i>Métodos de control de Varroa destructor</i> .....	13
<i>Alternativa para el control de Varroa destructor</i> .....	14
Aceites esenciales seleccionados para este estudio.....	15
<i>Juniperus communis</i> “ <i>enebro común</i> ” .....	15
<i>Azorella prolifera</i> “ <i>Neneo</i> ”.....	16
Objetivo general.....	17
Hipótesis .....	18
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>19</b>
Área de Estudio.....	19
Material Vegetal.....	20
<i>Ubicación y Obtención del Material Vegetal</i> .....	20
<i>Obtención de los Aceites Esenciales</i> .....	22
<i>Caracterización de los Aceites Esenciales</i> .....	23
Índice de refracción .....	23
Composición química: Cromatografía Gaseosa .....	24
Muestras de <i>A. mellifera</i> y <i>V. destructor</i> .....	25
<i>Prueba del Frasco</i> .....	25
<i>Colecta de Varroa destructor</i> .....	26
<i>Colecta de adultas Apis mellifera</i> .....	26
Bioensayos .....	27

<i>Bioactividad de los Aceites Esenciales</i> .....	27
<i>Test de Atracción y Repelencia</i> .....	29
Análisis Estadístico.....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
Análisis de los aceites esenciales .....	31
<i>Aceite esencial de J. communis</i> .....	31
<i>Aceite esencial de A. prolifera</i> .....	32
Bioensayos: <i>Apis mellifera</i> y <i>Varroa destructor</i> .....	33
<i>Bioactividad del aceite esencial de enebro</i> .....	33
Prueba de letalidad en <i>Apis mellifera</i> : Concentración letal 50 (CL <sub>50</sub> ) y NOAEL .....	33
Prueba de letalidad en <i>Varroa destructor</i> : Concentración letal 50 (CL <sub>50</sub> ).....	34
Índice de Selección ( <i>A. mellifera</i> / <i>V. destructor</i> ).....	35
Test de atracción y repelencia en <i>Varroa destructor</i> .....	36
<i>Bioactividad del aceite esencial de neneo</i> .....	36
Prueba de Letalidad en <i>Apis mellifera</i> : Concentración letal 50 (CL <sub>50</sub> ) y NOAEL .....	36
Prueba de Letalidad en <i>Varroa destructor</i> : Concentración letal 50 (CL <sub>50</sub> ) .....	37
Índice de selección ( <i>A. mellifera</i> / <i>V. destructor</i> ) .....	38
Test de Atracción y Repelencia en <i>Varroa destructor</i> .....	38
Toxicidad de los aceites esenciales en <i>A. mellifera</i> y <i>V. destructor</i> .....	38
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
Aceites esenciales .....	40
<i>Aceite esencial de J. communis</i> .....	40
<i>Aceite esencial de A. prolifera</i> .....	40
Bioensayos: toxicidad y actividad acaricida .....	41
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>42</b>
Consideraciones finales .....	43
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>45</b>

## AGRADECIMIENTOS

No niego ni afirmo que se me escaparon unas lágrimas escribiendo esto...

Gracias a mi familia por acompañarme y alentarme durante esta etapa que llega a su fin. En especial a mi mamá y a mis hermanos, por su apoyo incondicional, paciencia y aguante cada vez que rendía un final. Y a mi viejo, que, aunque no llegó a ver este final, sé que siempre estuvo y está presente.

Agradezco a mi super directora, Dra. Rosa Manzo, por su paciencia infinita, dedicación y acompañamiento constante en todo este proceso, su apoyo fue fundamental para el desarrollo de esta tesis. Y a mi co-directora, Juliana López de Armentia, por su ayuda y acompañamiento.

A las amigas que me dio la carrera: Tami, Romi y Lucesita, sin ustedes este camino hubiera sido mucho más difícil. Y a Graciela por compartir conmigo esta última instancia de aprendizaje y trabajo. ¡Con ustedes nunca faltan las risas, los llantos y los mates!

A mis amigas de la vida: Majo, Dana y Aye por apoyarme y alentarme todo este tiempo.

Gracias también a Susana Rizzuto, por el apoyo y motivación, que me impulsaron a iniciar y profundizar mis conocimientos en sanidad apícola. Asimismo, agradezco la oportunidad de integrarme en el hermoso equipo de trabajo junto con Rosi y Caro.

Gracias a mi asesora Gabi Papazian por las charlas y consejos.

Agradezco al INTA Trevelin, y en especial a Ivana Amico, por facilitarme el acceso al predio donde recolecté los frutos de enebro. También agradezco al establecimiento "Valle Andino" y al establecimiento "Cauce Viejo" por permitirme utilizar sus colmenas.

A la asociación ACLAA, cuyos miembros como Walter Matthies, Julio Callegaro y a Carlos Juan por demostrar interés y apoyo en esta investigación.

Gracias a INBIES-UNPSJB por permitirme usar el equipamiento para la extracción y caracterización de los aceites. Como también al LIEB-UNPSJB por brindarme todos los elementos y comodidades para el desarrollo de esta tesis.

Gracias a la UNPSJB-FCN y CS por brindar esta hermosa carrera y a los profesores por permitirme formarme como profesional.

Agradezco también a los Bomberos Voluntarios de Esquel, al personal de Bedelía y de la universidad, a CIEFAP y todos los que socorrieron en el pequeño incidente.

Este trabajo de tesis se llevó a cabo gracias a la adjudicación de la beca "Programa de Apoyo económico para Tesis y Proyectos Finales" otorgada por la provincia de Chubut-Secretaría de Ciencia y Tecnología, Innovación Productiva y Cultura.

## RESUMEN

Este estudio evalúa el potencial de los aceites esenciales de *Juniperus communis* (enebro) y *Azorella prolifera* (neneo) como alternativas naturales para el control de *Varroa destructor*, un ácaro ectoparásito que representa una amenaza para las colonias de *Apis mellifera* con una extensa distribución mundial, incluyendo la Patagonia Argentina. Ante la problemática de la resistencia a los acaricidas sintéticos y la potencial contaminación de los productos apícolas, el objetivo de esta tesis es estudiar el efecto acaricida e insecticida de estos aceites esenciales. El estudio se llevó a cabo en un apiario del noroeste de la provincia de Chubut, Argentina. Se recolectaron frutos maduros de *J. communis* y ejemplares completos de *A. prolifera*. Los aceites esenciales se obtuvieron mediante la técnica de arrastre con vapor de agua y se caracterizaron químicamente. Se realizaron bioensayos para determinar la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de los aceites sobre *V. destructor* y *A. mellifera*, como también ensayos de atracción y repelencia. Los resultados indicaron que el aceite esencial de *Juniperus communis* demostró ser una alternativa prometedora para el control de *Varroa destructor* con baja toxicidad para *Apis mellifera* tras 24 horas de exposición. El aceite esencial de *Azorella prolifera* también presentó actividad acaricida contra *V. destructor*; sin embargo, su índice de selección fue menor que el del aceite esencial de enebro, ya que este aceite resultó ser tóxico para las abejas en una concentración de 20 µl/ml. La composición química de los aceites esenciales, dominada por monoterpenos, especialmente el α-pineno y mirceno, explican en gran medida su actividad acaricida. Ninguno de los aceites esenciales evaluados mostró efectos atrayentes o repelentes sobre *V. destructor*. Este estudio destaca el potencial del aceite esencial de *J. communis* como una alternativa natural y prometedora para el control de *V. destructor*, abriendo paso a futuras investigaciones, como ensayos a campo, para establecer su real eficacia como acaricida orgánico, además promoviendo una articulación activa entre diferentes productores de la región para generar prácticas más sostenibles y amigables con el ambiente.

Palabras clave: ácaros, control natural, sanidad apícola, Patagonia.

## INTRODUCCIÓN

Los polinizadores, en particular las abejas melíferas (*Apis mellifera*, Linnaeus, 1758), son esenciales para la biodiversidad y la producción de alimentos a nivel global (Iglesias et al., 2022). Esta especie, de distribución cosmopolita, poliniza la mayoría de cultivos agrícolas y silvestres, incrementando en un 96% el rendimiento de los cultivos polinizados por animales (Potts et al., 2010). Además de su papel ecológico, las abejas nos brindan productos que se industrializan como miel, propóleo, polen, cera y jalea real entre otros (e.g. reinas y núcleos) (Mitton, 2019). Estos productos, una vez extraídos pueden ser utilizados como insumo en la industria alimenticia, farmacológica e industrial (Balleta & Locher, 2022).

La apicultura en Argentina, una actividad tradicional con un significativo valor económico y social, se ha convertido en protagonista esencial para el mercado mundial (Balleta & Locher, 2022). Argentina se posiciona en el tercer lugar a nivel mundial en producción y en segundo lugar como exportador de miel, comercializando entre el 90-95% de su producción a nivel internacional (Balleta & Locher, 2022). Esta actividad se desarrolla en gran parte del territorio argentino, aprovechando las condiciones climáticas y los avances tecnológicos para obtener miel de calidad y diversidad (Balleta & Locher, 2022).

En el año 2021, la producción promedio anual de miel en Argentina fue de 75.000 toneladas, mientras que el consumo interno rondó las 6.000 toneladas promedio, lo que demuestra las grandes exportaciones de miel en el país alcanzando aproximadamente los \$200 millones de dólares anuales (Ministerio de Economía, 2021). Según el Registro Nacional de Productores Apícola (RENAPA) en el año 2023, habían más de 19.000 apicultores inscriptos y 4.087.885 de colmenas en producción. Además, el país cuenta con el total de 1.209 salas de extracción de miel habilitadas por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), lo que demuestra la relevancia de esta actividad en las economías regionales del país (Ministerio de Economía, 2023; Portal Apícola, 2024).

Sin embargo, la producción y comercialización fluctúan a lo largo de los años, por ejemplo, en el año 2023 debido a factores climáticos (sequías e inundaciones), la producción de miel disminuyó un 15 % (Ministerio de Economía, 2023). A pesar de estas adversidades, en el periodo enero- octubre del 2024, se han exportado 115.726 toneladas de miel generando \$1.452 millones de dólares en ingresos (Ministerio de Economía, CIEP, 2024). Los principales destinos de exportación de miel incluyen Estados Unidos y Alemania, entre otros (Ministerio de Economía, CIEP, 2024). La miel argentina es de excelencia y reconocida mundialmente, basada en análisis tanto físicos como químicos: para caracterizar el producto y analizar si hay adulteración o manejo inadecuado; análisis palinológicos para detectar y diferenciar el tipo de polen agregado por las abejas, que denota el origen botánico de la miel; y análisis de marcadores botánicos, los cuales aseguran su autenticidad y valor nutricional (INTA & PROAPI, 2019).

## **Regiones Apícolas Argentinas**

El territorio argentino presenta una diversidad de especies florales que influyen en el rendimiento de la producción de miel y en la obtención de mieles monoflorales y/o multiflorales. De acuerdo a la caracterización agroclimática y de vegetación, Argentina se divide en 5 regiones apícolas: Noroeste Argentino (NOA); Noreste Argentino (NEA); Central; Nuevo Cuyo y Patagonia (Ferrari et al., 2011).

La Patagonia, región caracterizada por sus bajas temperaturas, fuertes vientos provenientes del oeste, precipitaciones concentradas en invierno, baja humedad y alta cobertura nubosa (Paruelo et al., 1998), ofrece un escenario apícola particular. Dentro de esta amplia región se encuentra la provincia de Chubut que está dividida en cuatro regiones apícolas, las cuales incluyen la Comarca VIRCH (Valle Inferior del Río Chubut), la Comarca Noroeste, el Valle 16 de Octubre y el Valle Sarmiento. Con más de 200 apicultores en la provincia, la producción anual de miel varía entre 50 y 70 mil kilos, la que es comercializada principalmente a nivel local (Gobierno del Chubut, 2020; Ministerio de Economía Argentina, 2023).

En esta provincia se registran 5 asociaciones, siendo la Asociación de Apicultores de la Comarca Los Alerces (AACLA) la que abarca principalmente las localidades de Esquel y Trevelin con epicentro en el valle 16 de Octubre. Esta asociación se conformó en el año 2005 y desde entonces ha experimentado un notable crecimiento y desarrollo. La existencia de esta asociación

condujo a la instalación de una planta comunitaria de extracción y envasado de miel con el apoyo de la Municipalidad de Esquel, que se puso en marcha en enero de 2007, la misma continúa funcionando hasta la actualidad, permitiendo mejorar los métodos productivos y optimizar los procesos de comercialización (El Chubut, 2023; Municipalidad de Esquel (s.f.)). Además de la producción de miel, la asociación se encarga de coordinar y realizar los monitoreos sanitarios con un esquema de rotación de principios activos. Asimismo, la AACLA la ofrece capacitación y orientación a los apicultores, tanto a sus miembros como a aquellos que no formen parte de la asociación, promoviendo la transferencia de conocimientos y el desarrollo de la apicultura en la zona.

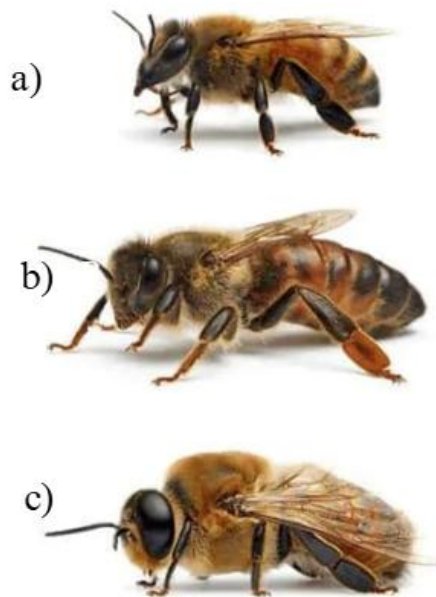
### **Biología de *Apis mellifera***

*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) es un insecto social que vive en colonias. Cada colonia está integrada por tres clases de individuos (castas): la reina (hembra), las obreras (hembras) y los zánganos (machos) (Winston, 1987) (Figura 1). La vida de una colonia se encuentra regulada por la acción de un conjunto de feromonas (principalmente emitidas por la reina), fenómenos comportamentales y flujo de néctar (Maggi, 2010). A medida que la oferta de alimento aumenta, la reina incrementa la postura de huevos, incrementándose el área de cría del nido, lo que lleva al desarrollo y crecimiento de la colonia (Maggi, 2010). Cuando alcanza niveles de población elevados en relación al ambiente físico que la aloja, la colmena procede a dividirse, previa producción de nuevas reinas. Como consecuencia de esta situación, la reina original abandona la colonia junto con el 50-90 % de las abejas obreras para fundar una nueva colonia (Winston, 1987). Como ocurre en otras especies sociales, las colonias de abejas poseen división del trabajo.

La reina, también mencionada como abeja madre, es la única hembra completamente desarrollada sexualmente en la colonia, capaz de poner huevos que producen obreras y zánganos, siendo su principal función la de ovopositar (Martinez- Pérez et al., 2017). Ella segrega sustancias químicas (feromonas) las cuales regulan el comportamiento de todos los individuos en la colonia. La reina virgen sale de su colmena para ser fecundada en el aire por 10 o más zánganos, garantizando espermatozoides para el resto de toda su vida útil, por lo que se conoce como vuelo nupcial o vuelo de fecundación (Massaccese, 2002; Gonzalez Hernandez, 2012).

Las obreras recién emergidas se encargan de la limpieza, de alimentar y atender a la reina y a las crías (Winston, 1998). Las obreras más viejas se ocupan de la construcción del nido, colecta de polen, néctar, agua y propóleos, como así también a la defensa de la colonia ante posibles invasores (Winston, 1998). Todas estas labores están sujetas a modificación dependiendo de las necesidades de la colonia y de estímulos externos (Mitton, 2019). Asimismo, la homeostasis del nido es mantenida por las obreras, las cuáles mantienen la temperatura y humedad prácticamente constantes a pesar de las condiciones ambientales externas.

Por otro lado, en cuanto a los zánganos, su única función es inseminar a la reina durante el vuelo nupcial (Winston, 1998).<sup>1</sup>



**Figura 1.** Castas de la especie de *Apis mellifera*. a) Abeja obrera; b) Abeja reina; c) Zángano<sup>1</sup>.

### **Ciclo de vida *Apis mellifera***

El ciclo de las abejas es haplo-diploide. Las hembras (reinas y obreras) se desarrollan a partir de huevos fecundados, por lo tanto, son diploides (2n). En cambio, los zánganos proceden de huevos sin fecundar, siendo estos, haploides (n). El ciclo está compuesto por los estadios de

---

<sup>1</sup> Fuente: <https://ecocolmena.com/ciclo-de-vida-de-las-abejas/>

huevo- larva- pupa y adulto, la duración de cada estadio dependerá de la casta. El desarrollo del ciclo para una reina requiere de 16 días, para una obrera de 21 días y para un zángano de 24 días (Maggi, 2010). Las larvas en su quinto día como tal, liberan feromonas que indican a las abejas obreras que las celdas deben ser operculadas (cubiertas con cera), con el paso de los días las larvas pasan a pupa y de pupa a adultas experimentando una metamorfosis completa (Rosenkranz et al., 2010) (Figura 2). La reina puede sobrevivir durante varias temporadas, mientras que las obreras y zánganos usualmente viven unos pocos meses, pero durante el invierno, las obreras sobreviven más tiempo, ya que las actividades de la colmena son menores (Winston, 1987).



**Figura 2.** Desarrollo de la abeja *Apis mellifera*.<sup>2</sup>

### Sanidad de *Apis mellifera*

La disminución drástica de colonias de *A. mellifera* a nivel mundial representa una amenaza significativa para la agricultura y la biodiversidad. En distintas regiones, los apicultores han observado una alarmante reducción en las colonias de *A. mellifera*, manifestando debilitamiento, despoblamiento y consecuente mortalidad de las colonias (Mitton, 2019). No existe una única explicación para las extensas pérdidas. Probablemente, las interacciones entre diferentes estresores como la pérdida de hábitat, la agricultura intensiva, la reducción de recursos florales y los parásitos,

<sup>2</sup> Extraído de: <https://www.britannica.com/animal/honeybee>

contribuyen a esta crisis (Potts et al., 2010). Entre estos factores, ciertas enfermedades parasitarias han sido identificadas como una de las principales causas de mortalidad en las colmenas (Maggi et al., 2011; Iglesias et al., 2022). Los parásitos presentan una amenaza significativa para la salud de las abejas, debido a la alta densidad de individuos y la homogeneidad genética dentro de las colmenas, condiciones que las convierten en hospedadores ideales para una amplia variedad de patógenos (Schmid-Hempel, 1995).

Dentro de estos patógenos, podemos mencionar a la bacteria *Paenibacillus larvae* (conocida como loque americana), virus como el de las alas deformes (DWV), virus de la parálisis crónica (CBPV), patógenos fúngicos como los microsporidios de *Nosema* sp. Además, entre otras amenazas podemos encontrar insectos como el escarabajo *Aethina tumida* (Maggi, 2010).

Sin embargo, el principal agente causal de la mortandad de *A. mellifera* que produce los efectos más devastadores a nivel mundial, es el ácaro ectoparásito *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2000 (Acari: Mesostigmata) (Nazzi & Le Conte 2016). Este ectoparásito afecta tanto a la abeja adulta como a la cría, razón por la cual es la patología con mayor impacto sobre el desarrollo del insecto (Potts et al., 2010; Rosenkranz et al., 2010). El ácaro se alimenta de los cuerpos grasos de los individuos adultos y de las larvas (Ramsey et al., 2018). A su vez, facilita la entrada a una amplia gama de agentes patógenos tales como el hongo *Ascosphaera apis*, la bacteria *Hafnia alvei*, y diversos virus que afectan a *A. mellifera* (Chen & Siede, 2007; Iglesias, 2024).

Sumado a las características propias de la propagación de *V. destructor*, la actividad humana juega un papel crucial en acelerar este proceso. Los principales factores incluyen el impacto del comercio mundial de abejas, así como también, la gran falta de medidas preventivas y su cumplimiento en materia de leyes sanitarias (Sammataro et al., 2005).

### **Biología de *Varroa destructor***

El ectoparásito responsable de la “varroosis” en *Apis mellifera* pertenece a la especie *V. destructor*, anteriormente conocido como *Varroa jacobsoni* (Anderson & Trueman, 2020). Actualmente, *V. destructor* parasita tanto a *Apis cerana* como a *Apis mellifera*, especies de abejas de importancia económica. Originalmente, las dos especies de abejas se encontraban en regiones geográficamente separadas, *A. cerana* en regiones de Asia, mientras que *A. mellifera* se encontraba en el continente europeo y africano (Mitton, 2019). Este ectoparásito a mediados del siglo XX, cambió su hospedador natural *A. cerana* por la abeja europea *A. mellifera*. Esto pudo deberse a la

trashumancia, el traslado de colonias de *A. mellifera* a territorios donde coexistía con *A. cerana*. Lo que facilitó la propagación y dispersión de *V. destructor* a nivel mundial (Fuentes et al., 2022).

En Argentina, se detectó por primera vez en el año 1976, en la provincia de Formosa, hipotetizando que provino de reinas de *A. mellifera* introducidas por apicultores desde el Paraguay, y desde entonces se ha diseminado por todo el territorio nacional produciendo mortandad de colonias y dificultad en su control (Fuentes et al., 2022).

### **Adaptaciones al parasitismo: morfología y comportamiento**

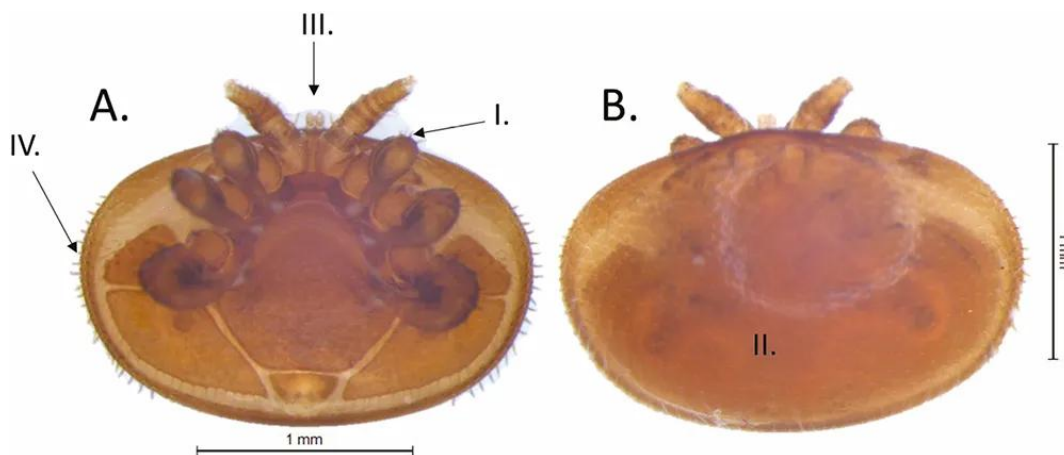
*Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata) presenta dimorfismo sexual, las hembras adultas son de forma ovalada y de un color pardo rojizo, miden entre 1,00 - 1,77 mm de longitud y 1,50 - 1,99 mm de ancho. Los machos adultos son de forma esférica y presentan un color blanquecino o amarillento, son más pequeños que las hembras, midiendo entre 0,75 - 0,88 mm de longitud y 0,70 - 0,88 mm de ancho (Ellis & Zettel Nalen, 2010).

En ambos sexos, el cuerpo está dividido en dos tagmas: el gnatosoma (región anterior) e idiosoma (región posterior). En el gnatosoma se encuentran las piezas bucales con función perforante y chupadora con dos pedipalpos sensoriales y dos quelíceros, para poder alimentarse (Rosenkranz et al., 2010). En los machos los quelíceros están modificados, para poder transferir los espermatozoides al tracto genital de la hembra. El idiosoma, el cual ocupa la mayor parte del cuerpo, está organizado en un escudo dorsal y varios ventrales, cuatro pares de patas las cuales terminan en uñas y ventosas (Rosenkranz et al., 2010). El exoesqueleto presenta una estructura molecular similar a la de *A. mellifera*, permitiéndole camuflarse con el aroma de la abeja y no ser detectado por ella (Nation et al., 1992).

Otra característica del cuerpo del ácaro, es que en todo su cuerpo incluyendo patas y piezas bucales, está cubierto por distintos tipos de setas, algunos con funciones sensoriales, quimio o mecánico receptoras (Rosenkranz et al., 2010). El primer par de patas no es empleado para el movimiento, sino que cuenta con receptores para la humedad, temperatura, y con sensilas olfatorias que permiten la recepción de productos químicos y gustativos (Rosenkranz et al., 2010) (Figura 3).

En cuanto a las adaptaciones comportamentales, *V. destructor* presenta la capacidad de percibir señales químicas y físicas del ambiente para invadir celdas de cría de las colmenas, adecuadas para su reproducción. Asimismo, es capaz de detectar a las abejas encargadas del cuidado de las crías, facilitando así su entrada en las celdas (Le Conte & Arnold, 1988). Una vez

dentro de la celda de la cría, la *Varroa* fundadora prepara sitios de encuentro para facilitar su reproducción (depositando heces en la pared de la celda), y prepara un sitio de alimentación en la pupa de la abeja para sus descendientes; lo que evidencia un desarrollo de cuidado parental por parte de *Varroa destructor* (Donzé et al., 1996).



**Figura 3.** Hembra de *Varroa destructor*. A) Vista ventral muestra sus patas (I), boca y órganos de alimentación, que en conjunto se denominan gnatosoma (III), y numerosos pelos llamados setas (IV). B) Vista dorsal muestra el escudo dorsal (II) (Fotografías de Noble Noble, Ph.D., Universidad de Florida).

### **Ciclo de vida de *Varroa destructor***

Los conocimientos del ciclo de vida de *V. destructor* son fundamentales para comprender la parasitación en las colonias de *Apis mellifera*. Dado que el ciclo de vida del ácaro se adapta al ciclo de la abeja, lo que le permite aprovechar las diferentes etapas de desarrollo de la cría para reproducirse (Figura 4).

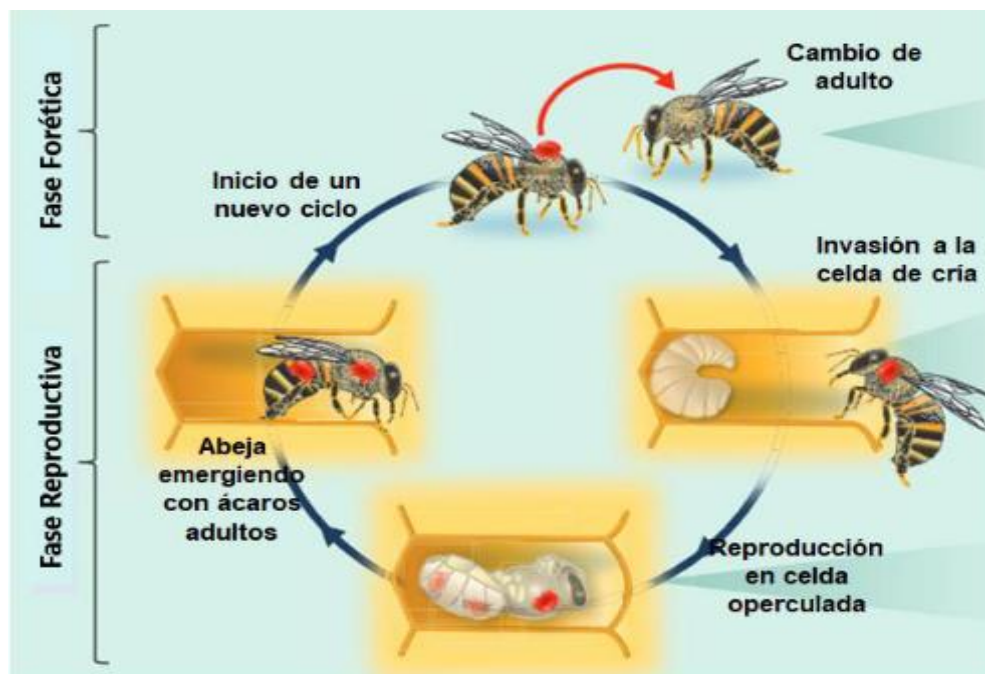
El ciclo biológico de *V. destructor* en su etapa adulta se divide en las fases forética y reproductiva. En la etapa forética, actualmente conocida como de dispersión (Vilarem et al., 2021), los ácaros se encuentran sobre el cuerpo de las abejas adultas, desplazándose y alimentándose de sus cuerpos grasos (Ramsey et al., 2019). La estructura dorsoventral de las hembras adultas les permite esconderse entre los tergos de las abejas adultas, permaneciendo sobre ellas durante un par de días o hasta varias semanas. El final de esta fase depende de la temporada y la disponibilidad de cría en las colonias (Fuentes et al., 2022).

La segunda etapa, fase reproductiva, comienza cuando el ácaro hembra fértil (hembra fundadora) ingresa en la colmena a una celda de cría de obrera o de zángano cuando faltan entre

15 y 20 horas para que dicha celda sea operculada por las obreras (Vilarem et al., 2021). Una vez en el interior de la celda, los ácaros se sumergen en el alimento restante de la cría para pasar desapercibidos. La hembra fundadora perfora el cuerpo de la pupa de abeja con sus quelíceros, creando un orificio que permanecerá abierto a los anticoagulantes de su saliva. Este orificio sirve como acceso al alimento para sus futuras crías (Fuentes et al., 2022).

Una vez operculada la celda, dentro de las primeras 60 horas la hembra de *V. destructor* deposita su primer huevo que será macho (haploide). Los siguientes huevos que serán hembras (diploides) son depositados cada 30 horas. El ciclo del ácaro consta de estadio de huevo, estadio larvario, que se divide en protoninfa y deutoninfa, y el estadio adulto (Martín, 1994). Una vez alcanzada la etapa adulta, si ingresa a la celda una sola hembra fundadora, se producen múltiples eventos de apareamiento entre hermano y hermanas, lo que daría la situación de infestación única (Donzé et al., 1996; Rosenkranz et al., 2010). En esta situación, cuando la abeja emerge de la celda, con ella también lo hacen los ácaros hembra nacidos en su interior y la hembra fundadora, mientras el macho que había nacido primero, muere dentro de la celda (Rosenkranz et al., 2010). Otra situación, es cuando ingresan a la celda más de un ácaro hembra fundadora, entonces se producen múltiples reproducciones, dando como resultado, una abeja adulta emergiendo con múltiples ácaros. De esta forma, comienza así, un nuevo ciclo forético sobre las abejas adultas, comenzando con una nueva etapa de dispersión y reproducción del ácaro.

La reproducción de *V. destructor* puede verse afectada por diferentes factores incluyendo la disponibilidad de crías de abejas, la presencia de cría de zánganos, el comportamiento higiénico de las abejas, las condiciones climáticas, la raza de la abeja, la ausencia de la reina, la duración del periodo de percolación y la infertilidad de las hembras *V. destructor* (Rosenkranz et al., 2010; Iglesias, 2024).



**Figura 4.** Ciclo simplificado de *Varroa destructor*. Se observa la Fase forética y reproductiva de *V. destructor*, junto al desarrollo de *Apis mellifera* (extraído de Fuentes et al., 2022).

### **Daños causados por *Varroa destructor* en *A. mellifera***

*Varroa destructor* ocasiona diversos tipos de alteraciones en la salud de las abejas que pueden conducir al colapso de las colonias (Maggi et al., 2009). Los daños ocasionados pueden clasificarse en directos e indirectos. Los daños directos afectan principalmente a las larvas y las pupas, siendo estos los estadios más sensibles, seguido por las abejas adultas. Durante el desarrollo de la larva en la celda de cría, la alimentación del ácaro causa una disminución significativa del peso de la abeja emergida, cuya magnitud depende del número de ácaros fundadores y de la cantidad de reproducción de ácaros. En abejas adultas, *V. destructor* se alimenta de su tejido adiposo, comprometiendo la salud y longevidad de *A. mellifera* (Maggi et al., 2016).

Una infestación promedio resulta una pérdida de peso corporal del 7% en obreras y entre un 11 % y 19 % en zánganos, lo cual les genera una disminución en el rendimiento del vuelo (De Jong et al., 1982; Duay et al., 2002). Una alta carga parasitaria puede provocar malformaciones en las abejas emergentes, siendo las más comunes en las alas, disminución del número de artejos en las patas y acortamiento del abdomen (De Jong et al., 1982). Asimismo, las abejas que han sido parasitadas durante su desarrollo presentan una menor longevidad (De Jong et al., 1982),

alteraciones en el patrón de aprendizaje y memoria, reduciendo de su capacidad de orientación y retorno a la colonia (Kralj et al., 2007).

En cuanto a los daños indirectos, *V. destructor* actúa como vector de numerosos microorganismos (Chen & Siede, 2007). Puede inducir inmunosupresión en su hospedador, potenciando infecciones virales de las cuales también es vector (Chen & Siede, 2007). Además, puede crear dentro de una colmena las condiciones ideales para el desarrollo del hongo patógeno *Ascosphaera apis*, agente causal de la cría yesificada, y transportar sobre su cuerpo esporas de *Paenibacillus larvae*, agente causal de loque americana (Mitton, 2019).

Es importante destacar que los efectos de la *V. destructor* no se limitan a los daños directos e indirectos mencionados anteriormente, sino que la interacción entre la presencia del ácaro y otros factores estresantes, como la nutrición, las condiciones ambientales, el manejo y la exposición a pesticidas, puede exacerbar los problemas de salud de las colonias y aumentar la susceptibilidad al colapso.

### **Métodos de control de *Varroa destructor***

Las abejas melíferas han desarrollado algunos mecanismos de defensa contra *V. destructor*, entre ellos se pueden nombrar el *grooming* o *acicalamiento* que se define como la capacidad de las abejas de detectar, morder y eliminar los parásitos en la etapa forética (Araneda et al., 2008). Este comportamiento puede ser sobre sí misma y se conoce como *autogrooming* donde la abeja cepilla su cuerpo entero con sus extremidades; o puede ser sobre otras abejas denominándose *allogrooming*, en el cual una o más abejas buscan el ácaro en la abeja infestada tomándolo con sus mandíbulas y arrojándolo al piso de la colmena (Flores et al., 1998). Otro mecanismo de defensa es el comportamiento higiénico, este consiste en la capacidad de las obreras de desopercular las celdas de cría, remover las muertas y eliminar cualquier masa infectante de la colonia (Araneda et al., 2008). Para que una colonia se considere higiénica, debe presentar un valor de remoción entre el 80 y el 95% de las crías, lo cual contribuye a la resistencia a enfermedades (Araneda et al., 2008).

A pesar de estos mecanismos, la abeja no logra controlar las poblaciones de este ácaro (Peng et al., 1987). Por lo tanto, el uso de acaricidas se ha convertido en una práctica común en la apicultura para mantener la salud de las colonias. Se ha mencionado históricamente que la varroosis podía tardar hasta tres años en ocasionar la muerte de las colonias (Ritter, 1981).

Actualmente, se considera que, si las mismas no reciben un tratamiento acaricida adecuado, suelen colapsar en el transcurso del primer año (Maggi et al., 2016).

Los acaricidas sintéticos, como los organofosforados: cumafós, los piretroides: tau-fluvalinato y flumetrina, y la formamidina: amitraz, han sido los principales productos utilizados para el control de *V. destructor* en los últimos 25 años (Ritter, 1981, Maggi, 2010). El cumafós es un inhibidor de la acetilcolinesterasa e interfiere en la señalización nerviosa, mientras que los piretroides actúan activando los canales de voltaje de sodio de las células nerviosas, y la formamidina actúa en los receptores de aminas biogénicas en el sistema nervioso central (Haynes, 1988; Rosenkranz et al., 2010).

### **Alternativa para el control de *Varroa destructor***

Los compuestos naturales, como los ácidos orgánicos y los aceites esenciales, representan una alternativa válida y una herramienta útil para ser incorporada en un programa de Manejo Integrado de Plagas. Esta integración posibilita la rotación de los acaricidas de síntesis ya existentes, y minimizando su uso. Los compuestos naturales presentan una baja toxicidad en mamíferos, un escaso impacto ambiental y muy buena aceptación pública (Isman, 2000). Estudios *in vitro* han demostrado su eficacia sobre ácaros parásitos de abejas (Lindberg et al., 2000; Eguaras et al., 2005; Ruffinengo et al., 2005). Sin embargo, cuando son aplicados en el interior de las colmenas, esta eficacia ha sido variable y poco exitoso a la hora de controlar a *V. destructor* (Imdorf et al., 1999; Flamini, 2003). Además, el elevado costo de los acaricidas orgánicos lleva a la mayoría de los productores apícolas a optar por los acaricidas sintéticos.

Algunas de las ventajas que tienen los acaricidas sintéticos es que son productos fáciles de aplicar, económicamente convenientes y no requieren tener un conocimiento experto de la biología de los ácaros. Además, como se trata de sustancias lipofílicas, son absorbidas rápidamente por la cera de abejas, son persistentes, estables, y se acumulan luego de repetidos tratamientos (Wallner, 1999). En cuanto a las principales desventajas se destaca su acumulación en los productos de las colmenas, ya que generalmente, la mayor cantidad de residuos de pesticidas encontrados en las colmenas son productos químicos introducidos intencionalmente, en un intento por mitigar los efectos de la parasitosis ocasionada por la varroosis (Johnson et al., 2009; Medici et al., 2016). Los residuos de acaricidas encontrados generalmente están más concentrados en la cera, seguido por el propóleo, el polen, y por último la miel (Wallner, 1999; Martel et al., 2007; Lodesani et al., 2008; Johnson et al., 2009; Medici et al., 2016). No existen antecedentes que reporten la presencia

de residuos de pesticidas en la jalea real, pero podrían estar presentes en dicho alimento debido a las secreciones de las abejas obreras que lo producen (Dai et al., 2018). Esto resulta perjudicial para el destino de la colonia debido a la alteración de la fisiología, el deterioro de la función o disminución de la supervivencia de las abejas adultas dentro de la colmena, lo cual conlleva a una rápida despoblación de la colonia (Cousin et al., 2013). Además, entre otras consecuencias se destacan la alteración del aprendizaje, memoria, orientación, (Teeters et al., 2012; Frost et al., 2013; Williamson & Wright, 2013), reducción de la supervivencia de las larvas (Wu et al., 2011; Zhu et al., 2014) y efectos en la reproducción (Rinderer et al., 1999; Burley et al., 2008). De este modo, a largo plazo, el uso indiscriminado de estos compuestos puede conducir al desarrollo de poblaciones de abejas con deficiencias y favorecer al desarrollo de poblaciones de ácaros resistentes (Mitton et al., 2016; 2018).

En este sentido, se ha demostrado que aceites esenciales de lavanda, lavandín, laurel, tomillo, lúpulo, entre otros, causaron mortalidad significativa de ácaros en condiciones de laboratorio (Sammataro et al., 1998; Ruffinengo et al., 2005; Damiani et al., 2009; Iglesias, 2024)

Dado que la presencia de terpenos en los aceites esenciales como el timol, linalol,  $\beta$  mirceno, alfa cariofileno,  $\beta$  cariofileno y entre otros, reducen significativamente la infestación de *V. destructor* en colonias de abejas (Lindberg et al., 2000; Ruffinengo et al., 2005; Maggi et al., 2010; Iglesias, 2024). Por lo tanto, surge un especial interés en la exploración de estos compuestos en nuestra región. En este sentido, los estudios e investigaciones sobre el efecto de los aceites esenciales en *V. destructor* y *A. mellifera*, en la región patagónica, es limitado. Por lo tanto, es crucial acceder al conocimiento de la bioactividad de estas sustancias para integrarlas en Programas de Manejo Integrado de esta parasitosis. Esto permitiría reducir las pérdidas de las colonias afectadas y las pérdidas económicas aparejadas en la región.

## **Aceites esenciales seleccionados para este estudio**

### ***Juniperus communis* “enebro común”**

El enebro común (*Juniperus communis* L.) pertenece a la familia Cupressaceae. Es endémica del hemisferio Norte, sin embargo, actualmente tiene una distribución más amplia, siendo la única especie de *Juniperus* que se encuentra en ambos hemisferios (Gonçalves et al., 2022). Es un arbusto o árbol pequeño de hasta 15 m de altura. Presenta una corteza parda o grisácea, las hojas son perennes y aciculares dispuestas en verticilos de 3, glaucas con ápices

agudos y punzantes. Se trata de una especie dioica, en la que hay individuos masculinos y femeninos diferenciados. Los pies femeninos tienen estróbilos carnosos (fruto), denominados gálbulos, de aspecto redondo u ovoide de 4 a 6 mm de diámetro de color azul oscuro en la madurez lo que tarda entre dos y tres años en ocurrir (Dambolena et al., 2011; Agastra et al., 2021; Ferriol Molina, 2024) los cuales proceden de escamas que aparecen en verticilos de tres y se hacen carnosas, envolviendo a tres semillas, dejando un triángulo ápice, con olor a terebinto y sabor amargo (Bais et al., 2014). Los pies masculinos poseen estróbilos amarillentos de pequeño tamaño (Ferriol Molina, 2024). Florece entre la primavera y comienzos del verano.

Es una especie con múltiples usos. Se utilizan distintas partes de la planta (fruto, partes aéreas y corteza). El principal uso es el aprovechamiento de sus aceites esenciales presentes en las ramas, hojas y gálbulos (bayas). Los gálbulos se emplean para aromatizar alimentos como también bebidas alcohólicas. Asimismo, se utiliza en diferentes áreas de la disciplina biomédica ya que ha demostrado poseer propiedades diuréticas, digestiva, antiinflamatorias, actividad antifúngica (Abbassy & Marei, 2013), antimicrobiana (Sati & Joshi, 2010), analgésica, entre otras (Bais et al., 2014; Gonçalves et al., 2022). Por último, también se emplea en jardinería.

Las partes de la planta están compuestas principalmente por azúcares, resinas, ácidos orgánicos, alcaloides, ácidos terpénicos, leucoantocianinas y flavonoides, cumarinas, gomas, ligninas y ceras. Sus aceites esenciales son ricos en monoterpenos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, sabineno y mirceno), diterpenos y sesquiterpenos (Bais et al., 2014; Gao et al., 2019; Xavier et al., 2021; Gonçalves et al., 2022). El orden de estos compuestos varía según el genotipo, origen, método de cultivo, condiciones meteorológicas y las técnicas de extracción (Gonçalves et al., 2022)

### ***Azorella prolifera* “Neneo”**

El neneo, *Azorella prolifera* (Cav.) G.M. Plunket & A.N. Nicolas pertenece a la familia Apiaceae. Es una planta endémica de la región patagónica. Se distribuye en Argentina desde San Juan hasta Santa Cruz, y en Chile desde Coquimbo a Magallanes (Ferreya et al., 2005). Es un subarbusto espinescente que forma cojines redondeados generalmente glabros, de color verde, de 0,3 a 0,5 cm de diámetro. Sus hojas están divididas en 3 segmentos lineares y espinosos. Sus flores amarillo- verdosas, son pequeñas y dispuestas en umbelas. El fruto es ovoide a orbicular formado por dos mericarpos, con cuatro alas anchas (Ferreya et al., 2005).

Tradicionalmente es usada como medicina para aliviar el dolor de muelas, enfermedades hepáticas y urinarias (Echenique et al., 2014). Además, estudios recientes demuestran que podría

servir como agente antiparasitario (Sulsen et al., 2006), antibacteriano (Echenique et al., 2014), analgésico, antiinflamatorio e hiperglucémico (Estomba et al., 2006; Berruezo et al., 2022). Por otra parte, las inflorescencias forman parte de un recurso forrajero importante para el ganado como para la fauna silvestre (Seoane et al., 2011).

En cuanto a su conocimiento fitoquímico, estudios han reportado la presencia de ácidos resínicos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y limoneno, así como dos ácidos diterpenoides mulinanos (Nicoletti et al., 1996). Los componentes más abundantes del aceite esencial son  $\alpha$ - pineno (61,713 %), limoneno (9,918 %) y mirceno (3,153 %) (UEAE- INBIES, 2022).

## **Objetivo general**

Los apicultores de la zona, Esquel y Trevelin, enfrentan desafíos sanitarios aún no resueltos, principalmente relacionados con el control del ácaro parásito *Varroa destructor*. Ante esta problemática, la AACLA ha iniciado una colaboración con la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), el Laboratorio de Investigaciones en Evolución y Biodiversidad (LIEB) y el Instituto Nacional de Biotecnología y Biología Estructural (INBIES) con el objetivo de profundizar en el desarrollo de nuevas estrategias, principalmente para el control de *V. destructor*, que permitan minimizar los efectos del ácaro en las colonias, evitar las problemáticas de resistencia, y posible contaminación de los productos de la colmena por el uso de acaricidas sintéticos. Esta alianza hace factible investigar el uso de aceites esenciales como una alternativa más sostenible y efectiva para el control de esta parasitosis. Además, la Patagonia una región reconocida por su diversidad y abundancia de plantas medicinales y aromáticas con potencial farmacéutico (Gastaldi et al., 2016), ofrece un marco ideal para estas investigaciones. Dado que existen pocos estudios previos sobre el tema en la región, es de suma importancia que los apicultores trabajen en estrecha colaboración con investigadores e instituciones para desarrollar y evaluar la efectividad de los acaricidas orgánicos, como los aceites esenciales, para el control de *V. destructor*.

El objetivo general de la presente tesis es evaluar el efecto acaricida de los aceites esenciales de enebro (*Juniperus communis*) y de neneo (*Azorella prolifera*) sobre *Varroa destructor* e insecticida sobre *Apis mellifera* en laboratorio. Los objetivos específicos son:

- 1) Caracterizar las propiedades químicas de los aceites esenciales de enebro y neneo obtenidos en laboratorio.
- 2) Determinar la actividad acaricida de cada aceite esencial sobre *Varroa destructor*.
- 3) Analizar el efecto insecticida de cada aceite esencial sobre adultos de *Apis mellifera*.
- 4) Calcular el índice de selección para los aceites esenciales seleccionados.
- 5) Evaluar en laboratorio la atracción y repelencia de cada aceite esencial sobre *Varroa destructor*.

## **Hipótesis**

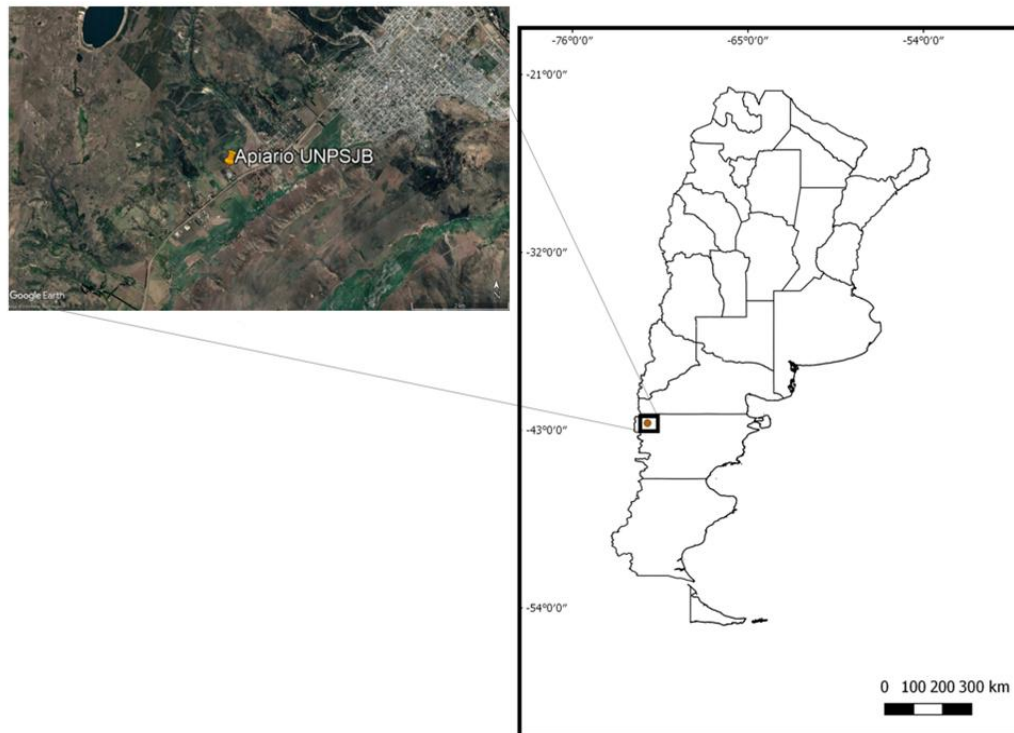
- 1) La presencia de terpenos, en la composición química de los aceites esenciales de *J. communis* y *A. prolifera*, son óptimos para el control de *V. destructor*.
- 2) Los aceites esenciales de *J. communis* y *A. prolifera* afectan el comportamiento forético de *V. destructor*.
- 3) Las concentraciones seleccionadas de los aceites esenciales de *J. communis* y *A. prolifera* no actuarán como insecticida frente a *A. mellifera*.
- 4) Los aceites esenciales mostrarán efectos repelentes sobre *V. destructor* debido a sus componentes volátiles.

## METODOLOGÍA

### Área de Estudio

Para este estudio se seleccionó un apiario localizado en el noroeste de la provincia de Chubut, Argentina, específicamente en el predio de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco en la ciudad de Esquel (42°55'52,8" S 71°21' 48,9" W) (Figura 5). Este sitio se encuentra en un ambiente de ecotono o transición entre el bosque subantártico y la estepa patagónica. Esta área se caracteriza por un gradiente de vegetación, donde el bosque está dominado por especies arbóreas como *Nothofagus antártica* (ñire), *Austrocedrus chilensis* (ciprés de la cordillera), *Maytenus boaria* (maitén), *Schinus patagonicus* (laura). A medida que la cobertura arbórea disminuye y la estepa se hace más evidente, se encuentran arbustos como *Berberis microphylla*. (calafate) *Senecio filaginoides*, *Grindelia anethifolia* y *Azorella prolifera* (neneo). Finalmente, en la estepa predominan gramíneas como *Pappostipa speciosa*, *Pappostipa humulis* y *Poa ligularis* (Oyarzabal et al., 2018). Además de la vegetación nativa, en las cercanías del apiario se encuentran plantaciones de especies exóticas tales como *Pinus ponderosa*, *Larix decidua*, *Cupressus macrocarpa* y *Cupressus arizonica*, entre otras.

El clima en Chubut es templado frío y húmedo, con nieve en invierno y heladas durante todo el año. Las temperaturas medias oscilan entre 3 y 12 °C, variando principalmente con la latitud y factores locales como la topografía y los vientos predominantes del oeste (Coronato, 1993; Paruelo et al., 1998). Las precipitaciones, concentradas en invierno, varían de forma decreciente de oeste a este y tienen una media anual de aproximadamente 600 mm (León et al., 1998; Paruelo et al., 1998).



**Figura 5.** Mapa de ubicación de la zona de estudio. Indica el apiario ubicado en el predio de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, en la localidad de Esquel, provincia de Chubut.

## Material Vegetal

### Ubicación y Obtención del Material Vegetal

Se recolectaron frutos maduros de la especie *J. communis* (enebro) en el mes de abril del 2023 en dos sitios, uno ubicado en el predio del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Trevelin (coordenadas: 43°07'22.8" S 71°33'39.6" W; Ruta acceso a Presa Futaleufú, Km 13) y el otro sitio en una plantación que se ubica próxima a la Unidad de Extracción de Aceites Esenciales (UEAE) de Esquel (coordenadas: 42°55'26.4" S 71°15'46.8" W; Ruta 259 Km 4,5). La elección de dos sitios de recolección se fundamentó en la necesidad de obtener una muestra representativa de la especie y de asegurar la cantidad requerida de aceite esencial para los análisis. P previo a la extracción, se procedió a limpiar el material recolectado, dejando únicamente las bayas, buscando obtener un aceite esencial de mayor calidad. Estas fueron lavadas con agua potable y secadas con papel, y finalmente trituradas con un mortero para asegurar una mayor eficiencia en el proceso (Figura 6).



**Figura 6.** Cosecha y procesamiento de los frutos de *J. communis*.

En cuanto a *A. prolifera* (neneo), se extrajeron ejemplares completos durante el mes de mayo del 2023 en el camino al Centro de Actividades de Montaña La Hoya, a 7 km de la ciudad de Esquel (coordenadas 42°51'15.3" S 71°17'12.8" W). El material vegetal se recolectó en el estadio fenológico de prefloración, ya que existe evidencia de que es la época con mayor concentración de compuestos fenólicos en las plantas en ambientes patagónicos (González et al., 2018). Del material recolectado se seleccionó la raíz, se lavó con agua potable y se cortó en trozos pequeños para aumentar la eficiencia de extracción, dejándolos secar sobre cartón y diario durante una semana aproximadamente (Figura 7).



**Figura 7.** Recolección y procesamiento de *A. prolifera*.

## **Obtención de los Aceites Esenciales**

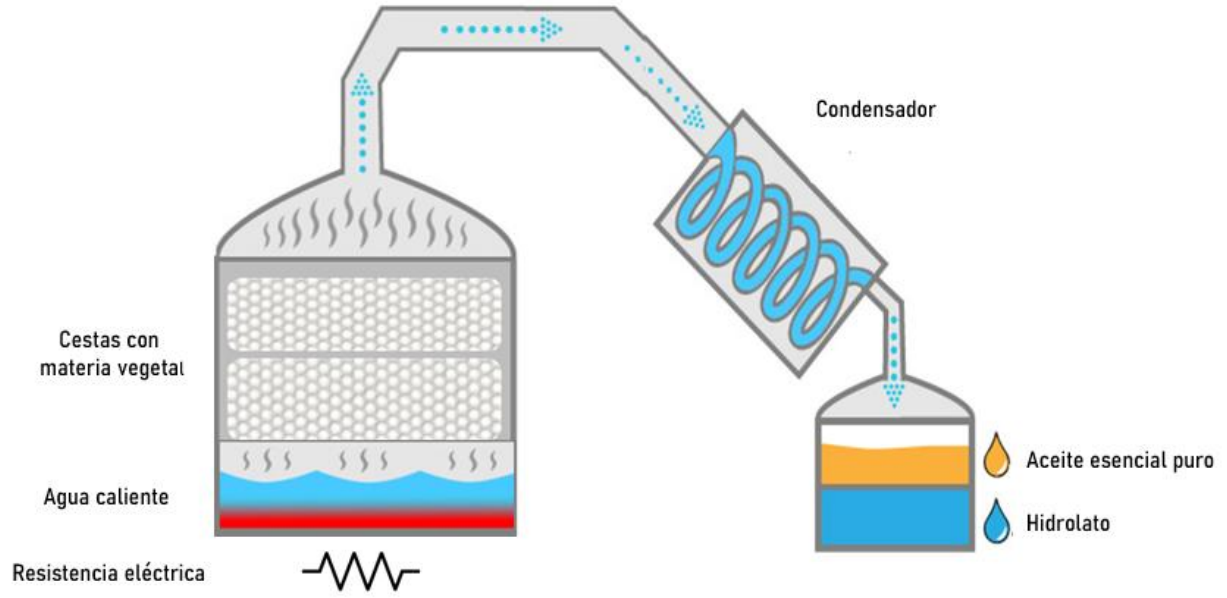
Los aceites esenciales de *J. communis* y *A. prolifera* se obtuvieron mediante la técnica de extracción por arrastre con vapor de agua. Para ambas especies, se realizaron destilaciones independientes utilizando el Equipo de Laboratorio de la Unidad de Extracción de Aceites Esenciales (UEAE) del Instituto de Biotecnología Esquel (INBIES) perteneciente a la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB). La cuba de destilación utilizada tiene una capacidad de 4 litros, está fabricada en su totalidad en acero inoxidable, y cuenta con generación interna de vapor de agua saturado a 100 °C. En su interior, tiene la resistencia eléctrica, y en la parte superior dos cestas de acero inoxidable donde se coloca el material vegetal a procesar.

Para poder obtener los aceites esenciales en primer lugar, se procedió a llenar la cuba con 3l de agua potable para la generación interna del vapor de agua. Posteriormente se pesó la fitomasa a procesar en cada ciclo y se distribuyó en las cestas de la cuba. Una vez acondicionado el material dentro las mismas se colocó dentro de la cuba dando inicio al proceso de extracción.

Este proceso consiste en que, una vez alcanzado el equilibrio térmico dentro de la cuba, el vapor de agua generado atraviesa el material vegetal, arrastrando los aceites esenciales hacia el condensador. Esta mezcla de vapor de agua con aceite esencial extraído, tras pasar por el condensador, pasa de estado gaseoso a líquido, que, por diferencia de densidad, se separa el aceite esencial puro del hidrolato (Figura 8).

Se utilizaron 1695 g de frutos maduros de *J. communis* y 886 g de raíces de *A. prolifera*. Se realizaron dos destilaciones por especie, cada una de una duración de 1 h y 30 min. Una vez finalizado el proceso de extracción, los aceites esenciales fueron almacenados en frascos de vidrio color ámbar y conservados a 4 °C en un ambiente sin acceso a la luz solar hasta su utilización.

Se calculó el rendimiento para cada proceso de destilación, expresado como volumen (ml) de aceite esencial obtenido a partir de la fitomasa (kg) procesada.

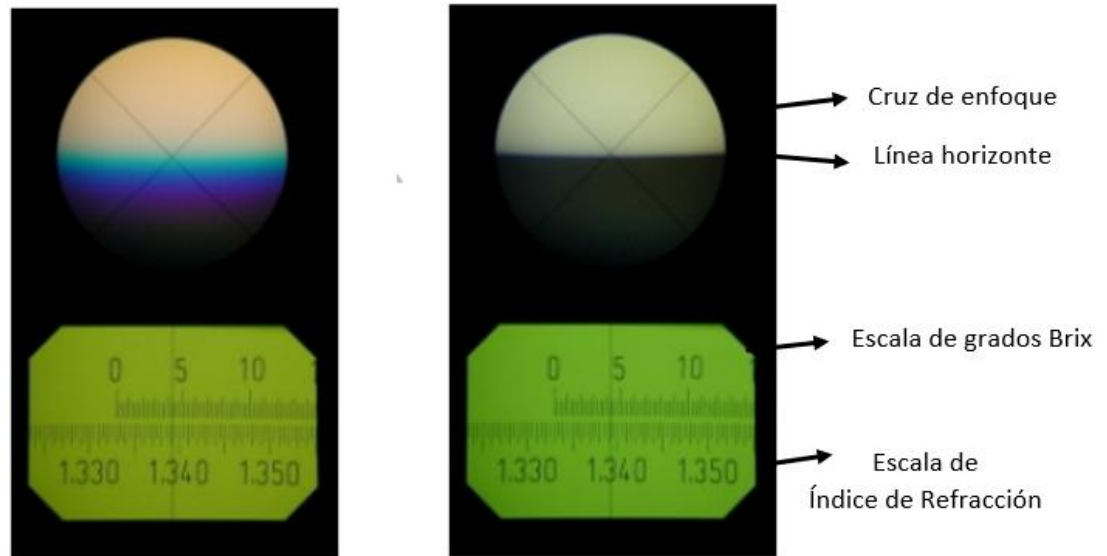


**Figura 8.** Esquema ilustrativo del equipo para extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor (Fuente: elaboración propia).

## Caracterización de los Aceites Esenciales

### *Índice de refracción*

Para conocer la velocidad de la luz a la cual pasa por los aceites esenciales se procedió a medir el índice de refracción  $n$  mediante un refractómetro Abbe a 20 °C. Para poder medir el índice de refracción se inició el procedimiento al encender el refractómetro. Luego, se abrió la tapa del prisma superior y utilizando un gotero se depositó una muestra del aceite esencial directamente sobre la superficie del prisma de medición. Se tuvo especial cuidado de no tocar la superficie del prisma con el gotero. Una vez aplicada la muestra, se cerró la tapa superior. Posteriormente, se ajustó el dial frontal hasta obtener el mejor contraste posible entre los dos campos de visión. Luego, se movió el dial lateral con el objetivo de ubicar la línea divisoria de los dos campos exactamente en la intersección de las líneas cruzadas. Finalmente, se bajó la perilla para obtener la lectura directa del índice de refracción en la escala superior del instrumento (Figura 9).



**Figura 9.** Vista a través del ocular de un refractómetro Abbe. La imagen de la izquierda muestra una vista desenfocada, mientras que la imagen de la derecha muestra la imagen enfocada correctamente en la cual se ajusta la línea de separación entre las zonas claras y oscuras para poder obtener el índice de refracción (Modificado de Bellingham & Stanley, 2023).

### ***Composición química: Cromatografía Gaseosa***

Para conocer la composición química de los aceites esenciales se realizó una cromatografía de gases en un cromatógrafo CHROMPACK CP- 9003 equipado con una columna capilar CP-SIL 5CB-MS FS 60 x 0.32 (1.0). Se utilizó Nitrógeno como gas portador. El programa de temperatura empleado fue el siguiente: temperatura inicial de 60 °C (durante 0 min), seguido de un incremento de temperatura de 4 °C/ min hasta alcanzar una temperatura final de 240 °C. Se inyectó 0,2 µl de muestra a una temperatura del inyector de 270 °C. La detección se realizó mediante un detector de ionización de llama (FID) a una temperatura de 270 °C. Para la identificación de los componentes químicos de los cromatogramas obtenidos, se compararon los patrones disponibles en la biblioteca cromatográfica de la UAEAE. De esta forma, se pudieron identificar los componentes mayoritarios presentes en cada aceite esencial.

## **Muestreos de *A. mellifera* y *V. destructor***

Las muestras se obtuvieron durante los meses de febrero hasta abril del 2024. Se colectaron ácaros y abejas adultas provenientes del apiario del establecimiento “Valle andino”, ubicado en el predio de la UNPSJB. Estas colonias sirvieron como fuente de parásitos al mantenerse sin tratamiento durante más de 6 meses. Para la obtención de los ejemplares de ácaros y abejas se utilizaron colonias de *A. mellifera* con alta prevalencia de *V. destructor* (mayor al 10 % de infestación). Anualmente, se realiza un tratamiento a principios de marzo, después de la cosecha de miel, mediante la aplicación rotativa de acaricidas sintéticos: amitraz o flumetrina, rotando su uso cada año.

### ***Prueba del Frasco***

En primer término, se realizó la prueba del frasco para conocer el porcentaje de infestación por varroosis de las colmenas. Para esta prueba se utilizó un frasco de boca ancha el cual en su interior contiene un embudo con una rejilla, agua y detergente. Se tomaron aproximadamente 300 abejas nodrizas de un cuadro con cría. Para ello se deslizó el frasco hacia abajo de ambas caras del cuadro de tal forma, que las abejas se deslizaron dentro del embudo. Luego se agitó enérgicamente durante cinco minutos para lograr el desprendimiento de los ácaros. Posteriormente se lavó la muestra con abundante agua para evitar que los parásitos queden adheridos a las abejas. Para calcular el porcentaje de infestación, se realizó el conteo de ácaros y abejas presentes en la muestra mediante visualización directa. Se dividió la cantidad de ácaros por el número de abejas, dicho valor se multiplicó por 100 dando así el porcentaje de varroosis presente en la colmena (SENASA, 2010) (Figura 10).

Se consideró una colmena infestada cuando el porcentaje de infestación fuese igual o superior a 10 %.



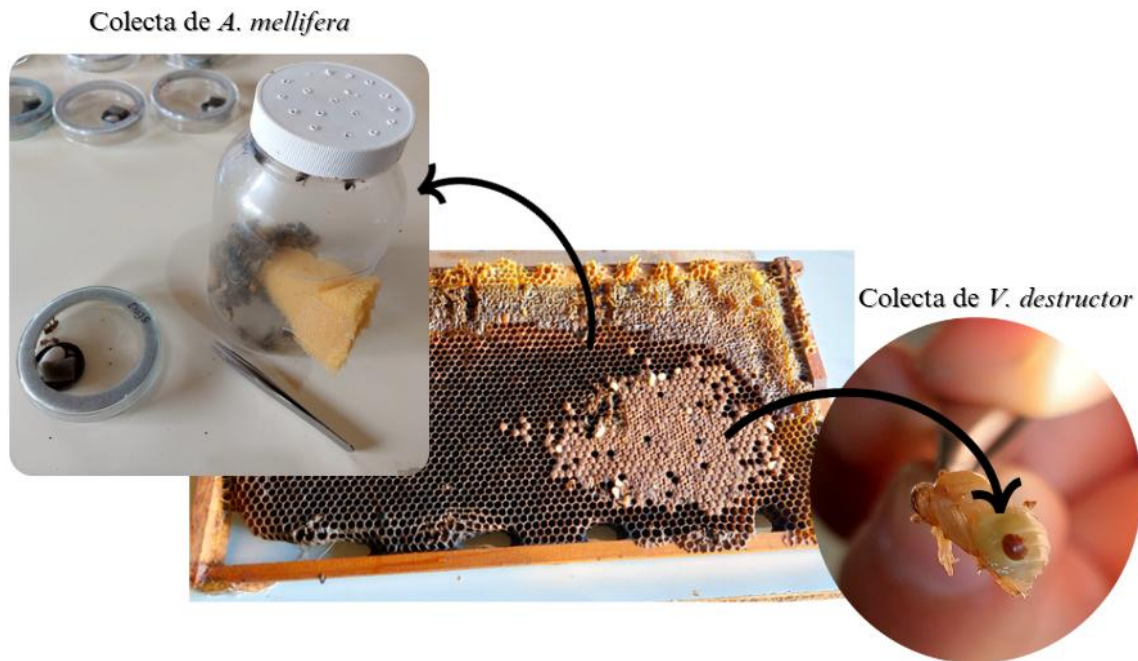
**Figura 10.** Pasos (1-5) para determinar a partir de la prueba del frasco el porcentaje de infestación por varroosis.

### **Colecta de *Varroa destructor***

Tras identificar las colmenas infestadas, se seleccionaron dos de ellas que cumplieran con el porcentaje mínimo requerido de infestación. De cada colmena se separaron dos cuadros con cría (4 en total), los cuales se colocaron en incubadora durante 24 horas a temperatura y humedad constante (30 °C y 60 % HR). De estos cuadros se obtuvieron las hembras adultas del ácaro, para lo cual se desopercularon e inspeccionaron las celdas individuales, con una pinza de laboratorio y con luz artificial. Los ácaros encontrados fueron recolectados con un pincel fino y colocados en cajas de Petri las cuales contenían larvas de abeja como fuente de alimento (Figura 11).

### **Colecta de adultas *Apis mellifera***

Se colectaron abejas obreras recién emergidas (entre 0 y 3 días de edad) de los cuadros previamente colocados en la incubadora, de los cuales también se obtuvieron los ácaros. Las abejas fueron cuidadosamente transferidas a un frasco ventilado y provisto de alimento (candy y agua) para su posterior uso en los ensayos (Figura 11).



**Figura 11.** Proceso de recolección de *A. mellifera* y *V. destructor*.

## **Bioensayos**

### ***Bioactividad de los Aceites Esenciales***

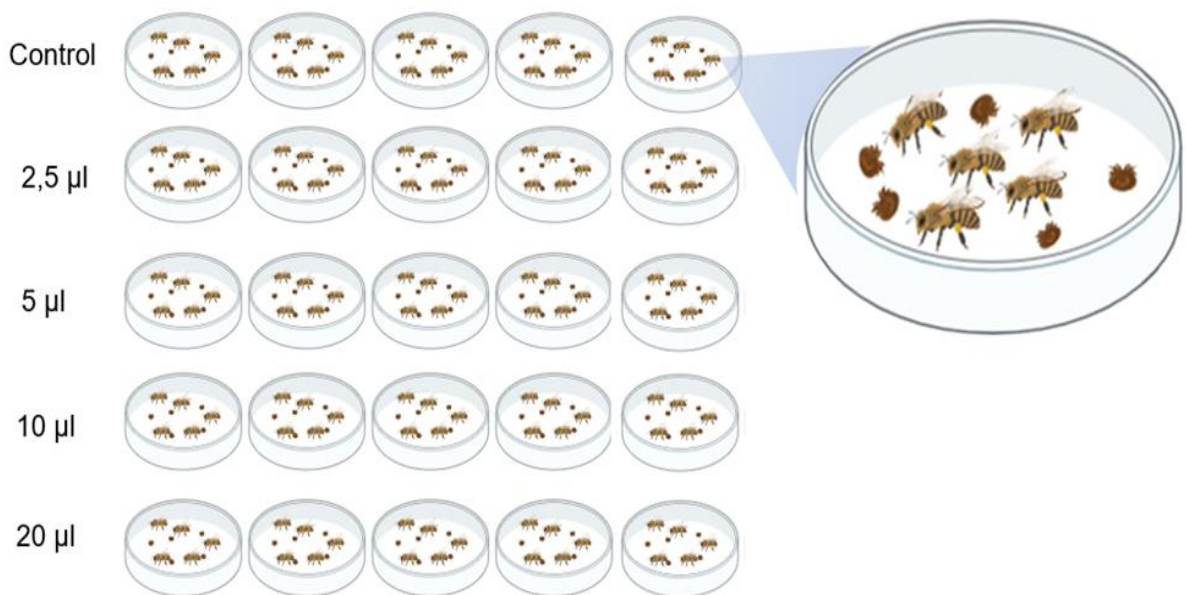
Se realizaron ensayos para calcular la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de los aceites seleccionados para tratar *V. destructor* mediante el método de exposición completa descrita por Ruffinengo et al. (2005).

Para los tratamientos se utilizaron placas Petri de vidrio de 10 cm de diámetro x 10 mm alto, dentro de cada una de las tapas de las placas se colocó un aro de goma espuma para evitar el escape de los ácaros. Cada aceite esencial se diluyó en 1 ml de acetona hasta una concentración deseable (2,5; 5; 10 y 20 µl/ml por cápsula de Petri) (Ruffinengo et al., 2005; Iglesias et al., 2020) y se aplicó 1 ml de esta dilución en el fondo de cada placa de Petri. Luego de su aplicación, todas las placas se dejaron abiertas durante 5' para lograr la evaporación del solvente. Se realizaron cinco réplicas por tratamiento más el control que tenía sólo 1 ml de acetona en el fondo de la placa de Petri.

Luego de la evaporación del solvente, se procedió a colocar en el interior de cada cápsula cinco ácaros y cinco abejas obtenidos de los cuadros que se encontraban en la incubadora (50 cajas en total, 20 con aceite de enebro más 5 control y 20 con aceite de neneo más 5 control) (ver sección

“*Colecta de V. destructor*” y “sección *Colecta de adultas A. mellifera*”). Como alimento para las abejas se adicionó candy (mezcla de agua y azúcar impalpable) dentro de cada placa y, también esponjas humedecidas con agua para mantener la humedad (Figura 12).

Los ácaros y abejas fueron expuestos a los tratamientos durante 72 h y la mortalidad de ambos se cuantificó a las 24 h, 48 h y 72 h desde el inicio del ensayo. Durante la duración del ensayo las cápsulas se mantuvieron en incubadora a 60 % HR y 30 °C. La mortalidad de los ácaros se evaluó mediante exposición a una fuente de luz durante un lapso de cinco minutos: la falta de respuesta frente al estímulo se consideró un indicio de muerte. Todas las abejas (muertas y vivas) fueron inspeccionadas visualmente para detectar la presencia de ácaros (Figura 13). Además, para cada tratamiento y en cada tiempo de observación, se determinó el índice de selección, calculado como la relación entre  $CL_{50}$  *A. mellifera* y  $CL_{50}$  *V. destructor* ( $CL_{50}$  *A. mellifera*/ $CL_{50}$  *V. destructor*).



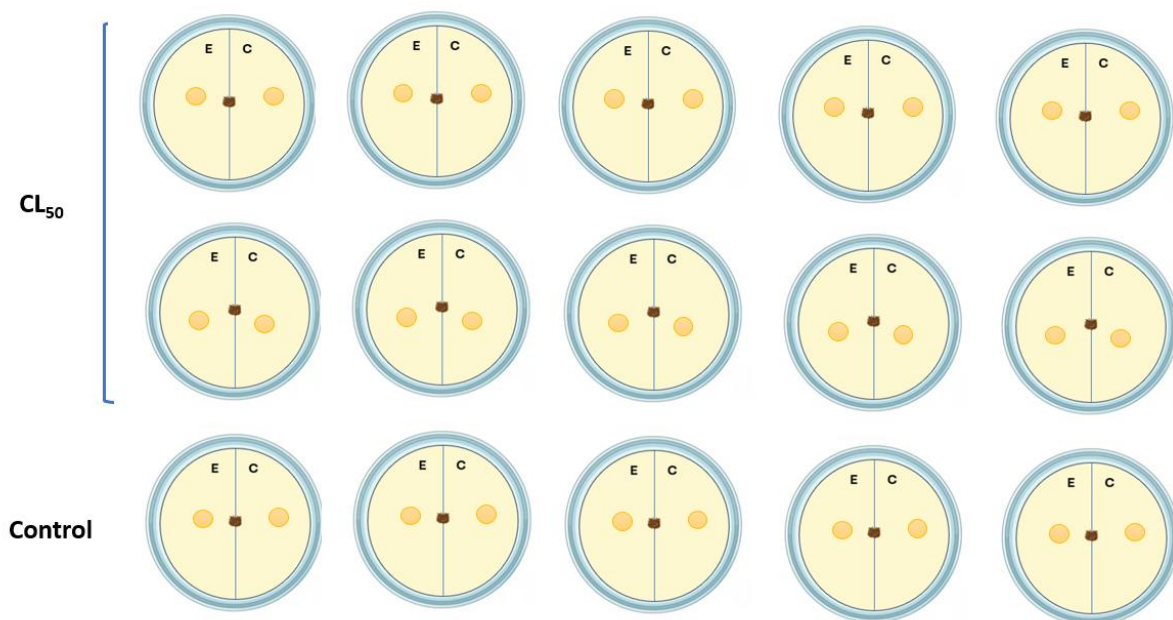
**Figura 12.** Representación gráfica del ensayo de exposición completa: 5 ácaros con 5 abejas por placa, con 5 réplicas por tratamiento para cada uno de los aceites esenciales.



**Figura 13.** Esquema del bioensayo de Bioactividad de Aceites esenciales.

### ***Test de Atracción y Repelencia***

Estos ensayos se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Damiani et al., (2011). Para cada tratamiento (CL<sub>50</sub> del aceite esencial), se utilizaron 10 placas de Petri (10 cm diámetro), lo que equivale a 10 repeticiones. Además, se incluyeron 5 repeticiones para el control, siendo un total de 15 placas por aceite esencial (Figura 14). Cada placa de Petri se dividió en dos secciones (E y C). En cada sección se colocó un círculo de papel filtro de 1 cm de diámetro, ubicándolos en la base de la placa de Petri. El papel colocado en la sección E, estaba embebido con 8 µl de aceite esencial a testear (enebro o neneo), diluido con el solvente (acetona) en la concentración de la CL<sub>50</sub> calculada (ver sección “*Bioactividad de los Aceites Esenciales*”). La sección C, como control, se impregnó únicamente con 8 µl acetona. Ambas soluciones se dejaron evaporar antes de introducir un ácaro hembra adulta en el centro de la placa. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y oscuridad, luego de transcurridos 90 minutos, se registró la ubicación de los ácaros según las áreas de división de cada placa (Kraus et al., 1994).



**Figura 14.** Disposición de las secciones que dividen la placa de Petri para el ensayo de atracción y repelencia (E: aceite esencial; C: control con acetona; los círculos naranjas corresponden al papel de filtro para cada sección).

## **Análisis Estadístico**

Para la determinación de la  $CL_{50}$  se utilizó un calculador libre  $LD_{50}/CL_{50}$  (Dr. M. Alpha Raj, Calculating  $LD_{50}/LC_{50}$  Probit Analysis in Excel Blog, 2016) mediante las tres observaciones (ver sección “*Bioactividad de aceites esenciales*”). Además, se realizaron comparaciones múltiples entre todos los valores de  $CL_{50}$  obtenidos (APHA, 1992).

A su vez, se determinó la concentración máxima de aceite esencial que no causó un aumento significativo en la mortalidad de las abejas en comparación con el grupo control. Este valor, conocido como Nivel Sin Efecto Adverso Observado (NOAEL, por sus siglas en inglés: “no observed adverse effect level”), es un parámetro fundamental en la toxicología y evaluación de riesgos. Para su cálculo, se empleó la prueba de  $\chi^2$  para comparar la mortalidad entre los grupos tratados y el control. Se consideró como NOAEL la concentración más alta en la cual la mortalidad de las abejas no difirió significativamente ( $\alpha = 0,05$ ) del control (Medrzycki et al., 2013).

Los efectos atractivos-repelentes de los aceites esenciales sobre los ácaros, se analizaron por contraste con la frecuencia observada de ácaros en cada zona mediante una prueba binomial para una variable dependiente categórica de dos niveles usando el software InfoStat versión 2011 (Di Rienzo et al., 2011), versión.

## RESULTADOS

### Análisis de los aceites esenciales

#### Aceite esencial de *J. communis*

**Rendimiento:** A partir de 1,695 kg de fruto maduro de enebro se logró extraer 6,5 ml de aceite esencial, lo que representa un rendimiento de 3,83 ml/kg.

#### Caracterización:

- **Índice de refracción:** El índice de refracción presentó un valor de  $n_D = 1,4771$ .
- **Composición química:** El análisis cromatográfico permitió identificar el 92,98 % del total de los componentes del aceite esencial. Entre ellos se destacan el  $\alpha$ - pineno (32,72 %), seguido por el mirceno (17,97 %), limoneno (14,63 %) y sabineno (13,51 %) (Figura 15).

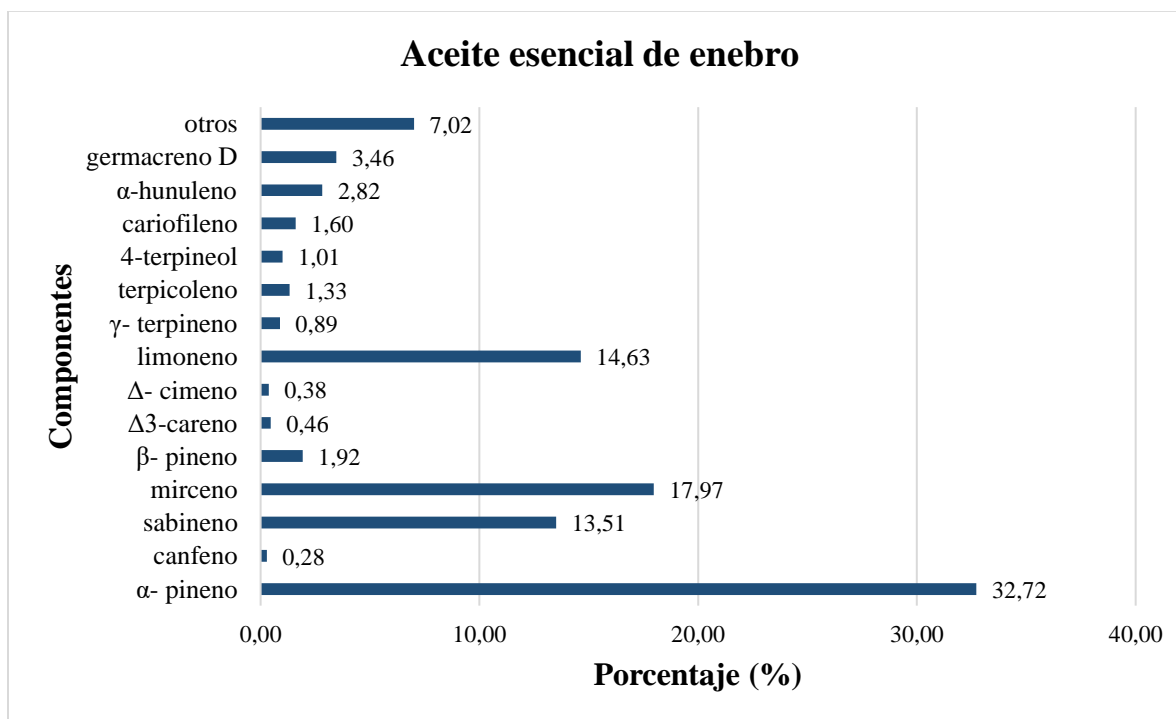


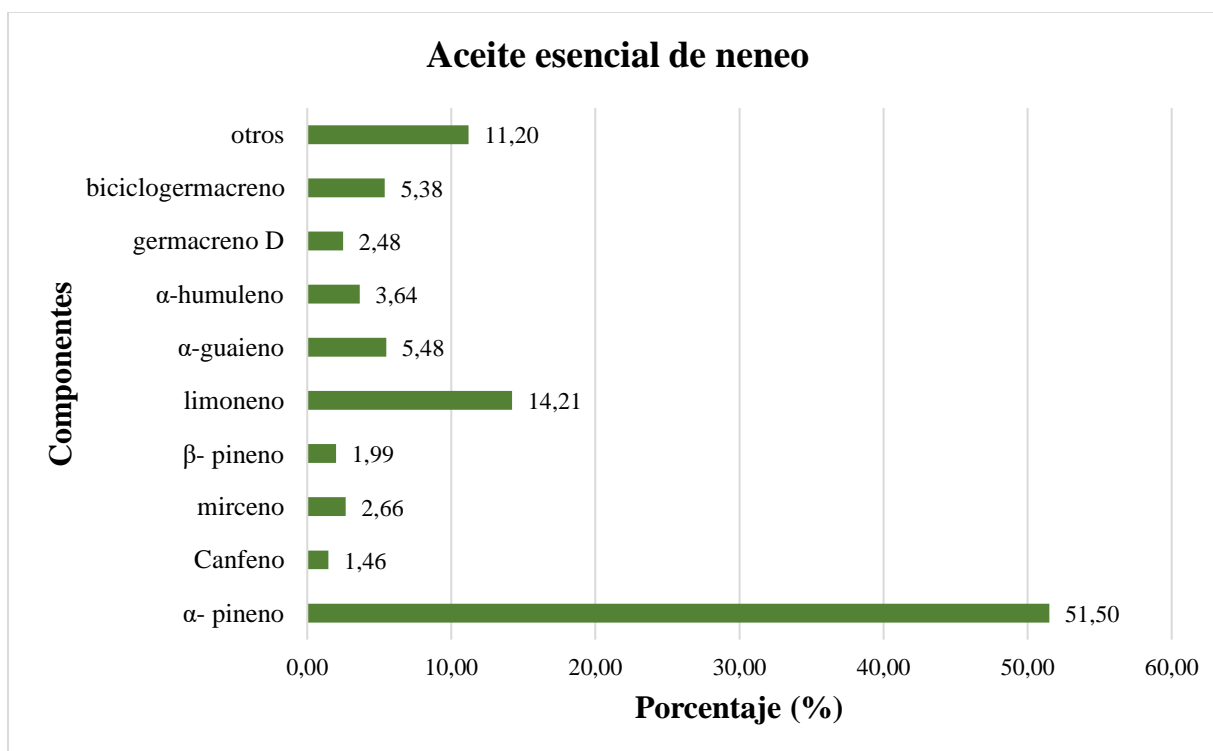
Figura 15. Perfil químico del aceite esencial de enebro. Se observan los porcentajes de los componentes del aceite.

### Aceite esencial de *A. prolifera*

**Rendimiento:** A partir de 0,886 kg de raíz de neneo, se obtuvo un rendimiento de aceite esencial de 3,95 ml/kg, correspondiente a 3,5 ml de aceite esencial extraído.

#### **Caracterización:**

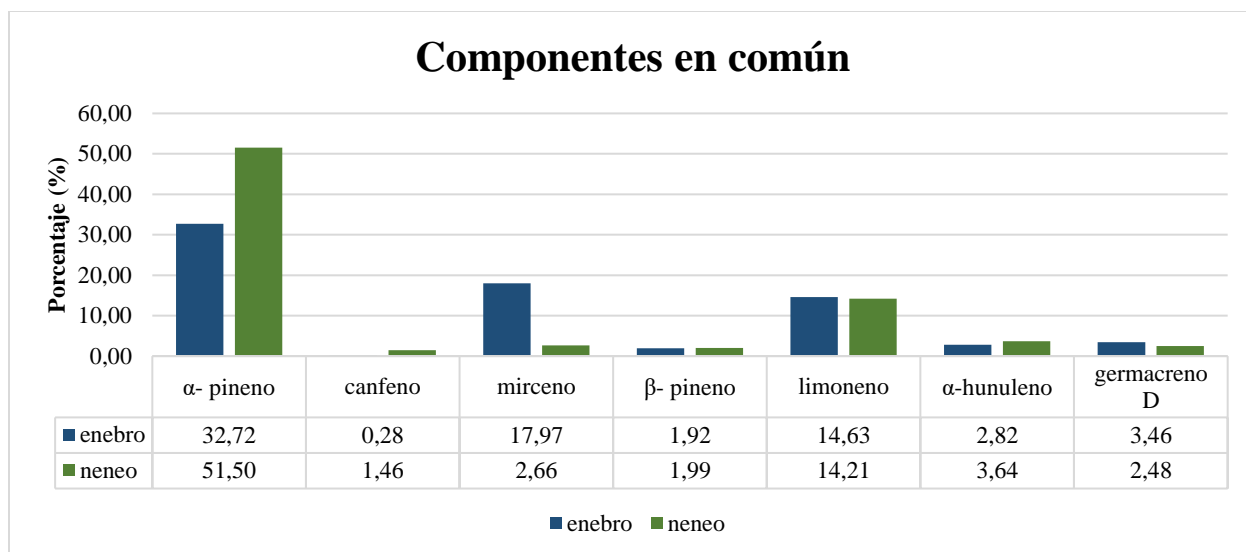
- **Índice de refracción:** El índice de refracción medido dio un valor de  $n_D = 1,4878$ .
- **Composición química:** Se pudo identificar el 88,80 % del aceite esencial mediante cromatografía de gases. Los componentes mayoritarios obtenidos fueron el  $\alpha$ -pineno (51,50 %) y el limoneno (14,21 %) (Tabla 2) (Figura 16).



**Figura 16.** Composición del aceite esencial de neneo. Los valores de los componentes están representados en porcentaje.

### Compuestos en común de los aceites esenciales de *J. communis* y *A. prolifera*

Los aceites esenciales de *J. communis* y *A. prolifera* mostraron compuestos mayoritarios en común, como  $\alpha$ -pineno y limoneno. Si bien el porcentaje de limoneno es similar en ambos aceites esenciales, en otros compuestos presentan diferencias en sus porcentajes (Figura 17).



**Figura 17.** Componentes químicos compartidos entre los aceites de eucalypto y neneo.

## Bioensayos: *Apis mellifera* y *Varroa destructor*

### Bioactividad del aceite esencial de eucalypto

#### Prueba de letalidad en *Apis mellifera*: Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) y NOAEL

Los valores estimados de CL<sub>50</sub> para *A. mellifera* expuestos al aceite esencial de eucalypto se presentan en la tabla 1. A las 48 horas, se registró el menor valor de la CL<sub>50</sub> (0,24 µl/ml), indicando una mayor toxicidad del aceite para las abejas en este periodo de tiempo.

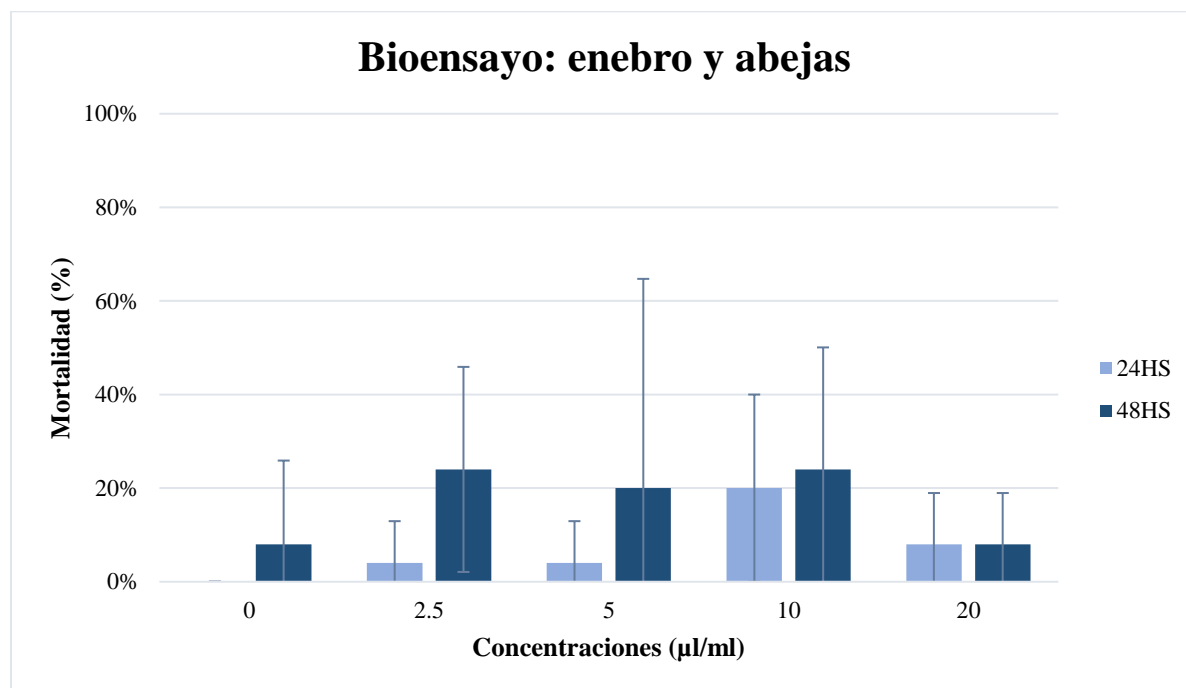
**Tabla 1.** Valores de la CL<sub>50</sub> (µl/ml) para *A. mellifera* en cada intervalo de tiempo con el aceite esencial de eucalypto. Los valores en paréntesis corresponden a los mínimos y máximos.

Abejas CL <sub>50</sub> (µl/ml)		
24h	48h	72h
537,09 (69,70- 4138,31)	0,24 (0,05-1,21)	No estimado

La mortalidad de las abejas no fue significativa tras la aplicación de los tratamientos del aceite esencial en comparación al control en ninguna de las concentraciones ni tiempos de exposición evaluados [(NOAEL de 2,5 µl/ml ( $X^2(1, N = 50) = 2,38$  p = 0,12), NOAEL de 5 µl/ml ( $X^2(1, N = 50) = 1,49$  p = 0,22), NOAEL de 10 µl/ml ( $X^2(1, N = 50) = 2,38$  p = 0,12 y

el NOAEL de 20  $\mu\text{l/ml}$  ( $X^2 (1, N = 50) = 0 p = 1$ ).

Si bien se observa una ligera tendencia al aumento de mortalidad a las 48 horas, en las concentraciones 2,5  $\mu\text{l/ml}$ ; de 5  $\mu\text{l/ml}$  y 10  $\mu\text{l/ml}$ , esto no resultó significativo estadísticamente. Además, se observó que la concentración de 10  $\mu\text{l/ml}$  mostró una mortalidad más alta en ambos tiempos de exposición, en comparación a las demás concentraciones evaluadas (Figura 18).



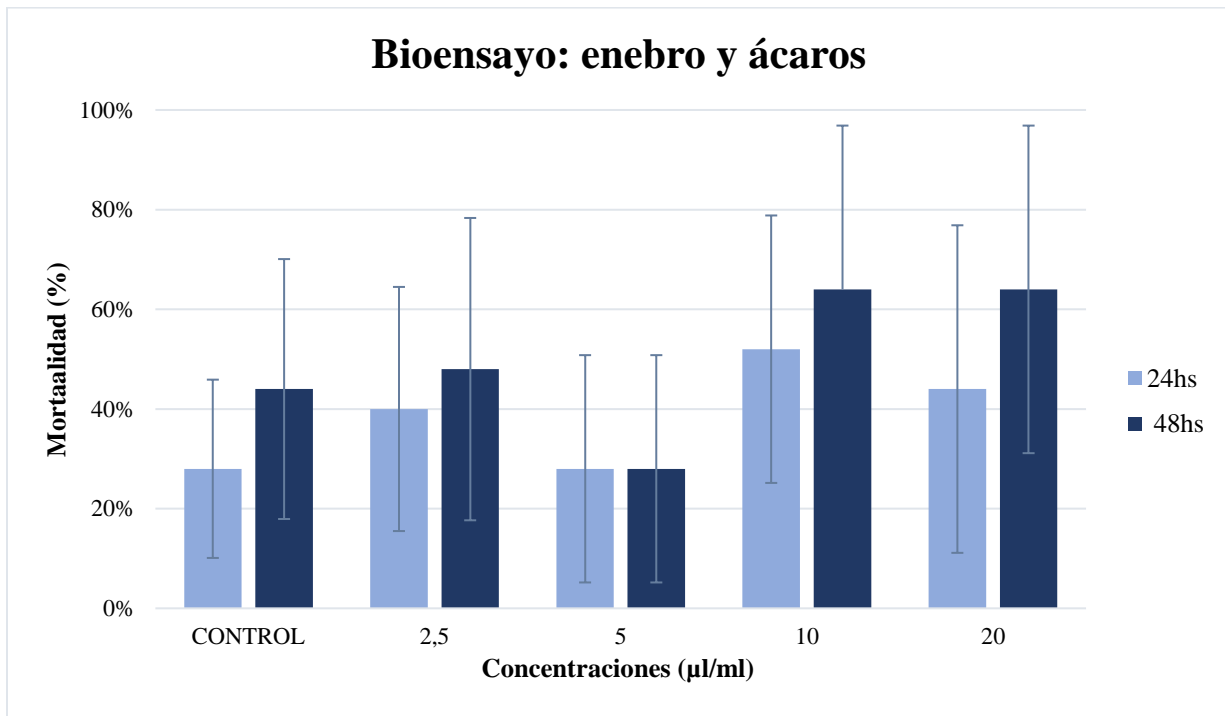
**Figura 18.** Bioensayo con el aceite esencial de enebro, analizando la mortalidad de las abejas según las distintas concentración y tiempo de exposición. Valores de mortalidad representados en porcentaje (media $\pm$  desviación estándar).

#### **Prueba de letalidad en *Varroa destructor*: Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>)**

Los resultados de CL<sub>50</sub> para *V. destructor* se indican en la tabla 2. En este caso, el menor valor de CL<sub>50</sub> se obtuvo a las 24 horas, siendo un valor de 3,33  $\mu\text{l/ml}$ . El mayor porcentaje de mortalidad (64 %) para ácaros se encuentra en las concentraciones de 10  $\mu\text{l/ml}$  y 20  $\mu\text{l/ml}$  a las 48 horas (Figura 19).

**Tabla 2.** Valores de CL<sub>50</sub> (µl/ml) para *V. destructor* en cada intervalo de tiempo con el aceite esencial de enebro. En paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos.

Ácaros CL <sub>50</sub> (µl/ml)		
24h	48h	72h
3,33 (0,40-27,25)	3,59 (2,57- 5,02)	No estimado



**Figura 19.** Bioensayo con aceite esencial de enebro: mortalidad de ácaros según concentración y tiempo de exposición. Valores de mortandad representados en porcentaje media± desviación estándar).

### Índice de Selección (*A. mellifera* / *V. destructor*)

Se calculó el índice de selección del aceite esencial para cada intervalo de tiempo de exposición. A las 24 horas, se obtuvo el índice máximo con un valor de 161,28. El mínimo se obtuvo a las 48 horas, con un valor de 0,06. No se pudo determinar el índice de las 72 horas.

### Test de atracción y repelencia en *Varroa destructor*

El aceite esencial de enebro no mostró signos de atracción o repulsión en ácaros de *V. destructor*. El análisis de Chi<sup>2</sup> no reveló diferencias significativas ( $\chi^2 = 1,6593$ , p-valor = 0,197) en la distribución de los ácaros entre el control y la concentración del aceite esencial testada (CL<sub>50</sub> enebro).

### Bioactividad del aceite esencial de neneo

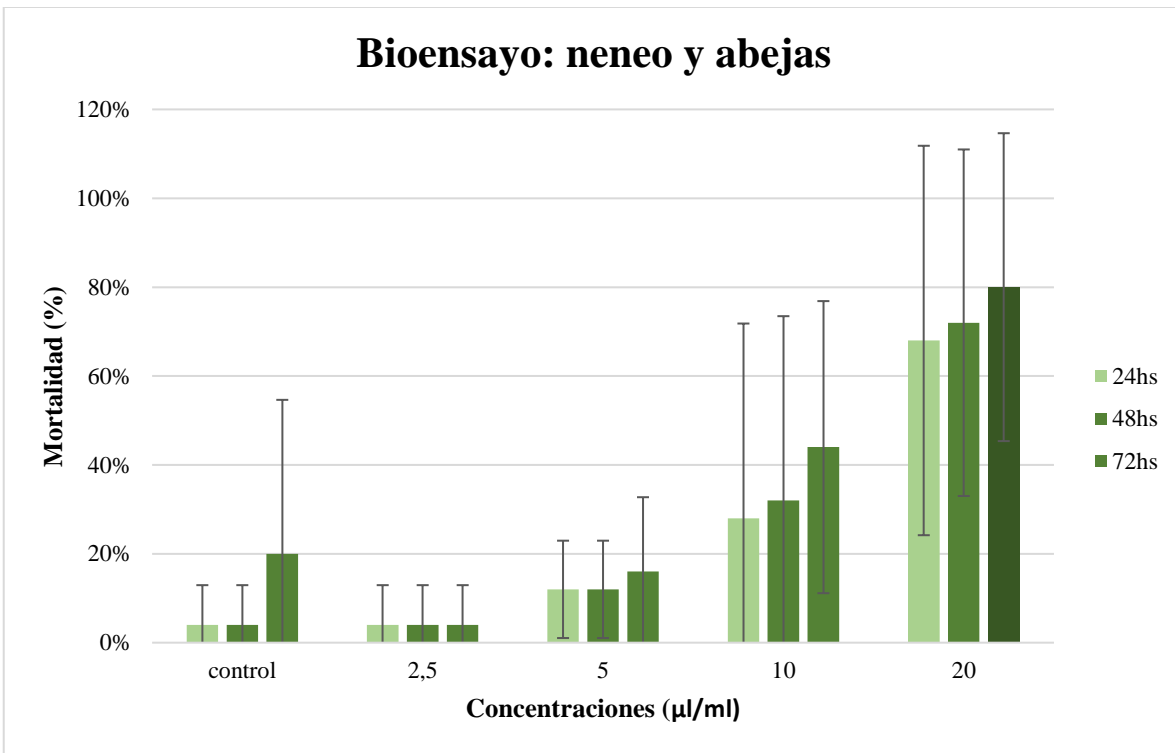
#### Prueba de Letalidad en *Apis mellifera*: Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) y NOAEL

Los valores estimados de CL<sub>50</sub> para *A. mellifera* expuestos al aceite esencial de neneo se presentan en la tabla 3. En este caso, el valor de CL<sub>50</sub> menor se obtuvo a las 72 horas con un valor de 8,14 µl/ml.

**Tabla 3.** Valores de CL<sub>50</sub> (µl/ml) para *A. mellifera* en cada intervalo de tiempo con el aceite esencial de neneo. En paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos

Abejas CL <sub>50</sub> (µl/ml)		
24h	48h	72h
14,68 (9,42-22,86)	13,36 (8,81-20,26)	8,14 (5,73-11,57)

La mortalidad de las abejas no fue significativa tras la aplicación de los tratamientos del aceite esencial en comparación al control en las concentraciones más bajas (NOAEL de 2,5 µl/ml ( $X^2(1, N = 50) = 3,03$  p = 0,08), NOAEL de 5 µl/ml ( $X^2(1, N = 50) = 0,13$  p = 0,71), NOAEL de 10 µl/ml ( $X^2(1, N = 50) = 3,30$  p = 0,06). Sin embargo, la mortalidad de abejas fue significativa con el tratamiento de 20 µl/ml en comparación con el control (NOAEL de 20 µl/ml ( $X^2(1, N = 50) = 18$  p = 0,000022)). Este resultado, se refleja claramente en la figura 20, donde se observa un aumento de mortalidad con la concentración de 20 µl/ml, alcanzando un máximo del 80 % de mortalidad.



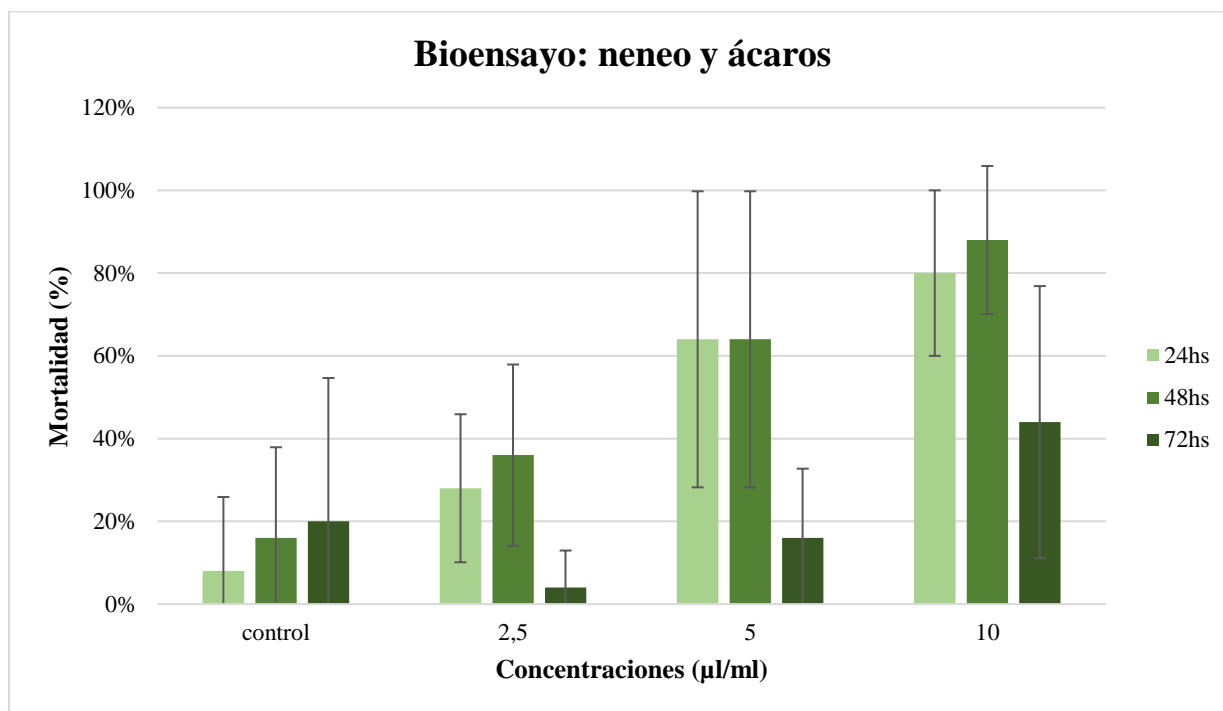
**Figura 20.** Bioensayo con aceite esencial de neneo: mortalidad de abejas según concentración y tiempo de exposición. Valores de mortandad representados en porcentaje (media± desviación estándar).

#### Prueba de Letalidad en *Varroa destructor*: Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>)

Los resultados de CL<sub>50</sub> para *V. destructor* se indican en la tabla 4. En este caso, el valor de CL<sub>50</sub> menor se obtuvo a las 72 horas con un valor de 2,72 µl/ml. En cuanto al mayor porcentaje de mortalidad de ácaros, fue en la concentración de 10 µl/ml para las 48 horas con un valor del 80 % (Figura 21).

**Tabla 4.** Valores de CL<sub>50</sub> (µl/ml) para *V. destructor* en cada intervalo de tiempo con el aceite esencial de neneo. En paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos.

Ácaros CL <sub>50</sub> (µl/ml)		
24h	48h	72h
4,13 (2,69-6,40)	2,99 (2,00-4,46)	2,72 (1,82-4,07)



**Figura 21.** Bioensayo con aceite esencial de neneo: mortalidad de ácaros según concentración y tiempo de exposición. Valores de mortalidad representados en porcentaje, (media± desviación estándar).

### Índice de selección (*A. mellifera* / *V. destructor*)

Se calculó el índice de selección del aceite esencial para cada intervalo de tiempo de exposición. El índice máximo (4,46) se registró a las 48 horas, seguido por un valor de 3,55 a las 24 horas. El índice mínimo (2,98) se registró a las 72 horas.

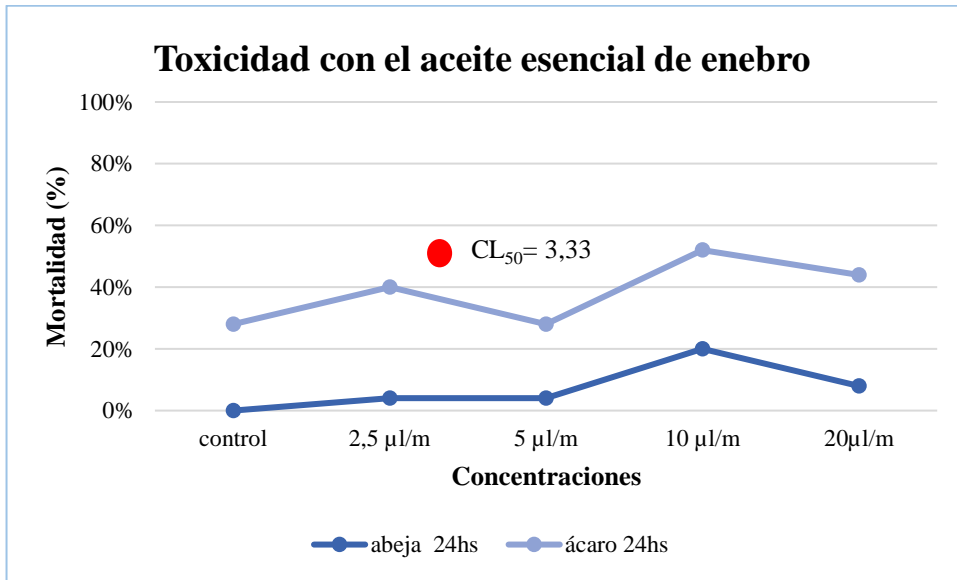
### Test de Atracción y Repelencia en *Varroa destructor*

El aceite esencial de neneo, no mostró signos de atracción o repulsión en ácaros de *V. destructor*. El análisis de Chi<sup>2</sup> realizado no reveló diferencias significativas ( $\chi^2= 3,6161$ , p- valor= 0,057) en la distribución de los ácaros con respecto al control y la concentración del aceite esencial testada (CL<sub>50</sub> neneo).

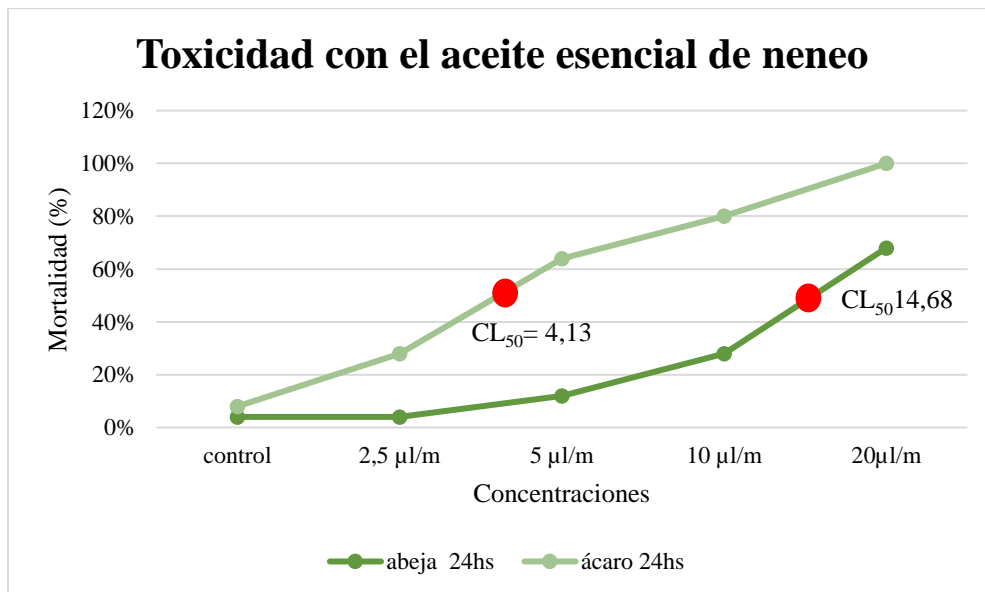
### Toxicidad de los aceites esenciales en *A. mellifera* y *V. destructor*

La aplicación del aceite de enebro a una concentración de 10 µl/ml provocó una mortalidad del 20 % en *Apis mellifera* y un 52 % en *Varroa destructor*. Estos resultados junto con el valor de CL<sub>50</sub> para los ácaros se muestran en la figura 22. En cuanto a la aplicación del aceite de neneo, se registró que en la concentración de 20 µl/ml alcanzó una mortalidad del 68 % para *A. mellifera* y

un 100 % para *V. destructor*. Los resultados obtenidos, junto con los valores de  $CL_{50}$  para abejas y el  $CL_{50}$  para ácaros se pueden observar en la figura 23.



**Figura 22:** Toxicidad del aceite esencial de enebro en distintas concentraciones para abejas y ácaros. Se señala un círculo rojo para la  $CL_{50}$  de varroa.



**Figura 23:** Toxicidad del aceite esencial de neneo en distintas concentraciones para abejas y ácaros. Se señala un círculo rojo la  $CL_{50}$  de abejas y  $CL_{50}$  de varroa.

## DISCUSIÓN

### Aceites esenciales

#### Aceite esencial de *J. communis*

El rendimiento del aceite esencial obtenido de los frutos de *J. communis* en este estudio (0,38 %), se encuentra dentro del rango reportado por literatura (0,2 a 3,8 %) (Agastra et al., 2021). Las propiedades físicas del aceite, como el índice de refracción, se encuentran dentro de los parámetros esperados de los aceites esenciales de alta pureza (1,470 a 1,480). La composición química, dominada por monoterpenos, reveló al  $\alpha$ - pineno como el componente mayoritario, seguido por mirceno, limoneno y sabineno. Esta composición es similar a la reportada en otros estudios sobre este aceite esencial (Bais et al., 2014; Gao et al., 2019; Agastra et al., 2021; Esteban et al., 2023). Sin embargo, Dambolena et al. (2011) observaron variaciones en la composición química, donde el sabineno fue el compuesto mayoritario, proveniente de plantaciones de INTA en la localidad de Trevelin. Estas variaciones en las composiciones químicas pueden explicarse por ser diferentes sitios de recolección y por las condiciones edafoclimáticas (Radoukova et al., 2018). En este estudio, al mezclar los frutos de dos localidades con diferencias edafoclimáticas, es de esperar que se encuentra variación en la composición química, en comparación con estudios que se centran en una única población.

#### Aceite esencial de *A. prolifera*

Los resultados obtenidos en este estudio revelan que el rendimiento del aceite esencial de las raíces de *A. prolifera* (0,39 %) se encuentra dentro del rango reportado en la literatura (0,35 - 1,85 %) (Juárez et al., 2016). Respecto a las propiedades físicas del aceite, este estudio presenta los primeros reportes sobre su índice de refracción (1,4878). Asimismo, a diferencia de estudios previos, no se encontraron datos en la literatura sobre la densidad de este aceite. Ravetta & Soriano (1998) mencionan la presencia de una oleorresina en tallos y raíces, compuesta por aceites esenciales, resina y goma, pero no proporcionan datos cuantitativos sobre su densidad. La composición química, dominada por monoterpenos, principalmente el  $\alpha$ - pineno y limoneno, es similar a estudios previos (UEAE- INBIES, 2022). Sin embargo, hay variaciones en su composición, por ejemplo, Juárez et al. (2016) mencionan que el compuesto principal en el aceite esenciales es el biciclogermacrenol, mientras que en este estudio el componente mayoritario es el  $\alpha$ - pineno. Esta variación puede estar relacionada a los distintos sitios de recolección, ya que en el

estudio de Juárez et al. (2016) se recolectó en tres provincias (Neuquén, Río Negro y Chubut), mientras que en este estudio fue solo en sitio puntual.

### **Bioensayos: toxicidad y actividad acaricida**

Los resultados de los bioensayos demostraron que el aceite de *J. communis* presenta una baja toxicidad para *Apis mellifera*, respaldado por un valor de NOAEL no significativo, y un efecto tóxico para *Varroa destructor*. La toxicidad en los ácaros podría estar relacionada con la presencia de mirceno. Estudios previos han mostrado que el mirceno, en combinación con otros compuestos, pueden causar la muerte de ácaros, como la arañuela roja (*Tetranychus urticae*) por contacto o por asfixia (Cavalcanti et al., 2010). Además, la presencia de  $\beta$ - pineno y cariofileno en este aceite se han encontrado en concentraciones similares reportadas en otros aceites con actividad acaricida como el de *Acantholippia seriphioides*, por lo cual esta evidencia refuerza su potencial para el control de *Varroa destructor* (Ruffinengo et al., 2005).

Asimismo, es importante mencionar que hay estudios en los cuales se demostró que los monoterpenos como el mirceno, timol, linalol y cariofileno han exhibido una prometedora actividad acaricida contra *V. destructor* (Ruffinengo et al., 2005; Damianni et al., 2009; Cavalcanti et al., 2010; Maggi, 2010; Gimenez Martinez et al., 2019).

Los valores de concentración letal (CL<sub>50</sub>) de *A. mellifera*, de este estudio, fueron superiores al de otros aceites evaluados de plantas patagónicas, como por ejemplo el del aceite de *Syzygium aromaticum* (15,53  $\mu$ l/ml), *Acantholippia seriphioides* (2,0303  $\mu$ l/ml), *Aloysia polystachya* (>25  $\mu$ l/ml) y *Schinus molle* (>25  $\mu$ l/ml) quienes mostraban una baja toxicidad en abejas, así como una buena actividad acaricida (Ruffinengo et al., 2005; Maggi, 2010). Asimismo, en este estudio el aceite esencial de enebro fue prácticamente inocuo para las abejas.

Los valores de concentración letal (CL<sub>50</sub>) de ambos aceites para *V. destructor* son similares a los de otras investigaciones (Ruffinengo et al., 2005; Iglesias 2024). Por ejemplo, Ruffinengo et al. (2005) informaron que los aceites de *Acantholippia seriphioides*, *Eupatorium bunifolium*, *Aloysia polystachya*, *Lippia junelliana* y *Lippia turbinata* demostraron una buena actividad acaricida frente a *V. destructor*, así como una baja toxicidad en las abejas. Uno de los puntos a destacar es que la composición química de estos aceites esenciales fue similar a los de enebro y neneo, con  $\alpha$ - pineno, limoneno como componentes principales. Sin embargo, el aceite enebro se

distingue por presentar mayores concentraciones de mirceno y sabineno en comparación con los aceites evaluados por Ruffinengo et al. (2005).

En esta investigación, los aceites obtenidos no actúan como atrayentes ni como repelentes de los ácaros. Otros investigadores han utilizado este test y han obtenido resultados muy variados (Ruffinengo et al., 2005; Damiani et al., 2011; Iglesias et al., 2022). Por ejemplo, los aceites esenciales que han resultado ser repelentes son los de *L. junelliana*, *M. mollis* y *L. turbinata* (Ruffinengo et al., 2005). Pero hasta el momento no se ha encontrado una relación clara entre los aceites esenciales y los efectos repelentes (Iglesias, 2024). Este trabajo y hallazgos anteriores en la literatura sugieren que la aplicación de estos aceites debería basarse en la actividad miticida.

Estos resultados son prometedores, teniendo en cuenta que un buen acaricida tiene que reducir la infestación de ácaros, evitando al mismo tiempo una alta toxicidad y letalidad para las abejas melíferas (Brasacco et al., 2017). En este sentido, ambos aceites han demostrado tener un índice de selectividad adecuado para ser testeados a campo, siendo más prometedor el aceite esencial de enebro.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo fueron las siguientes:

- El aceite esencial de *Juniperus communis* demostró ser una alternativa prometedora para el control de *Varroa destructor*. Los bioensayos demostraron una baja toxicidad para *Apis mellifera* tras 24 horas de exposición. Por lo cual se confirma la hipótesis 1 que establece que la presencia de terpenos, en la composición química de los aceites esenciales de *J. communis* y *A. prolifera*, son óptimos para el control de *V. destructor*. Asimismo, se confirma la hipótesis 3 que menciona que las concentraciones seleccionadas de los aceites esenciales de *J. communis* y *A. prolifera* no actuarán como insecticida frente a *A. mellifera*.
- El aceite esencial de *Azorella prolifera* también presentó actividad acaricida contra *Varroa destructor*. Sin embargo, su índice de selección fue menor que el del aceite de enebro, ya que este aceite resultó tóxico para las abejas en una concentración de 20 µl/ml. Por lo tanto, también se confirma la hipótesis 1.

- La composición química de los aceites esenciales, dominada por monoterpenos, especialmente el  $\alpha$ - pineno y mirceno, explican en gran medida su actividad acaricida. En estudios previos han demostrado que el mirceno en conjunto con otros compuestos presenta propiedades acaricidas, causando la muerte de los ácaros.
- Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el aceite esencial de *J. communis* podría afectar la capacidad de los ácaros para adherirse a las abejas al alterar su comportamiento y finalmente morir. Sin embargo, dado que no se pudo evaluar directamente este cambio de comportamiento, se rechaza la hipótesis 2, que establece que los aceites esenciales de *J. communis* y *A. prolifera* afectan el comportamiento forético de *V. destructor*. Se requieren más estudios para profundizar el efecto directo del aceite sobre el comportamiento de los ácaros.
- Ninguno de los aceites esenciales evaluados mostró efectos atractivos o repelentes sobre *Varroa destructor*. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis 4 la cual establece que los aceites esenciales muestran efectos repelentes sobre *V. destructor* debido a sus componentes volátiles.

## Consideraciones finales

La crisis sanitaria causada por *Varroa destructor* y la creciente demanda de estrategias orgánicas para su control, han impulsado una intensa búsqueda de herramientas innovadoras a partir de investigaciones científicas que han ido incrementándose en los últimos años. Esto no es ajeno a la provincia de Chubut, el sector productivo y el sector científico, ponen a prueba tanto el aceite esencial de enebro como el de neneo con resultados prometedores. Gracias a esta investigación se ha demostrado el potencial del aceite esencial de *Juniperus communis* como una alternativa natural y prometedora para el control de la *V. destructor*. Dejando paso a futuras investigaciones para terminar de establecer la eficacia de este aceite, como los ensayos en larvas de *Apis mellifera* y luego ensayos a campo.

La utilización de aceites esenciales, no solo ofrece una solución más sostenible para el control de plagas en la apicultura, sino que también promueve el aprovechamiento de los recursos naturales locales. Esto no solo beneficia a los apicultores, sino que también fortalece la economía regional y fomenta prácticas agrícolas más respetuosas con el medio ambiente.

La colaboración interdisciplinaria entre químicos, biólogos y apicultores es fundamental para avanzar en esta línea de investigación y desarrollar estrategias de manejo de la varroosis más sostenibles y eficaces. Al fortalecer los vínculos entre la ciencia y la producción, podremos contribuir al desarrollo de una apicultura más competitiva y resiliente en la región.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbassy M.A., & Marei G.I.K. (2013). Antifungal and chemical composition of essential oils of *Juniperus communis* L. and *Thymus vulgaris* L. against two phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Sciences Reserch*, 9, 4584–4588.
- Agastra A., Gixhari B., Kadiasi N., & Alban I. (2021). Influence of environmental factors in the composition of essential oils content of *Juniperus communis* l. berries, in southeast part of Albania. *International Journal of Ecosystems and Ecology Science (IJEES)*, 11(4), 943–948. <https://doi.org/10.31407/ijeess11.436>.
- American Public Health Association (APHA) (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater (18<sup>th</sup> ed). Washington DC: APHA. pp. 518–523.
- Araneda D. X., Pérez N. R., Castillo R. C., & Medina M. L. (2008). Evaluación del comportamiento higiénico de *Apis mellifera* L. en relación al nivel de infestación de *Varroa destructor* Anderson & Trueman. *Idesia (Arica)*, 26(2). <https://doi.org/10.4067/S0718-34292008000200008>.
- Bais S., Gill N. S., Rana N., & Shandil S. (2014). A Phytopharmacological Review on a Medicinal Plant: *Juniperus communis*. *International Scholarly Research Notices*, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2014/634723>.
- Balleta A., & Locher M.V. (2022). Análisis del sistema apícola del centro de Santa Fé, Argentina. *Revista Agroalimentaria*, 28(54),101–121. ISSN: 2244-8128.
- Bellingham & Stanley. (2023). Refractómetro Abbe 5. Guía de usuario. Recuperado de <https://www.cienytec.com/PDF/lab1-refractometro-abbe-5-bellingham-stanley-guia-usuario-ESP.pdf>
- Berruezo S., Ferreyra S., Fontana A., Paola M., Pérez M.B., Scapini C., Cremer C., & Castro C. (2022). *Mulinum spinosum* root extract, rich in antioxidant compounds, mitigates harmful effects in mice with diet-induced metabolic syndrome. *Phytomedicine Plus*, 2(1), 100169. ISSN 2667-0313 <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100169>
- Brasceso C., Gende L., Negri P., Szawarski N., Iglesias A., Eguaras M., Ruffinengo S., & Maggi M. (2017). Assessing in Vitro Acaricidal Effect and Joint Action of a Binary Mixture

- Between Essential Oil Compounds (Thymol, Phellandrene, Eucalyptol, Cinnamaldehyde, Myrcene, Carvacrol) Over Ectoparasitic Mite *Varroa Destructor* (Acari: Varroidae). *Journal of Apicultural Science*, 61(2), 203–215. <https://doi.org/10.1515/jas-2017-0008>
- 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. *Journal of Economic Entomology*, 101, 1081–1087.
- Cavalcanti S.C.H., Niculau E.D.S., Blank A.F., Câmara C.A.G., Araújo I.N., & Alves P.B. (2010). Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Bioresource Technology*, 101(2), 829–832. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.053>
- Chen Y.P., & Siede R. (2007). Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research*, 70, 33–80. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(07\)70002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70002-7).
- Coronato F.R. (1993). Wind chill factor applied to Patagonian climatology. *International Journal of Biometeorology*, 37(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF01212759>.
- Cousin M., Silva-Zacarin E., Kretzschmar A., El Maataoui M., Brunet J.L. et al. (2013). Size Changes in Honey Bee Larvae Oenocytes Induced by Exposure to Paraquat at Very Low Concentrations. *PLoS ONE*, 8(5), e65693. doi:10.1371/journal.pone.0065693
- Dai P., Jack C.J., Mortensen A.N., Bustamante T., & Ellis J.D. (2018). *Scientific Reports*, 8(1), 1–9.
- Dambolena J.S., Meriles J.M., López A.G., Gallucci M.N., González S.B., Guerra P.E., Bruno A., & Zunino M.P. (2011). Actividad antifúngica del aceite esencial de cinco especies de *Juniperus* de Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10 (2), 104 – 115 B. ISSN 0717 7917.
- Damiani N., Gende L.B., Bailac P., Marcangeli J.A., & Eguaras M.J. (2009). Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Parasitology Research*, 106(1), 145–152. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1639-y>

- Damiani N., Gende L.B., Maggi M.D., Palacios S., Marcangeli J.A., & Eguaras M.J. (2011). Repellent and acaricidal effects of botanical extracts on *Varroa destructor*. *Parasitology Research*, 108(1), 79–86. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2043-3>
- De Jong D., De Jong P., & Gonçalves L. (1982). Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal Apicultural Reserech*, 21(3), 165–167. <https://doi.org/10.1080/00218839.1982.11100535>
- Di Rienzo JA., Casanoves F., Balzarini MG., Gonzalez L., Tablada M., & Robledo C.W. (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Recuperado de: <http://www.infostat.com.ar>.
- Donzé G., Herrmann M., Bachofen B., & Guerin P. (1996). Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Ecological Entomology*, 21(1), 17–26 <https://doi:10.1111/j.13652311.1996.tb00261.x>.
- Duay P., de Jong D., & Engels W. (2002). Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genetics and Molecular Reseserch*, 1(3), 227–232.
- Echenique D., Chiaramello A., Rossomando P., Mattana C., Alcaráz L., Tonn C., Laciari A., & Satorres S. (2014). Antibacterial activity of *Mulinum spinosum* extracts against slime producing *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers *Scientific World Journal*, 342143. doi:[10.1155/2014/342143](https://doi.org/10.1155/2014/342143).
- Eguaras M.J., Fuselli S., Gende L., Fritz R., Ruffinengo S.R., Clemente G., González A., Bailac P.N., & Ponzi M.I. (2005). An in vitro evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. *J Essent Oil Res*, 17(3), 336–340.
- El Chubut. (2023). Ongarato firmó convenio con Asociación de Apicultores para uso de la sala de miel del CAPEC. Recuperado de: [Ongarato firmó convenio con Asociación de Apicultores para uso de la sala de miel del CAPEC - Últimas Noticias: El Chubut](#)
- Ellis J.D., & Zettel Nalen C.M. (2010). Varroa Mite, *Varroa destructor* Anderson and Trueman (Arachnida: Acari:Varroidae). *IFAS Extension*, 473, 1–7.

- Esteban L.S., Mediavilla I., Xavier V., Amaral J.S., Pires T.C.S.P., Calhella R.C., López C., & Barros L. (2023). Yield, Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oils from Common Juniper (*Juniperus communis* L.) from Different Spanish Origins. *Molecules*, 28(11), 4448. <https://doi.org/10.3390/molecules28114448>
- Estomba D., Ladio A., & Lozada M. (2006). Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from North-western Patagonia. *Revista de Etnofarmacología*, 103(1),109–19. doi:10.1016.
- Ferrari C.A., Otero A., & Collía J.A. (2011). La Apicultura Argentina y sus regiones. Una visión panorámica. Disponible en: <http://biblioteca.cfi.org.ar/wp-content/uploads/sites/2/2017/06/apicultura-argenitna.pdf>.
- Ferriol Molina M. (2024). El enebro común (*Juniperus communis* L.) Universidad Politécnica de Valencia. <http://hdl.handle.net/10251/204881>.
- Ferreira M., Ezcurra C. & Clayton S. (2005) *Flores de Alta Montaña de los Andes Patagónicos: Guía para el reconocimiento de las principales especies de plantas vasculares altoandinas*. (1ra ed.) L.O.L.A.
- Flamini G. (2003). Acaricides of natural origin, personal experiences and review of literature (1990-2001). *Stud Nat Prod Chem*, 28(1): 381-451.
- Frost E.H., Shutler D., & Hillier N.K. (2013). Effects of fluvalinate on honey bee learning, memory, responsiveness to sucrose, and survival. *J Exp Biol*, 216, 2931–2938.
- Fuentes, G., Iglesias, A., Mitton, G., Ramos, F., Brasesco, C., & Maggi, M. (2022). Varroa destructor en Latinoamérica: Una introducción a la biología, ecología y control en la región. *EUNK Revista Científica de Abejas y Apicultores*, 1(2), 12-29. <https://doi.org/10.52559/eunk.v1i2.30>
- Gao H.W., Huang X.F., Yang, T.P., Chang, K.F., Yeh L.W., Hsieh M.C., Weng J.C., & Tsai N.M. (2019). *Juniperus communis* suppresses melanoma tumorigenesis by inhibiting tumor growth and inducing apoptosis. *The American Journal of Chinese Medicine* 47 (05), 1171–1191.

- Gastaldi B., Assef Y., van Baren C., Lira P.D.L., Retta D., Bandoni A.L., & González S.B. (2016). Actividad antioxidante en infusiones, tinturas y aceites esenciales de especies nativas de la Patagonia Argentina. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21 (1), 51-62.
- Gimenez Martinez P., Iglesias A., Ramirez C., Mitton G., Fuentes G., Fanovich M.A., Fuselli S., Maggi M. (2019). Aceites esenciales de flores de lúpulo para el control de *Paenibacillus larvae* y *Varroa destructor*, principales patologías en abejas. XV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA. MI 090.
- Gobierno del Chubut. (2020). Ministerio de producción. Apicultura. Extraído de: <http://www.produccion.chubut.gov.ar/apicultura>.
- Gonçalves A., Flores-Félix J., Coutinho P., Alves G., & Silva L. (2022). Zimbros (*Juniperus communis* L.) as a Promising Source of Bioactive Compounds and Biomedical Activities: A Review on Recent Trends. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3197. <https://doi.org/10.3390/ijms23063197>.
- González Hernández A. (2012). Evaluación de Dos Métodos de Bioensayos para Determinar la Toxicidad de Plaguicidas en *Apis mellifera*. Tesis de grado. Universidad Autónoma Agraria Narro. División de Agronomía. Departamento de Parasitología. Saltillo, Coahuila, México.
- González S.B., Silva Sofrás F.M., Gastaldi B., Mazzoni A.O., Sánchez G.O., Di Leo Lira P.M. D.R., ... & Bandoni A.L. (2018) Estudios fitoquímicos y botánicos comparativos de una planta aromática y medicinal endémica de la Patagonia argentina llevada a cultivo. XI Congreso Internacional de Fitoterapia "Ciudad de Oviedo".
- Haynes, K. F. (1988). Sublethal Effects of Neurotoxic Insecticides on Insect Behavior. *Annual Review of Entomology*, 33(1), 149-168. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.33.010188.001053>.
- Iglesias A. (2024). Control de *Varroa destructor* mediante extractos vegetales de *Humulus lupulus*. (Tesis doctoral) Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. CONICET. IIPROSAM. CIAS.
- Iglesias A., Mitton G., Szawarski N., Cooley H., Ramos F., Meroi Arcerito F., Brascesco C., Ramirez C., Gende L., Eguaras M., Fanovich A., & Maggi M. (2020). Essential oils from

- Humulus lupulus* as novel control agents against *Varroa destructor*. *Industrial Crops and Products*, 158, 113043. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113043>.
- Iglesias A.E., Fuentes G., Mitton G., Ramos F., Brasesco C., Manzo R., Orallo D., Gende L., Eguaras M., Ramirez C., Fanovich A., & Maggi M. (2022). Hydrolats from *Humulus lupulus* and Their Potential Activity as an Organic Control for *Varroa destructor*. *Plants*, 11(23), 3329. <https://doi.org/10.3390/plants11233329>.
- Imdorf A., Bogdanov S., Ibáñez Ochoa R., & Calderone N. (1999). Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie*, 30, 209228.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y PROAPI. (2019). *Guía para la caracterización de mieles argentinas*. ISBN 978-987-47099-2-9. Extraído de: [https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/Apicultura/documentos/Guia\\_para\\_la\\_Caracterizacion\\_de\\_Mieles\\_Argentinas\\_F40919.pdf?form=MG0AV3](https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/Apicultura/documentos/Guia_para_la_Caracterizacion_de_Mieles_Argentinas_F40919.pdf?form=MG0AV3).
- Isman M. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603–608.
- Johnson R.M., Pollock H.S., & Berenbaum M.R. (2009). Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *J Econ Entomol*, 102, 474–479.
- Juárez C., Di Leo Lira P., Martínez A.J., Van Baren C., Retta D., Elechosa M., Rosselot V. & Bandoni A. (2016). Estudios de especies aromáticas nativas colectadas en la región patagónica. *Dominguezia* 32(2) ISSN 1669-6859.
- Kralj J., Brockmann A., Fuchs S., & Tautz J. (2007). The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *J Comp Physiol*, 193, 363–370.
- Kraus B., Koeniger N., & Fuchs S. (1994). Screening of substances for their effect on *Varroa jacobsoni*: attractiveness, repellency, toxicity and masking effects of ethereal oils. *J Apic Res*, 33, 34–43.
- Le Conte Y., & Arnold G. (1988). Étude du thermopréférendum de *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 19, 155–164.

- León R.J.C, Bran D., Collantes M., Paruelo J.M., & Soriano A., (1998). Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecología Austral*, 8,123–141.
- Lindberg C.M., Melathopoulos A.P., & Winston M.L. (2000). Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni*, a honey bee parasite. *J Econ Entomol*, 93, 189–198.
- Lodesani M., Costa C., Serra G., Colombo R., & Sabatini A.G. (2008). Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*, 39(3), 324–333.
- Maggi M. (2010). “Biología, ecología y control de *Varroa destructor*, Anderson & Trueman 2000” (Tesis doctoral) Universidad Nacional de Mar del Plata- CONICET.
- Maggi M., Peralta L., Ruffinengo S., Fuselli S., & Eguaras M. (2011). Body size variability of *Varroa destructor* and its role in acaricide tolerance. *Parasitology Research*, 110(6), 2333–2340. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2768-7>.
- Maggi M.D., Antúnez K., Invernizzi C., Aldea P., Vargas M., Negri P., Brasesco C., De Jong D., Message D., Teixeira E.W., Principal J., Barrios C., Ruffinengo S., Rodríguez Da Silva, R., & Eguaras M. (2016). *Honeybee health in South America*. *Apidologie*, 47, 835–854.
- Maggi M.D., Sardella N.H., Ruffinengo S.R., & Eguaras M.J. (2009). Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parasitology Research*, 105(6), 1629-1636. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1605-8>.
- Martel A.C., Zeggane S., Aurières C., Drajnudel P., Faucon J.P., & Aubert M. (2007). Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol®50. *Apidologie*, 38(6), 534–544. <https://doi.org/10.1051/apido:2007038>.
- Martin S.J. (1994). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 18, 87–100. <https://doi:doi:10.1007/BF00055033>.
- Martínez-Pérez de Ayala L.R., Martínez-Puc J.F., & Cetzal-Ix W.R. (2017). Apicultura: Manejo, Nutrición, Sanidad y Flora Apícola, Universidad Autónoma de Campeche, Campeche. 112 p.
- Massaccese C.A. (2002). Apicultura en la Patagonia Andina.

- Medici S.K., Maggi M.D., Sarlo E.G., Ruffinengo S., Marioli J.M., & Eguaras M.J. (2016). The presence of synthetic acaricides in beeswax and its influence on the development of resistance in *Varroa destructor*. *J Apicult Res* 54(3),267–274.
- Medrzycki P., Giffard H., Aupinel P., Belzunces L.P., Chauzat M.P., Claßen C., Colin M.E., Dupont T., Girolami V., Johnson R., Le Conte Y., ... et al., (2013). Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *J Apic Res*, 52,4, 1–60, <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.14>.
- Ministerio de Economía Argentina (2023). Resolución N°275/2023 EPSA. *Chubut. Estrategia provincial para el sector agroalimentario*. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Industria y Comercio Extraído de: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/estrategias\\_provinciales\\_epsas\\_chubut\\_2023-.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/estrategias_provinciales_epsas_chubut_2023-.pdf).
- Ministerio de Economía. (2021). Arrancó la Campaña federal “Más miel todo el año”. Extraído en: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/arranco-la-campana-federal-mas-miel-todo-el-ano#:~:text=Apicultura%20en%20Argentina&text=El%20Registro%20Nacional%20de%20Productores,miel%20habilitadas%20por%20el%20Senasa>.
- Ministerio de economía. (2023). Resolución 1186/2023. *Boletín oficial de la República Argentina*, Buenos Aires.
- Ministerio de Economía. (2024). *Indicadores económicos. Apicultura- Información económica*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Centro de investigación de economía y prospectiva (CIEP). Disponible en: [https://public.tableau.com/views/Apicultura-ExportacionesArgentinas-Unif/ExposProv?%3Alanguage=es-ES&%3Adisplay\\_count=n&%3Aorigin=viz\\_share\\_link&%3AshowVizHome=no](https://public.tableau.com/views/Apicultura-ExportacionesArgentinas-Unif/ExposProv?%3Alanguage=es-ES&%3Adisplay_count=n&%3Aorigin=viz_share_link&%3AshowVizHome=no).
- Mitton G.A. (2019). Resistencia a xenobióticos y procesos de detoxificación. Estudios moleculares *Varroa* y *A. mellifera*. (Tesis doctoral). Centro de Investigación en Abejas Sociales. Universidad Nacional de Mar del Plata- CONICET.
- Mitton G.A., Quintana S., Giménez Martínez P., Mendoza Y., Ramallo G., Brasesco C., Villalba A., Eguaras M.J., Maggi M., & Ruffinengo S.R. (2016). First record of resistance to

- flumethrin in a *Varroa* population from Uruguay. *J Apic Res*, 55(5), 422– 427.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1257238>.
- Mitton G.A., Szawarski N., Ramos F., Fuselli S., Meroi Arcerito F.R., Eguaras M.J., Ruffinengo S., & Maggi M.D. (2018). *Varroa destructor*: cuando no se produce reversión a la resistencia al cumafós. *Revista de Investigación Apícola*, 57 (4), 536–540.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1475038>.
- Municipalidad de Esquel. (s.f.) *El Municipio renovó convenio con Asociación Apícola por uso de la Sala de Extracción de Miel del CAPEC*. Recuperado de: [El Municipio renovó convenio con Asociación Apícola por uso de la Sala de Extracción de Miel del CAPEC | Municipalidad de Esquel](#)
- Nation J.L., Sanford M.T., & Milne K. (1992). Cuticular hydrocarbons from *Varroa jacobsoni*. *Exp Appl Acarol*, 16, 331–344. Extraído de: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01218575>.
- Nazzi F., & Le Conte Y. (2016). Ecology of *Varroa destructor*, the major ectoparasite of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Annual review of entomology*, 61, 417–432.
- Nicoletti M., Di Fabio A., D’Andrea A., Salvatore G., Van Baren C., & Coussio J.D. (1996). Diterpenoid acids from *Mulinum spinosum*. *Phytochemistry*, 43(5), 1065–1067.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00403-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00403-7).
- Oyarzabal M., Clavijo J., Oakley L., Biganzoli F., Tognetti P., Barberis I., Maturo H., M.,..., León R.J. C. (2018) . Vegetation units of Argentina. *Ecología Austral*, 028 (01).
- Paruelo J.M., Beltrán A., Jobbágy E., Sala O.E., & Gollucio R.A. (1998). The climate of Patagonia: General patterns and controls on biotic processes. *Ecología Austral*, 8, 85–101.
- Peng Y.S., Fang Y.Z., Xu S.Y., & Ge L.S. (1987). The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. *J Invert Pathol*, 49(1), 54–60.
- Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O., & Kunin W.E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol*, 25, 345–353.

- Radoukova T., Zheljazkov V.D., Semerdjieva I., Dincheva I., Stoyanova A., Kac'ániová M., Marković T.; Radanović D., Astatkie T., & Salamon I. (2018). Differences in essential oil yield, composition, and bioactivity of three juniper species from Eastern Europe. *Industrial Crops and Products*, 124, 643–652. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.012>.
- 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., & Van Engelsdorp D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1792–1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>.
- Ramsey S., Gulbranson C., Mowery J.D., Ochoa R., Van Engelsdorp D., & Bauchan G.R. (2018). A Multi-Microscopy Approach to Discover the Feeding Site and Host Tissue Consumed by *Varroa destructor* on Host Honey Bees. *Microsc Microanal*, 24(S1),1258-1259.
- Ravetta D.A., & Soriano, A. (1998). Alternatives for the development of new industrial crops for Patagonia. *Ecologia Austral*, 8, 297-307
- Rinderer T.E., Guzman L.I., Lancaster V.A., Delatte G.T., & Stelzer J.A. (1999). *Varroa* in the mating yard: I. The effects of *Varroa jacobsoni* and Apistan on drone honey bees. *American Bee Journal*, 139 (2), 134-139.
- Ritter W. (1981). *Varroa* disease of the honeybee *Apis mellifera*. *Bee World*, 62, 141-153.
- Rosenkranz P., Aumeier P., & Ziegelmann B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.*,103, S96–S119.
- Ruffinengo S., Eguaras M., Floris I., Faverin C., Bailac P., & Ponzi M. (2005). LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. *J Econ Entomol*, 98(2), 651-655.
- Sammataro D., Untalan P., Guerra F., & Finley J. (2005). The resistance of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *Internat J Acarol*, 31(1), 67–74.
- Sati S.C., & Joshi S. (2010). Antibacterial potential of leaf extracts of *Juniperus communis* L. from Kumaun Himalaya. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4, 1291–1294.

- Schmid-Hempel P. (1995). Parasites and social insects. *Apidologie*, 26, 255–271.
- Senasa (2010) Recomendaciones para el control de varroosis. *Programa de Control de Enfermedades de las Abejas*
- Seoane N.F., Ochoa J., Borrelli L., Severino M.E., Taddeo H., Giraud C., & Andrade Gamboa J. (2011). *Mulimum spinosum* y la carne de cordero: detección de su presencia en ovinos vivos. *Archivos de Zootecnia*, 60, 283-292 Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- SIB. (s.f.) *Mullinum spinosum*. Recuperado de: <https://sib.gob.ar/especies/mullinum-spinosum?tab=info-general>.
- Sulsen V., Guida C., Coussio J., Paveto C., Muschietti L., & Martino V. (2006). In vitro evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine *Parasitology research*. 98, 370–374. Doi: 10.1007/s00436-005-0060-4.
- Teeters B.S., Johnson R.M., Elli M.D. & Siegfried B.D. (2012). Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environ Toxicol Chem*, 31, 1349–1354.
- Universidad de Extracción de Aceites Esenciales (UEAE- IBIES). (2022). Biblioteca de cromatografías.
- Vilarem C., Piou V., Vogelweith F., & Vétillard A. (2021). *Varroa destructor* from the laboratory to the field: Control, biocontrol and IPM perspectives - A Review. *Insects*, 12(9), 800.<https://doi.org/10.3390/insects12090800>.
- Wallner K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30, 235248.
- Williamson S.M., & Wright G.A. (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *J Exp Biol* 216, 1799–1807.
- Winston M.L. (1987). *Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets. <https://www.scribd.com/document/148806748/The-Biology-of-the-Honeybee>.
- Winston M.L. (1998). From where I sit: essays on bees, beekeeping, and science. Cornell University Press. Ithaca. New York.

- Wu J.Y., Anelli C.M., & Sheppard W.S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS One*, 6(2), e14720.
- Xavier V., Finimundy T.C., Heleno S.A., Amaral J.S., Calhelha R.C., Vaz J., Pires T.C.S.P., Mediavilla I., Esteban L.S., & Ferreira I.C. (2021). Chemical and bioactive characterization of the essential oils obtained from three Mediterranean plants. *Molecules*, 26, 7472.
- Zhu W., Schmehl D.R., Mullin C.A., & Frazier J.L. (2014). Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS One*, 9(1), e77547.