

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ACARICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper aduncum* subsp. *ossanum* FRENTE A *Varroa destructor*

O. Pino*, Y. Sánchez*, H. Rodríguez*, T.M. Correa**, J. Demedio***, J.L. Sanabria***

*Grupo de Plagas Agrícolas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: oriel@cenasa.edu.cu; **Laboratorio Anti-Doping, Instituto de Medicina Deportiva (IMD). 100 y Aldabó, Boyeros, Ciudad de La Habana; ***Universidad Agraria de la Habana (UNAH). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

RESUMEN: La varroosis de las abejas constituye uno de los mayores problemas de la apicultura tanto en Cuba como a nivel mundial. Actualmente, se realiza la búsqueda de nuevos métodos que permitan el control del ácaro *Varroa destructor*, agente causal de esta enfermedad, y minimicen el potencial para la aparición de resistencia y la contaminación de los productos de la colmena y el medio ambiente en general. En este contexto el CENSA ha venido investigando un grupo de plantas cubanas como fuente de plaguicidas y el objetivo de este trabajo fue establecer las potencialidades del aceite esencial de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* como candidato para el desarrollo de un nuevo producto para el control de la varroosis. Se evaluó su efecto acaricida por exposición completa y a los vapores. La composición química de este aceite se determinó por CG/EM. El mismo se fraccionó utilizando una columna seca en fase normal, para la identificación de los componentes asociados al efecto biológico. El aceite esencial de *P. aduncum* subsp. *ossanum* demostró que posee un efecto acaricida promisorio y selectivo frente a *V. destructor*. Los componentes mayoritarios del aceite son el canfeno, alcanfor, piperitona y viridiflorol. Al efecto acaricida de los vapores de *P. aduncum* subsp. *ossanum* contribuyen varios de sus componentes volátiles y el efecto por exposición completa está asociado a los terpenoides oxigenados, entre los que son mayoritarios el alcanfor y la piperitona. El aceite esencial de *P. aduncum* subsp. *ossanum* es un candidato promisorio para el desarrollo de un acaricida botánico y podría ser utilizado en un futuro en el contexto de un manejo integrado de la varroosis.

(Palabras clave: *Apis mellifera*; *Piper aduncum* subsp. *ossanum*; plaguicidas botánicos; *Varroa destructor*)

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ACARICIDAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL FROM *Piper aduncum* subsp. *ossanum* AGAINST *Varroa destructor*

ABSTRACT: Varroosis is one of the main problems of apiculture in Cuba and worldwide. Nowadays, new methods are searched to control *Varroa destructor*, causal agent of this disease, minimising the risk of resistance occurrence and the contamination of beehive products and the environment. In this context CENSA has studied a group of Cuban plants as source of pesticides and the aim of this work was to establish the potential of the essential oil from *Piper aduncum* subsp. *ossanum* as a candidate for developing a new product for varroa control. The acaricidal effect was evaluated by vapour and complete exposure. The chemical composition of this oil was determined by GC/MS. The components associated to biological effect were identified fractionating the oil using normal phase dry column chromatography. The essential oil from *Piper aduncum* subsp. *ossanum* showed a selective and promissory effect against varroa. The main components of this oil were camphene, camphor, piperitone and viridiflorol. Several volatile components contributed to the acaricidal activity and the effect by complete exposure was related to oxygenated terpenoids, mainly camphor and piperitone. The essential oil from *Piper aduncum* subsp. *ossanum* is a promissory candidate for developing a botanical acaricide and it can be use in the future as part of varroa integrated management.

(Key words: *Apis mellifera*; *Piper aduncum* subsp. *ossanum*; botanical pesticides; *Varroa destructor*)

INTRODUCCIÓN

La apicultura es una parte importante de la agricultura. La varroosis de las abejas es uno de los mayores problemas de la apicultura a nivel mundial; ocasionado por un ácaro el cual succiona la hemolinfa de las abejas y de sus crías, provoca pérdida de colmenas y afecta la producción de miel. Este ácaro no solo ocasiona daños físicos en las abejas sino que también cataliza el desarrollo de otras infecciones en la colonia. El parásito afecta a los adultos y larvas, se alimenta de los futuros productores de miel, las nuevas generaciones de abejas nacen con deformaciones, debilitadas y frecuentemente no son capaces de volar. La consecuencia final es la muerte de la colonia. Colmenas no tratadas son destruidas por la plaga y de hecho miles de ellas han sido exterminadas en numerosos países por el ataque de este parásito. Por otro lado, las abejas son de gran importancia para la polinización de importantes plantas de cultivo y este problema tiene una repercusión económica negativa por ejemplo en las producciones de hortalizas y frutas (1).

Varroa destructor Anderson & Trueman es sin duda la amenaza más seria a la salud de la abeja a nivel mundial y se convirtió en una preocupación desde el punto de vista económico en Japón y China en los años 1950 y 1960, en Europa a finales de los 1960 y 1970, y en Israel y Norte América en los 1980 (2). En Cuba, este parásito fue diagnosticado en 1996 y es uno de los peores problemas que afectan a la apicultura cubana. En estos momentos se ha extendido a todo el territorio nacional, ocasionando pérdidas millonarias en nuestro segundo renglón exportable. Entre 1996 y 1997 en sólo dos provincias se perdieron más de 10 000 colmenas, mortandad que fue detenida y hoy se estima como promedio anual en un 4% del parque apícola nacional, atribuibles estas muertes no solo directamente al cuadro morbosos causado por el ácaro, sino, a las enfermedades sobreañadidas como consecuencia de la acción expoliadora del parásito (3).

Las estrategias de lucha alternativa contra varroa actualmente aconsejan combinar los tratamientos utilizando compuestos de origen sintético, ácidos orgánicos y aceites esenciales (1, 2, 3). Los acaricidas organosintéticos han sido ampliamente utilizados por su eficacia y facilidad de aplicación; sin embargo, el uso de estos agroquímicos ha conducido en algunos casos al desarrollo de resistencia con la consiguiente pérdida de eficacia en el control (1). Además, el amplio uso de acaricidas sintéticos lipofílicos ha conducido a la acumulación de residuos en la miel, cera y propóleos (1, 2).

Estos problemas han constituido un incentivo poderoso para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento que minimicen el potencial para la aparición de resistencia y la acumulación de residuos en los productos de la colmena. Tanto en Cuba como a nivel mundial, actualmente se realiza la búsqueda de nuevos métodos que permitan el control del ácaro y no afecten a las abejas, o representen una fuente de contaminación a los productos de la colmena y el medio ambiente en general. Entre las alternativas de control se encuentran la introducción de líneas de abejas resistentes al ácaro y el empleo de ácidos orgánicos, extractos vegetales y aceites esenciales (1, 2, 3).

Nuestra rica biodiversidad florística ha sido poco explorada como fuente de acaricidas, permaneciendo sin descubrir nuevas fuentes de materiales comercialmente valiosos. En este contexto, el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria ha venido investigando un grupo de plantas cubanas como fuente de plaguicidas y el objetivo de este trabajo fue establecer las potencialidades del aceite esencial de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui como candidato para el desarrollo de un nuevo producto para el control de la varroosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta del material vegetal y obtención del aceite esencial. Las hojas de *P. aduncum* subsp. *ossanum*, perteneciente a la familia *Piperaceae*, se recolectaron en San José de las Lajas, La Habana; durante el período 2007-2009. La planta se identificó por la Dra. Hildelisa Saralegui Boza del Jardín Botánico Nacional de Cuba. Las hojas frescas y no dañadas se extrajeron por hidrodestilación durante tres horas con equipo Clevenger según lo establecido en la norma ISO 65-71:84 (4). El aceite se secó sobre sulfato de sodio y se almacenó a 8°C. Este aceite es denominado PAOV1. Se calculó el rendimiento del aceite esencial mediante la expresión: $R = (V/M) \times 100$, donde: R: rendimiento (%), V: volumen del aceite esencial (mL) y M: masa del material vegetal (g).

Caracterización físico-química del aceite esencial PAOV1. El aceite PAOV1 se caracterizó determinándose su olor, color, actividad óptica, índice de refracción y densidad. Para la determinación de la actividad óptica se realizaron cinco mediciones utilizando un polarímetro del tipo Cornu, con un error instrumental de $E = 0,05^\circ$ en cubetas de 10 cm, a una temperatura de 20°C. El índice de refracción se determinó mediante un refractómetro de tipo Abbe, con un error de $E = 0,01$, a una temperatura de 20°C. Para la deter-

minación de la densidad se utilizó un volumétrico de 10 mL el cual se pesó en una balanza analítica antes y después de contener el aceite. Se realizaron un total de cinco mediciones.

La composición química del aceite se determinó por CG/EM en un cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890 con un inyector del tipo «split splitless» (relación de split 20:1), acoplado con un espectrómetro de masas de la serie Agilent 05973; ambos provenientes de la firma Agilent Technologies. El espectrómetro de masas trabajó en modo scan de adquisición a 70eV. Se utilizó un analizador cuadrupolar a 150°C de temperatura del cuadrupolo, el detector trabajó en un rango de masas de hasta 800 uma, las temperaturas de la interfase y de la fuente fueron 280°C y 230°C respectivamente. Se utilizó una columna capilar SPB-5 (L=15m, DI=0,25mm, f=0,10mm) con una inyección de 2 mL. La temperatura del horno fue programada: 60°C (2 min isotérmicos), seguido de una rampa de calentamiento hasta 100°C a razón de 4°C.min⁻¹, otra rampa de 10°C min⁻¹ desde 100 °C hasta 250 °C donde finalmente permaneció durante 5 min isotérmicos. Se utilizó Helio como gas portador con un flujo constante de 1,0 mL min⁻¹. La identificación de los compuestos se realizó mediante el uso combinado de las bases de datos automatizadas NBS-NISTASCI y Wiley 275 y el Atlas Registry of Mass Spectra Data (6).

Evaluación de la actividad acaricida a nivel de laboratorio. Se evaluó la actividad acaricida por contacto del candidato PAOV1 por el método de exposición completa en placa Petri (5) y el efecto de los componentes volátiles por dos métodos, uno en placa Petri y otro en cajas plásticas. Las colmenas utilizadas para la realización de todos los ensayos biológicos procedían del apiario experimental de la Unidad Docente de Nazareno, pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria-Zootecnia de la Universidad Agraria de La Habana (UNAH). Estas colmenas se mantienen sin tratamiento químico.

Evaluación de la actividad acaricida de PAOV1 por exposición completa. Para evaluar el efecto acaricida como resultado de una exposición completa al producto, se utilizó el método de la placa Petri desarrollado por Lindberg *et al.* (5). Se seleccionaron colmenas con altos índices de infestación y panales de cría de obreras próximos a nacer. Estos se extrajeron de las colmenas y en el laboratorio se seleccionaron las abejas recién nacidas infestadas; por último se colocaron en placas Petri (seis abejas como mínimo). Se evaluaron diferentes dosis del aceite esencial PAOV1 (5, 25, 125 µL.placa⁻¹) disueltas en 2mL de acetona. Se utilizó un control no tratado y uno con acetona (2mL). En

cada caso se colocaron cuatro placas Petri por réplica y el experimento se repitió tres veces. Se registró la mortalidad a las 24, 48 y 72 horas.

Evaluación de la actividad acaricida de los componentes volátiles de PAOV1 en placas Petri. Hembras adultas de *V. destructor* se extrajeron de celdas de panales de crías de zánganos próximos a nacer y se pegaron por la parte dorsal sobre una cinta adhesiva de doble cara, colocada previamente sobre un portaobjeto. Para evaluar el efecto de los vapores de muestras volátiles (aceite esencial y fracciones) se colocó un portaobjeto con 25 ácaros dentro de la placa Petri y la muestra se aplicó uniformemente en el fondo de la placa sobre un papel de filtro (25 µL disueltos en 2 mL de acetona en cada placa). Se empleó un control no tratado y un control con acetona (2 mL). En cada caso se ubicaron dos placas (réplicas de 25 ácaros por portaobjeto cada una). En todos los casos se evaluó la sobrevivencia de los ácaros a las 24 horas de comenzado el experimento y se calcularon los porcentajes de mortalidad.

Evaluación de la actividad acaricida de los componentes volátiles de PAOV1 en cajas plásticas. La evaluación de la actividad acaricida de los vapores del candidato PAOV1 con los ácaros y las abejas en cajas plásticas se realizó utilizando diferentes mezclas de aceite (mL):zeolita (g): 1:6, 2:6, 3:6, 4:6, 16:6 y 0:6 (control). En cada caja se colocaron 50 abejas aproximadamente y 25 ácaros. Se ubicaron las cajas en estufas con un grado de hermeticidad apropiado, a una temperatura de 29°C. En cada estufa se ubicaron 4 cajas (réplicas) con la misma dosis de aceite y se emplearon 200 abejas y 100 ácaros en total. Después de 72 horas de exposición se contó el número de ácaros y abejas muertas.

Análisis Estadístico: En cada bioensayo se realizó una comparación múltiple de proporciones (p<0,05), empleando el Sistema de Comparación de Proporciones Versión 2.1, Software CENSASOFT 1998.

Fraccionamiento del aceite PAOV1. PAOV1 se sometió a un fraccionamiento, empleando cromatografía de columna seca, para la identificación de los componentes del aceite asociados al efecto biológico. El aceite esencial (1 mL) fue fraccionado usando una columna seca de Silica Gel H (15 g) empaquetada en un embudo con frita (porosidad 3, diámetro 40 mm). Como fase móvil se utilizaron combinaciones de hexano y acetato de etilo de polaridad creciente, comenzando por hexano (100 %), acetato de etilo / hexano (25:75, 50:50; 75:25, v/v) hasta acetato de etilo (100 %); sistema de fase móvil óptimo para lograr un perfil de separación de los componentes del aceite según

análisis de Cromatografía de Capa Delgada anterior, finalmente la columna se lavó con metanol. Se colectaron un total de seis fracciones de 15 mL cada una y estas fracciones se secaron por separado. F1 (0,0228 g, 3,75 %), F2 (0,1287 g, 21,16%), F3 (0,0858 g, 14,10 %), F4 (0,2737 g, 44,99 %), F5 (0,0953 g, 15,67 %), F6 (0,002 g, 0,33%). La composición química de las fracciones se analizó por CG/EM, empleando iguales condiciones que para PAOV1. Para determinar su actividad acaricida por exposición completa y el efecto de los vapores en placas Petri se emplearon las soluciones obtenidas al disolver por separado los residuos correspondientes a cada fracción en el mismo volumen de acetona.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de PAOV1 como candidato para el desarrollo de un nuevo producto para el control de la varroosis se basó en tres aspectos: a) su naturaleza química, PAOV1 es un aceite esencial y este tipo de producto natural es empleado como ingrediente activo en acaricidas comerciales utilizados para el control de varroa, b) este candidato mostró actividad acaricida relevante frente a ácaros plaga en cítricos, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio y c) existen múltiples antecedentes de actividad biológica en especies del género *Piper* ricas en aceites esenciales (7).

El aceite esencial extraído de las hojas de *P. aduncum* subsp. *ossanum*, tiene un olor penetrante, característico y un color amarillo claro, es dextrógiro con un ángulo de giro $q(20^{\circ}\text{C})=(28,50\pm 0,05)^{\circ}$, con un índice de refracción a 20°C de $1,473\pm 0,001$ y una densidad a esta misma temperatura de $0,87\text{ kg}\cdot\text{L}^{-1}$. El rendimiento del aceite fue de 0,56 %. En nuestro país, se informó anteriormente la obtención del aceite esencial de *P. aduncum* con un rendimiento de 0,96% (8). Las diferencias pueden estar dadas, fundamentalmente, por el lugar de recolecta de la muestra (Pinar del Río), la edad, el estado fenológico de la planta y la variedad empleada para el análisis, el modo de manejo del material vegetal, en este caso seco, y el tiempo de extracción (5 horas).

La figura 1 muestra el perfil cromatográfico obtenido por CG de los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial. Los componentes mayoritarios fueron el canfeno, alcanfor, piperitona y el viridiflorol (Fig. 2).

En la literatura se encuentran numerosos estudios acerca de la identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *P. aduncum*, recolectada en diferentes localizaciones geográficas. Trabajos realizados en Islas Fiji, Brasil, Panamá, Colombia, Cuba, Costa Rica, Ecuador y Papua Nueva Guinea, coinciden en la identificación del dilapiol como com-

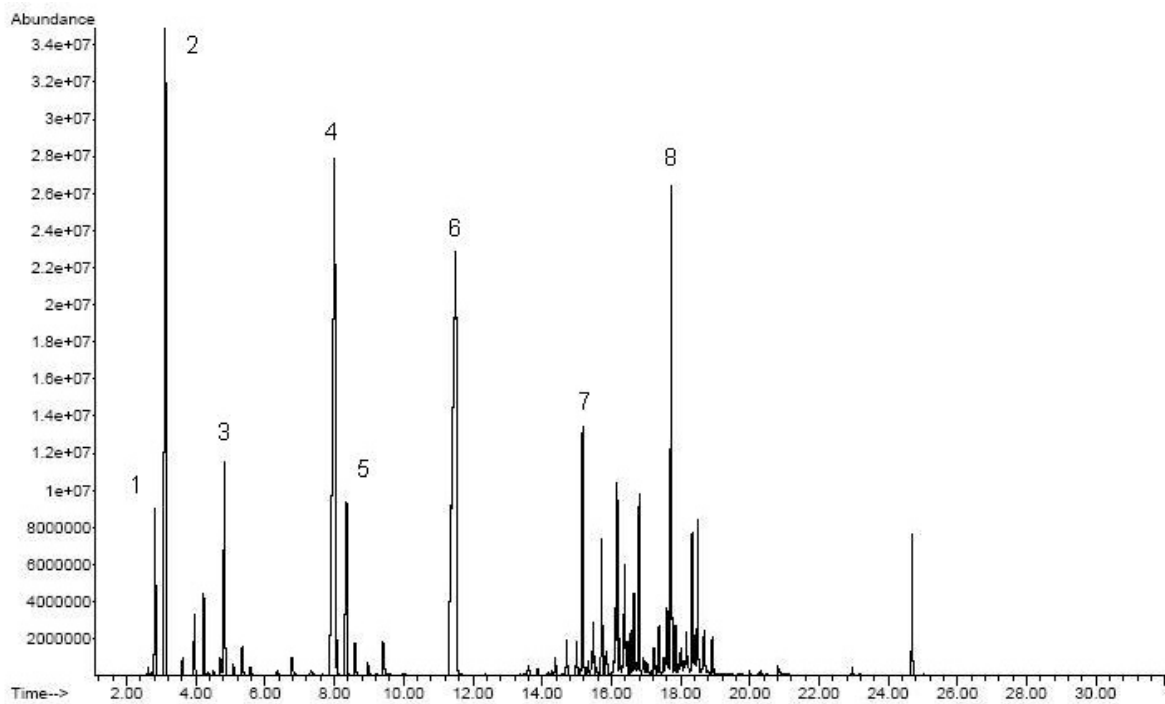


FIGURA 1. Cromatograma por CG/EM del aceite esencial de las hojas de *Piper aduncum* subsp. *ossanum*./ *GC/MS chromatogram of the essential oil from Piper aduncum subsp. ossanum leaves.*

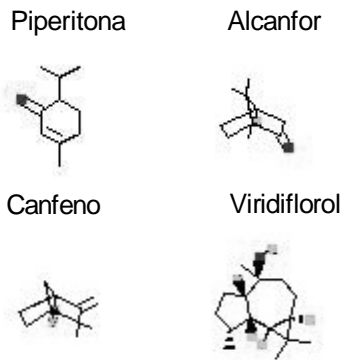


FIGURA 2. Estructuras de los principales componentes del aceite esencial de las hojas de *Piper aduncum* subsp. *ossanum*./ Structures of the main components of the essential oil from *Piper aduncum* subsp. *ossanum* leaves.

ponente mayoritario (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), oscilando su abundancia relativa entre un 25,8 (16) y un 90 % (11). Las variaciones en el contenido de este compuesto se informan entre variedades (10) y localidades de un mismo país (13). Gottlieb *et al.* (10) estudiaron los componentes principales de las variedades brasileñas *P. aduncum* var. *aduncum* y *P. aduncum* var. *cordulatum* encontrando 74,5% y 88,4% de dilapiol respectivamente y trazas de alcanfor en la primera. Ciccío y Ballesteró (13) obtuvieron que la composición de los aceites esenciales de *P. aduncum* recolectada en dos localidades de Costa Rica era diferente: dilapiol (32,9-61,8%), piperitona (2,2-13,5%), 1,8-cineol (0,1-8,6%), 4-terpineol (1,6-5,4%) y el α -cariofileno (4,0-5,3%).

En contraste, Tirillini *et al.* (18), analizaron por CG/EM el aceite esencial de *P. aduncum*, y el alcanfor y el canfeno fueron los principales constituyentes. Vila *et al.* (19) informaron un alto contenido de sesquiterpenos en muestras provenientes de Panamá, con α -cariofileno y aromadendreno como componentes mayoritarios, mientras que las muestras bolivianas estuvieron compuestas predominantemente por monoterpenos, con el 1,8-cineol como componente principal.

Aunque la mayoría de las investigaciones relacionadas con la composición química del aceite esencial de *P. aduncum* coinciden con la presencia mayoritaria de dilapiol, este fenilpropanoide no se identificó entre los componentes con mayor abundancia relativa en el aceite PAOV1. Los resultados de nuestro trabajo confirman los presentados por otros autores en cuanto a la presencia de piperitona (9; 12, 13, 15), alcanfor y canfeno como componentes mayoritarios en el aceite esencial de *P. aduncum* (18).

Las discrepancias relacionadas con la composición del aceite, cambios cualitativos y cuantitativos (canti-

dades relativas obtenidas de diferentes componentes), pueden ser consecuencia de variaciones en las condiciones ecológicas (clima, tipo de suelo, estación del año, lugar geográfico) en que se desarrolla la planta (20, 21, 22). En la mayoría de los trabajos sobre la especie se le nombra sin especificar si se trata de una subespecie o variedad, el aceite estudiado (PAOV1) es obtenido a partir de *P. aduncum* subsp. *ossanum*, una especie endémica en Cuba occidental (23), y es probable que las causas de las diferencias en su composición química estén asociadas a factores genéticos y ambientales que conlleven a variaciones en la biosíntesis de metabolitos secundarios en esta subespecie.

La evaluación del efecto por exposición completa del aceite PAOV1 demostró que con una dosis de 25 μ L por placa se provoca selectivamente la muerte de los ácaros y las abejas no son afectadas (Tabla 1). El efecto acaricida de esta dosis de PAOV1 se evidenció a las 24 horas. La sobrevivencia de las abejas fue evaluada hasta las 72 horas y no se observaron diferencias significativas con el control.

TABLA 1. Actividad de PAOV1 frente a *Varroa destructor* y *Apis mellifera*./ Activity of PAOV1 against *Varroa destructor* and *Apis mellifera*

Dosis PAOV1 (μ L)	Mort. Abejas (%)	Mort. Ácaros (%)
5	7 ^b	28 ^b
25	8 ^b	100 ^a
125	100 ^a	100 ^a
Control	6 ^b	0 ^c

Porcentajes seguidos de letras iguales no difieren significativamente ($p < 0,05$)

No se habían realizado estudios de este tipo utilizando aceite de *P. aduncum* subsp. *ossanum*, por lo que no se cuenta con datos sobre el tipo de efecto que puede inducir sobre varroa. El efecto producido por PAOV1 puede deberse a la acción de los componentes del aceite por contacto o por ingestión; y/o puede ser el resultado de la exposición a sus vapores (componentes más volátiles).

Entre las alternativas para el control de la varroosis están a disposición del apicultor diferentes productos basados en aceites esenciales como el ApilifeVar, ThymoVar y Apiguard; cuyo efecto acaricida se relaciona con la acción de los componentes volátiles de los aceites esenciales que constituyen los ingredientes activos de estas formulaciones comerciales (1, 24).

Por ello, se procedió a determinar el efecto acaricida de los componentes volátiles de PAOV1. Imdorf *et al.* (24) informan que aunque se han estudiado más de 150 aceites esenciales y sus componentes para determinar su efecto frente a varroa, únicamente unos pocos han demostrado ser efectivos al ser evaluados en colmenas; y plantean que esto puede deberse a la insuficiente capacidad de los ensayos a nivel de laboratorio para predecir los efectos en condiciones de campo. Consecuentemente, la acción de los vapores de PAOV1 se estudió empleando dos diseños: placas Petri y cajas plásticas, este último permiten simular con mayor aproximación las condiciones prácticas en las colmenas.

Los resultados de la evaluación de la actividad acaricida de los vapores del aceite esencial en placas Petri (Tabla 2) y cajas plásticas (Tabla 3), evidenciaron que los componentes volátiles de PAOV1 poseen un efecto acaricida promisorio frente a *V. destructor*, que se constató en ambos experimentos.

TABLA 2. Actividad acaricida de los vapores de PAOV1 en placas Petri./ *Acaricidal activity of PAOV1 vapours in Petri dish*

Tratamiento	Mort varroa (%)
25µL PAOV1	100 a
Control Acetona	7.84 b
Control -	5.88 b

Porcentajes seguidos de letras iguales no difieren significativamente ($p < 0,05$)

TABLA 3. Actividad acaricida de los vapores de PAOV1 en cajas plásticas./ *Acaricidal activity of PAOV1 vapours in plastic boxes*

Dosis aceite(mL):zeolita(g)	Mort. abejas (%)	Mort. ácaros (%)
1:6	6 ^b	32 ^c
2:6	6 ^b	40 ^c
3:6	8 ^b	56 ^{bc}
4:6	10 ^b	76 ^b
16:6	100 ^a	100 ^a
0:6	3 ^b	8 ^d

Porcentajes seguidos de letras iguales no difieren significativamente ($p < 0,05$)

PAOV1 demostró que posee un efecto acaricida promisorio y selectivo frente a varroa por el método de exposición completa y por la evaluación del efecto de sus componentes volátiles, resultados que indican la combinación de un efecto tóxico por contacto e inhalación.

La actividad acaricida de una sustancia debido a la exposición completa a la misma, puede estar asociada a la toxicidad por contacto directo, inhalación y/o ingestión de dicha sustancia. Se plantea, que el efecto acaricida de los aceites esenciales frente a *V. destructor* está asociado en gran parte a la actividad de los vapores de estas sustancias volátiles (24), pero no se excluye que la toxicidad de los componentes de estas mezclas naturales se produzca por contacto directo y/o ingestión. De hecho se plantea que los tratamientos donde se aplica timol solo por evaporación no resultan suficientemente efectivos y es necesario que la abeja entre en contacto con el principio activo para que el tratamiento sea eficaz (2).

Imdorf *et al.* (24) plantean que un aceite esencial con una eficacia acaricida mayor del 70% a nivel de laboratorio puede ser considerado como un buen punto de partida para el desarrollo de varroicidas basados en este tipo de compuestos. PAOV1, por su efecto acaricida promisorio y selectivo frente a varroa se sometió a estudios químicos más profundos encaminados a la identificación de el(los) componente(s) asociado(s) a la actividad biológica. En la Tabla 4 se presentan los resultados de la evaluación de la actividad biológica de las fracciones del aceite.

TABLA 4. Actividad acaricida de las fracciones de PAOV1./ *Acaricidal activity of fractions from PAOV1*

Tratamiento	Mort. Exposición Completa (%)	Mort. Vapores (%)
F1	8,7c	6,0 b
F2	50,0b	11,8 b
F3	25,0 bc	5,8 b
F4	78,1 a	7,8 b
F5	13,6 c	14,0 b
F6	4,3 cd	2,0 c
PAOV1 50 µL	97,5a	100,0 a
Control -	0,0 d	5,9 b
Control Acetona	9,5 c	7,8 b

Porcentajes seguidos de letras iguales no difieren significativamente ($p < 0,05$)

La evaluación del efecto de los vapores de las fracciones evidenció una disminución de la actividad de todas ellas, en comparación con la actividad de los vapores del volumen correspondiente del aceite. Estos resultados indican que para producir los elevados niveles de mortalidad de los ácaros obtenidos con PAOV1 es necesario el empleo de la mezcla natural de compuestos que tributa a la proporción y concentración en fase gaseosa de los componentes bioactivos requerida y se puede inferir la posible existencia de un efecto sinérgico

entre los componentes más volátiles del aceite, que más aportan a su composición en fase de vapor.

Los mayores valores de mortalidad se obtuvieron por exposición completa y correspondieron a las fracciones F2, F3 y F4 ($F4 > F2 > F3$), lo que señala que el efecto acaricida de PAOV1 no es ejercido exclusivamente por inhalación. Solo la fracción F4 produjo una mortalidad superior al 70% similar al aceite total. Esto puede atribuirse a que en F4 se encuentran los componentes que dentro de la mezcla del aceite PAOV1 están asociados al efecto acaricida.

El análisis por CG/EM de las fracciones obtenidas a partir de PAOV1 (Figura 3) evidenció que F1, F2 y F3 están constituidas fundamentalmente por hidrocarburos monoterpenicos (HM) y sesquiterpenicos (HS); mientras que, en F4 y F5 predominan los terpenos oxigenados (TO). En F6 se encuentran terpenoides oxigenados y sesquiterpenoides, esta fracción se obtiene del lavado de la columna con metanol, disolvente de mayor fortaleza de elución, y solo representa el 0,3% del total del aceite. La segunda y tercera fracciones son muy similares cualitativamente, solo se diferencian en cuanto a la abundancia relativa de compuestos como el α -pineno y el canfeno en la fracción F2 (10,8 y 31,7 %, respectivamente) y F3 (3,7 y 19,7%).

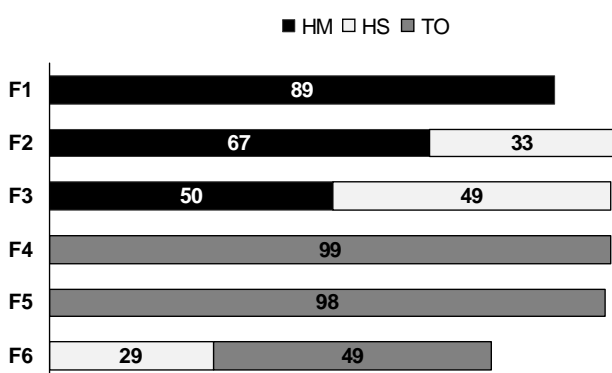


FIGURA 3. Composición química de las fracciones de PAOV1./ *Chemical composition of PAOV1 fractions.*

La composición de la fracción bioactiva F4 (45% (p/p) del aceite) se caracteriza por el predominio de terpenos oxigenados dentro de ellos las cetonas y alcoholes representan el 68 y 30% respectivamente (Tabla 5). Las cetonas monoterpenicas alcanfor (cetona bicíclica) y piperitona (cetona monocíclica) son los componentes mayoritarios de la fracción 4. La piperitona posee actividad antimicrobiana, antialimentaria e insecticida (25, 26, 27, 28), pero no existen antecedentes de su efecto frente al ácaro en estudio El alcanfor posee actividad acaricida frente a

varroa (24) y a su presencia en el aceite de *Piper aduncum* subsp *ossanum* se le podría atribuir parte de la actividad acaricida de este aceite.

TABLA 5. Composición química de la fracción F4 del aceite PAOV1./ *Chemical composition of F4 fraction from PAOV1*

Pico	tr (min)	Compuestos	%
1	8,0	Alcanfor	36,0
2	8,0	Exo-metil-canfenilol	1,2
3	8,3	Isoborneol	9,8
4	8,5	L-borneol	1,9
5	9,3	alfa-terpineol	2,2
6	11,5	Piperitona	32,1
7	17,5	Globulol	1,4
8	17,7	Viridiflorol	8,9
9	18,3	Torreyol	2,8
10	18,4	Murolol	2,3
11	24,6	NI	1,4

Se conoce que en la mayoría de los aceites esenciales extraídos de las plantas, son precisamente los constituyentes oxigenados y no los hidrocarburos los responsables de la acción biológica (29, 30). Por ejemplo, el análisis realizado a 63 aceites esenciales aislados de plantas bolivianas con propiedades insecticidas, mostró que los componentes principales de esos aceites esenciales eran alcoholes, cetonas, ésteres, éteres y epóxidos de 10 y 15 átomos de carbono; entre ellos se determinó la presencia de piperitona. En el estudio mencionado este compuesto formaba parte de aceites esenciales con una elevada actividad larvicida y ovicida frente a *Triatoma infestans* Klug (Orden: Hemiptera) (28).

En otras investigaciones realizadas con el objetivo de establecer la relación entre la estructura química de algunos monoterpenos y su actividad acaricida frente a *Psoroptes cuniculi* Delafond (Orden: Acarina), se evidenció que la presencia de grupos hidroxílicos y fenólicos libres en los monoterpenos se correspondía con las mejores actividades acaricidas, que aquellos compuestos donde la función oxigenada estaba bloqueada (por ejemplo esterificada) sólo provocaban una baja susceptibilidad y que los hidrocarburos simples eran totalmente inactivos (31).

Otros estudios realizados para establecer la relación entre la resistencia a la infección con *Verticillium dahliae* Kleb. (Orden: Hypocreales) de especies de algodón y su contenido de sesquiterpenos, se observó que la fungoresistencia a la infección de las distintas variedades de esta planta no estaba directamente re-

lacionada con el contenido de los cuatro sesquiterpenos fundamentales encontrados, sino con la capacidad de cada especie de convertir estos sesquiterpenos en derivados oxigenados, con acción biológica potente, mediante desmetilación e introducción de grupos hidroxilo (32).

Tomando en consideración estos antecedentes se puede relacionar la acción acaricida frente a varroa por exposición completa de PAOV1 a sus componentes oxigenados y la mayor contribución a este efecto al alcanfor y la piperitona. La identificación de los componentes del aceite esencial asociados al efecto acaricida resulta de gran importancia para establecer los indicadores de calidad de la materia prima, el proceso de obtención y el acaricida comercial, que podría desarrollarse a partir de PAOV1.

Varroa destructor provoca situaciones de gran gravedad y produce enormes pérdidas y su control ya no puede estar limitado al tratamiento químico con un producto en particular. La aparición de resistencia y residuos en los productos de la colmena agrava esta situación. Hoy ya no es posible asumir el control de varroa mediante el uso de un solo principio activo pues de esta forma el problema se recrudece, ya no debe pensarse en el acaricida «mágico» como solución (2). Se debe promover programa de manejo integrado de plagas basado en monitoreos periódicos de las poblaciones de parásitos, la rotación de plaguicidas de diferente naturaleza química y modo de acción y diferentes metodologías de manejo de la colonia (1, 2, 3, 33, 34).

En el contexto de la implementación de un programa de manejo integrado para el control de *V. destructor*, dirigido a mantener las poblaciones del ácaro por debajo del nivel de daño económico, que debe adaptarse a las condiciones locales y encaminarse a disminuir el riesgo de aparición de resistencia y de contaminación; alcanza gran relevancia la aplicación alternada de acaricidas con distintos modos de acción y la sustitución de productos sintéticos por otros naturales. Los aceites esenciales y/o sus componentes, por conjugar características como buena eficacia, amplio espectro de acción, baja residualidad y toxicidad, así como elevada disponibilidad general, representan un grupo de productos naturales que emergen como una alternativa importante dentro del manejo de este ácaro y otras enfermedades apícolas. El aceite esencial de *P. aduncum* subsp. *ossanum* es un candidato promisorio para el desarrollo de un acaricida botánico y podría ser utilizado en un futuro en el contexto de un manejo integrado de varroa.

REFERENCIAS

1. Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. J of Invert Pathol. 2010;103:96-119.
2. Eguaras MJ, Ruffinengo SR. Estrategias para el control de varroa. 2^{da} ed. Mar del Plata: Argentina; 2008.
3. Verde M, Chan S. Estrategia de lucha integrada para el control de varroa: Resultados y experiencia cubana. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. 2005;VI(10) Octubre.
4. International Standardization Organization. ISO 6571. Spices, condiments and herbs- Determination of volatile oil content. 1984. (Norma ISO).
5. Lindberg GD, Melaenophalus H, Winston M. Laboratory Evaluation of Miticides to Control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a Honey Bee (*Hymenoptera: Apidae*) Parasite. J Econ Entomol. 2000;93(2):189-98.
6. Stenhagen E, Abrahamsson S, McLafferty FW. Atlas Registry of Mass Spectra Data. 1974.
7. Celis Á, Mendoza C, Pachón M, Cardona J, Delgado W, Cuca LE. Plant extracts used as biocontrol with emphasis on *Piperaceae* family. A review. Agron Colomb. 2008;26(1): 97-106.
8. Pino JA, Marbot R, Bello A, Urquiola A. Essential oils of *Piper peltata* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. J Essent Oil Res. 2004;16:124-26.
9. Smith RM, Kassim H. The essential oil of *Piper aduncum* from Fiji. New Zealand. J. Crop Hort. Sci. 1979; 22: 127-128.
10. Gottlieb OR, Koketsum M, Magalhaes MT, Maia JGS, Mendez PH, da Rocha AI, da et al. Óleos essenciais da Amazônia VII. Acta Amazônica 11. 1981;143-148
11. Gupta MP, Arias TD, Smith RM. The composition of the essential oil of *Piper aduncum* L. from Panamá. Rev Latinoamer Quím. 1983;14:36-37.
12. Díaz PP, Maldonado E, Ospina E. Aceite esencial de *Piper aduncum* L. Rev Latinoamer Quím. 1984;15:136-38.

13. Ciccio JF, Ballester CM. Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de *Piper aduncum* (*Piperaceae*) de Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 1997;45:35-38.
14. Guerrini A, Sacchetti G, Rossi D, Paganetto G, Muzzoli EAM, Tognolini M, *et al.* Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (*Piperaceae*) essential oils from Eastern Ecuador. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009;27(1):39-48.
15. Rali T, Wossa SW, Leach DN, Waterman PG. Volatile Chemical Constituents of *Piper aduncum* L and *Piper gibbilimum* C. DC (*Piperaceae*) from Papua New Guinea. *Molecules.* 2007;12:389-394.
16. Bottia EJ, Díaz OL, Mendivelso DL, Martínez JR, Stashenko EE. Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia *Piperaceae* obtenidos por destilación-extracción simultánea. *Scientia Et Technica.* 2007; XIII(33):193-95.
17. Rafael MS, Hereira-Rojas WJ, Roper JJ, Nunomura SM, Tadei WP. Potential control of *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*) with *Piper aduncum* L. (*Piperaceae*) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genetics and Molecular Research* 2008;7(3):772-781.
18. Tirillini B, Velásquez ER, Pellegrino R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. *Planta Med.* 1996; 62 (4): 372-373.
19. Vila R, Tomi F, Mundina M, Santana AI, Solis PN, López Acre J B, *et al.* Unusual composition of the essential oils from the leaves of *Piper aduncum*. *Flav Frag J.* 2005;20:67-69.
20. Barton AFM, Tjandra J, Nicholas PG. Chemical evaluation of volatile oils in *Eucalyptus* Species. *J Agric Food Chem.* 1989;7:1253-1257.
21. Song Q, Gómez-Barrios ML, Fronczek FR, Vargas D, Thien LB, Fischer NH. Sesquiterpenes from southern *Magnolia virginiana*. *Phytochemistry.* 1998;47(2):221-226
22. Durán DC, Monsalve LA, Martínez JR, Stashenko EE. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Scientia et Technica.* 2007;33:435-437.
23. Saralegui BH. Flora de la República de Cuba. *Piperaceae.* 2004; Fascículo 9(3):1-5.
24. Imdorf A, Bogdanov S, Kilchenmann V, Berger T. Toxic effects of essential oils and some of their components on *Varroa destructor* (Oud.) and *Apis mellifera* L. under laboratory conditions. *ALP Science.* 2006;495:1-18.
25. Saleh MA, Belal MH, El-Baroty G. Fungicidal activity of *Artemisia herba alba* Asso (*Asteraceae*). *J. Environ. Sci. Health.* 2006;41(3):237-244.
26. Abdelgaleil SAM, Abbassy MA, Belal ASH, Abdel Rasoul MAA. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. *Bioresour. Technol.* 2008;99(13):5947-5950.
27. Ketoh GK, Koumaglo HK, Glitho IA, Huignard J. Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia.* 2006;77(7-8):506-10.
28. Dominique L, Vilaseca A, Chantraine JM, Ballivian C, Saavedra G, Ibañez R. Insecticidal Activity of Essential Oils on *Triatoma infestans*. *Phytotherapy Res.* 1997;11:285-289.
29. Maguna FP, Romero AM, Garro OA, Okulik NB. Actividad antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet). Facultad de Agroindustrias, UNNE, Argentina. 2006. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf>. (Consultado. 9 oct 2008).
30. Bosnic T, Softic D, Grujic Vasic J. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils and Major Constituents of Essential Oils. *Acta Medica Academica.* 2006;35:19-22
31. Pérez GMC, González GMC, Gonzáles CMP. Structure/Activity relationship of some natural monoterpenes as acaricides against *Psoroptes cuniculi*. *J of Nat Prod.* 2001;58(8):1261-1264.

32. Garas, N.A.; Weiss, A.C. Differential Accumulation and distribution of antifungal sesquiterpenoids in Cotton Steams Inoculated with *Verticillium dahliae*. *Physiol. Biochem.* 1986; 76 (10):1011-1017.
33. May-Itzá WJ, Medina Medina LA, Marrufo Olivares JC. Eficacia de un gel a base de timol en el control del ácaro *Varroa destructor* que infesta colonias de abejas *Apis mellifera* bajo condiciones tropicales en Yucatán, México. *Vet. Méx.* 2007;38(1):1-8.
34. Espinosa Montaña LG, Guzmán-Novoa Eficacia de dos acaricidas naturales, ácido fórmico y timol, para el control del ácaro *Varroa destructor* de las abejas (*Apis mellifera* L.) en Yucatán, México. *Vet Méx.* 2007;38(1):1-8.
35. Le Conte Y. The fight against *Varroa destructor* - Honey bee parasite – Integrated varroa management. Bertrand S, Kreiter S, McCoy KD, Migeon A, Navajas M, Tixier MS, Vial L. editores. *Integrative Acarology Proceedings of the 6th European Congress*; 2008 July 21-25; Montpellier, France: Springer; 2008.

(Recibido 13-11-2010; Aceptado 1-2-2011)