

UNIVERSIDAD NACIONAL

**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO (SEPUNA)
CENTRO DE INVESTIGACIONES APÍCOLAS TROPICALES (CINAT)
MAESTRÍA EN APICULTURA TROPICAL (MAT)**

**EVALUACIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE ÁCIDO FÓRMICO EN GEL PARA EL CONTROL DEL
ÁCARO VARROA (*Varroa destructor* Anderson & Truemann) EN COLMENAS DE ABEJAS
AFRICANIZADAS**

Nicolás Feoli Matamoros

Heredia, Costa Rica

Agosto de 2017

**Trabajo presentado para optar al grado de Máster en Apicultura Tropical. Cumple con
los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad
Nacional.**

Heredia. Costa Rica

Tutores:

PhD. Johan van Veen Marinissen

M.Sc. Eduardo Umaña Rojas

Asesores:

Lic. Marianyela Ramírez Montero

M.Sc. Eduardo Umaña Rojas

Dr. Rafael Calderón Fallas

M.Sc. José Fernando Ramírez Arias

**Este trabajo se realizó bajo el auspicio del Centro de Investigaciones
Apícolas Tropicales (CINAT), de la Universidad Nacional**

Agradecimientos

Al Ph.D. Johan van Veen por la dirección que le ha brindado a este trabajo, y sus excelentes consejos.

Al M.Sc. Eduardo Umaña, por todo su tiempo y los recursos que tan desinteresadamente me ha ofrecido para la realización del presente trabajo

A Guillermo Ramírez y al M.Sc. Fernando Ramírez por brindarme su ayuda en las giras al campo y por esa su ya característica inmejorable disposición a ayudar.

La M.Sc. Luis Sánchez, por sus acertadas observaciones que permitieron pulir el trabajo.

Al Ph.D. Rafael A. Calderón por todo el “apadrine” en este proceso.

A Beatriz Zepeda y Karla Barquero, por ser excelentes amigas tanto dentro del CINAT, como en las múltiples ocasiones de esparcimiento que tuvimos. Ustedes realmente han sido personas formidables.

A Marianyela Ramírez, por su valioso tiempo que ha dedicado a este trabajo y la amistad que forjamos durante el proceso.

A la Lic. Paula Sanabria, por su valioso tiempo y paciencia al revisar el formato del trabajo y sus referencias bibliográficas.

A Natalia Fallas y Eduardo Herrera, por su valiosa amistad.

A mis hermanas y hermano, por siempre estar allí.

A mi esposa Karla Rodríguez por su apoyo incondicional.

A mis padres también por todo cuanto han dado y hecho por mí.

Dedicatoria

A mi niña, Angélica Isabel

A mi esposa, Karlita

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
La abeja melífera y su importancia económica	2
Amenazas actuales para la abeja, el caso de Varroa destructor.	2
El ácido fórmico como opción para el control de infestaciones de V. destructor en colonias de A. mellífera.	3
Algunos ensayos previos realizados bajo condiciones tropicales	4
Limitaciones de los ensayos.....	5
Ensayo preliminar.....	5
Justificación.....	6
OBJETIVOS	7
Objetivo General.....	7
Objetivos específicos.....	7
Hipótesis	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
CONCLUSIONES.....	19
RECOMENDACIONES.....	20
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Cálculo de la tasa de evaporación del ácido fórmico.....	8
Figura 2 Cálculo de la concentración de ácido fórmico en muestras de gel, mediante titulación.....	9
Figura 3 Cálculo de la eficacia acaricida.....	9
Figura 4 Grado de infestación inicial de cada colmena, según número de fondo y tratamiento.....	11
Figura 5 Promedio del porcentaje acumulado de ácaros caídos por efecto del ácido fórmico, según día y tratamiento.....	12
Figura 6 Proporción media de ácaros caídos por efecto del ácido fórmico respecto al efecto del fluvalinato.....	13
Figura 7 Prueba estadística Kruskal Wallis para la variable de eficacia acaricida según tratamiento.....	15
Figura 8 Gráfico de cajas para el efecto acaricida según tratamiento.....	16

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resumen de medidas estadísticas descriptivas.....	13
Tabla 2 Prueba T para una media, valor propuesto 60 % de efectividad acaricida.....	14
Tabla 3 Temperatura y humedad relativa registrada en cada apiario.....	15

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AC AF:	Ácaros caídos por efecto del ácido fórmico
AF:	Ácido fórmico
Conc:	Concentración
Conc i:	Concentración inicial
Conc f:	Concencración final
CV:	Coefficiente de variación
D.E.:	Desviación estándar
Ef:	Eficacia
Ef Ac:	Eficacia acaricida
Fluv:	Fluvalinato
H:	Valor H
HCOOH:	Ácido fórmico
HR:	Humedad relativa
LI:	Límite inferior
LS:	Límite superior
Max:	Máximo
Min:	Mínimo
N:	Tamaño de muestra
m. muestra:	Masa de muestra
p:	Valor p
PM:	Peso molecular
T:	Valor T
T1:	Tratamiento 1
T2:	Tratamiento 2
T3:	Tratamiento 3

Temp: Temperatura
USDA: United States Department of Agriculture
Σ AC: Sumatoria de ácaros caídos.

RESUMEN

Se probaron tres tratamientos a base de ácido fórmico en gel al 65 % (v/v) para el control de *Varroa destructor* en colmenas de abejas *Apis mellifera*. El producto se suministró en bolsas de polietileno de 100 g cada una, las cuales permanecieron en las colmenas por espacio de dos semanas. Éstas fueron perforadas a razón de 7,96 cm² en seis agujeros de 1,3 cm de diámetro y cubiertas con cinta microporo para regular su evaporación. Los tratamientos 1 (control), 2 y 3 consistieron en 0 g/colmena, 100 g/colmena y 200 g/colmena, respectivamente. Solamente T3 logró una eficacia acaricida significativamente distinta del control (Kruskal Wallis, $p < 0.05$), pero no lo hizo así con respecto a T2 ($p > 0.05$) ($\mu_1 = 30,15$ $\mu_2 = 31,95$ $\mu_3 = 55,02$).

Se midió la evaporación del ácido fórmico, por medio de la diferencia de su concentración en el gel remanente, respecto al nivel inicial previamente medido de 14,55 mmol/g. Dicha concentración se determinó mediante la titulación del gel con NaOH, obteniéndose que en promedio se perdiera 7,64 mmol/g, lo cual representa un 52,52 % del ingrediente activo disponible. Lo anterior implica que la dosis diaria promedio obtenida (4,21 g) está muy por debajo de los 10 g/día, reportada por distintos autores como suficiente para proveer un porcentaje de supresión de al menos 70 %.

Se considera necesario evaluar alternativas que permitan optimizar la tasa de evaporación, aproximándose a la dosis de 10 g/día, de manera que se logre mejorar la eficacia acaricida para poder obtener una alternativa viable y recomendable para el control de la Varroosis.

INTRODUCCIÓN

La abeja melífera y su importancia económica

La abeja melífera (*Apis mellifera*) ha sido explotada por los humanos durante milenios con distintos fines, el más tradicional ha sido la producción de miel para su consumo; además, esta abeja es proveedora de servicios de polinización para la agricultura y su importancia radica en que aproximadamente una tercera parte de los alimentos dependen de éstos. Cabe destacar que la especie que mejor se ha adaptado al manejo y crianza por parte del ser humano para dicho fin es *A. mellifera* (Crane, 1990).

La práctica de la crianza de abejas melíferas exclusivamente para fines de polinización es mucho más reciente, pues vino de la mano con la tecnificación de la agricultura y del establecimiento de superficies de cultivo cada vez más extensas que se dio a partir de la década de 1930. Esto ocasionó un desplazamiento progresivo de las poblaciones de polinizadores naturales e hizo necesario la provisión artificial de polinizadores (principalmente abejas melíferas) para mantener los rendimientos esperados (Roubik, 1995).

Amenazas actuales para la abeja, el caso de *Varroa destructor*.

A pesar de la importancia de las abejas para los sistemas de producción de alimentos, recientemente su sobrevivencia se ha visto amenazada. Cabe destacar que desde el 2006 se ha reportado la pérdida a gran escala de colonias en zonas templadas, fenómeno al cual se le llamó “síndrome de despoblamiento de la colonia” (colony collapse disorder, en inglés) y aún no se le ha podido asociar a una sola causa (Francis, 2013). Se cree que dicha anomalía sea multicausal, e incluya elementos como la toxicidad crónica de ciertos plaguicidas, en combinación con el estrés sanitario infligido por patógenos como virus, bacterias y microsporidios (USDA, 2015).

Uno de los mayores problemas sanitarios para *A. mellifera* es la Varroosis, cuyo agente causal es el ácaro *Varroa destructor*, el cual era originalmente un parásito exclusivo de *Apis cerana* (Calderón y Ramírez, 2013). Los registros más antiguos de este ácaro parasitando abejas melíferas provienen de Japón, China y Rusia a principios de la década de 1960 (Alvarado et al., 2012); posiblemente propiciado por el contacto entre las dos especies que hubo en dichas regiones. *Varroa* ingresó a

América en 1971, mediante una importación de reinas de Japón a Paraguay. En Costa Rica se reportó por primera vez en setiembre de 1997 (Van Veen et al., 1998).

Los daños que este parásito le puede ocasionar a la abeja melífera son numerosos. El más directo es el debilitamiento general de la abeja por efecto de la succión de hemolinfa que el ácaro le ocasiona en su proceso de alimentación (Alvarado et al., 2012). No obstante, la transmisión de otras numerosas patologías de origen viral se considera aún más perjudicial y pueden tener relación directa con el síndrome de despoblamiento de la colonia. Algunas de las virosis transmitidas por *V. destructor* son: El virus de las alas deformes, la parálisis viral aguda y el complejo agudo kashmir-israelí (Bailey y Ball, 1991).

A nivel de colonia el daño puede variar de afecciones leves, hasta ocasionar el colapso irremediable de la colonia cuando la infestación es demasiado elevada (Martin, 2001; Francis et al., 2013); destacando cierto paralelismo con el síndrome de despoblamiento de la colonia. De ahí que resulta importante controlar eficaz y oportunamente las infestaciones de *V. destructor* en las abejas melíferas bajo manejo. En este sentido, Francis et al. (2013) encontraron que fácilmente se puede mejorar la tasa de sobrevivencia de colonias de abejas durante el invierno simplemente mediante un control adecuado de las infestaciones de varroa.

El ácido fórmico como opción para el control de infestaciones de *V. destructor* en colonias de *A. mellifera*.

Existe una amplia gama de opciones para el control de *V. destructor*, cada uno de ellos con particularidades que les confiere algunas ventajas y desventajas. Existen los productos orgánicos que normalmente actúan por la evaporación del ingrediente activo. Este modo de acción tiene el beneficio de proveer un control adicional de otras plagas, como la Acariosis. La desventaja principal es la dificultad de controlar la tasa de evaporación del producto, la cual tiene relación directa con las condiciones medio ambientales (Conrad, 2013).

El ácido fórmico aparece como una opción prometedora, pues es poco residual y forma parte de la composición química de la miel (Conrad, 2013). Esto hace que la mayoría de los mercados tengan altos límites de residualidad máxima permitida, o bien que del todo no lo monitoreen. Sin embargo, el hecho de ser el único producto que efectivamente controla *V. destructor* en su fase reproductiva (dentro de celdas de cría selladas) es su principal ventaja (Ramírez y Calderón, 2016).

Al actuar por evaporación el ácido fórmico, las altas temperaturas de las zonas apícolas tradicionales promueven una volatilización muy acelerada de éste. Esto

ocasiona que se reduzca el tiempo de exposición necesario para matar a los ácaros (Underwood y Currie, 2003), pero también puede tener efectos letales sobre las abejas, especialmente en la reina, o bien, ocasionar su reemplazo. Otros efectos adversos pueden manifestarse como mortalidad en la cría (Elzen et al., 2004). La temperatura ambiental ideal para vaporizar el ácido fórmico en estado líquido en una colmena es de 11° C a 27° C (Conrad, 2013).

Se han probado distintas formulaciones para suministrar el ácido fórmico en las colmenas, con el objetivo de controlar la tasa de evaporación de manera que prevenga efectos negativos en las abejas, al mismo tiempo que controle al parásito. En este sentido se han probado soluciones en concentraciones variadas desde el 85 % al 60 % (v/v) (Conrad, 2013), además de una amplia gama de otras presentaciones tales como: Tiras de gel, evaporadores de mecha, bandejas de evaporación lenta y otros tipos de evaporadores (González et al., 2005).

Algunos ensayos previos realizados bajo condiciones tropicales

Dado que las condiciones ambientales en los trópicos son muy distintas de las zonas templadas (donde mucha de la tecnología apícola se desarrolla), resulta importante validar la técnica propuesta y adecuarla al medio. En este aspecto, Quan (1998) obtuvo niveles de supresión de *V. destructor* en cría sellada del 48,16 % utilizando 15 ml de ácido fórmico al 85 % en cuatro aplicaciones, no obstante, el autor menciona una baja cantidad de cría hacia el final del ensayo, por lo que podría indicar afecciones en la reina.

Por otra parte, Pavón (2011) probó una dosis promedio de 10,8 g diarios del ácido en una concentración del 65 %, obteniendo resultados fueron poco consistentes, pues en una primera instancia obtuvo una mortalidad de ácaros en cría de 42,18 % en una sola colmena y al replicarlo obtuvo 10,58 % y 18,4 %.

Medina y May (2005) recomiendan dosis de 180 ml de ácido fórmico al 60 % en tres aplicaciones de 60 ml, impregnado en piezas de cartón y embolsado. El nivel de supresión reportado por los autores es del 77,79 %.

Ramírez (2013) obtuvo un nivel de supresión del 94,7 %, evaluando tiras de producto comercial por 30 días, las cuales contienen 150 g de gel al 65 % de concentración. No obstante, es importante destacar que la autora reporta muerte de abejas adultas y de cría, así como problemas de evasión.

Otros ensayos similares como el de Vásquez et al. (2006) obtuvo 64,62 % de supresión al tratar colmenas con 230 g de gel a una concentración no detallada. Espinosa y Guzmán (2007), por su lado, reportan 66,4 % de supresión al tratar

colmenas con 80 ml de ácido fórmico líquido al 65 %, administrado mediante bolsa de plástica con mecha evaporadora.

Un tercer estudio llevado a cabo por Ávila et al. (2010) evaluaron dosis de 8 g/día – 12 g/día sin que se reportara efectos negativos en las colmenas, salvo la pérdida de tres reinas mas ello se atribuyó a otros factores. El nivel de supresión reportado en dicho estudio fue de 70 %.

Otros autores también coinciden que una tasa de evaporación de 10 g/día por dos semanas es suficiente para proveer una supresión de *V. destructor* del 70 %, tales como Satta et al. (2005) y Scott et al. (1999).

Limitaciones de los ensayos

En el estudio realizado por Quan (1998), se menciona escasas de cría al término del ensayo. No se valida la presencia de posibles afecciones en la reina, los cuales son una posibilidad real dada la concentración del producto utilizada (85 %) y su cantidad (cuatro aplicaciones de 15 ml c/u).

En los estudios realizados por Ávila (2010) y Pavón (2011), el problema radica en que estiman la cantidad de ácido fórmico perdido por medio de las diferencias en masa de los dispositivos utilizados. De esta forma, la pérdida de vapor de agua se cuantifica juntamente con la evaporación del ingrediente activo, de manera que resulta imposible discriminar uno del otro.

Existe un problema a nivel general, el cual consiste en la poca consistencia entre ensayos, dado que algunos autores reportan niveles de supresión cercanos al 95 %, mientras que otros se mantienen cercanos al 65 %. Sin embargo, la mayoría de estudios consultados realizados bajo condiciones tropicales se ubican en el rango del 65 % al 70 %, por lo cual se les podría considerar como valores típicos para el ácido fórmico.

Ensayo preliminar

La primera fase del trabajo consistió en un estudio sobre la formulación y empaque del gel de ácido fórmico, con base en el estudio realizado por Pavón (2011). Posteriormente se realizó un ensayo de evaporación en laboratorio y un ensayo preliminar en campo.

El gel formulado contiene 92,3 % de ácido fórmico (AF) al 65 % (v/v) y el restante 7,7 % de Cab – O – Sil como agente gelificante (p/p). El diseño del empaque consistió en bolsas de polietileno de 100 g de gel, las cuales habían sido previamente perforadas seis veces con sacabocados de 1,3 cm de diámetro. Los agujeros cubrían solamente una cara de la bolsa, distribuidos homogéneamente y fueron cubiertos por cinta microporo.

Durante el ensayo de evaporación, se expusieron los dispositivos en baño maría a 38°C por ocho días. Los tratamientos consistieron en las bolsas con los agujeros cubiertos con cinta microporo y expuestas. Se concluyó que la mejor opción de suministrar el ácido fórmico es con la cinta microporo, pues ésta actúa como barrera que regula la volatilización del producto a un nivel cercano a los 10 g/día, el cual se recomienda para obtener un buen efecto acaricida.

Posteriormente se evaluó el producto en un ensayo de campo preliminar durante ocho días de exposición. En una de las dos colmenas tratadas con ácido fórmico (200 g de gel), se obtuvo un nivel importante en la supresión de la infestación de varroa, cercana al 90 %. La evaluación de la eficacia acaricida se realizó en abeja adulta y no se registró la ocurrencia de efectos adversos a las colonias.

En cuanto a la caída de ácaros, medido con trampa de fondo, se obtuvo un promedio de 39 % de caída durante las primeras 24 horas de aplicación, esto coincidió con una evaporación en laboratorio proporcionalmente mayor durante este mismo periodo de 31,4 %.

Justificación

El estudio pretende evaluar dos diferentes dosis de ácido fórmico para el control de ácaro varroa, así como la inocuidad del producto para las abejas. Los resultados del trabajo pueden ser de utilidad para el desarrollo de nuevas técnicas de manejo integrado de varroa bajo condiciones tropicales, las cuales suponen un mayor grado de complejidad frente al clima templado.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la efectividad de una solución de ácido fórmico gelificado para el control de infestaciones de *V. destructor* en colonias de *A. mellifera*.

Objetivos específicos

Determinar, la tasa de evaporación del ácido fórmico de los dispositivos utilizados en el ensayo.

Evaluar la eficacia acaricida de dos diferentes dosis de una solución gelificada de ácido fórmico.

Documentar la ocurrencia de posibles efectos adversos a las colonias, como consecuencia del tratamiento acaricida.

Hipótesis

Se espera obtener niveles de supresión superiores al 60 % para el tratamiento de 200 g/colmena, en concordancia con otros estudios que han evaluado dosis similares de ácido fórmico en concentraciones del 65 %.

Se espera obtener ausencia de efectos adversos a las colonias, ya que el uso del producto en la concentración descrita ha sido reportado como segura.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo durante la temporada lluviosa, del 02 de junio al 20 de julio del 2017, la cual coincide con la época en la que los productores normalmente controlan varroa. Esta temporada está caracterizada por una escasez de recursos alimenticios, menor producción de cría, reducción de la población de abejas adultas, así como una mayor tendencia a la evasión por parte de la colonia.

Se evaluaron tres tratamientos de ácido fórmico (AF) para suprimir las infestaciones de *V. destructor*. T1 (control) = 0 g de AF, T2 = 100 g AF y T3 = 200 g AF. Las colmenas se ubicaron en dos apiarios distintos, el primero ubicado en Lepanto de Puntarenas, se les asignó tres colmenas por tratamiento. En la segunda localidad, Cebadilla de Alajuela, se ubicaron las colmenas restantes para completar un tamaño de muestra de siete por cada tratamiento evaluado.

Las colmenas evaluadas se seleccionaron por mostrar un nivel inicial de infestación relativamente alto. El montaje del ensayo incluyó la colocación de las trampas de fondo, con cartulina impregnada de vaselina para realizar conteos de ácaros caídos. La primera fase del tratamiento consistió en el aprovisionamiento del ácido fórmico. Producto que permaneció en las colmenas durante 15 días. Posteriormente se retiraron las bolsas de ácido fórmico y se colocaron las tiras de fluvalinato con un nivel de eficacia del 99 %, como control positivo.

En cada uno de los dos apiarios se llevó registro de la temperatura y humedad relativa máxima y mínima, mediante termo hidrógrafos digitales genéricos. También se midió la tasa de evaporación del ácido fórmico en campo, mediante su concentración en el gel remanente de las colmenas al final de tratamiento. Éste se calculó por medio de la titulación de muestras del gel con NaOH al 0,1 M (figura 1).

Figura 1

Cálculo de la tasa de evaporación del ácido fórmico

$$\text{Tasa de evaporación (g/día)} = \frac{(\text{Conc}_i - \text{Conc}_f) * 100}{1000} * \text{PM HCOOH (g/mol)}$$

Nota: Conc_i = Concentración inicial del ácido fórmico (mmol/g); Conc_f = Concentración del ácido fórmico al final del ensayo (mmol/g); PM HCOOH = Peso molecular del ácido fórmico (46,02538)

Cabe destacar que se tomó la concentración inicial de ácido fórmico calculada en la fase previa al presente estudio, dado que la formulación del gel fue la misma. Dicho valor medio fue de 14,55 mmol/g. Para calcular la concentración del ácido fórmico en el gel al final del ensayo, se utilizó la figura 2.

Figura 2

Cálculo de la concentración de ácido fórmico en muestras de gel, mediante titulación

$$\text{Conc HCOOH (mmol/g)} = \frac{\text{NaOH (mL)} * \text{conc NaOH (mol/L)}}{\text{m. muestra (g)}}$$

Nota: Conc HCOOH = Concentración de la muestra de ácido fórmico; NaOH = Cantidad de hidróxido de sodio agregado a la mayor diferencial de pH respecto a los mililitros de NaOH agregado; Conc NaOH = Molaridad de la base titulante (hidróxido de sodio); m. muestra = Masa de la muestra de gel utilizada.

Paralelamente a la aplicación de los tratamientos, se llevó a cabo los conteos de ácaros caídos. Para este fin, los fondos recubiertos de vaselina se colectaron y renovaron a las 24 horas, 48 horas, ocho días y quince días, para el caso del ácido fórmico. En el caso del fluvalinato, se colectaron dos muestras diarias al inicio del tratamiento, y semanalmente durante cuatro semanas.

El cálculo de eficacia acaricida se llevó a cabo mediante la figura 3. Es importante mencionar que el 0,99 corresponde al nivel de eficacia conocida del fluvalinato utilizado como control positivo del ensayo. Además, la fórmula supone que la sumatoria de ácaros caídos luego del tratamiento con fluvalinato es el 99% del total (infestación inicial).

Figura 3

Cálculo de la eficacia acaricida

$$\text{Ef Ac (\%)} = \frac{\text{AC AF} * 0,99}{\Sigma \text{AC}} * 100$$

Nota: Ef Ac: Eficacia acaricida (%); AC AF: Ácaros caídos por el ácido fórmico; Σ AC: Sumatoria de ácaros caídos (ácido fórmico y fluvalinato).

Además del monitoreo de ácaros caídos, durante el ensayo se llevó registro de cualquier efecto adverso que se manifestara en las colmenas. Éstas pudieron variar desde el cese de postura por parte de la reina, el cambio o muerte de ésta, mortalidad de crías o abejas adultas y la evasión de la colonia.

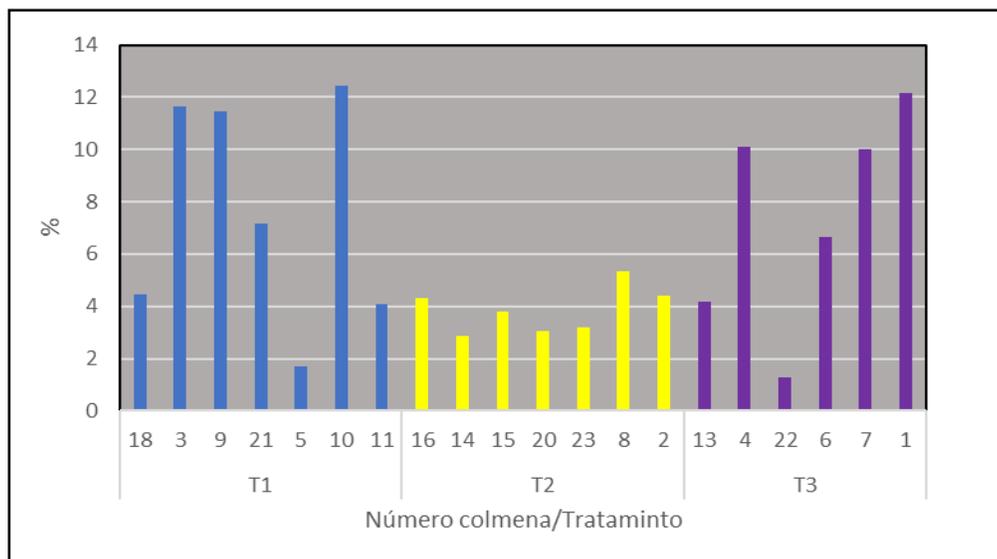
Los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico Infostat, utilizando las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y Mann Whitney, según las particularidades de cada caso. Igualmente, se utilizó la prueba T para una media, con el objetivo específico de descartar diferencias significativas de las medias con respecto al valor propuesto en la hipótesis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se inició muestreando el grado de infestación inicial de cada colmena. De esta forma se pudo seleccionar aquellas más afectadas para el ensayo. En la figura 4 se presenta el detalle del grado de infestación inicial de cada colmena. Cabe destacar que, aunque en cada apiario los tratamientos fueron asignados al azar, T2 obtuvo por casualidad las colmenas menos infestadas.

Figura 4:

Grado de infestación inicial de cada colmena, según número de fondo y tratamiento asignado



Nota: Elaboración propia (2017)

Se halló que existe un efecto de choque del ácido fórmico, puesto que la caída de ácaros no sigue un patrón del todo lineal. Durante las primeras 24 horas, T3 reportó una caída de ácaros superior al 30 %, el cual pasó al 60 % al cabo de 48 horas. Luego de ocho días, cayó casi un 85 % del total de ácaros. Tanto T2 como T1 siguieron un patrón similar al descrito anteriormente, pero con valores menores, tal como se muestra en la figura 5.

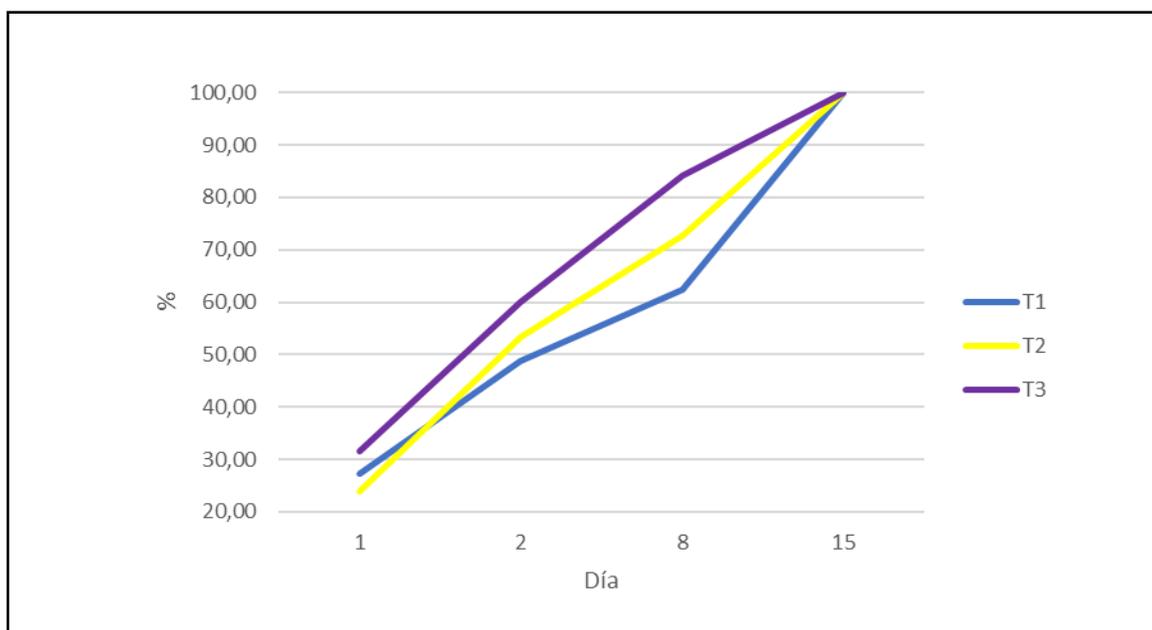
Es importante destacar que el promedio del porcentaje de ácaros caídos de T1 supera a T2 en el primer día de tratamiento, efecto que se revierte al cabo del segundo día. A los ocho días se puede observar un distanciamiento considerable

de T1 con respecto al resto de tratamientos, puesto que éste se mantiene cercano al 60 %, mientras que los demás superan el 70 %.

En los últimos ocho días de tratamiento, T1 reporta una caída de ácaros cercana al 40 %, mientras que T2 es de un 27 % y un 15 % para T3. Es importante destacar que este efecto se midió con base en el total de ácaros caídos durante el periodo de tratamiento con ácido fórmico, por lo tanto, dicho porcentaje parte de una eficacia acaricida distinta para cada tratamiento.

Figura 5

Promedio del porcentaje acumulado de ácaros caídos por efecto del ácido fórmico, según día y tratamiento

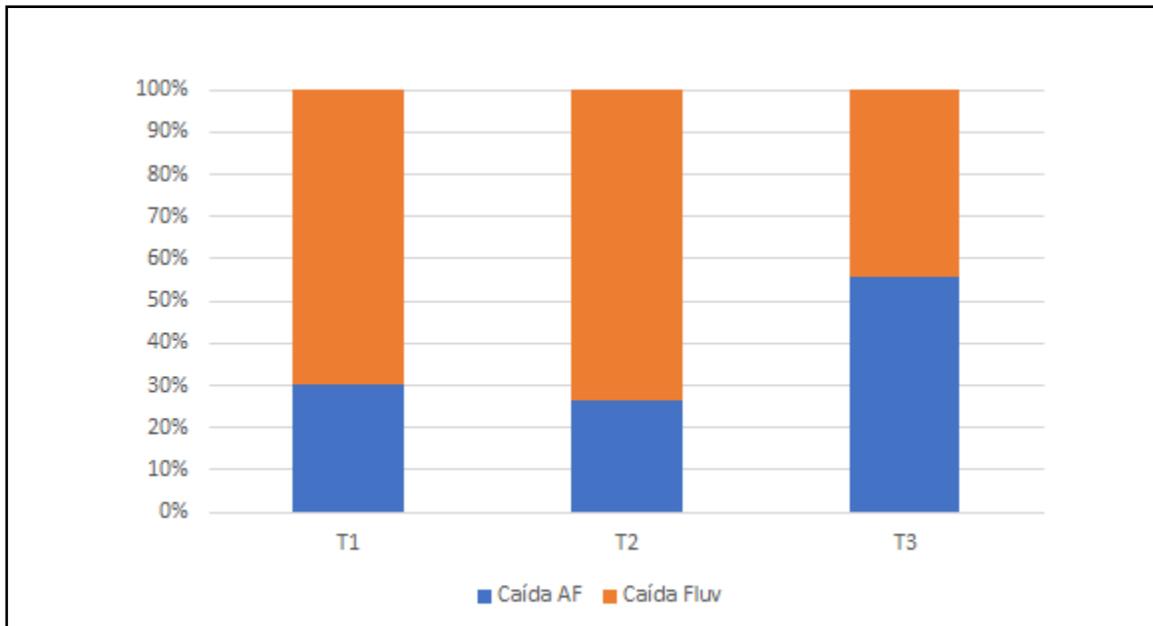


Nota: Elaboración propia (2017)

En cuanto a la proporción de ácaros caídos por efecto del ácido fórmico y del fluvalinato, se puede notar un efecto creciente, respecto a la dosis proporcionada, ya que T1 y T2 rondan el 30 % de caída. T3, en cambio, mostró una proporción de ácaros caídos por ácido fórmico cercana al 50 % (ver figura 6).

Figura 6:

Proporción media de ácaros caídos por efecto del ácido fórmico respecto al efecto del fluvalinato



Nota: Elaboración propia (2017)

La eficacia acaricida de T1 ($\mu = 30,15$) se mostró muy similar a la de T2 ($\mu = 31,95$). Por su parte, T3 ($\mu = 55,02$) obtuvo una diferencia considerable. A continuación se presenta el Tabla 1 con la información estadística más importante de manera resumida.

Tabla 1

Resumen de medidas estadísticas descriptivas

Medidas resumen							
Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	CV	Min	Máx
T1	Ef acaricida %	7	30,15	25,27	83,81	5,05	79,84
T2	Ef acaricida %	7	31,95	14,27	44,65	12,35	55,69
T3	Ef acaricida %	6	55,02	24,73	44,95	23,16	90,66

Nota: Captura de pantalla del programa estadístico Infostat. T1 = Tratamiento 1; T2 = Tratamiento 2; T3 = Tratamiento 3; n = Tamaño de muestra; D.E. = Desviación estándar; CV = Coeficiente de variación; Min = Mínimo; Máx = Máximo.

Se realizó una prueba T para una media, con la finalidad de probar si efectivamente alguno de los tratamientos era al menos estadísticamente igual al valor planteado en la hipótesis (eficacia acaricida mayor o igual a 60 %). De aquí se obtuvo que solamente T3 logró igualar al parámetro propuesto (ver tabla 2).

Tabla 2:

Prueba T para una media, valor propuesto 60 % de efectividad acaricida

Prueba t para una media								
Valor de la media bajo la hipótesis nula: 60								
Tratamiento	Variable	n	Media	DE	LI(95)	LS(95)	T	p(Bilateral)
T1	Eficacia acaricida	7	30,15	25,27	6,78	53,52	-3,12	0,0205
T2	Eficacia acaricida	7	31,95	14,27	18,76	45,15	-5,20	0,0020
T3	Eficacia acaricida	6	55,02	24,73	29,07	80,96	-0,49	0,6424

Nota: Captura de pantalla del programa estadístico Infostat. T1 = Tratamiento 1; T2 = Tratamiento 2; T3 = Tratamiento 3; n = Tamaño de muestra; D.E. = Desviación estándar; LI = Límite inferior; LS = Límite superior; T = Valor T; p = Valor p

Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Se obtuvo que T3 es el único tratamiento estadísticamente diferente del testigo ($p < 0,05$), aunque no haya logrado diferenciarse significativamente de T2 ($p > 0,05$), dada la alta desviación estándar que presentaron los datos (ver figura 7).

Figura 7

Prueba estadística Kruskal Wallis para la variable de eficacia acaricida según tratamiento

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Ef acaricida %	T1	7	30,15	25,27	22,46	4,61	0,0997
Ef acaricida %	T2	7	31,95	14,27	30,77		
Ef acaricida %	T3	6	55,02	24,73	53,13		

Trat.	Ranks
T1	8,00 A
T2	9,36 A B
T3	14,75 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

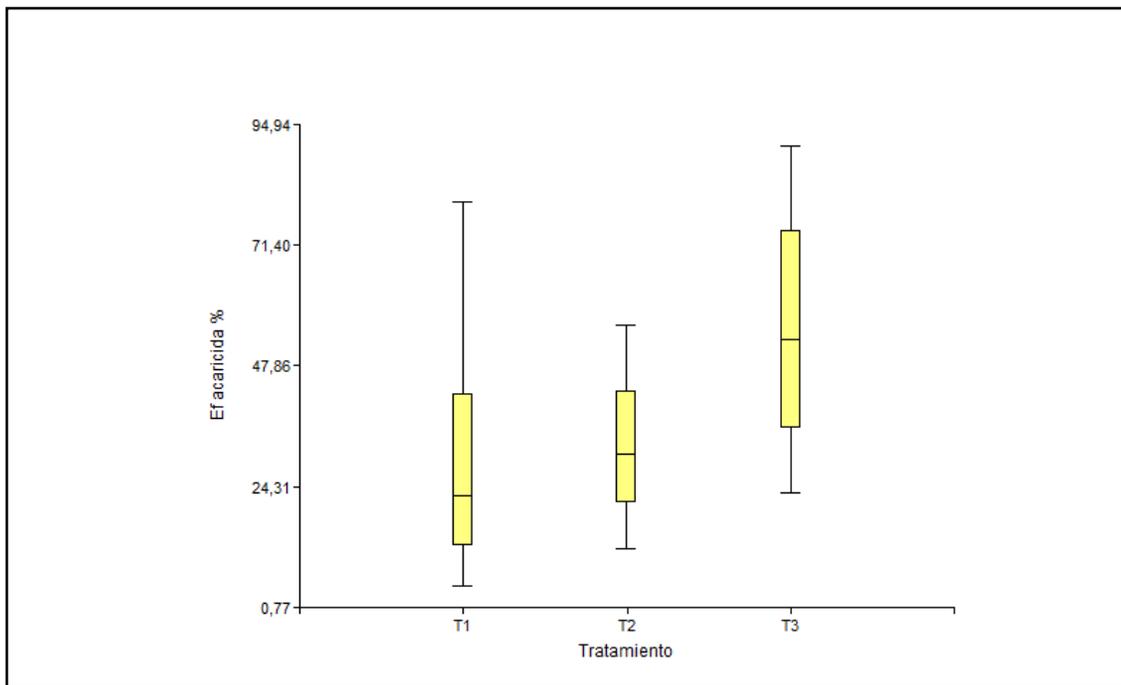
Nota: Captura de pantalla del programa estadístico Infostat. T1 = Tratamiento 1; T2 = Tratamiento 2; T3 = Tratamiento 3; N = Tamaño de muestra; D.E. = Desviación estándar; H = Valor H; p = Valor p

En la figura 8 se observa el gráfico de cajas correspondiente al efecto acaricida según el tratamiento suministrado. Se hace evidente la gran similitud entre T1 y T2, con un mayor rango para la primera y una caja mucho más estrecha para la segunda y con una mediana ligeramente superior. En cuanto a T3, se observa una marcada diferencia con respecto a las dos anteriores, cuya mediana supera incluso el tercer cuartil de los demás tratamientos.

Puede verse claramente un efecto acaricida marginal para T2, y considerablemente mayor para T3. No obstante, en comparación con otros acaricidas disponibles en el mercado, dicho efecto acaricida es bajo.

Figura 8

Gráfico de cajas para el efecto acaricida según tratamiento



Nota: Elaboración propia (2017). T1 = Tratamiento 1; T2 = Tratamiento 2; T3 = Tratamiento 3; Ef acaricida = Eficacia acaricida

Al comparar la eficacia acaricida entre apiarios, se constató que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre apiarios (U Mann Whitney, $p > 0,05$). No obstante, se observa una tendencia de este parámetro favorable al apiario de Cebadilla ($\mu = 40,24 \%$), frente al de Lepanto ($\mu = 35,18 \%$).

Por otro lado, la temperatura y humedad relativa registradas fueron un tanto distintas para cada apiario. En el Tabla 3 se observa se nota que en Lepanto las condiciones fueron menos calurosas y un poco más húmedo que Cebadilla, a pesar de estar a mucha menor altura. Este efecto posiblemente haya sido ocasionado por el mayor sombreado que existe en el primero.

Tabla 3:

Temperatura y humedad relativa registrada en cada apiario

		Lepanto		Cebadilla	
		Temp	HR	Temp	HR
Afuera	max	30,9	90	36,5	88
	min	24,8	69	24	49
Adentro	max	33,9		44,3	
	min	26,8		30,2	

Nota: Elaboración propia. max = máximo; min = mínimo; Temp = temperatura; HR = Humedad relativa

La pérdida de ácido fórmico fue similar en ambos apiarios, cuyos datos no muestran diferencias estadísticamente significativas entre si (U Mann Whitney, $p > 0,05$). No obstante, la media de ellas favoreció al apiario de Cebadilla ($\mu = 7,81$) frente al de Lepanto ($\mu = 7,48$).

Considerando una concentración inicial de ácido fórmico en el gel de 14,55 mmol/g, se obtuvo que en el apiario de Cebadilla se logró evaporar un 53.65 % de éste, frente a un 51,39 % para el caso de Lepanto. Dichos valores son muy bajos, pues suponen que solamente se aprovecha cerca de la mitad del ingrediente activo suministrado a las colmenas.

Aunque los datos muestran resultados a nivel de tendencia, cabe destacar su consistencia, ya que las condiciones más propicias para la evaporación del ácido se presentaron en Cebadilla, en donde la titulación del gel efectivamente reflejó una mayor pérdida de éste, además de registrar un mayor efecto acaricida.

El limitado efecto acaricida que se obtuvo también puede tener una estrecha relación con el moderado porcentaje de ingrediente activo evaporado. Tomando como referencia la dosis de 10 g/día reportada como efectiva por autores como Scott et al. (1999), Ávila et al. (2010) y Thomas (1997) en Satta et al. (2005), se puede decir que la evaporación obtenida en el presente ensayo fue de considerablemente menor (4.21 g/día, promedio). Lo anterior sugiere que es posible mejorar la eficacia acaricida del producto al hallar mejores formas de administrarlo, o bien, propiciando de alguna manera la evaporación del principio activo.

Tomando en consideración la cantidad de gel administrado y la concentración del ingrediente activo en él, se determinó que la tasa de evaporación máxima posible

es de 8 g/día, puesto que en los 200 g de gel contienen solamente 120 g de ácido fórmico. Por ende, se considera que el simple hecho de optimizar la tasa de evaporación de los dispositivos podría ser una alternativa insuficiente para proveer un adecuado nivel de supresión de varroosis. Es probable que una segunda aplicación de 200 g de gel al cabo del octavo día pueda incrementar considerablemente la eficacia acaricida del tratamiento.

Es importante mencionar que tanto T1 como T2 no presentaron efecto adverso alguno. En T3 se presentó una colmena que evadió, y otra que presentó cambio de reina. Se considera que la evasión pudo deberse a una combinación de factores, que fuese agravada por la presencia de los vapores de ácido fórmico dentro de la colmena, ya que al momento del montaje del ensayo había un gran impulso hacia el pillaje, el cual por si solo supone un nivel considerable de estrés para las colonias.

En cuanto a la colmena que cambió su reina, ello pudo deberse a defectos en ésta. Se debe recordar que se ha reportado que uno de los efectos adversos del ácido fórmico precisamente es el cambio de reinas (Ávila et al. 2010).

CONCLUSIONES

Se comprobó que la formulación de ácido fórmico utilizada, a dosis de 200 g/colmena, puede ser utilizada como medio para controlar infestaciones de *Varroa destructor* en abejas *Apis mellifera*, al ser el único tratamiento cuya eficacia acaricida no difiere significativamente del 60 % planteado en la hipótesis.

Por otro lado, solamente T3 tuvo una eficacia acaricida significativamente mayor del control. Por lo que se puede descartar T2 como dosis que presente supresión de varroosis.

Es importante evaluar alternativas que promuevan una mayor evaporación del ácido fórmico contenido en el gel, para propiciar una mejor eficacia acaricida del producto. Asimismo, el contenido del ácido fórmico en 200 g gel es insuficiente para proveer una evaporación de 10 g/día.

Se reportó una colmena evadida en T3. No obstante, dicho efecto podría atribuirse al estrés ocasionado por el pillaje que se sufrió al momento del montaje del ensayo, el cual bien pudo haber sido agravado por los vapores del ácido fórmico suministrado.

RECOMENDACIONES

Dado los resultados del ensayo en campo, podría descartarse T2 como un tratamiento a ser recomendado y evaluado en futuros ensayos. De esta manera se podrían diseñar ensayos más robustos, con mayor tamaño muestral, al evaluar solamente dos tratamientos.

El porcentaje de pérdida de ácido fórmico del gel al final de las dos semanas es moderado (ligeramente superior al 50 %), por lo que sería recomendable evaluar alternativas que promuevan aún más la evaporación del ingrediente activo.

Partiendo de la proporción de ácaros caídos por el ácido fórmico, se podría tomar ventaja del efecto de choque que tiene el producto al considerar realizar una segunda aplicación de 200 g/colmena del gel al cabo de la primera semana del tratamiento. Dicha alternativa también podría incrementar significativamente la eficacia acaricida, al mejorar la tasa de evaporación diaria.

Podría considerarse la opción de utilizar termo hidrógrafos más complejos, los cuales permitan recuperar lecturas periódicas y así obtener los promedios de temperatura y humedad relativa. De esta forma se podría estudiar más a fondo la relación de éstos con la evaporación del producto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, G., Mayorga, F., Trujillo, M. y Suárez, F. (2012). *Patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades y plagas de las abejas melíferas*. México: OIRSA
- Ávila, F. (2010). Ácido fórmico en gel para regular su evaporación. *Ciencia Ergo Sum*. 17 (1), 67-71. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10412443009>
- Ávila, F., Otero, G., Sánchez, H., Santillán, M. y Tecante, A. (octubre, 2010). A Gel Formulation of Formic Acid for Control of Varroa Destructor. En *Trends in Acariology*. Proceedings of the 12th International Congress. doi 10.1007/978-90-481-9837-5_94
- Bailey, L. y Ball, B. (1991). *Honey Bee Pathology*. Reino Unido: Academic Press
- Crane, E. (1990). *Bees and Beekeeping, Science, Practice and World Resources*. Reino Unido: Heinemann Newness
- Calderón, R. y Ramírez, F. (2013). *Enfermedades de las Abejas Melíferas con Énfasis en Abejas Aricanizadas*. Heredia, C.R.: EUNA
- Conrad, R. (2013). *Natural Beekeeping*. Estados Unidos: Chelsea Green Publishing
- Elzen, P., Westervelt, D. y Raymond, L. (2004). Formic acid treatment for control of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) and safety to *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) under southern united states conditions. *Journal of Economic Entomology*. 97 (5). Recuperado de <https://naldc.nal.usda.gov/download/41282/PDF>
- Espinosa, L. y Guzmán, E. (2007). Eficacia de dos acaricidas naturales, ácido fórmico y timol, para el control de ácaro *Varroa destructor* de las abejas (*Apis mellifera* L.) en Villa Guerrero, Estado de México. *Veterinaria México*. 32 (1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/423/42338102/>
- Francis, R., Nielsen, S. y Kryger, P. (2013). Varroa-Virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE*. 8 (3). Recuperado de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057540>
- González, D., Abarca, D., Marcangelli, J., Moreno, L. y Arguello, O. (2005). Comparación de la eficacia del ácido fórmico y del fluvalinato, como métodos de control de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) en colmenas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), en Ñuble, centro sur de Chile. *Revista de la Sociedad*

- Martin, S. (2001). The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *Journal of Applied Ecology*. 38 (5). doi 10.1046/j.1365-2664.2001.00662.x
- Medina, L. y May, W. (2005). *Enfermedades de las abejas*. Mérida: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- Pavón, C. (2011). *Diseño de un tratamiento con ácido fórmico en gel para el control del ácaro varroa (Varroa destructor Anderson & Truemann) en abejas africanizadas (Apis mellifera L.) bajo condiciones tropicales* (Tesis de maestría inédita). Universidad Nacional, Costa Rica.
- Quan, J. (1998). *Evaluación del efecto acaricida del ácido fórmico en celdas con cría sellada e infestadas con el ácaro Varroa jacobsoni (Oudemans) en abejas Apis mellifera* (Tesis de licenciatura). Universidad Zamorano, Honduras. Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2753/1/CPA-1998-T088.pdf>
- Ramírez, M. (2013). *Evaluación de la efectividad de ácido fórmico y el timol en el manejo integrado del ácaro Varroa destructor en colmenas de abejas africanizadas bajo condiciones tropicales* (Tesis de licenciatura inédita). Universidad Nacional, Costa Rica
- Ramírez, M. y Calderón, R. (2016). Control del ácaro *Varroa destructor* en cría sellada de obrera al utilizar ácido fórmico y timol, en colmenas de abejas africanizadas, bajo condiciones tropicales. *Revista de Ciencias Veterinarias*. 34 (2). doi 10.15359/rcv.34-2.3
- Roubik, D. (1995). *Pollination of cultivated plants in the tropics*. Roma: FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-v5040e.pdf>
- Satta, A., Floris, I., Eugaras, M., Cabras, P., Garau, V. y Melis, M. (2005). Formic acid - based treatments for control of *Varroa destructor* in a mediterranean area. *Journal of Economic Entomology*. 98 (2). doi 10.1093/jee/98.2.267
- Scott, D., Abdulkareem, H. y Kenna, M. (1999). Membrane-barrier delivery of formic acid, a chemical used for mite control on honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*. 38 (1-2). doi 10.1080/00218839.1999.11100996
- Underwood, R. y Currie, R. (2003). The effects of temperature and dose of formic acid on treatment efficacy against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), a parasite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Experimental and Applied Acarology*. 29. 303-313. doi 10.1023/A:1025892906393

- United States Department of Agriculture. (2015). *Colony collapse disorder and bee health action plan*. USDA. Recuperado de [https://www.ree.usda.gov/ree/news/CCD-HBH Action Plan 05-19-2015-Dated-FINAL.pdf](https://www.ree.usda.gov/ree/news/CCD-HBH_Action_Plan_05-19-2015-Dated-FINAL.pdf)
- Van Veen, J., Calderón, R., Cubero, A. y Arce, H. (1998). *Varroa jacobsoni* in Costa Rica: Detection, spread and treatment with formic acid. *Bee World*. 79 (1), 5-10
- Vásquez, J., Narrea, M. y Bracho, J. (2006). Efecto del ácido oxálico, ácido fórmico y coumaphos sobre *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) en colonias de abejas. *Rev. Perú. Entomol.* 45. 149-152 Recuperado de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/entomologia/v45/pdf/a26v45.pdf>